

# Smaksnøytrale proteiner fra makrell

## Faglig sluttrapport

Tone Aspevik, Mari Ø. Gaarder, Sileshi G. Wubshet, Birthe Vang, Peter Molesworth, Runar G. Solstad, Katinka Dankel, Ingunn Berget, Lars Thoresen, John-Erik Haugen, Wilhelm Glomm og 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 proteiner fra makrell (SMELL)</b>	ISBN 978-82-8296-673-3 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL)	<i>Rapportnr.:</i> 9/2021
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Tone Aspevik, Mari Ø. Gaarder, Sileshi G. Wubshet, Birthe Vang, Peter Molesworth*, Runar G. Solstad, Katinka Dankel, Ingunn Berget, Lars Thoresen, John-Erik Haugen, Wilhelm Glomm* og Diana Lindberg (PL). *fra SINTEF Industri	<i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
<i>Avdeling:</i> Råvare og prosess	<i>Dato:</i> 30. april 2021
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 52
<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 «Smaksnøytrale proteiner fra makrell» (SMELL) var å utvikle en prosess for å fremstille et lukt- og smaksnøytralt proteinprodukt fra makrellavskjær. Nofima, og prosjektpartnere SINTEF Industri og Pelagia, har utviklet en avansert analyseplattform, basert på kjemisk, sensorisk og statistisk analyse for å kunne forutse smaksutvikling i produktene. Prosjektet omfatter blant annet proteasescreening, prosessoptimalisering og smaksmaskering. Innledningsvis ble 10 proteaser screenet for aktivitet samt utbytte og smak av hydrolysatene. Under prosessoptimaliseringen ble både limvann fra Pelagia og hydrolysat produsert i lab- og pilot-skala, mikro- og nanofiltrert for å optimalisere produktene. Resultater viser at mikrofiltrering gir god fjerning av partikler og fettrester og at nanofiltrering er egnet til å redusere askeinnhold, øke proteininnhold og redusere innhold av TMA/TMAO. Sensorisk analyse viser at nanofiltrerte hydrolysat har tilsvarende lavere smaksintensitet og redusert og fiskesmak. Sensoriske data har blitt koblet mot biokjemiske data med avansert statistikk. Resultater viser at det går 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. Selv om SMELL har lovende resultater fra småskalaproduksjon, er videre arbeid nødvendig for å nå målet i industriell skala.	<i>Prosjektnr.:</i> 12754
<i>English summary/recommendation:</i> This is the end report of project Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL). This has been an FHF-financed project with project partners Nofima, Pelagia and SINTEF, with the main aim to develop a process for producing a sensory neutral protein concentrate, preferably for human consumption. The project has developed and relied on an extensive analytical platform to solve this aim, where results from NMR and GC-MS have been combined with sensory attributes through advanced statistical methods. The tasks involved e.g. protease selection, process optimization, membrane filtration and sensory masking. Although we have promising results from small scale production, further work is needed to reach the aim on an industrial scale.	

## **Forord**

Denne rapporten er sluttrapporten til 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.

# Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag (både på norsk og engelsk)</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b> .....	<b>3</b>
3.1	Leveranse i forhold til resultatmål .....	4
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b> .....	<b>7</b>
4.1	Råstoff .....	7
4.2	Enzymatisk proteinhydrolyse (Task 1.1) .....	7
4.3	Optimalisering og membranfiltrering (Task 1.2) .....	8
4.4	Maskering av smakskomponenter (Task 1.3) .....	9
4.5	Pilotskala hydrolyse og behandling av limvann (Task 2.1) .....	9
4.6	Maskering av smakskomponenter (Task 2.2) .....	10
4.7	Oppskalering hos Biotep (Task 2.3) .....	10
4.8	Analyse av løselige komponenter (Task 3.1) .....	11
4.8.1	Nuclear Magnetic Resonance (NMR) .....	11
4.8.2	Size-Exclusion Chromatography (SEC) .....	11
4.8.3	Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR) .....	11
4.9	Analyse av flyktige komponenter (Task 3.2) .....	11
4.10	Spesifikk identifisering av smakskomponenter (Task 3.3) .....	12
4.11	Statistiske analyser (Task 3.4).....	12
4.12	Sensoriske analyser .....	13
4.12.1	Sensorisk screening (Task 4.1).....	13
4.12.2	Sensorisk profilering (Task 4.3) .....	13
4.12.3	Sensorisk rangering (Task 4.4).....	13
4.12.4	Sensorisk vurdering av maskerte produkter (Task 4.5).....	14
<b>5</b>	<b>Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon</b> .....	<b>15</b>
5.1	Forsøk i lab skala.....	15
5.1.1	Optimalisering av enzymatisk hydrolyse (Task 1.1) .....	15
5.1.2	Raffinering av hydrolysater og limvann (T1.2) .....	16
5.1.3	Maskering av smakskomponenter, første forsøk (Task 1.3) .....	18
5.2	Kjemiske og sensoriske analyser av hydrolysatfraksjoner produsert i pilot-skala .....	19
5.2.1	Pilotskala hydrolyse (Task 2.1) .....	19
5.2.2	Sensorisk rangering av hydrolysat (Task 4.4) .....	23
5.3	Kjemiske og sensoriske analyser av limvannsfraksjoner produsert i pilot-skala.....	25
5.3.1	Kjemisk analyse av limvann .....	25
5.3.2	Sensorisk rangering av limvann .....	26
5.4	Analyse av flyktige komponenter i hydrolysat- og limvannsfraksjoner (Task 3.2) .....	26
5.5	Analyse av flyktige komponenter fra AP1 (Task 3.2).....	29
5.5.1	Flyktige komponenter fra screening forsøk (AP1).....	29
5.6	Analyse av løselige komponenter (Task 3.1) .....	33
5.6.1	NMR.....	33
5.6.2	Analyse av størrelsesseparasjonsdata fra SEC.....	35
5.6.3	FTIR (fra protease-screeningforsøk i AP1).....	37

5.7	Kjemisk og sensorisk evaluering av maskerte hydrolysater .....	39
5.7.1	Maskering av smakskomponenter (Task 2.2).....	39
5.7.2	Sensorisk vurdering av maskerte hydrolysater fra AP1 og AP2 (Task 4.5).....	40
5.8	Industriell-skala produksjon ved Biotep (Task 2.3) .....	44
5.9	Resultatvurdering .....	44
5.9.1	Vurdering av sikkerhet og presisjon .....	44
5.9.2	Vurdering av muligheter til videre bruk, og industriell implementering og nytteverdi for sjømatnæringen .....	44
<b>6</b>	<b>Hovedfunn .....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Leveranser .....</b>	<b>49</b>
8.1	Populærvitenskapelige artikler.....	49
8.2	Postere.....	49
8.3	Presentasjoner.....	49
8.4	Rapporter .....	49
<b>9</b>	<b>Vedlegg 1 .....</b>	<b>51</b>

## 1 Sammendrag (norsk og engelsk)

Hovedmålet med det FHF-finansierte prosjektet Smaksnøytrale proteiner fra makrell (SMELL) var å utvikle en prosess for å fremstille et lukt- og smaksnøytralt proteinkonsentrat fra makrellavskjær. Nofima, og prosjektpartnere SINTEF Industri og Pelagia, har gjennom prosjektet utviklet en avansert analyse- og sensorisk plattform for å kunne screene og bedømme proteinkonsentrater. Prosjektet er gjennomført med en iterativ tilnærming som omfatter blant annet proteasescreening, prosessoptimalisering og smaksmaskering. Innledningsvis i AP1 ble 10 proteaser screenet for oppnådd prosessutbytte og smak i hydrolysat produsert av makrellrygger. Prosessoptimalisering og membranfiltrering ble utført og proteasen FoodPro PNL ble valgt til videre oppskaleringsforsøk. I smaksmaskeringen ble ulike maskeringsagenter testet for å undersøke effekten på proteinhydrolysater. I AP2 ble videre prosessoptimalisering, basert på mikro- og nanofiltrering, utført på både proteinhydrolysat produsert i pilotskala og limvann fra Pelagia. Resultater viser at mikrofiltrering fjerner partikler og fettrester og at nanofiltrering er egnet til å redusere askeinnhold, øke proteininnhold og betraktelig redusere innhold av trimetylamin (TMA)/trimetylaminoksid (TMAO). Sensorisk analyse viser at nanofiltrert hydrolysat har en tilsvarende lavere smaksintensitet og redusert fiskesmak. Resultatene viser at det er mulig å forutsi enkelte sensoriske attributter, eksempelvis bitterhet og nivåer av bitterhet, samt smaksattributter koblet til fett- og proteinoksidasjon ved å koble sensoriske analyser og NMR og GC/MS data sammen med avanserte statistiske metoder. Selv om SMELL har lovende resultater fra småskalaproduksjon, er videre arbeid nødvendig for å oppnå en smaksnøytral prosess i industriell skala.. Resultater og metodikk utviklet i prosjektet er likevel industrielt relevante, særlig koblingen mellom kjemiske og sensoriske analyser, som kan brukes uavhengig av råstoff.

The main aim of the FHF-financed project Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL) was to develop a process for production of a taste-neutral protein product. During the project, Nofima and project partners SINTEF Industry and Pelagia have developed an advanced analytical- and sensory platform to reach this goal. The project has used an iterative approach, including protease screening, process optimization and taste masking. In work package (WP) 1, 10 proteases were screened for activity, in addition to yield and sensory attributes of the produced hydrolysates. This was followed by process optimization and membrane filtration, and based on this work, the protease Foodpro PNL was selected for further upscaling. In taste masking, masking agents were tested for suitability for taste reducing in hydrolysates. In WP2, further process optimization, based on micro- and nanofiltration, was performed on protein hydrolysates and stickwater from Pelagia. Results show that microfiltration can remove particles and lipid remains, and that nanofiltration of hydrolysates reduces ash, increases protein levels and significantly reduces the amount of trimethylamine (TMA)/ trimethylamine oxide (TMAO). Sensory evaluations show that the nano filtrated hydrolysates exhibit a corresponding reduction in taste intensity and reduced fishy taste. Using statistical approaches, sensory data has been coupled to analytical data, such as NMR and GC-MS. 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. 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. Results and methodology developed during the project is industrially relevant, especially work from developing the bioanalytical-sensory coupling of data which could serve to significantly reduce process development time in hydrolysis development based on any raw material.

## 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 verdikningen 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 en 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, men blir i dag enten kassert eller brukt som føringrediens, og det er et ønske om oppgradering av dette produktet inn mot humant konsum. En annen tilnærming, er enzymatisk proteinhydrolyse (EPH), hvor enzymer bryter ned proteinene i råstoffet slik at de blir mer vannløselig, og således gir et høyere prosessutbytte enn en tradisjonell limvannsprosess. En utfordring med proteinhydrolysater er at de ofte har en bitter smak, som skyldes peptidsammensetningen.

Det er mulig å oppnå høy verdiskaping av makrellavskjær dersom man produserer proteinprodukter med akseptabel smak til en så lav som mulig pris. I tillegg kan peptider fra EPH ha bioaktive egenskaper, slik blodtrykkshemmere og bidra til reduisering av kolesterolnivåer. Slike peptider kan selges som verdifulle ingredienser i eksempelvis funksjonell mat og nutraceuticals. EPH er ansett som en mild prosess som gir økt prosesskontroll og utbytte, sammenlignet med en tradisjonell fiskemelsprosess og ble valgt som foretrukket metode i SMELL-prosjektet. Samtidig er det også inkludert noe arbeid på makrellimvann i prosjektet.

Prosjektgruppen bestod av forskere og representanter fra Nofima AS, SINTEF Industri og Pelagia. Referansegruppen bestod 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).

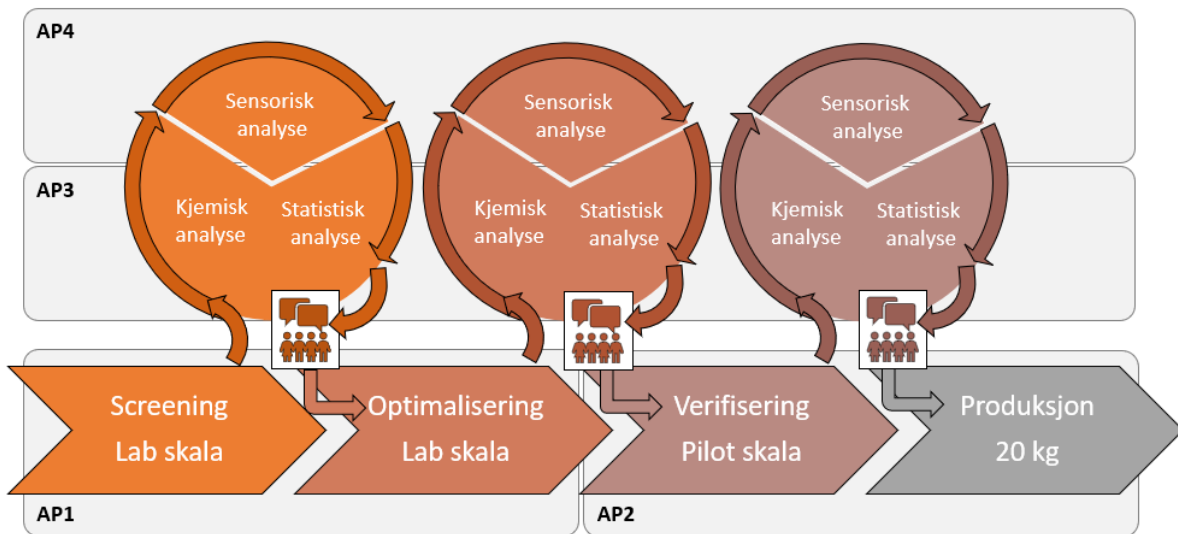


### 3 Problemstilling og formål

Det kan forventes smaksutfordringer i proteinfraksjoner fremstilt av restråstoff fra makrell da 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 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 føre til bitter smak i hydrolysater. Dette er en stor utfordring knyttet til hydrolysat fra både fisk og skalldyr (Kim and Li-Chan, 2006; Aspevik et al., 2016a).

