



Rapport Bioaktive komponenter

Applikation af hydrolysater med ACE-inhiberende aktivitet i tomatsuppe

28. juli 2015
2000221-13
EHBR/LME/MT

Eva Honnens de Lichtenberg Broge, Camilla Bejerholm, Kirsten Jensen og Lene Meinert

Baggrund

22% af verdens befolkning over 18 år lider af forhøjet blodtryk (WHO, 2013). Forhøjet blodtryk bidrager til den samlede forekomst af hjertekar-sygdomme, der er estimeret til at blive en af de mest hyppigt forekommende dødsårsager i 2020 (WHO 2014). Forhøjet blodtryk er ligeledes en alvorlig problemstilling i Danmark, hvor det estimeres, at 20-25% af danskerne (18+) har forhøjet blodtryk (Ibsen et al. 2009, Kronborg et al. 2009). Den direkte årsag til forhøjet blodtryk kendes ikke, men det vides, at det angiotensin-konverterende enzym (ACE) spiller en central rolle i reguleringen af blodtrykket, og derfor er syntetiske ACE-inhibitorer ofte anvendt i behandling af forhøjet blodtryk. Alternativt til syntetisk fremstillede ACE-inhibitorer kan ACE-inhiberende bioaktive peptider udvindes fra animalske proteindråvarer. Nærværende forsøg tager afsæt i de sidste års aktiviteter inden for biprodukter og bioaktive komponenter gennemført under projektet "Bioaktive Komponenter". Projektet er finansieret af SAF og KAF, og denne rapport beskriver resultater for applikation af hydrolyserede svine- og okseråvarer.

Formål

Forsøget havde to overordnede formål:

1. At teste applikation af hydrolyserede råvarer fra svin og okse i en ikke-kødbaseret fødevarerematrice (tomatsuppe). Herunder:
 - a) Analyse af ACE-inhiberende aktivitet i de rene hydrolysater og efter tilsætning til tomatsuppe.
 - b) Dokumentation af spisekvalitet af tomatsuppe tilsat hydrolyserede animalske råvarer.
2. At undersøge holdbarheden af hydrolyserede biprodukter fra svin og okse med fokus på:
 - a) Ændringer i den ACE-inhiberende effekt under lagring
 - b) Eventuelle farveændringer i løbet af lagringsperioden

Konklusion

ACE-inhiberende aktivitet

ACE-inhiberende aktivitet blev bevaret med 55-56% i suppe tilsat hydrolyseret svinefedtende i forhold til de rene hydrolysater, mens suppe tilsat hydrolyseret oksemellemgulv blev bevaret med 139-155%. Dette muliggør indtagelse af produktet i mængder

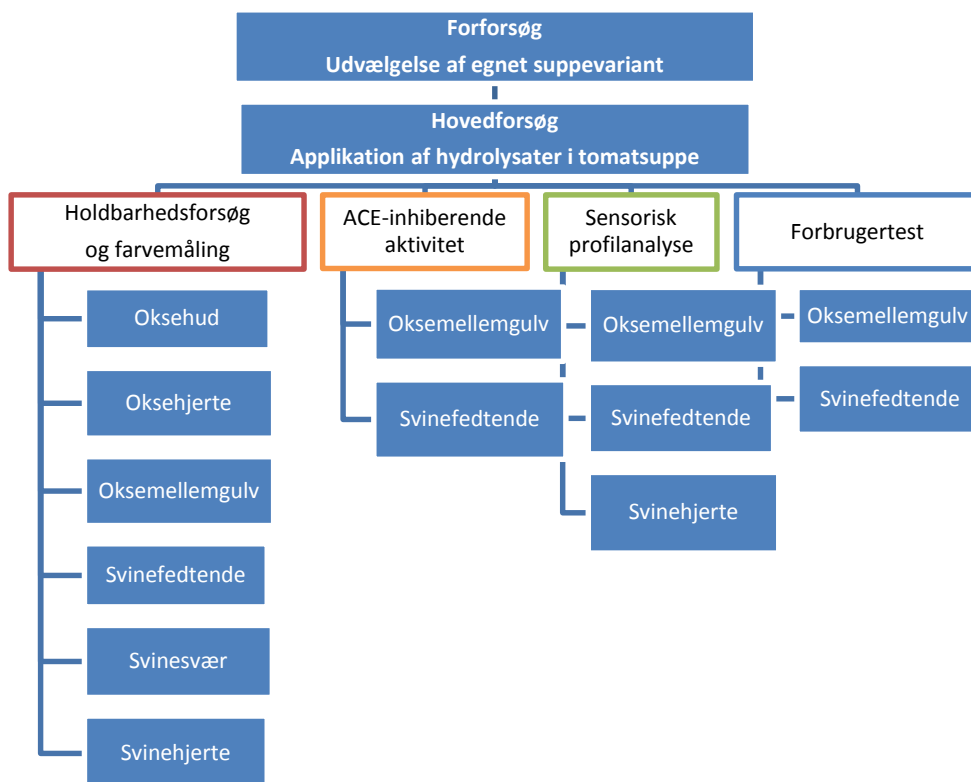
svarende til normal portionsstørrelse for at opnå effekt svarende til minimal vedligeholdelsesdosis af medicinske ACE-hæmmere. Det kan ikke umiddelbart forklares, hvorfor aktiviteten stiger i tomatsuppen tilsat hydrolyseret oksemellemgulv, ift. det rene hydrolysat, men fænomenet er også set i kødpølse for både hydrolyseret oksemellemgulv og svinefedtende.