Det overordnede prosjektmålet i SMELL har vært å utvikle en prosess for å fremstille et lukt- og smaksnøytralt proteinkonsentrat fra makrellavskjær. For å nå dette målet er SMELL bygget opp med en tverrfaglig og iterativ tilnærming (Figur 1). Første runde i prosjektet ble utført i arbeidspakke (AP)1 (rapportert i Solstad et al., 2020), og runde to og tre ble utført i AP 2-4 (rapportert i Aspevik et al., 2021).



Figur 1 SMELL ble gjennomført som en iterativ prosess. Hvert trinn i prosjektet ble evaluert med hjelp av avansert statistisk analyse, basert på resultater fra en rekke kjemiske og sensoriske teknikker. Resultatene ble evaluert og neste trinn planlagt i samråd mellom alle arbeidspakkeledere med bred fagkompetanse, for å sikre optimal utnyttelse av tid og ressurser.

Delmålene i SMELL var følgende:

#### **AP1**

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

#### **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

#### **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

#### **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**

#### **AP1. Optimalisert labskala produksjon av smaksnøytralt limvann og hydrolysat**

**Optimalisering av enzymatisk hydrolyse (Task 1.1).** Innledende prosessoptimalisering av enzymatisk hydrolyse av makrellavskjær hadde fokus på smak, utbytte og enzymkostnader. Leveransen ble møtt ved bruk av screening av selekterte proteaser, samt optimalisering av enzymkonsentrasjon av utvalgte proteaser.

**Raffinering av hydrolysater og limvann (Task 1.2).** Utvalgte hydrolysater ble raffinert ved bruk av membranteknologi (mikro- og nanofiltrering). Dette ble gjort for å fjerne restfett og partikulært materiale, grovfraksjonere basert på molekylstørrelse, og fjerne lavmolekylære komponenter som bidrar med uønsket smak (fiskesmak, bitterhet og oksidasjonsprodukter).

**Maskering av smakskomponenter (Task 1.3).** Maskering av smakskomponenter på selekterte hydrolysatfraksjonene fra Task 1.2 ble gjennomført. Relevante næringsmiddelsbaserte hjelpestoffer og bærere for formulering eller innkapsling av fraksjonene ble benyttet i innkapslingsteknologi basert på spraytørking.

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

**Pilotskala prosessering av hydrolysat og limvann (Task 2.1).** 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 (Task 2.2).** 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 Task 2.2 ble evaluert i AP4, og utvalgte produkter ble karakterisert nærmere i AP3.

**Semi-industriell produksjon av proteinpulver (Task 2.3).** 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 (Task 3.1).** Hydrolysatfraksjoner fra AP1 og AP2 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.** 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 (Task 3.3).** 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 Task 4.2 (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 (Task 3.4).** Forsøksdesign, ANOVA og prinsipalkomponentanalyse ble brukt for å forstå hvordan råstoff og prosess variabler påvirker kjemisk og sensorisk karakterisering av proteinhydrolysater.

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

**Sensorisk screening av lab-skala hydrolysater (Task 4.1)** 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 (Task 4.3)** Selekterte hydrolysater fra Task 4.1 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 (Task 4.5).** Maskerte hydrolysater ble evaluert for sensorisk profilering.

## 4 Prosjektgjennomføring

### 4.1 Råstoff

Til første runde i AP1 ble makrell fra sesongen 2018 brukt (oppbevart ved  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ettersom restråstoff 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 (Task 1.1).

Til membranfiltreringsforsøk i AP1.2 ble makrellrygg hentet fra prosesseringslinjen til Pelagia i Selje. Makrellryggene ble pakket og fryst ved  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , før de ble sendt frosset til Tromsø. I Tromsø ble makrellryggene oppbevart ved  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  til dagen før kverning da de ble tint ved romtemperatur over natt. Ryggene ble kvernet, porsjonert og vakuumpakket før det ble oppbevart ved  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  til dagen før hydrolyse.

Til AP2 ble makrellrygger hentet hos Pelagia, Selje i begynnelsen av oktober 2019 og oppbevart på frys ( $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) frem til hydrolyse i midten av februar 2020. Råstoff ble kvernet vha en Comitrol. Limvann ble sendt frosset fra Pelagia, Måløy og oppbevart på frys ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; ca 1 mnd) før prosessering.

Til oppskaleringsforsøket i AP2.3 ble makrellrygger tatt ut fra prosesseringslinjen til Pelagia, Selje i løpet av oktober 2020 og sendt frossen til Biotep, hvor de ble lagret på frys frem til hydrolyse.

### 4.2 Enzymatisk proteinhydrolyse (Task 1.1)

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 (°C)
<b>Corolase 8000</b>	AB Enzymes, Tyskland	60
<b>Bromelain</b>	Enzybel, Indonesia	55
<b>Alcalase</b>	Novozymes A/S, Danmark	55
<b>Foodpro PNL</b>	Danisco/du Pont, Danmark	60
<b>Endocut 01</b>	Tailorzyme ApS, Danmark	50
<b>Flavourzyme</b>	Novozymes A/S, Danmark	55
<b>Flavourpro 766</b>	Biocatalysts Ltd, UK	50
<b>Foodpro 51 FP</b>	Danisco/du Pont, Danmark	52
<b>Flavourpro 839</b>	Biocatalysts Ltd, UK	50
<b>Promod 950L</b>	Biocatalysts Ltd, UK	55
<b>Miks av Flavourzyme og Alcalase</b>	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 ønsket hydrolysetid ble prosessen 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 hydrolysatene fjernet ved hjelp av et papirfilter (Whatman #4). Prøvene ble oppbevart i fryserer ved minst -20 °C frem til frysetørking. Analyse av kjemisk sammensetning av hydrolysatene ble utført ved ALS (Oslo).

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 %.

### 4.3 Optimalisering og membranfiltrering (Task 1.2)

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

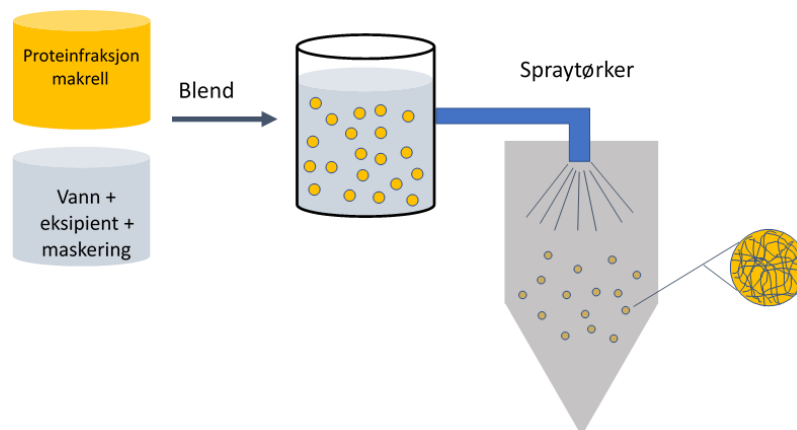
Hydrolysatene ble filtrert med 1kDa membranfilter på et tangentielt flow filtreringssystem (Pall Centramate 500 S, Pall, NY). Dette ga til sammen tre fraksjoner; crude – kun filtrert med papirfilter, permeat og retentat med 1 kDa cut-off. Alle fraksjoner ble undersøkt kjemisk og spektroskopisk og sensorisk i AP3 og AP4.

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
Bromalain	0,5	Crude, permeat, retentat

#### 4.4 Maskering av smakskomponenter (Task 1.3)

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

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

I hydrolyseprosessen ble kvernet 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 separering i en Flottweg trikanter. Hydrolysat (etter trikanter) og limvann (fra Pelagia) ble behandlet likt i nedstrømsprosesseringen.

Produktene ble først mikrofiltrert vha et keramisk filter (0,1  $\mu\text{m}$ ; 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 3).

Tabell 3 Oversikt over hydrolysat- og limvannsprodukter produsert i Task 2.1

Prøvenavn	Prosess	Fryseteknologi	Filtrering
SH-Crude	Hydrolyse	Spraytørking	Før nanofiltrering
SH-Retentat	Hydrolyse	Spraytørking	Retentat (>200 Da) etter nanofiltrering
FH-Crude	Hydrolyse	Frysetørking	Før nanofiltrering
FH-Retentat	Hydrolyse	Frysetørking	Retentat (>200 Da) etter nanofiltrering
FH-Permeat	Hydrolyse	Frysetørking	Permeat (<200 Da) etter nanofiltrering
FL-Crude	Limvann	Frysetørking	Før nanofiltrering
FL-Retentat	Limvann	Frysetørking	Retentat (>200 Da) etter nanofiltrering
FL-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 4). De sensoriske egenskapene til produktene ble evaluert i AP4, og utvalgte produkter ble karakterisert nærmere i AP3.

Tabell 4 Oversikt over kjemiske analyser brukt i AP 2

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)

## 4.6 Maskering av smakskomponenter (Task 2.2)

Smaksmaskering i AP2 bygget videre på arbeid fra AP1, og maltodekstrin og myseprotein ble brukt som maskeringsagent. En eksipient, gum arabic (samme som AP1), en forbindelse som binder sammen hydrolysat med smaksmaskering for å minimalisere frigivelse av smak i munnhulen, ble også brukt. I tillegg ble det gjort noen forsøk med pH-justering ved hjelp av sitronsyre for eventuelt å oppnå to effekter; først å redusere utfordringer med flyktige aminforbindelser og dernest til 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 henhold til eksperimentelt design. Konsentrasjonen av materialer til binding og pH-justering ble holdt konstant gjennom forsøkene på henholdsvis 10 vekt % og 2,5 vekt %.

## 4.7 Oppskalering hos Biotep (Task 2.3)

Nytt råstoff ble sendt fra Pelagia til Biotep i oktober 2020. 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 µm; 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:

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

## 4.8 Analyse av løselige komponenter (Task 3.1)

### 4.8.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

<sup>1</sup>H NMR-eksperimentene ble utført med en Bruker Avance 400 MHz-magnet ved 298K. <sup>1</sup>H kjemiske skift ble beregnet relativt til internstandarder TMSP. NMR-dataene ble prosessert i programvaren Bruker TopSpin versjon 3.2.. Hydrolysatene ble løst i D<sub>2</sub>O med TMSP som internstandard, og <sup>1</sup>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.

### 4.8.2 Size-Exclusion Chromatography (SEC)

SEC-analyser 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 preprosessering i multivariate analyser.

### 4.8.3 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 bakgrunnsspektrum av den 96-brønn IR-transparente Si-platen. Av hver prøve ble det tatt fem replikat spekter. Spektraene ble pre-prosessert ved 2. derivering (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.

## 4.9 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 adsorbenttrør med aktivt kull (Tenax GR, kornstørrelse 60/80 mesh) i 2 minutter med 100 ml/min. Gassprøven ble overført ved termisk desorpsjon til en gaskromatograf (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 bærer-gass. 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).

#### 4.10 Spesifikk identifisering av smakskomponenter (Task 3.3)

SEC-kromatogrammer fra Task 3.1 ble delt inn i 7 forskjellige molekylvektsfraksjoner. Multivariat korrelasjon (iPLS) av disse 8 regionene sammen med sensorisk data ble utført. Molekylvektsfraksjon(er) med høy korrelasjon med sensorisk data ble identifisert som mulige fraksjoner ansvarlig for den relaterte sensoriske attributtene.

#### 4.11 Statistiske analyser (Task 3.4)

**Preprosessering:** 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 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).

## 4.12 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 tilfredsstillende krav i ISO 8586:2012 (General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors). Det sensoriske panelet blir trent, testet og kontrollert regelmessig. Task 4.1 til 4.5 er presentert nedenfor, med unntak av task 4.2 Sistnevnte task kunne ikke gjennomføres da prøvene ble vurdert til å være uegnet for humant konsum.

### 4.12.1 Sensorisk screening (Task 4.1)

Hydrolysater produsert med 10 ulike proteaser (fra AP1) ble sensorisk vurdert ved bruk av Projective Mapping (PM). PM baserer seg på at hver prøve vurderes i tilfeldig rekkefølge opp mot hverandre med tanke på de mest fremtredende egenskapene. Prøver som er svært ulike plasseres langt fra hverandre, mens prøver som er like plasseres i nærheten av hverandre i et todimensjonalt plott. Egenskaper som beskriver prøvene kan så markeres i plottet. Prøvene ble servert som vandig løsning basert på 1 % tørrstoff (TS).

### 4.12.2 Sensorisk profilering (Task 4.3)

En full sensorisk beskrivelse av 17 hydrolysater fra AP1 ble evaluert ved bruk av kvantitativ beskrivende analyse (QDA, ISO 13299:2016). Alle prøver ble servert romtemperert og som vandige løsninger basert på 1 % TS. 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 27 sensoriske egenskaper fra de sensoriske modalitetene lukt, smak og munnfølelse. Hver egenskap vurderes på en ustrukturert skala fra 1 til 9 der 1 er ingen intensitet og 9 er tydelig intensitet av den gitte egenskapen.

### 4.12.3 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 Task 2.1 (Tabell 3) ble vurdert opp mot en kommersiell prøve. Alle ble vurdert på egenskapene total smaksintensitet, bittersmak, fiskesmak og umamismak. De tre limvannprøvene fra Task 2.1 (Tabell 3) ble kun vurdert på totalsmaksintensitet. Dommerne ble bedt om å rangere prøvene for stigende grad av den angitte egenskapen.

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

De maskerte hydrolysatproduktene og tilhørende referanser (totalt 17 prøver) fra Task 1.2 og Task 2.2 ble først kjørt igjennom en sensorisk screening i form av en PM ved bruk av sensorisk trent panel som beskrevet over i pkt. 4.12.1. Prøvene ble servert som vandig løsning basert på 1 % TS. Basert på resultater fra PM, ble 10 prøver selektert til en full sensorisk profilering. En full sensorisk profilering av produktene ble gjennomført ved bruk av QDA som beskrevet over. 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 Forsøk i lab skala

#### 5.1.1 Optimalisering av enzymatisk hydrolyse (Task 1.1)

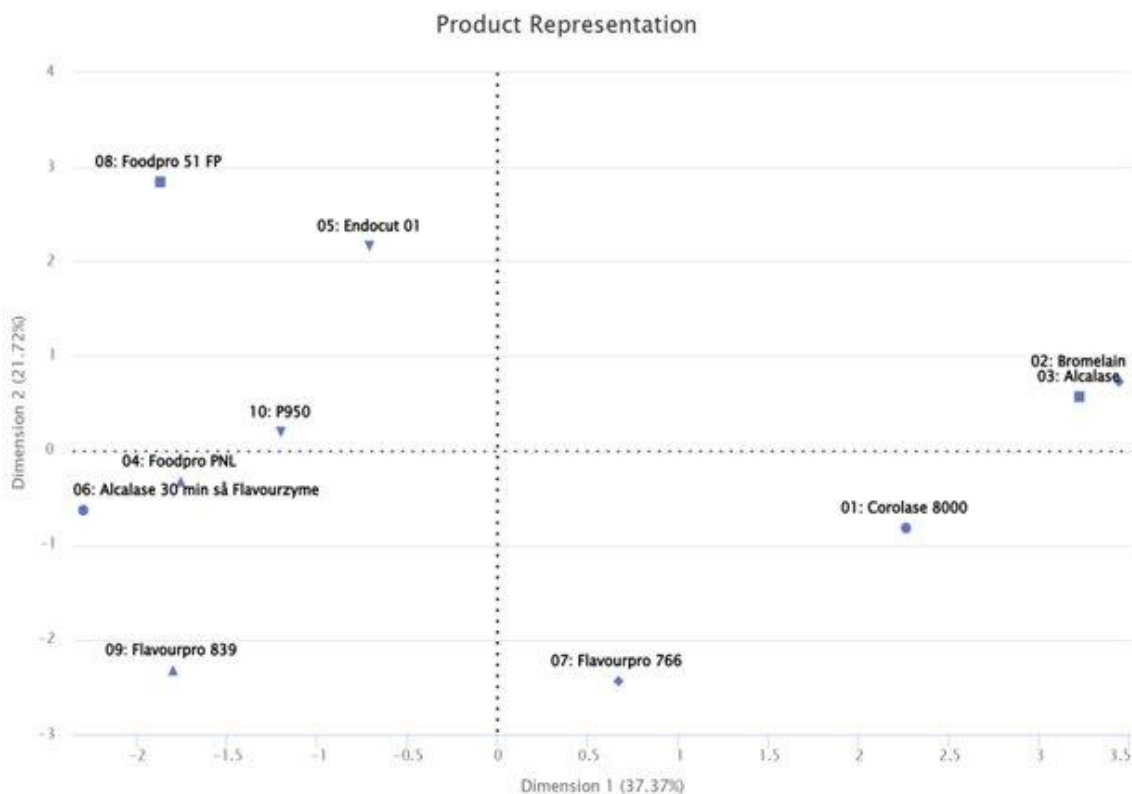
Proksimatanalyser av råstoffet viste følgende innhold: 59,4 % vann, 1,8 % aske, 18,3 % fett, 18,6 % protein og 1,9 % karbohydrater. Tabell 5 viser oppnådd utbytte av hydrolysat og pris på de forskjellige enzymene brukt.

Tabell 5 Tørrstoffutbytte og proteinutbytte av hydrolysat 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 5 viser godt samsvar mellom tørrvekstutbytte og proteinutbytte. Proteasene som ga høyest hydrolysatutbytte var Bromelain og Alcalase. Dette er to kjente effektive proteaser som i henhold til våre resultater også yter godt i hydrolyse av makrellrygg. Miksen Alcalase og Flavourzyme var den enzymkombinasjonen som gav dårligst hydrolysatutbytte, 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. Hydrolysat produsert med 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 produsert med FoodPro 51FP og Endocut 01. Disse beskrives som nøytrale, syrlige og med mild smaksintensitet (Figur 4). Hydrolysat produsert med FoodPro PNL beskrives også som mild, men med smak av kjøtt og noe fermentert. FoodPro 51FP, Endocut 01 og FoodPro PNL ga lavest utbytte, men fordi disse hydrolysatene hadde mest nøytral smaksprofil og enzymene hadde forholdsvis lav kostnad, ble FoodPro PNL og Endocut 01 valgt som kandidater for videre produksjon av hydrolysat til sensorisk analyse.



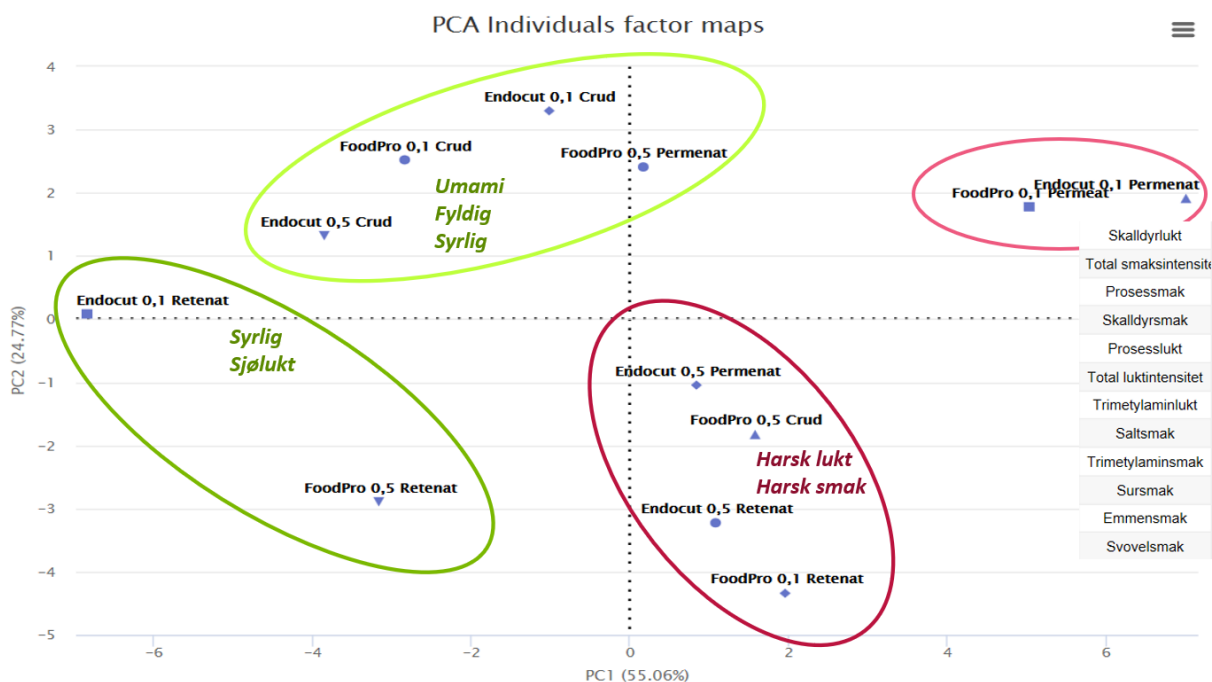
Figur 4 Resultater fra Multiple Factor Analysis (MFA) fra sensorisk screening (Napping) med trent sensorisk panel. Prøve 01 til 10 er de ulike hydrolysatene basert på 10 ulike enzymer produsert i Task 1.1.

For å sjekke om det er mulig å få en optimalisering av smak ble FoodPro PNL og Endocut 01 brukt ved to forskjellige enzymkonsentrasjoner, 0,1 % og 0,5 % i et oppfølgende hydrolyseforsøk. I tillegg ble hydrolysater produsert med Alcalase og Bromelain brukt som negative smaksreferanser til både sensorisk og kjemisk analyse.

### 5.1.2 Raffinering av hydrolysater og limvann (T1.2)

Hydrolysater produsert med bruk av Alcalase, Bromelain, FoodPro PNL og Endocut 01, ble filtrert med et 1kDa membranfilter. Permeat og retentat ble sammen med opprinnelig hydrolysat, totalt 17 fraksjoner, sendt til sensorisk analyse ved bruk av kvantitativ beskrivende analyse (QDA), samtidig som proteininnhold og askeinnhold ble analysert (Tabell 6 og 7).

Resultatene fra PCA og cluster-analysen av QDA for alle prøver produsert 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 karakteristikker: «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. Bittersmak plasserte seg nede mellom grønn og rød sirkel, men ble tatt ut fra figuren da denne ikke bidro til signifikante forskjeller for de fire segmentene.



Figur 5 PCA plott over hydrolysater fra Endocut 01 og Foodpro PNL med både 0,1 % og 0,5 %, crude (før filtrering), permeat og retentat. 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 7), som fører til at proteininnholdet (Tabell 6) i prøvene til sensorisk testing var forskjellige, ettersom sensorisk analyse var basert på 1 % tørrstoff. Alle prøvene ble beskrevet som noe bitre, med små forskjeller i sensorisk score, hvor kun 0,5 % FoodPro PNL retentat var signifikant mer bitter enn 0,1 % FoodPro PNL crude, 0,1 % Endocut 01 crude og Endocut 01 retentat (ikke vist). Når det gjelder egenskapene harsk smak og lukt, var det forventet at crude og/eller retentat ville ha høy forekomst av disse egenskapene, da eventuelle fettrester ville fulgt disse fraksjonene. Men her er ikke resultatene entydige. Alle prøvene hadde forekomst av harsk smak, men de sensoriske verdiene er relativt lave. Vi ser imidlertid at prøvene 0,1 % FoodPro PNL retentat og 0,5 % Endocut 01 retentat har de høyeste verdiene av harsk smak, og er de prøvene som trekker i PC2 retning sammen med harsk smak.

Tabell 6 Proteininnhold i de ulike hydrolysatfraksjonene

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

Tabell 7 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 var derfor viktig at neste steg i prosessoptimaliseringen også skulle inneholde kommersielle hydrolysater i tillegg til optimaliserte produktenene. Kun på den måten ville vi kunne vurdere om det optimaliserte hydrolysatet fra dette prosjektet har en mer nøytral smak enn andre kommersielle hydrolysater.