- Sensorisk profil* Jo mere hydrolysat, der tilsættes suppen, jo mere intensiveres bismagen og jo mere neutraliseres suppens tomatsmag. Der blev endvidere set en generel øgning i cremethed ved tilsætning af hydrolysater.
- Forbrugerpræference* Jo mere hydrolysat, der tilsættes, jo mindre kunne forbrugerne lide suppen. Forbrugerne oplevede supper tilsat hydrolysatprodukter som discountagtige og kunstige. Kun 55% af forbrugerne kunne lide kontrolsuppen, hvilket kan have bidraget til at skubbe den overordnede liking af tomatsuppen i en negativ retning. 41% af forbrugerne mente, at funktionelle fødevarer kunne gavne deres sundhed, hvorimod 33% mente, at de er uigennemskuelige. 52% mente, at proteinberigede fødevarer er unødvendige, hvorimod 48% kunne se relevansen i forhold til at sikre et optimalt proteinindtag, enten i forbindelse med træning eller til vedligehold af muskelmasse.
- Lagringstid og -temperatur* Temperatur og lagringsperiode påvirkede den ACE-inhiberende aktivitet minimalt. ACE-inhiberende aktivitet for hydrolyseret oksehud viste varierende værdier hen over lagringsperioden, hvilket imidlertid tilskrives den meget lave ACE-inhiberende aktivitet i dette hydrolysat, som kan medføre større måleusikkerhed.
- Farve* For hydrolysater af oksehud og svinesvær påvirkede lagringstid og temperatur ikke farven væsentligt. Derimod blev hydrolysater baseret på svine- og oksehjerte mørkere under opbevaring, mens oksemellemgulvs- og svinefedtendehydrolysater blev lysere.

Materialer og metode

Forsøgsdesign

Figur 1 viser det overordnede forsøgsdesign, og hvilke hydrolysater der er anvendt i de enkelte forsøg.



Figur 1. Oversigt over studie samt anvendte hydrolysater for de enkelte forsøg.

Udvælgelse af fødevarematrice

Den bærende fødevarematrice blev valgt ud fra, at det skulle være et produkt, der var internationalt, generisk, vellidt på tværs af aldersgrupper og en ikke-kødbaseret fødevarematrice. Det blev derfor i samråd med branchen besluttet at teste hydrolysaterne i et suppeprodukt.

Forforsøg: Indledende screening af egnet suppevariant

Indledningsvist blev 5 kommercielle suppevarianter tilsat 8% hydrolyseret svinefedtende og oksemellemgulv smagstestet for at få et indtryk af, hvilke suppe- og smagsvarianter der egnede sig til applikation af hydrolysater. Hydrolyseret svinefedtende og oksemellemgulv blev anvendt i denne indledningsvise screening, da netop disse to hydrolysater var beskrevet med højest ACE-inhiberende effekt i et tidligere forsøg med kødpølse (Meinert, L. og Jensen, K. 2013; bilag 1). Hydrolysaterne blev tilsat til 5 forskellige suppevarianter, så de udgjorde 8% (vægt %). Supperne blev bedømt sensorisk i forhold til maskering af eventuel bismag på lugt og smag. Supperne blev derudover også vurderet på konsistens på en 4-punktsskala (Tabel 1). Tomat- og karrysuppe blev fundet velegnede, da de smagsmæssigt var acceptable, hvorimod græskarsuppen blev bedømt afvigende og dermed uacceptabel for begge hydrolysattyper. Tomatsuppe blev valgt, da den blev fundet acceptabel for begge hydrolysater.

Table 1. Sensorisk screening af suppevarianter på en 4-punktsskala: 1 = slet ikke afvigende – acceptabel, 2 = lidt afvigende men acceptabel, 3 = noget afvigende – uacceptabel, 4 = meget afvigende – uacceptabel.

Hydro-lysatsat	Suppevariant	Lugt	Smag (bitter)	Smag (kemisk)	Konsistens
Svinefedtende	Cup noodles med tomatsmag (instant)	1	1	1	1 ^{*)}
	Cup noodles med karrysmag (instant)	1	1	1	1
	Mou karrysuppe (frost)	1	2	2	1 ^{*)}
	Mou Græskar-Chili suppe (frost)	2	3	3	1
	Knorr Cup a soup tomatsmag (instant)	1	1	1	1
Oksemeltemgulv	Cup noodles med tomatsmag (instant)	1	1	1	1
	Cup noodles med karrysmag (instant)	1	1	1	1
	Mou karrysuppe (frost)	1	2	2	1
	Mou Græskar-Chili suppe (frost)	2	4	4	1
	Knorr Cup a soup tomatsmag (instant)	1	1	2	1

^{*)} Lidt tyk

Hovedforsøg

Fremstilling af tomatsuppe

Tomatsuppen blev fremstillet efter en recept udviklet til formålet og med afsæt i grundsmagene samt en hypotese om, hvordan bismag integreres bedst muligt. For at maskere bismagen blev der lagt vægt på, at tomatsuppen skulle have en intens og kompleks egensmag baseret på høj sødme-/syrebalance og umamismag. Recept samt fremgangsmåde findes i bilag 2. De færdige supper blev sat på køl ved 4°C i køleskab indtil den efterfølgende dag, hvor der blev gennemført kvalitetsanalyser.

Analyse af ACE-inhiberende aktivitet i hydrolysat og suppe

Den ACE-inhiberende aktivitet blev bestemt ved følgende fremgangsmåde:

Hydrolysat/suppe afvejes (mg) og fortyndes i målekolbe. Der fremstilles en fortyndingsrække, der passer til den enkelte prøves forventede ACE-aktivitet. 100 µl substrat (hippuryl-L-histidyl-L-leucin, HHL), tilsættes 12 µl hydrolysat/suppe opløst i boratbuffer 0,1 M. Reaktionen startes ved at tilsætte 40 µl ACE-opløsning. Reaktionsblandingen inkuberes i 30 min ved 37°C på vandbad, og reaktionen afsluttes ved tilsætning af 1100 µl 0,1 M saltsyre (HCl). Hippursyre (HA), omdannet fra HHL med ACE, ekstraheres med 3,0 ml ethylacetat, der tilsættes prøven under kraftig omrystning på Whirly-mixer efterfulgt af centrifugering i 10 min. ved 2500 rpm. 2 ml af ethylacetatlaget overføres til et reagensglas og tørres i inddamper ved 50°C i 10 min. HA opløses i 2 ml 0,1 M natriumchlorid, og absorbansen ved 228 nm bestemmes i engangskuvetter.

Beregning af bevaret ACE-inhiberende effekt

Den bevarede ACE-inhiberende effektivitet i tomatsuppen, i forhold til de rene hydrolysater, er beregnet som anført i nedestående eksempel med svinefedtende. For at få et overblik over bevaret aktivitet for alle supperne henvises til resultatafsnittet.

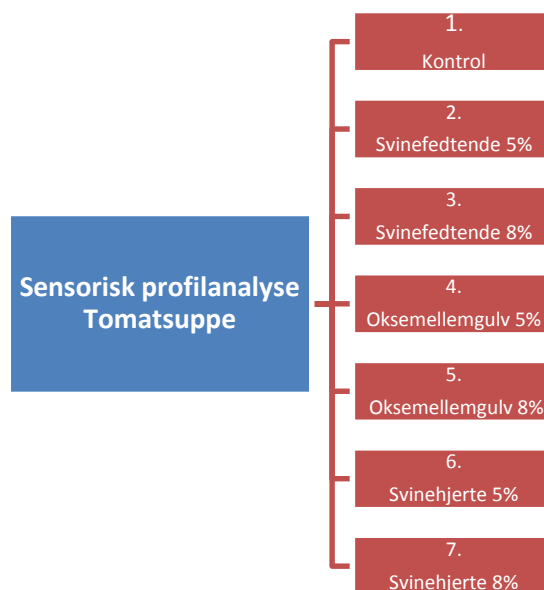
Ex. tomatsuppe tilsat 5% hydrolysat fra svinefedtende:

Der opnås 50% inhibering af aktiviteten (IC50) ved 2 mg/ml hydrolysat i ren opløsning pr. ml og $(58 * 0,05) = 2,9$ mg hydrolysat/ml tilsat tomatsuppen.

- Effektiviteten af rent hydrolysat: 100%
- Effektiviteten i hydrolysat tilsat tomatsuppe = $(100\%/2 \text{ mg/ml}) \cdot (2-2,9) \text{ mg/ml} = 45\%$
- Effektivitet i forhold til ren hydrolysat = $100-45\% = 55\%$

Sensorisk profilanalyse

Den sensoriske profilanalyse blev udført på i alt 7 forskellige tomatsupper som vist i figur 2.



Figur 2. Oversigt over tomatsupper med tilsatte hydrolysater til sensorisk profilanalyse

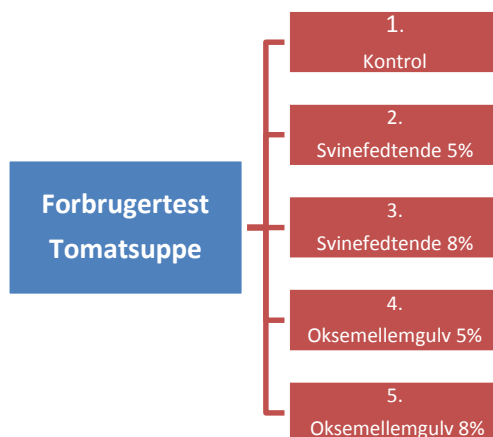
Applikationsforsøg med hydrolysater i kødpølse i 2013 viste, at hydrolyserede svinefedtender, oksemellemgulv og svinehjerter bevarede den ACE-inhiberende aktivitet i den forarbejdede kødpølse med over 100% (bilag 1) sammenlignet med de rene hydrolysater, og derfor blev disse udvalgt til applikation i tomatsuppen. Hydrolysaterne blev tilsat tomatsuppen i to koncentrationer på hhv. 5% og 8% (vægt %). Disse to koncentrationer blev valgt, da det var muligt at tilsætte op til 8% hydrolysat i et kommercielt suppeprodukt i den indledende screening uden at smagen afveg. Det blev besluttet også at teste tilsætning af 5% hydrolysat ud fra en formodning om, at en "hjemmelavet" suppe ville være mindre effektiv til at maskere en eventuel bismag, da den ikke indeholdt smagsforstærker.

Gennemførelse Den sensoriske bedømmelse blev gennemført med 9 trænede smagsdommere og indledtes med to træningssessioner med udvikling af et ordsæt til beskrivelse af supperne. Profilbedømmelse blev herefter gennemført for 7 supper, hvor dommerne bedømte intensiteten af de valgte egenskaber. Supperne blev serveret i opvarmede 50 ml glas med ca. 30 ml i hvert glas ved en serveringstemperatur på 55°C. Prøverne blev randomiseret, så smagsdommerne ikke smagte på supperne i samme rækkefølge.

Forbrugertest

Forbrugertesten blev gennemført på DMRI med forbrugere rekrutteret gennem Teknologisk Instituts intranet.

Forbrugerne vurderede fem supper, der blev udvalgt på grundlag af den sensoriske profilbedømmelse:



Figur 3. Oversigt over tomatsupper med tilsatte hydrolysater vurderet af forbrugere.

Bedømmelse Forbrugerne bedømte, hvor godt de kunne lide hver enkelt suppe på en 15 cm ustruktureret linjeskala (skala fra 0 til 15, hvor 0 = kan slet ikke lide og 15 = kan rigtig godt lide). Dernæst bedømtes en række holistiske ord såsom: spændende, kunstig, indbydende, velkendt, discount og eksklusiv (skala fra 0 til 15, hvor 0 = i ringe grad og 15 = i høj grad) – se bilag 4. Endelig blev forbrugerne spurgt om alder og køn samt deres holdning til funktionelle fødevarer og proteinberigede fødevarer. Tomatsupperne blev serveret som beskrevet i afsnittet om sensoriske profil.

Statistik Forbrugerliking blev analyseret med en lineær mixed model (Lmer test) i R.