Basert på sensorikkanalysene kunne vi konkludere med at det i realiteten ikke forelå særlig forskjeller i smaksintensitet mellom de opprinnelige hydrolysatene Endocut 01 0,5 % og FoodPro PNL 0,5 %. Der det statistisk sett var forskjell mellom de opprinnelige 0,5 % hydrolysatene var det generelt sett små forskjeller i smaks- og luktkarakteristikk. Basert på resultater fra innledende tester, både mtp kjemisk sammensetning, pris og sensorikk, ble 0,1 % FoodPro PNL valgt videre til oppskaleringsforsøk (AP2). I tillegg har prosjektgruppen vist lovende resultater med bruk av dette enzymet i hydrolyse av makrellråstoff, i EU-prosjektet Aquabiopro-fit ([www.aquabioprofit.eu](http://www.aquabioprofit.eu)).

### 5.1.3 Maskering av smakskomponenter, første forsøk (Task 1.3)

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, 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 8. Til tross for den lave tørrstoffmengden lot Alcalase-hydrolysatet seg lett spraytørke til et tørt pulver, i motsetning til Bromelain-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. En interessant observasjon var at Bromelain-hydrolysat konsekvent ga vesentlig lavere utbytte i spraytørking, hvilket er en betraktning som også bør tas hensyn til i valg av protease og prosessparametere under pilotskalaforsøk.



Tabell 8 Oversikt av første forsøk med spraytørking

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



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

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

### 5.2.1 Pilotskala hydrolyse (Task 2.1)

#### Råstoff

Den kjemiske sammensetningen til makrellråstoffet som ble brukt i oppskaleringsforsøket (Tabell 9) viser et relativt høyt protein og fettinnhold på henholdsvis 17,5 % og 14,5 %.

Tabell 9 Kjemisk sammensetning av makrellråstoffet som ble brukt i hydrolyserforsøkene (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 10) 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, men nivåene er relativt lave.

Tabell 10 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

### Tørking 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 hydrolysaten (Tabell 11) 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 11 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 12) viste også at det var små forskjeller i spraytørket sammenlignet med frysetørket produkt. Sum av aminosyrer på tørrstoffnivå reflekterer sum protein (Tabell 11), og viste at Retentat-produktet var mye mer proteinrikt enn Crude og Permeat. Dette kan forklares fra en reduksjon av aske i de forskjellige produktene (Tabell 11). 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 12). En stor prosentandel av histidin forelå som fri aminosyre (Tabell 13), 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 14).

Tabell 12 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 13 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 14 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 15), 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 viste ingen tydelig reduksjon av de biogene aminene etter nanofiltrering, noe som indikerer 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 15 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

### 5.2.2 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 molekulvektfordelingen til det kommersielle produktet (Tabell 16) viste at produktet hadde en kjemisk sammensetning og molekulvektfordeling som kan sammenlignes med H-Retentat (Tabell 11 og 14). Alle hydrolysatprøvene ble vurdert på flere sensoriske egenskaper, da vi vet at ulike sensoriske egenskaper påvirkes av forskjellige faktorer. Prøvene ble bedømt på total

smaksintensitet, bittersmak, fiskesmak og umamismak, som ble vurdert til å være de mest relevante i denne sammenhengen. TMA er kjent for å gi en karakteristisk fiskesmak og produktet med høyest TMA-verdi (FH-permeat; Tabell 15) ga også sterkest intensitet av denne smaksattributten (Tabell 17). For bittersmak var det ikke så store forskjeller mellom de ulike hydrolysatene, men Retentatprøvene ble vurdert til å ha sterkere bittersmaksintensitet enn Crude-prøvene. Dette kan muligens skyldes en reduksjon av andre smaker i Retentat-produktet, slik at bittersmaken ble mer fremtredende etter nanofiltrering. I tillegg ble produktene testet på tørrstoff-nivå, hvor proteininnholdet var betydelig høyere i retentat-produktene enn crude-produktene (Tabell 11). 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 12) som kan forklare en mer intens smak av umami.

Tabell 16 *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 17 *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

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

### 5.3.1 Kjemisk analyse av limvann

Den kjemiske sammensetningen til limvannet før behandling (Tabell 18) viste at produktet inneholdt hovedsakelig protein og aske, og en del fett på tørrstoffbasis. Molekylvektfordelingen til det vannløselige proteinet er gitt i Tabell 19. 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 18) ble det besluttet å behandle limvannet med samme fremgangsmåte som hydrolysatet, ved først å mikrofiltrere 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 19) 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 18 Kjemisk sammensetning av limvann før og etter behandling med mikrofiltrering (L-Crude) og nanofiltrering (L-Retentat og L-Permeat)

	Limvann	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 19 Molekylvektfordeling av 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 20). 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 20 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

### 5.3.2 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 21). Dette kan muligens forklares fra både det høyere askenivået (Tabell 18) og TMA-nivået (Tabell 20) i L-Permeat sammenlignet med L-Crude og L-Retentat.

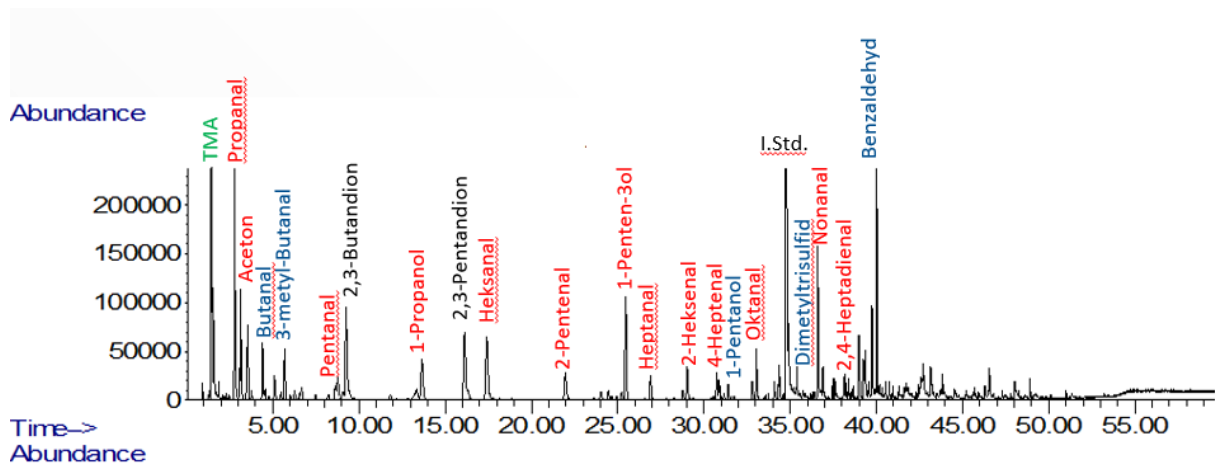
Tabell 21 Rangering på total smaksintensitet for limvann etter mikrofiltrering (crude) og etter nanofiltrering (retentat og permeat)

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

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

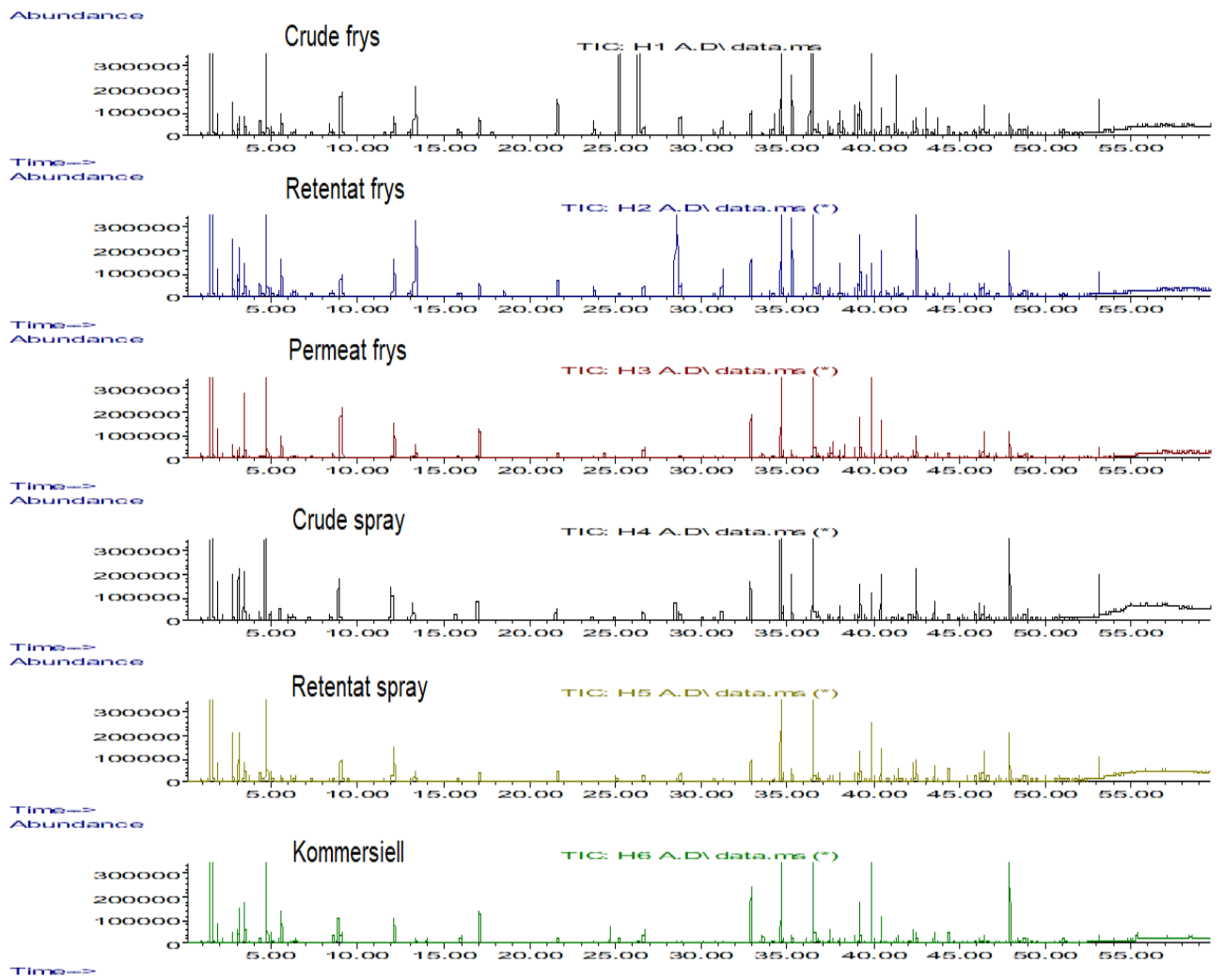
Et typisk gasskromatogram av H-Crude er vist i Figur 7. Det ble funnet over 100 ulike flyktige forbindelser. Hydrolysatet var karakterisert ved lipid oksidasjonsprodukter (heksanal, 2-pentenal, 1-penten-3-ol, 2-heksenal, nonanal, 2,4-heptadienal, 2,6-nonadienal, 3,5-oktadien-2-onm.fl.), protein oksidasjonsprodukter (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.



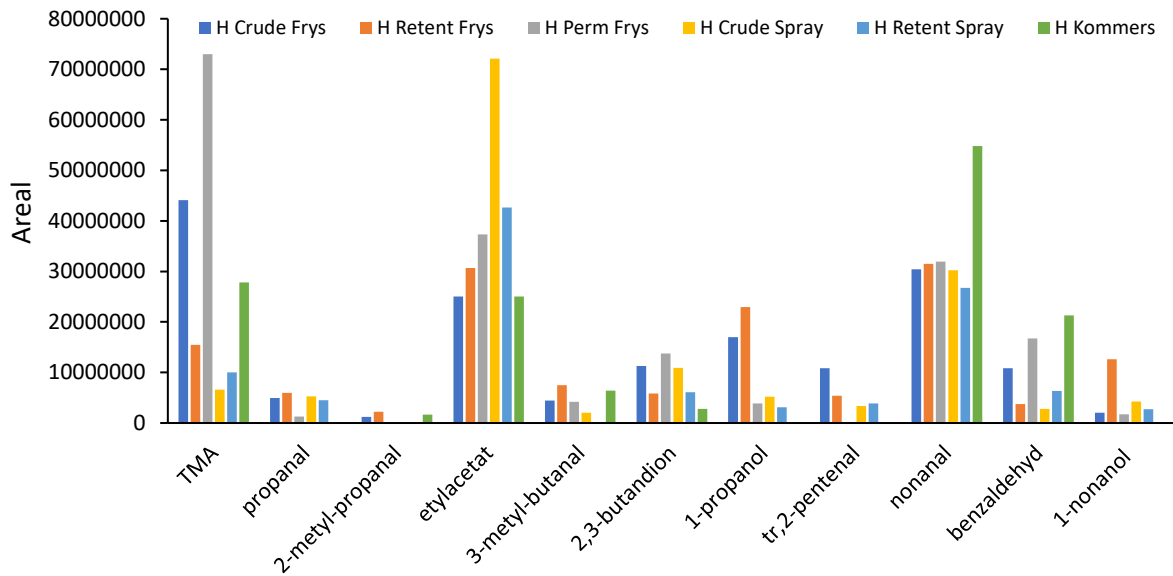


Figur 7 Typisk gasskromatogram av Crude hydrolysat som viser de dominerende forbindelsene: trimetylamin (TMA, i grønt), lipid oksidasjonsprodukter (i rødt), protein oksidasjonsprodukter (i blått), bakteriemetabolitter (sort) og tilsatt kvantifiseringsstandard (I.St.).