Holdbarhed

ACE-inhiberende aktivitet Holdbarheden af den ACE-inhiberende aktivitet i hydrolysaterne blev undersøgt ved et lagringsforsøg hen over 3 mdr. ved tre forskellige temperaturer (5°C, 20°C og 40°C) for at illustrere 3 opbevaringsscenarier ved køleskabstemperatur, stuetemperatur og ekstrem varme, der kan forekomme under fx containertransport i Asien. Der blev afmålt 50 g af hvert hydrolysat, der under lagringen blev opbevaret i en petriskål, vakuumpakket i poser. Den ACE-inhiberende aktivitet blev bestemt med et spektrofotometrisk baseret ACE-inhiberende assay målt i de rene hydrolysater på dag 0, 45 og 90.

Farvemåling Farvemåling blev udført på de rene hydrolysater med udtag dag 0, 45 og 90 for at kunne udbygge viden om holdbarhed af hydrolysaterne i relation til eventuelle ændringer i farve. 50 g afvejede hydrolysat blev fordelt i et jævnt lag i en petriskål, og der blev herefter udvalgt et område til farvemåling af L* (lyshed), a* (rød-grøn) og b* (blå-gul) værdier, målt på blå baggrundsplade i VideometerLab (VideometerLab, Videometer A/S – Visionteknologi, Hørsholm). Den overordnede farvedifferens (ΔE) blev beregnet ved $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*^2) + (\Delta b^*^2) + (\Delta L^*^2)}$, hvor $\Delta E = 0-1$ indikerer en usynlig forskel; $\Delta E = 1-2$

indikerer en lille forskel, der kan ses af et trænet øje; $\Delta E = 2-3,5$ indikerer en synlig forskel for et ikke-trænet øje; $\Delta E = 3,5-5$ indikerer en tydelige forskel; og $\Delta E = >5$ indikerer en meget tydelig forskel.

Resultater og diskussion

Bevaret ACE-inhiberende effekt i tomatsuppen

For en optimal applikation af hydrolysater i fødevarerprodukter er det afgørende, at den ACE-inhiberende aktivitet bevares i det forarbejdede produkt. I tabel 2 vises værdier for den ACE-inhiberende aktivitet målt i de rene hydrolysater sammenlignet med den ACE-inhiberende aktivitet målt i tomatsuppe. Svinefedtende har den mest effektive inhiberingsevne i de rene hydrolysater, men bevarer kun omkring 55% af aktiviteten i tomatsuppen. I modsætning hertil bevarer hydrolyseret oksemellemgulv 5 og 8% hhv. 152 og 139% af aktiviteten på trods af en mindre effektiv inhiberingsevne i de rene hydrolysater.

Tabel 2. Bevaret ACE-aktivitet i de rene hydrolysater sammenlignet med aktivitet i det forarbejdede suppeprodukt.

	ACE IC ₅₀ hydrolysat	ACE IC ₅₀ , mg suppe/ml	Omregnet til mg Hydrolysat/ml	Effektivitet bevaret, %
5% svinefedtende	2	58	2,9	55
8% svinefedtende	2	36	2,9	56
5% oksemellemgulv	10	96	4,8	152
8% oksemellemgulv	10	76	6,1	139

Et applikationsforsøg med kødpølse i 2013 viste ligeledes en aktivitetsforøgelse af den ACE-inhiberende effekt i kødpølsen sammenlignet med aktiviteten i det rene hydrolysat. Da de to typer af hydrolysater er håndteret ens og tilsat den samme suppe, kan en forklaring være forskelle i den primære forarbejdning af hydrolysaterne, hvor især spraytørring har stor indflydelse på graden af proteinernes denaturering.

Hvor meget suppe skal man spise for at opnå en effekt?

Det er essentielt at overveje, hvor meget af de færdige fødevarer der skal indtages for at opnå en eventuel blodtryksnedsættende effekt. I det følgende sammenlignes med lægemidlet Captopril (ACE-hæmmer). Beregningerne bygger på en række antagelser beskrevet i notatet "Pille eller pølse" (Kirsten Jensen, DMRI, 2013).

Beregningsgrundlag:

Captopril IC₅₀ = 4,8 µg/ml

Svinefedtende IC₅₀ = 2 mg/ml

Vedligeholdelsesdosis ved forhøjet blodtryk er 25-150 mg Captopril hver 8.-12. time

Antagelser:

Vægtfylden af tomatsuppen antages at være 1 g/ml.

Omregning:

25 mg Captopril svarer til 10,4 g hydrolyseret svinefedtende.

(2 mg/ml / 4,8 µg/ml * 25 mg = 10,4 g)

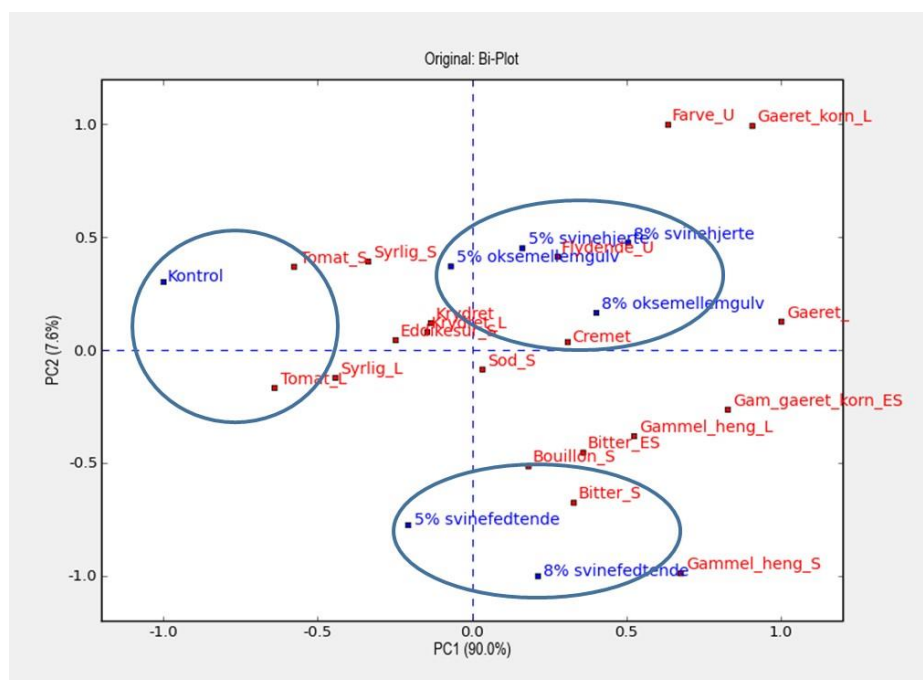
Tomatsuppe med højeste niveau (8%) af hydrolyseret svinefedtende indeholder 8 g hydrolysat pr. 100 ml. For at en opnå en ACE-inhiberende aktivitet svarende til den mindste vedligeholdelsesdosis for medicinske ACE-hæmmere, skal der således indtages:

- 130 ml tomatsuppe, forudsat at 100% af aktiviteten bevares i suppen
- 232 ml tomatsuppe, forudsat at 56% af aktiviteten bevares i suppen iht. tabel 2.

Sensorisk profilanalyse

Den sensoriske profilanalyse blev udført på 7 forskellige supper (se figur 2 for oversigt).

Figur 5 viser et PCA-plot med den overordnede sensoriske variation primært forklaret i PC1 (90,0%). Der ses en gruppering af hydrolysaterne, således at kontrollen er adskilt fra de øvrige og forklares med egenskaberne tomatsmag og -lugt. Supper med tilsat hhv. svinehjerter (5 og 8%) og oksemellemgulv (5 og 8%) minder om hinanden og beskrives med egenskaberne flydende og cremet. Svinefedtende (5 og 8%) beskrives med egenskaberne gammel/hengemt smag, bitter smag og bouillonsmag.



Figur 5. PCA-plot, der viser den sensoriske variation for bedømmelsen af de 6 tomatsupper tilsat hydrolyserede svine- og okseprodukter og en kontrolsuppe. Den sensoriske variation er forklaret med 90,0% i PC 1 og 7,6% i PC2.

Tabel 3. Resultat af sensorisk bedømmelse (gennemsnit af 9 dommere og 4 gentag). Bogstaverne angiver, om gennemsnittene adskiller sig signifikant fra hinanden (LSD Bonferroni er anvendt).

	Egenskab	Produkter							P-værdi	
		Kontrol	Svinefedtende			Svinehjerte		Oksemellemgulv		
		0%	5%	8%	5%	8%	5%	8%		
Udseende	Farve_U	2,4 ^d	3,4 ^{cd}	4,1 ^{bcd}	5,6 ^{ab}	6,8 ^a	4,6 ^{bc}	5,5 ^{ab}	P<0,001	
Lugt	Tomat_L	6,3 ^a	4,3 ^b	3,2 ^{bc}	2,9 ^{bc}	2,4 ^c	3,6 ^{bc}	2,7 ^c	P<0,001	
	Syrlig_L	5,7 ^a	3,9 ^b	3,7 ^b	3,3 ^b	2,8 ^b	3,8 ^b	3,0 ^b	P<0,001	
	Krydret_L	3,9 ^a	3,2 ^b	3,0 ^b	2,9 ^b	3,0 ^b	3,1 ^b	3,2 ^b	P<0,001	
	Gammel/hengemt_L	1,4 ^b	3,8 ^a	4,4 ^a	4,0 ^a	4,7 ^a	3,2 ^{ab}	4,4 ^a	P<0,001	
	Gæret korn_L	1,0 ^c	2,5 ^{bc}	4,2 ^{ab}	5,2 ^a	6,5 ^a	4,5 ^{ab}	6,4 ^a	P<0,001	
Smag	Tomat_S	7,0 ^a	4,8 ^{bc}	3,7 ^{bc}	4,3 ^{bc}	3,6 ^{bc}	5,1 ^b	3,4 ^c	P<0,001	
	Syrlig_S	6,0 ^a	4,4 ^b	3,9 ^b	4,5 ^a	4,0 ^a	4,8 ^{ab}	3,9 ^a	P<0,001	
	Eddikesur_S	5,3 ^a	4,0 ^b	4,0 ^b	3,9 ^b	3,7 ^b	3,8 ^b	3,9 ^b	P<0,001	
	Bitter_S	3,1 ^b	4,7 ^{ab}	5,8 ^a	4,3 ^{ab}	5,1 ^a	4,3 ^{ab}	5,0 ^a	P<0,001	
	Sød_S	3,4	3,7	3,8	3,5	4,0	3,7	3,2	NS	
	Bouillon_S	3,6	4,9	5,3	4,4	5,0	4,3	4,4	NS	
	Krydret_S	4,7 ^a	3,9 ^{ab}	3,8 ^{ab}	3,7 ^b	4,1 ^{ab}	3,8 ^{ab}	3,6 ^b	P<0,05	
	Gammel/hengemt_S	1,0 ^b	4,4 ^a	5,7 ^a	4,1 ^a	5,1 ^a	3,4 ^a	5,1 ^a	P<0,001	
Gæret_S	1,0 ^c	4,0 ^b	5,9 ^{ab}	5,7 ^{ab}	7,2 ^a	5,0 ^{ab}	6,6 ^a	P<0,001		
Eftersmag	Bitter_ES	2,4 ^b	3,5 ^{ab}	4,9 ^a	3,7 ^{ab}	4,5 ^a	3,6 ^{ab}	4,3 ^a	P<0,001	
	Gammel/gæret korn_ES	0,9 ^b	3,9 ^a	5,3 ^a	4,8 ^a	5,8 ^a	4,0 ^a	5,9 ^a	P<0,001	
Tekstur	Cremet_T	3,9 ^b	5,3 ^a	5,4 ^a	5,5 ^a	6,1 ^a	5,5 ^a	5,7 ^a	P<0,001	
	Flydende_T	3,9 ^b	4,3 ^b	4,8 ^{ab}	5,2 ^{ab}	5,9 ^a	5,0 ^{ab}	5,2 ^{ab}	P<0,01	

Lugt Det var primært kontrolsuppen, der adskilte sig fra de øvrige supper på egenskaberne tomatsmag og -lugt, syrlig smag og krydret lugt (tabel 3).

Kontrolsuppen havde en signifikant højere intensitet af tomat-, syrlig og krydret lugt, og signifikant mindre gammel/hengemt og gæret kornlugt sammenlignet med de øvrige supper. Dog var kontrolsuppen og suppen tilsat 5% svinefedtende ikke forskellige mht. gæret kornlugt. Der var ingen signifikant effekt af doseringsniveau (5 og 8% hydrolysat) på de beskrevne lugtegenskaber.

Udseende Suppe tilsat 8% hydrolyseret oksemellemgulv og suppe tilsat hhv. 5 og 8% hydrolyseret svinehjerte var karakteriseret ved en mere brunlig farve, sammenlignet med de øvrige supper. Der var ingen signifikant effekt af doseringsniveau på udseende.

Smag Smagsmæssigt adskilte supperne tilsat hydrolysat sig fra kontrolsuppen ved at have en mindre intens tomat-, syrlig og eddikesur smag og mest bitter, gammel/hengemt samt gæret kornsmag. Sammenligning af doseringsniveau inden for de enkelte hydrolysater viste kun en smagsforskel for hydrolyseret oksemellemgulv på egenskaben tomat-smag, med en mere intens tomatsmag ved 5% sammenlignet med 8%.

Konsistens Cremetoden blev øget ved tilsætning af hydrolysaterne, hvilket også betød, at suppen blev mere tykflydende.

Eftersmag

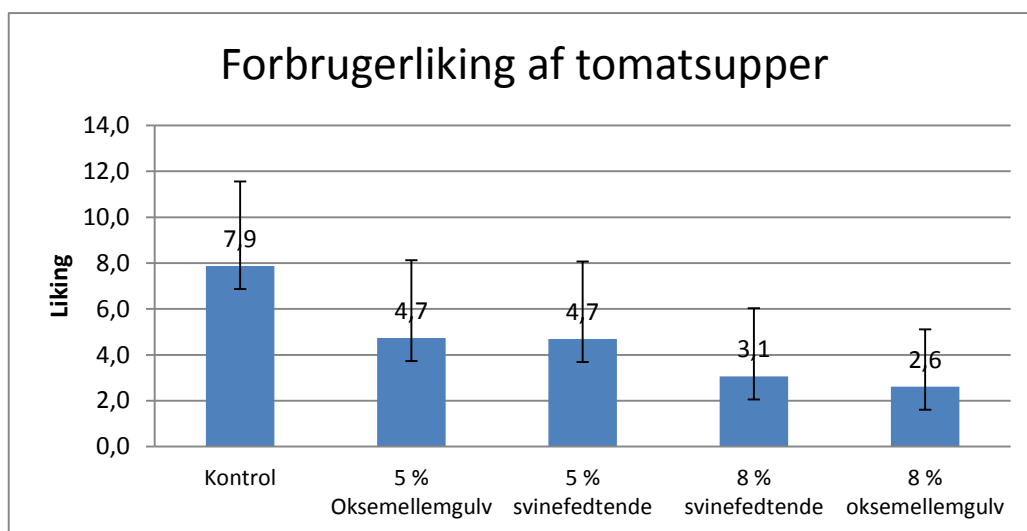
Kontrolsuppen havde en signifikant mindre gammel/gæret korneftersmag sammenlignet med de øvrige supper, som ikke adskilte sig fra hinanden. Mht. bitter eftersmag var det kun de højeste doseringer (8%) af hydrolysaterne, der gav en signifikant højere intensitet af bitter eftersmag sammenlignet med kontrolsuppen.

Forbrugertest

Liking

Forbrugertesten blev gennemført på DMRI med medarbejdere fra Teknologisk Institut. Der deltog i alt 49 forbrugere, 22 mænd og 27 kvinder i alderen 24-64 år med en gennemsnitsalder på 46 år.

Overordnet var der en tydelig forskel på, hvor godt forbrugerne kunne lide supperne med en klar præference for kontrolsuppen ($P < 0,001$). Figur 6 viser, at forbrugerne i gennemsnit bedst kunne lide kontrolsuppen efterfulgt af suppen tilsat 5% hydrolyseret svinefedtende sammen med suppen tilsat 5% hydrolyseret oksemellemgulv. Forbrugere kunne mindst lide suppen tilsat 8% hydrolyseret oksemellemgulv ($P < 0,001$).

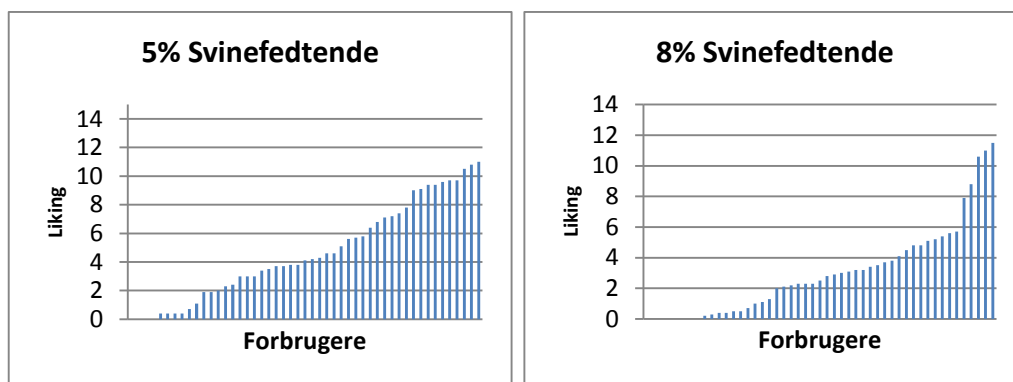


Figur 6. Gennemsnitlig forbrugerliking af tomatsupper grupperet på hydrolysatype og mængde (Kontrol 0%, Oksemellemgulv 5 og 8%, Svinefedtende 5 og 8%). Standardafvigelsen er vist.