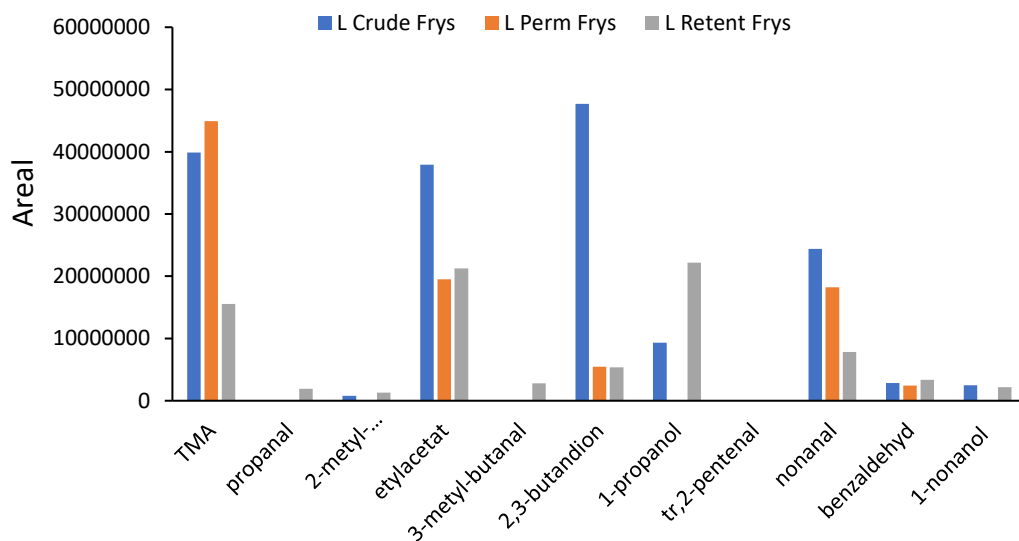
Spraytørket Crude (SH-Crude) og Retentat (SH-Retentat), og frysetørket Crude (FH-Crude), Retentat (FH-Retentat) og Permeat (FH-Permeat) ble analysert for flyktige komponenter, basert på samme konsentrasjon som ble benyttet i den sensoriske evalueringen. Gasskromatogram av prøvene er vist i Figur 8. GC-areal av utvalgte forbindelser (Figur 9 og 10) 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 16), som ble brukt i sensorikkforsøkene, er også tatt med og viser at denne har en relativt lik profil som SH-Retentat.



Figur 8 Gasskromatogram av frysetørkede og spraytørkede fraksjoner av hydrolysat.



Figur 9 GC-areal (middelverdier for 2 parallelle analyser) av utvalgte forbindelser for de ulike hydrolysatfraksjonene.



Figur 10 GC-areal (middelverdier for 2 parallelle analyser) av utvalgte forbindelser for de ulike limvannfraksjonene.

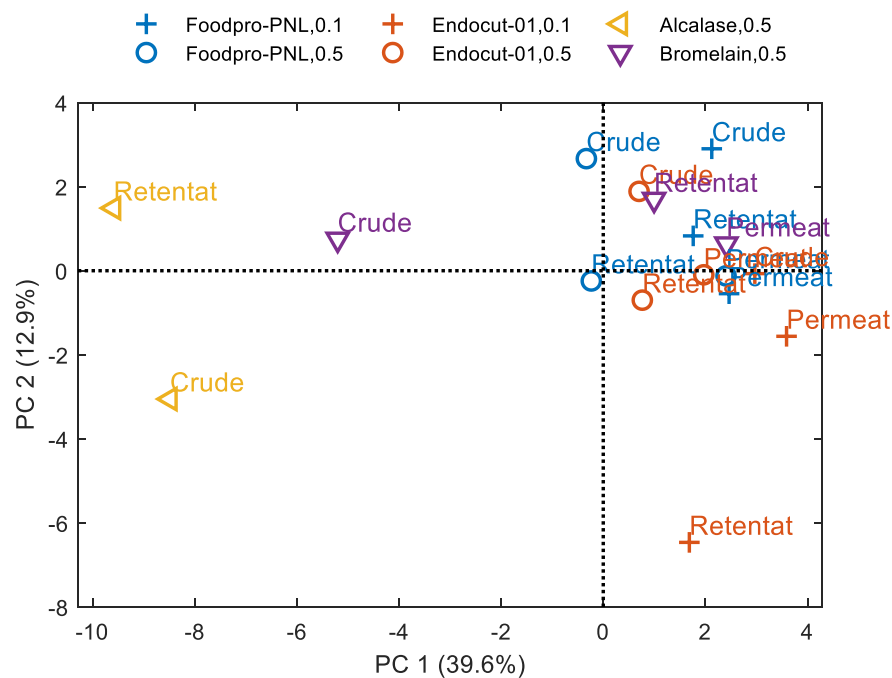
## 5.5 Analyse av flyktige komponenter fra AP1 (Task 3.2)

### 5.5.1 Flyktige komponenter fra screening forsøk (AP1)

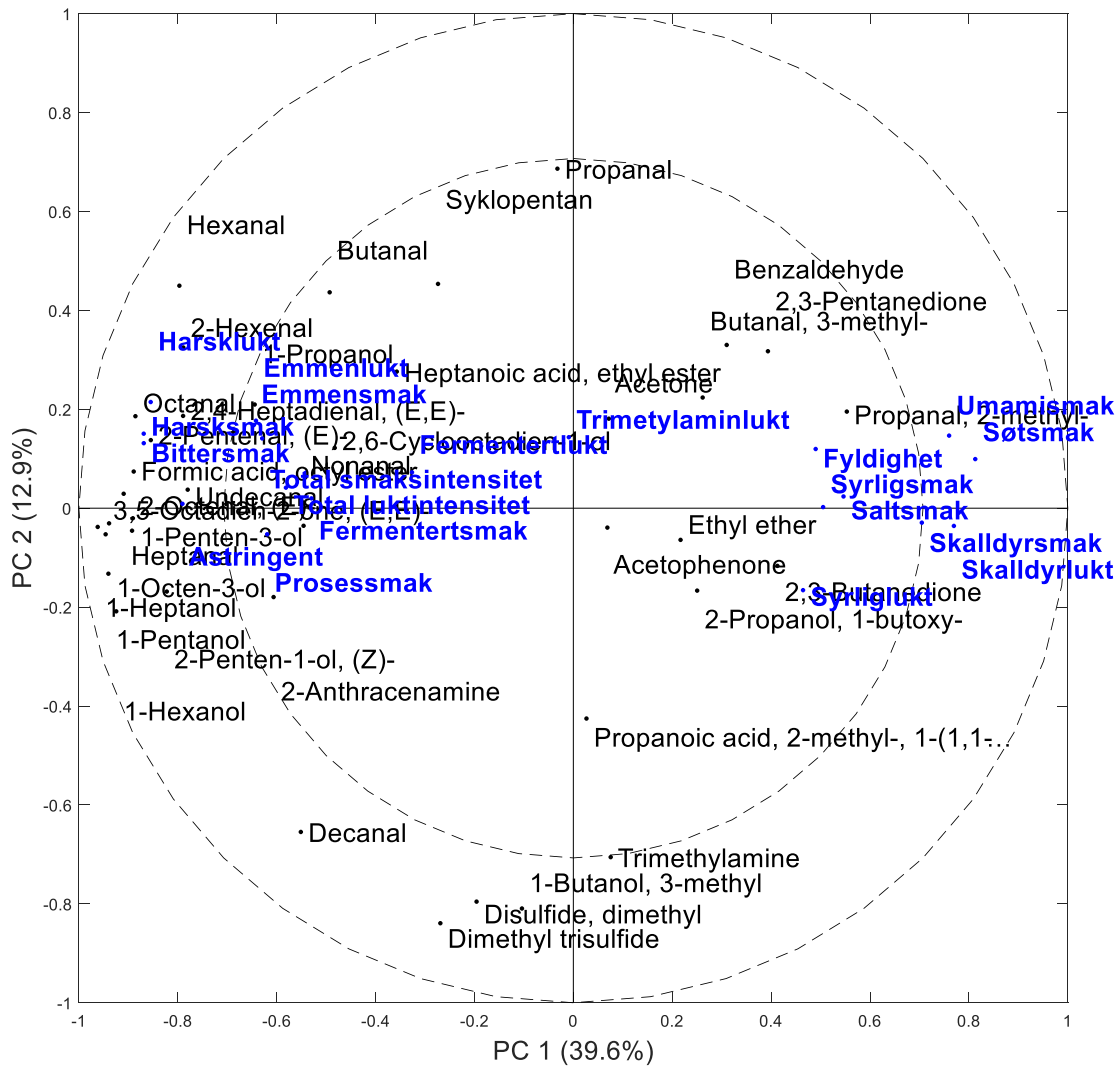
En PCA av de flyktige komponentene fra hydrolysater produsert i AP1 viste at protease og til dels hvilken konsentrasjon som ble brukt i hydrolysen, er av stor betydning for sammensetningen i det

ferdige produktet. Alcalase og den laveste konsentrasjonen av Endocut-01 (0,1 %) skilte seg ut fra de øvrige (Figur 11). 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 22. 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 12). 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 11 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.

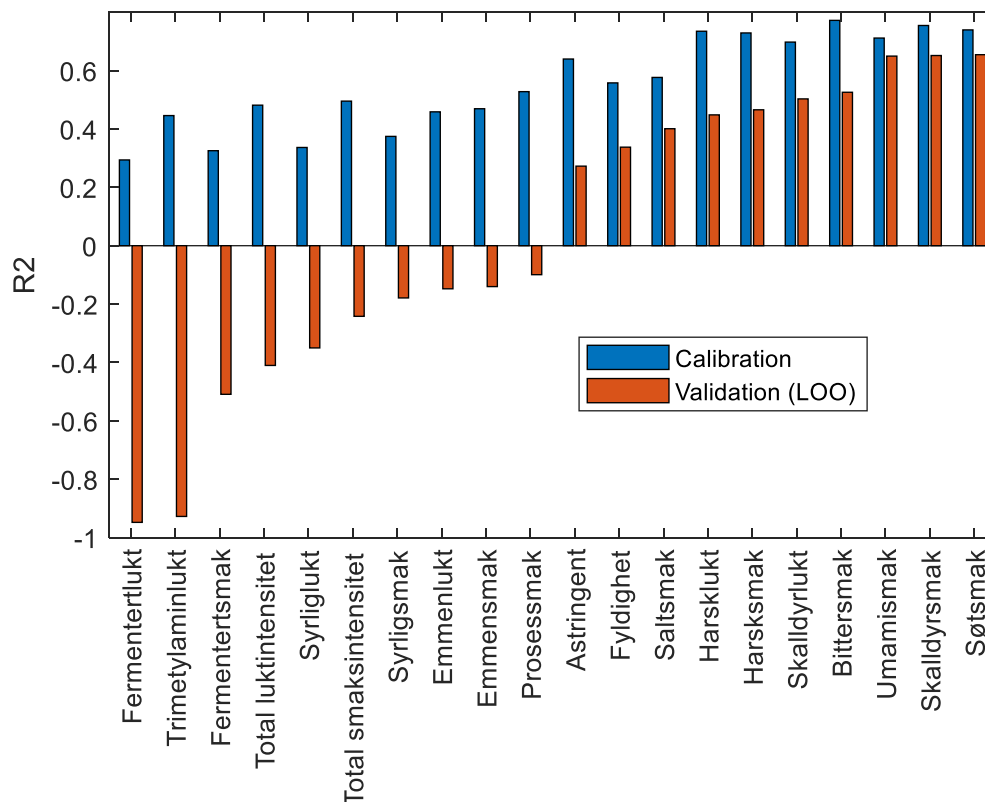


Figur 12 PCA for flyktige komponenter. Korrelasjonsladninger av de flyktige forbindelsene, med sensoriske variabler inkludert som supplementære variabler. Dette vil si at de ikke bidrar i beregning av PCA, men vi ser hvordan de sensoriske egenskapene korrelerer med prinsippal komponentene basert på de flyktige komponentene. Forbindelser på høyre side er relatert til produkter med Alcalase. Forbindelser langt ned er relatert til Endocut-01 0,5 %.