Variation i forbrugerliking

Svinefedtende

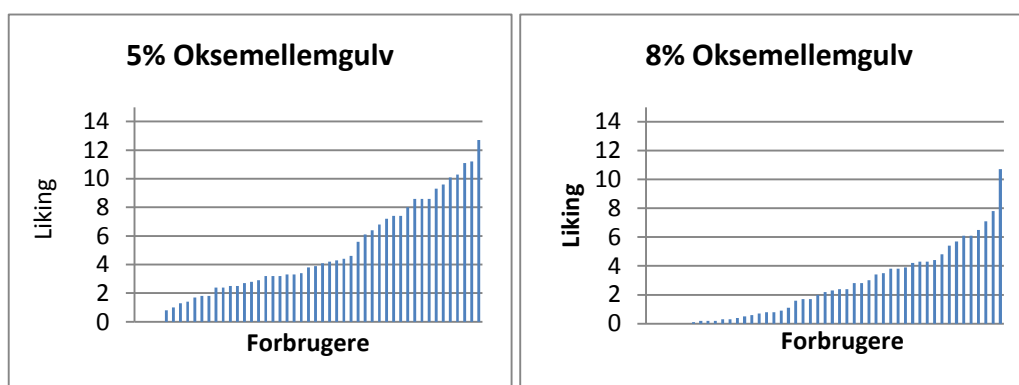
Figur 7 viser variationen mellem forbrugernes bedømmelser af tomatsuppe tilsat hydrolyseret svinefedtende. Den tilsatte mængde hydrolysat havde stor indflydelse på, hvor godt forbrugerne kunne lide suppen. Det antages, at forbrugere, der har givet karakteren 8 og derover, godt kan lide suppen. 20% af forbrugerne kunne lide suppen tilsat 5% hydrolyseret svinefedtende, mens kun 8% kunne lide suppen tilsat 8%. 55% af forbrugere kunne lide kontrolsuppen.



Figur 7. Frekvensfordeling af forbrugernes liking af tomatsuppe, tilsat henholdsvis 5% og 8% hydrolyseret svinefedtende. Skala 0 til 15, hvor 0 = kan slet ikke lide og 15 = kan rigtig godt lide.

Oksemellemgulv

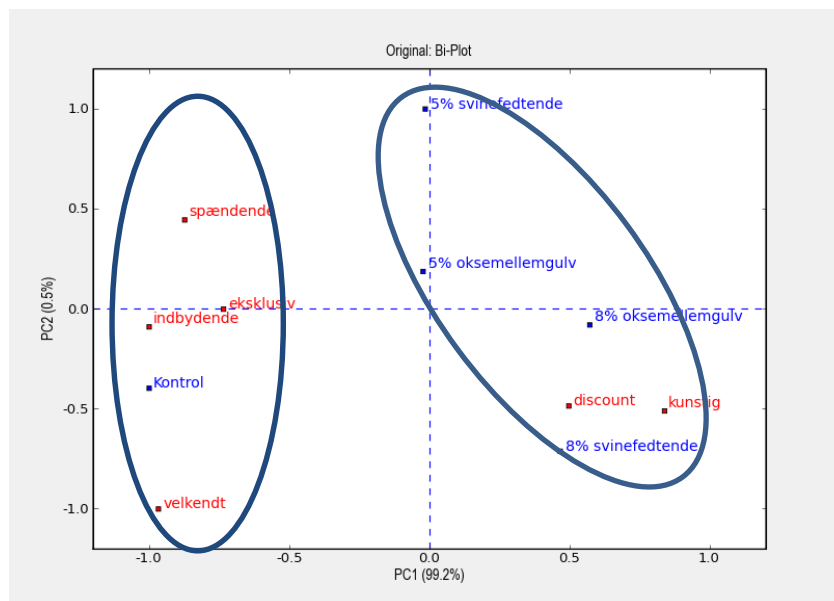
Variationen i forbrugerliking for suppe tilsat hydrolyseret oksemellemgulv er vist i figur 8. 22% af forbrugerne kunne lide tomatsuppen tilsat 5% hydrolyseret oksemellemgulv, hvorimod kun 2% kunne lide tomatsuppen tilsat 8% oksemellemgulv, hvilket svarer til, at kun én forbruger brød sig om den.



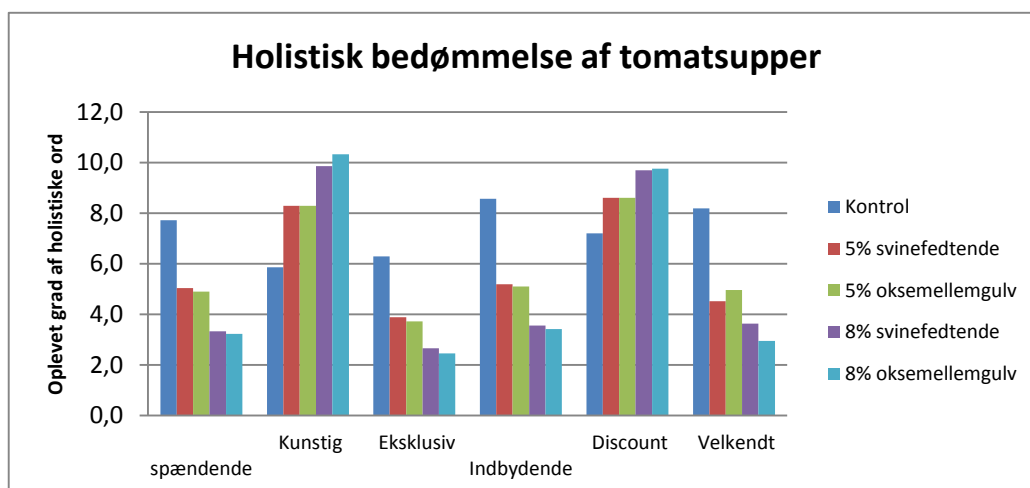
Figur 8. Frekvensfordeling af forbrugernes liking af tomatsuppe, tilsat henholdsvis 5% og 8% hydrolyseret oksemellemgulv. Skala 0 til 15, hvor 0 = kan slet ikke lide og 15 = kan rigtig godt lide.