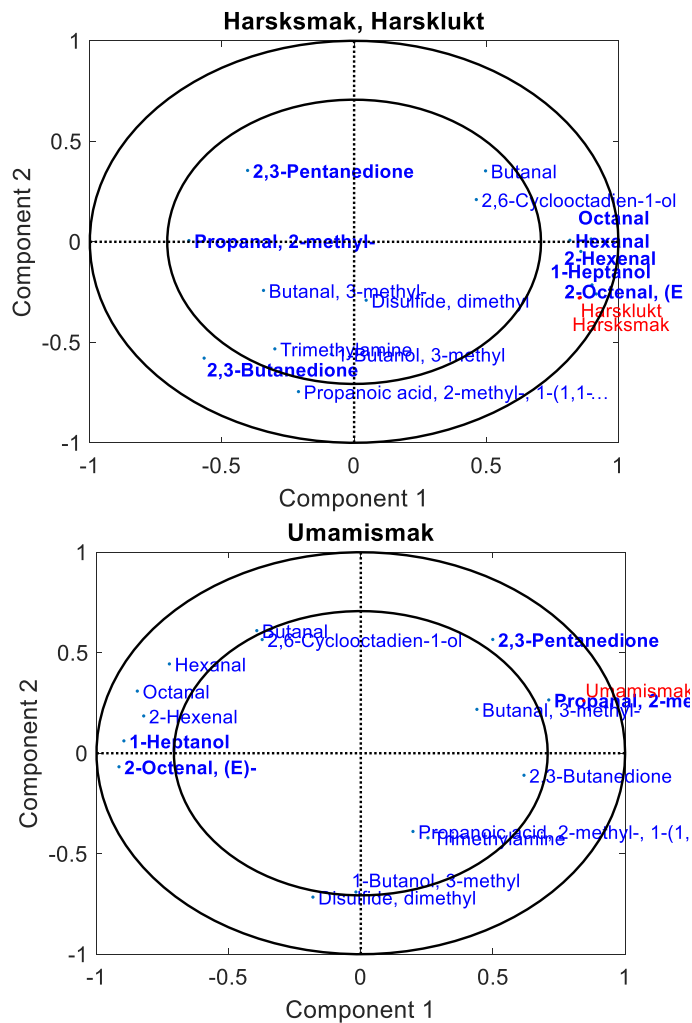
Tabell 22 Resultater fra multivariat anova for flyktige komponenter. P-verdier < 0.1 er markert med fet skrift, p-verdier < 0.05 har i tillegg en stjerne. ExplVar = Forklart Varians, Pval = Pvalue

		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 13) 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 14 viser korrelasjonsladninger for harsksmak/harsklukt og for umamismak.



Figur 13 PLS for flyktige komponenter og smaksegenskaper. R<sup>2</sup> er korrelasjon mellom predikert og observert verdi for hver smaksegenskap, kalibrert og med leave one out cross validation (LOCV).

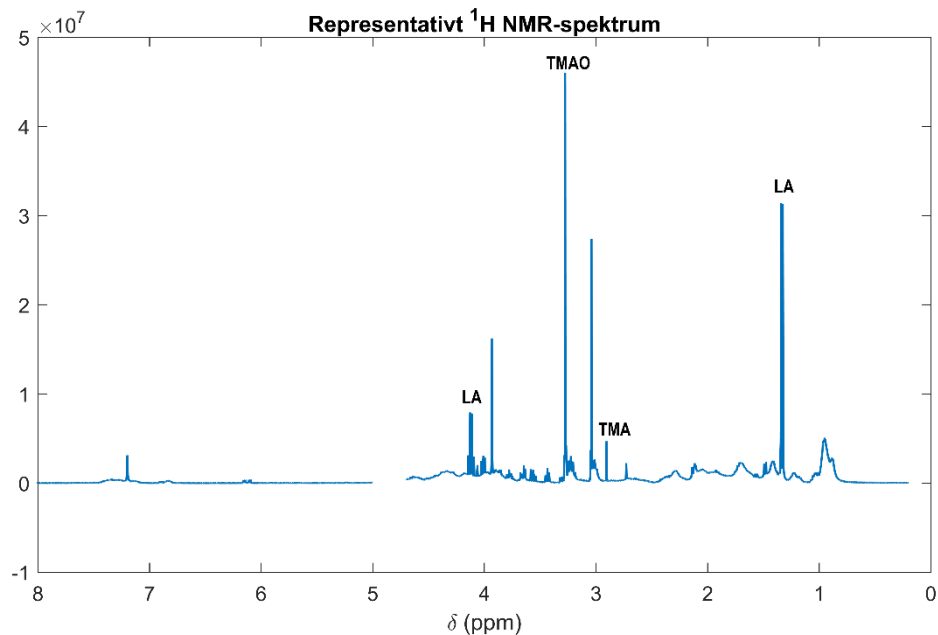


Figur 14 Korrelasjonsladninger for PLS mellom flyktige komponenter og harsksmak og harsklukt (øverst, PLS2 modell) og for umamismak (nederst, PLS1 modell).

## 5.6 Analyse av løselige komponenter (Task 3.1)

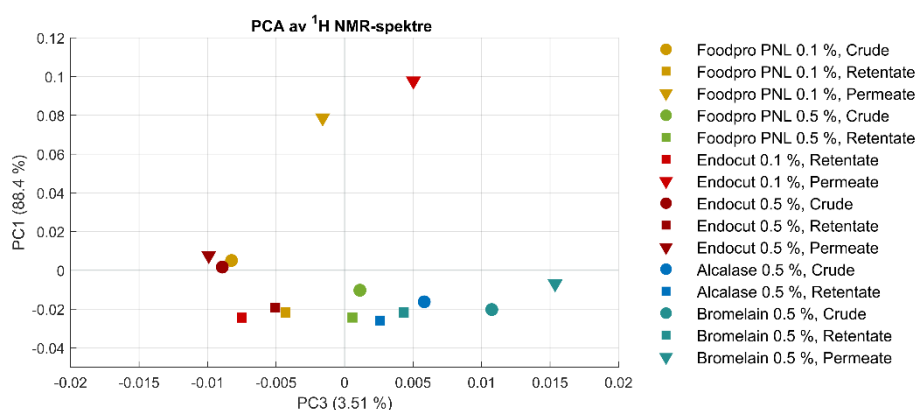
### 5.6.1 NMR

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



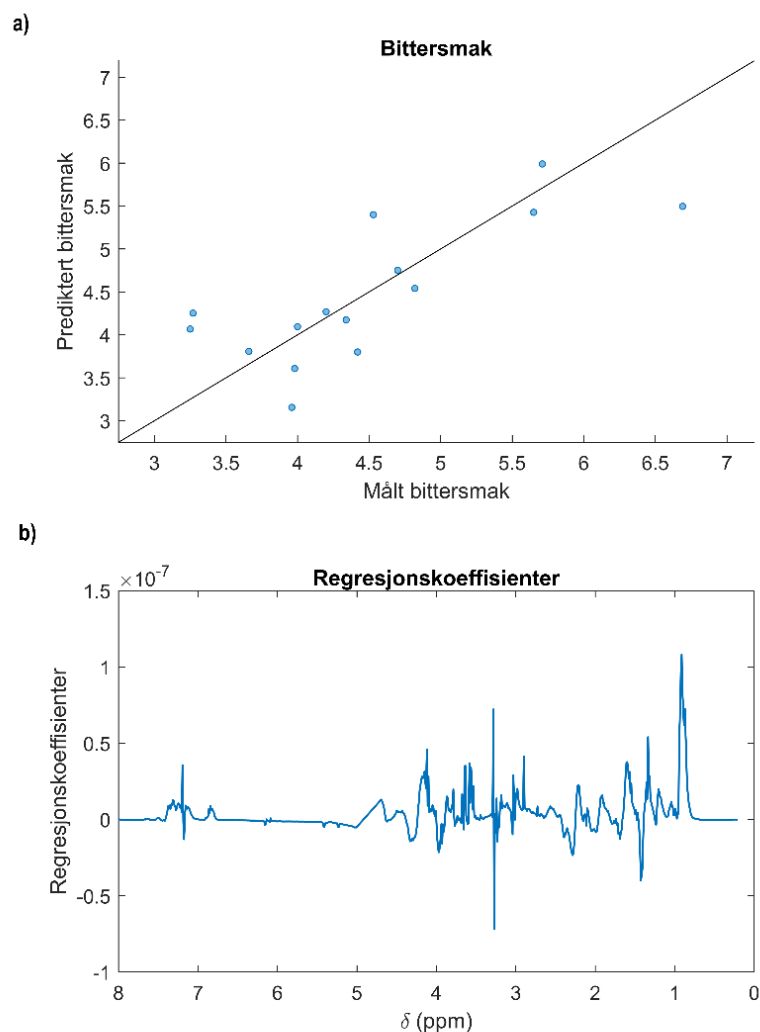
Figur 15 Representativt  $^1\text{H}$  NMR-spektrum av hydrolysat fra makrell. Signalene fra melkesyre (LA), trimetylamin (TMA) og trimetylaminoksid (TMAO) er angitt i figuren.

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 (Figur 16). 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 17a). Regresjonskoeffisienten vektet særlig de laveste kjemisk skiftene (Figur 17b). Disse kan tilordnes alifatiske sidekjerder i lipofile aminosyrer. Dette stemmer overens med tidligere studier hvor bittersmak tilskrives alifatiske sidekjerder i peptider (Ney, 1971; Kim & Li-Chan 2006).



Figur 16 Resultater fra PCA analyse av NMR-data. Scoreverdier til første vs. tredje prinsipalkomponent. Basert på hydrolysater som ble produsert og filtrert i AP1.

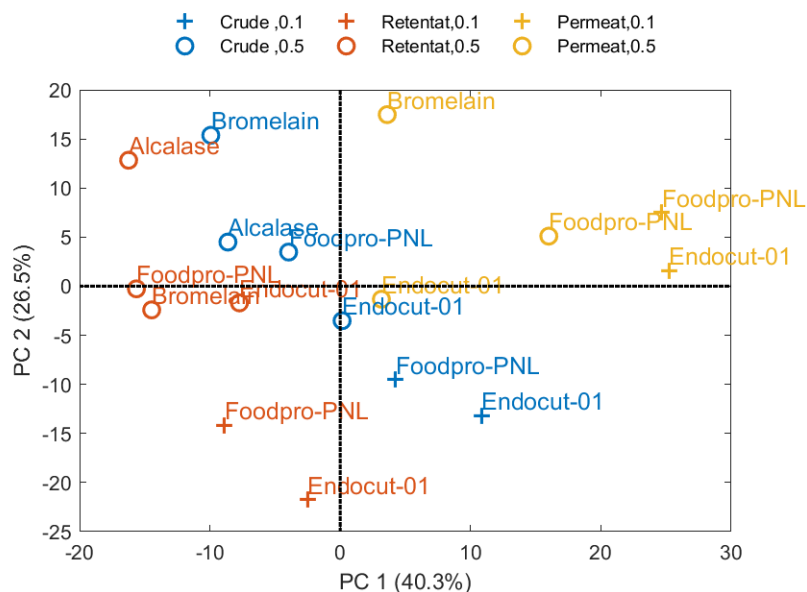




Figur 17 PLS regresjonsmodell for prediksjon av bittersmak fra  $^1\text{H}$  NMR-spektre. a) Sensorisk gradering av bittersmak plottet mot modellens kryssvaliderte prediksjoner av bittersmak. b) Modellens regresjonskoeffisienter.

### 5.6.2 Analyse av størrelsesseparasjonsdata fra SEC

Den viktigste variasjonen i SEC data var relatert til forskjell mellom fraksjonene etter filtrering, som som sees i PCA plottet i Figur 18, 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 18 PCA basert på SEC data. Farge er relatert til fraksjon, mens symbol relateres til enzym konsentrasjon. Resultater er basert på funn i AP1.

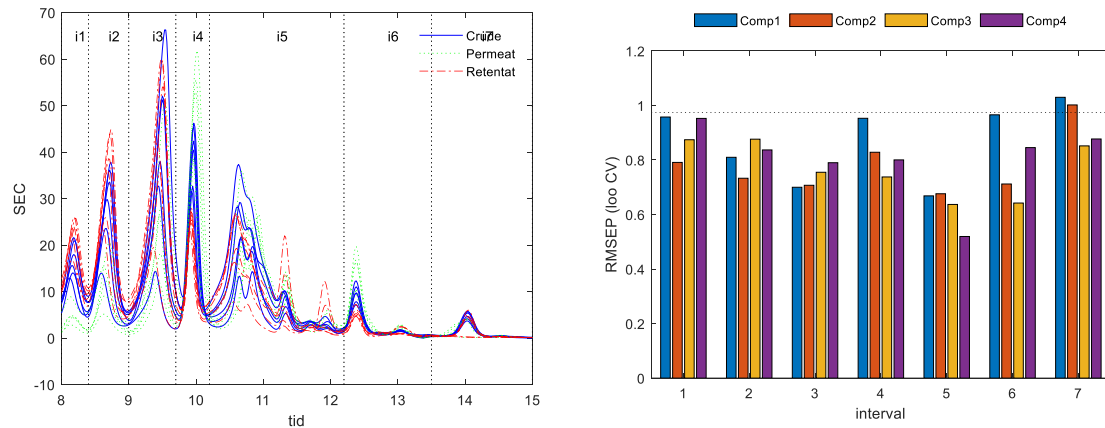
Multivariat ANOVA (Tabell 23) bekreftet effekt av fraksjonering, med signifikant eller nær signifikant p-verdi i alle delanalysene og for alle tre valgte metoder. Med 50-50 manova var effekten av type protease signifikant i alle delanalysene, mens det er noe mer usikkert med de andre metodene. Igjen var det interaksjoner mellom forsøksfaktorene som kompliserer resultatene.

Tabell 23 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
Del1	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>
Del2	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
Del3	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 19). Med PCA var det tydelig at hovedforskjellen i kromatogrammene var mellom regioner for sensoriske data (AP1), 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

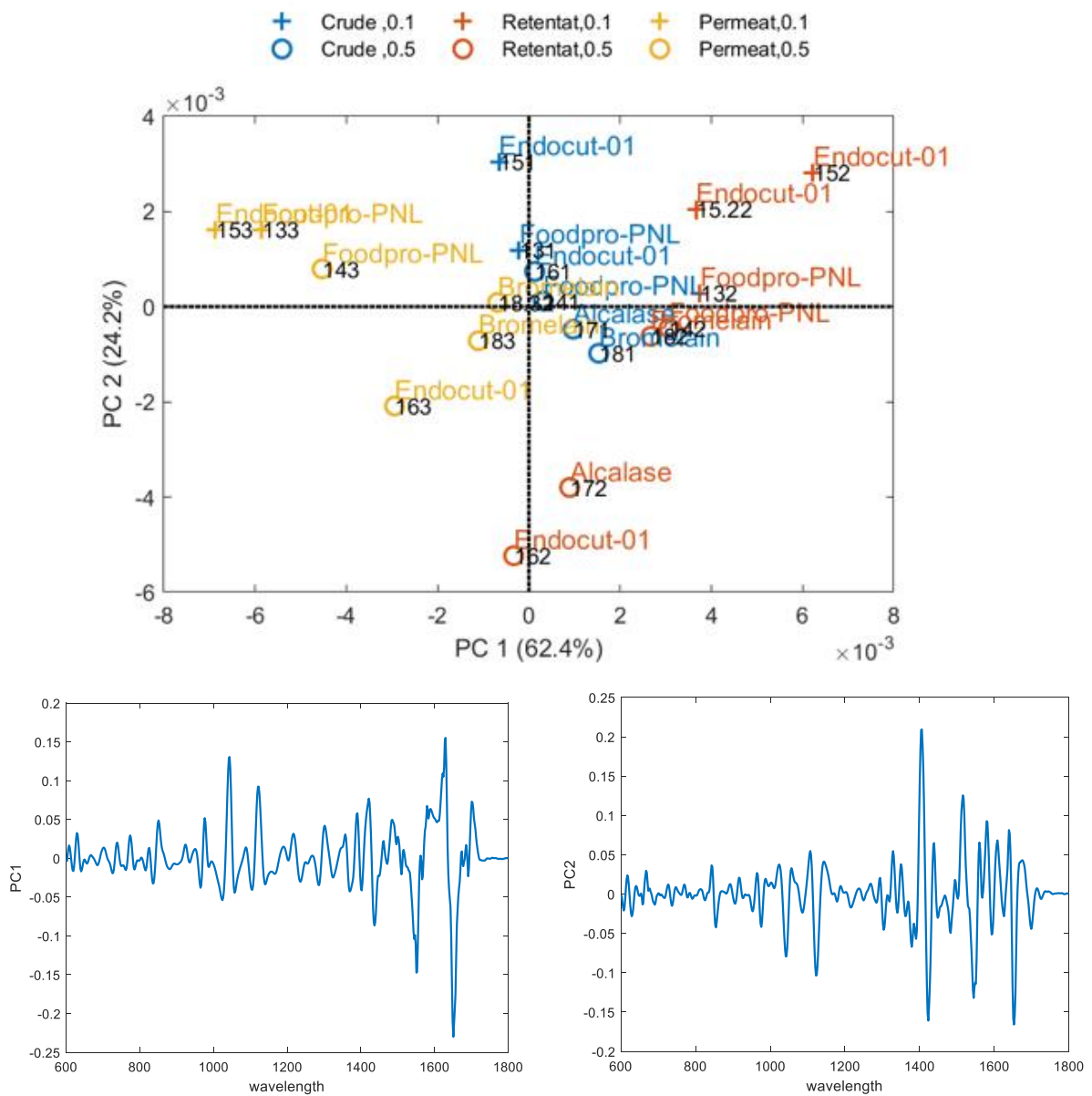
og syrlig smak. Skalldyrsmak, skalldyrlukt og søt smak var viktige for PC2 i de sensoriske dataene. Det er usikkert om prediksjonen er relatert til en reell korrelasjon mellom sensoriske egenskaper, eller er et resultat av at både SEC og sensoriske data til stor grad skiller mellom molekylvektsfraksjonene.



Figur 19 iPLS for SEC og sensoriske data—Høyre side: SEC data med intervaller, venstre side: Root Mean Squared Error of Prediksjon for prediksjon av bittersmak.

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

De ulike hydrolysatfraksjonene var i hovedsak separert langs PC1 (62,4 %), med Crude mellom Permeat og Retentat (Figur 20). 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 24) bekrefter at det er fraksjonering og ikke type protease eller konsentrasjon som har størst betydning basert på FTIR data.



Figur 20 PCA fra IR data øverst: Scoreplot, deretter ladninger fra henholdsvis PC1 og PC2.

Tabell 24 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*

## 5.7 Kjemisk og sensorisk evaluering av maskerte hydrolysater

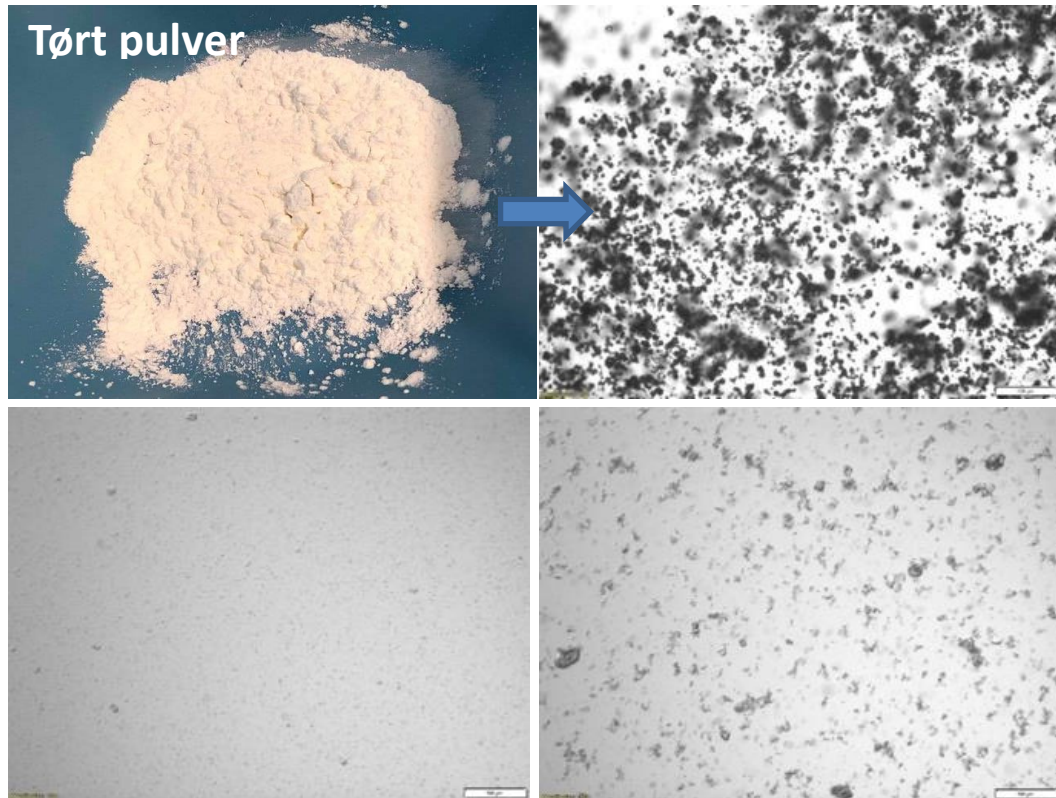
### 5.7.1 Maskering av smakskomponenter fra AP2 (Task 2.2)

Hydrolysat fra AP2, før (H-Crude) og etter nanofiltrering (H-Retentat), ble testet i maskeringsforsøk. Startmaterialet hadde en tørrvekt på 3,0 % (H-Crude) og 6,0 % (H-retentat). Resultater fra forsøk er oppsummert i Tabell 25. De fleste av forsøkene var vellykket og ga tørt pulver med høyt utbytte (63-84 %) og lav restfuktighet (5-7 %), se også Figur 21. 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 14). Prøver maskert med maltodekstrin besto av løselig aggregert pulver med en gjennomsnittlig partikkelstørrelse på 2-5  $\mu\text{m}$  (estimert fra optisk mikroskopi), mens prøver maskert med myse ga større (5-10  $\mu\text{m}$ ) og mindre aggregerte partikler.

Tabell 25 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

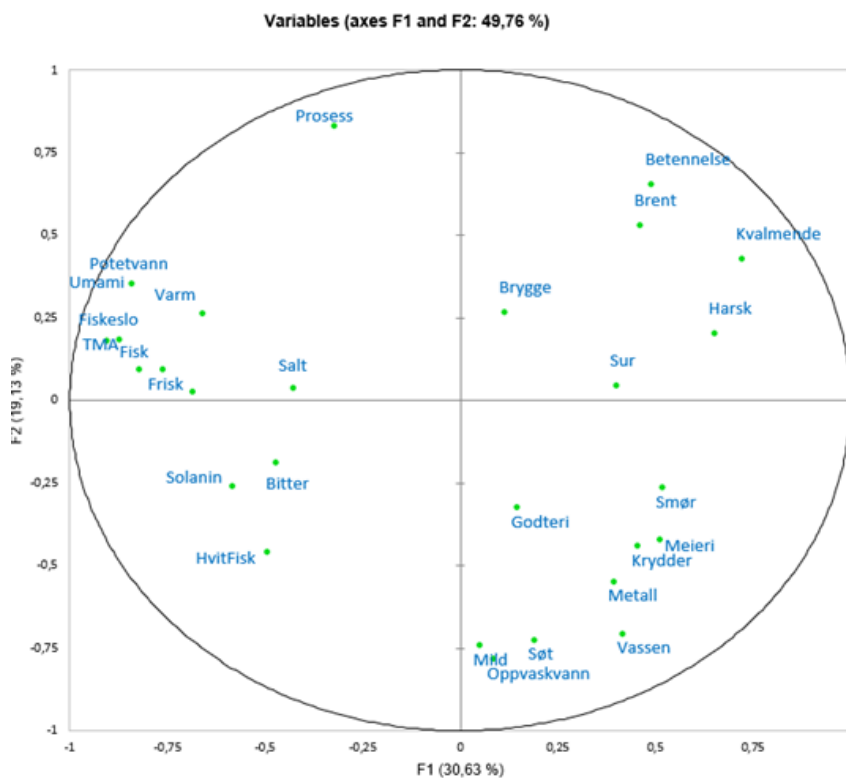
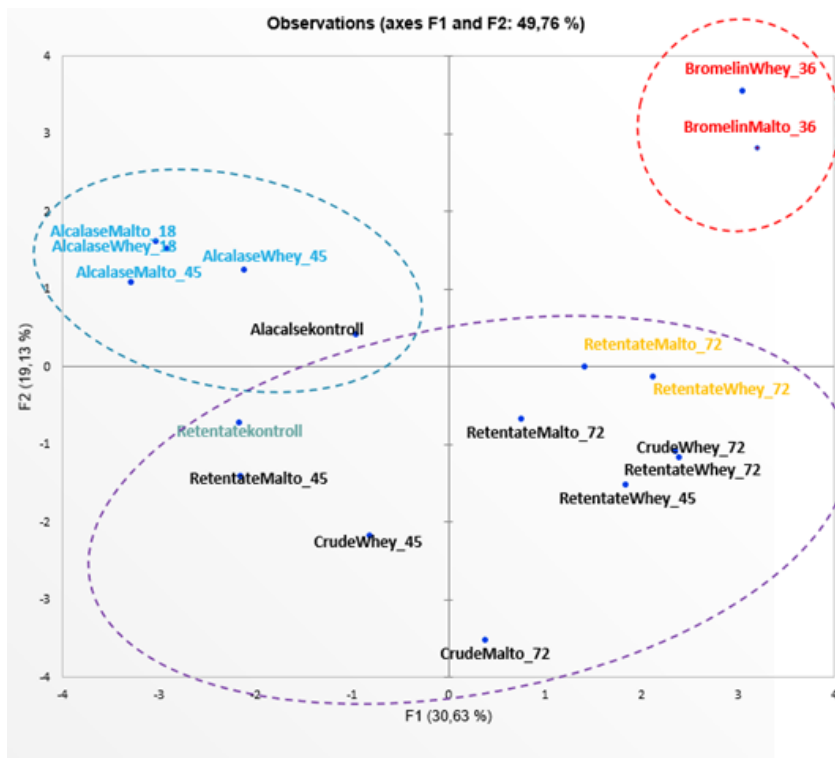
Ved undersøkelse av løselighet/dispergerbarhet for de maskerte hydrolysaterne ble det funnet at alle de maskerte hydrolysaterne kunne dispergeres raskt i vann med et minimum av påført skjær (risting), og resulterte i lysegule suspensjoner. Etter redispergering i vann ga prøver med maltodekstrin ikke små restpartikler, mens prøver maskert med myse fortsatt hadde små mengder av 1-2  $\mu\text{m}$  partikler (Figur 21, nederst til venstre). Justering av pH med sitronsyre resulterte i større partikler med mer kompleks struktur (se Figur 21, 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 hydrolysaterne da ikke er tilgjengelig for binding til smaksløker i munnen.



Figur 21 Eksempel på resultat fra spraytørking: Øverst til venstre; bulk pulver, Øverst til høyre; optisk mikroskopi av bulk pulver. Nedre panel, redispergert pulver, retentat: myse 1:4, venstre uten pH justering (# 20), Nederst til høyre; med pH justering (# 30). Målestokk: 100  $\mu\text{m}$

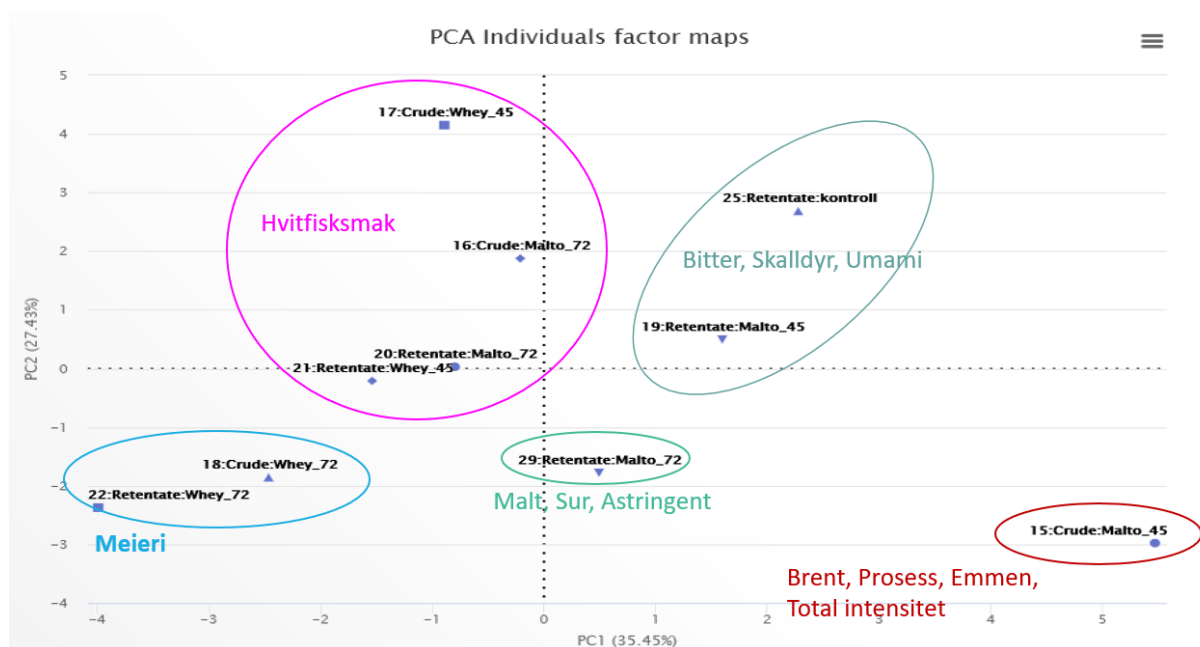
### 5.7.2 Sensorisk vurdering av maskerte hydrolysater fra AP1 og AP2 (Task 4.5)

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 22). 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. Hydrolysatene fra AP2, dvs Retentat og Crude, 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 22 Projective mapping med trent sensorisk panel basert på maskerte hydrolysater produsert i AP1 og AP2. Totalt 17 maskerte hydrolysater ble vurdert og presentert i observasjonsplottet (øverst). Tilhørende sensoriske egenskaper er presentert i variabelplottet (nederst). Hydrolysatene 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 23) 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 26). 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 23 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 26 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

## 5.8 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 i hydrolysatet (Tabell 27) 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 gjøres ved nanofiltrering av makrellhydrolysat, på grunn av det høye askeinnholdet. Produktet ble i tillegg vurdert som mer smaksrikt enn SH-Retentat, som ble produsert i AP2.1, av utrente prosjektdeltagere. Selv om det endelige sluttproduktet ikke møtte et ønskelig nøytralt smaksriteria, har det muligens et potensiale innen *petfood* eller som proteinberikende ingrediens i fiskeprodukter som fiskekaker, fiskepudding e.l.

Tabell 27 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	21,0
<200 Da	38,9

## 5.9 Resultatvurdering

### 5.9.1 Vurdering av sikkerhet og presisjon

Det er godt kjent at fiskens nærings sammensetning forandres gjennom året. Det hadde vært gunstig å gjenta forsøkene for å verifisere funn også i andre deler av året. Gjennomføringen av prosjektet hatt stort fokus på å kvalitetssikre resultater med statistikk, sikkerhet og presisjon i databehandling.

### 5.9.2 Vurdering av muligheter til videre bruk, og industriell implementering og nytteverdi for sjømatnæringen

Prosjekt hadde som mål å bidra til økt og bedre utnyttelse av proteinfraksjonen fra makrellavskjær. Dette er i tråd med bioøkonomien som sikter på helhetlig utnyttelse av råstoff fra matproduksjon. Prosjektet viser lovende resultater for produksjon av et smaksnøytralt proteinprodukt til humant

konsum i pilot-skala, men videre arbeid er nødvendig for å oppnå en tilsvarende prosess i industriell skala. Selv om det endelige sluttproduktet ikke møtte et ønskelig nøytralt smakskriteria, har det muligens et potensiale innen *petfood*. Prosjektgruppen har også erfaringer med at pulver med en balansert fiskesmak godt kan brukes som smaksforsterkende og/eller proteinberikende ingrediens i forskjellige produkter (posesupper e.l.). Videre er resultat og metoder utviklet i prosjektet industrielt relevante, særlig den analytiske og sensoriske metodikken som er utviklet, og kan brukes for å korte ned prosessutviklingstid i hydrolyseindustrien, uavhengig av hvilket råmateriale som blir brukt. Prosjektet har generert resultater som har potensial til å skape merverdi for pelagisk og annen fiskeriering generelt, men også for kunder som ønsker å bruke fiskeprotein. Det ligger også store nytteverdier i forskning som bidrar til en generell økt forståelse av hvilke komponenter som bidrar til uønsket fiskelukt/smak i proteinpulver fra fiskerestråstoff, samt gi svar på hvilken type prosessering som resulterer i et stabilt proteinprodukt.

## 6 Hovedfunn

- Valg av protease påvirker bittersmaken til proteinfraksjonene fra hydrolyse og det er mulig å produsere hydrolysat med lav bitterhet fra makrellrygg.
- Nanofiltering 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.
- Til tross for svært lave nivåer av fett i hydrolysatene viser prosjektet at fettoksidasjonsprodukter, som heksanal, og proteinoksidasjonsprodukter 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 fremstille et makrellhydrolysat som har lavere total smaksintensitet, bittersmak og fiskesmak enn et kommersielt relevant produkt (basert på laks) i pilotskala, men det er vanskelig å oppskalere til industriell skala, og ytterlige forsøk trengs før videre implementering i industrien.
- Det er mulig å produsere maskert spraytørket hydrolysat med bindemidler til testing i smakspaneler og det er mulig å kontrollere binding mellom myseprotein, hydrolysater og gum arabic med pH.

## 7 Referanser

- Aspevik, T., Gaarder, M.Ø., Wubshet, S.G., et al, 2021 Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL). Delrapport for AP2, AP3 og AP4. *Nofima rapport 8/2021*. ISBN 978-82-8296-672-6
- 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. 2020. Smaksnøytrale 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

## 8 Leveranser

### 8.1 Populærvitenskapelige artikler

Avskjær fra makrell skal bli proteinpulver uten lukt og smak. Fiskeribladet.no. 27. juni 2019.

[Avskjær fra makrell skal bli proteinpulver uten lukt og smak | Tekfisk](#)

Smaksprosjekt med smell – for makrell. Nofima.no 27 juni 2019.

[Smaksprosjekt med smell – for makrell | Nofima](#)

Skal lage lukt- og smakfritt proteinpulver av makrell-rester. Forskning.no 27 juni 2019.

[Skal lage lukt- og smakfritt proteinpulver av makrell-rester \(forskning.no\)](#)

Det er mulig å fjerne lukt og smak fra fiskeproteiner (forskjellige versjoner, i kronikk på Fiskeribladet.no og Nofima.no 8. April 2020 April 8, blogg på Sintef.no og Gemini.no 4. Mai 2020 og debatt i Teknisk ukeblad [nett] 8. mai, 2020). To eksempler:

[Det er mulig å fjerne lukt og smak fra fiskeproteiner - Tu.no](#)

[Det er mulig å lage smaksnøytrale protein av fisk | Fiskeribladet](#)

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

[Vil knekke makrellkoden med et SMELL - Kyst og Fjord](#)

### 8.2 Postere

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). 49th Conference of the West European Fish Technologists Association – WEFTA., Torshavn, Færøyene, 14-18 oktober 2019.

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. MR2020. Oslo, Norge. 7-8 januar, 2020.

### 8.3 Presentasjoner

Lindberg, D., Wubshet, S.G. Unravelling chemical fingerprints related to sensory attributes of protein hydrolysates. Case – SMELL. Oral presentation. Marint protein nettverk (MPN) fagdag. Webinar og fysisk møte. Gardermoen, Norway. Nov 5, 2020.

Lindberg, D. Smaksnøytrale proteiner fra makrell. Oral presentation. Pelagisk løft - økt bearbeiding av makrell. Bergen, Norway. Jan. 7, 2020.

### 8.4 Rapporter

Solstad, R.G, Vang, B., Gaarder, M.Ø, Molesworth, P. et al. 2020. Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL). Delrapport for AP1. Nofima rapport 15/2020. ISBN 978-82-8296-631-3.

Aspevik, T., Gaarder, M.Ø., Wubshet, S.G., et al, 2021 Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL).  
Delrapport for AP2, AP3 og AP4. Nofima rapport 8/2021. ISBN 978-82-8296-672-6 .



## 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
<b>Skalldyrsmak</b>	Smak av skalldyr, (kreps, krabbe, reker) Ingen intensitet = ingen skalldyrsmak Tydelig intensitet = tydelig skalldyrsmak
<b>Bryggesmak</b>	Relateres til en smak av brygge, fiskeslo, gamle fiskekasser Ingen intensitet = ingen bryggesmak Tydelig intensitet = tydelig bryggesmak
<b>Vassen smak</b>	Relateres til en vassen smak (avkok av poteter, tam) Ingen intensitet = ingen potetvannsmak Tydelig intensitet = tydelig potetvannsmak
<b>Meierismak</b>	Relateres til en smak av meieri (smør, melk, myse) Ingen intensitet = ingen meierismak Tydelig intensitet = tydelig meierismak
<b>Maltekstraktsmak</b>	Relateres til smak av maltekstrakt, malt Ingen intensitet = ingen maltekstraktsmak Tydelig intensitet = tydelig maltekstraktsmak
<b>Prosess smak</b>	Relateres til en kjemikalie, mekanisk, eksos smak. Ingen intensitet = ingen prosess smak Tydelig intensitet = tydelig prosess smak
<b>Brentsmak</b>	Relateres til en brent smak, svidd Ingen intensitet = ingen brent smak Tydelig intensitet = tydelig brent smak
<b>Harsksmak</b>	Styrken av alle harske smaker (gress, høy, stearin, maling) Ingen intensitet = ingen harsk smak Tydelig intensitet = tydelig harsk smak
<b>Total smaksintensitet</b>	Styrken av alle smaker i prøven Ingen intensitet = ingen smak Tydelig intensitet = tydelig smak

## **MUNNFØLELSE**

<b>Astringent</b>	En kompleks følelse, etterfulgt av sammentrekninger, tørrhetsfølelse, snurping av huden eller slimhinner i munnen Ingen intensitet = ingen astringens Tydelig intensitet = tydelig astringens
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