Holistisk bedømmelse

Supperne blev yderligere vurderet af de samme 49 forbrugere på 6 holistiske ord, der skulle beskrive, hvordan forbrugerne oplevede supperne tilsat hydrolysat. I figur 9 ses, hvordan de holistiske ord grupperer sig i forhold til de 5 tomatsupper, og figur 10 viser gennemsnitsværdier for den holistiske bedømmelse.



Figur 9. PCA-plottet viser grupperingen af de holistiske ord i forhold til de fem tomat supper.

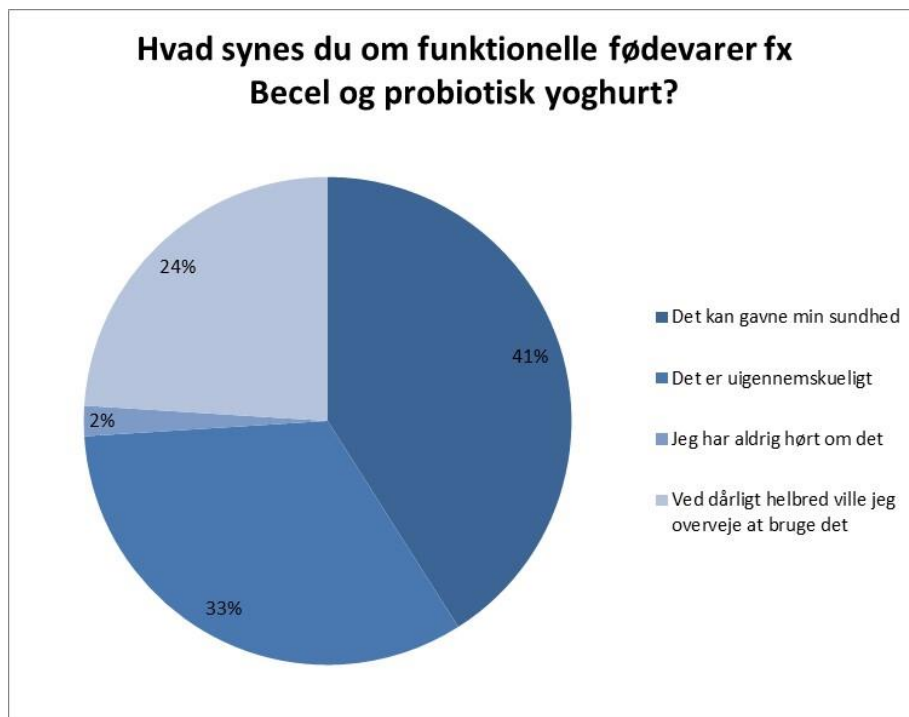


Figur 10. Figuren viser gennemsnitsværdier for holistisk bedømmelse (n=49). Skala 0 til 15, hvor 0 = i ringe grad og 15 = i høj grad

Supperne tilsat 5% og 8% hydrolysat blev oplevet som "kunstige" og "discountagtige". Kontrolsuppen blev primært oplevet som "indbydende" og "velkendt", hvilket peger på, at suppen som udgangspunkt blev oplevet positivt, og at det er de tilsatte hydrolysater, der bidrager til de negativt ladede ord. Dog skal det tages i betragtning, at kun 55% af forbrugerne kunne lide kontrolsuppen.

Holdning til funktionelle fødevarer

Forbrugerne blev spurgt om deres generelle holdning til funktionelle fødevarer, som det kendes fra produkter som fx Becel og probiotisk yoghurt (figur 11). Generelt set er funktionelle fødevarer en produktkategori, de adspurgte forbrugere er bekendte med, da kun 2% aldrig har hørt om det tidligere. 24% ville overveje det ved dårligt helbred, hvilket antyder, at nogle forbrugere opfatter denne produkttype mere som sundhedsfremmende eller kun overvejer anvendelse, når der er et særligt behov i modsætning til et fødevarerprodukt anvendt som en del af hverdagskosten.



Figur 11. Procentvis svarfordeling af forbrugerholdninger til funktionelle fødevarer for 49 adspurgte forbrugere.

Holdning til protein berigede produkter

Forbrugerne blev ligeledes spurgt om deres holdning til proteinberigede produkter (figur 12). En forklaring på, at 52% mener, at proteinberigelse er unødvendigt, kan være, at den adspurgte forbrugergruppe (gennemsnitsalder = 46 år) ikke identificerer sig med målgruppen for proteinberigede produkter, der primært markedsføres i fitnesscentre. 22% svarede, at det er en god måde at sikre et optimalt proteinindtag, mens 18% svarede, at det kun var relevant i forbindelse med træning. En forklaring på disse to grupperinger kan muligvis være, at de (22%) har en ernæringsmæssig forståelse af behovet for et optimalt proteinindtag mod de 18%, der primært opfatter proteintilskud i relation til (muskel) træning. Kun 8% svarer, at det er en hjælp til vedligeholdelse af muskelmasse og god fysik. Dette er ofte anbefalet i forbindelse med sund aldring og rettet mod 60+ segmentet, hvilket udgjorde 12% af den adspurgte forbrugergruppe (data ikke vist).

Hvad synes du om produkter tilsat ekstra protein?

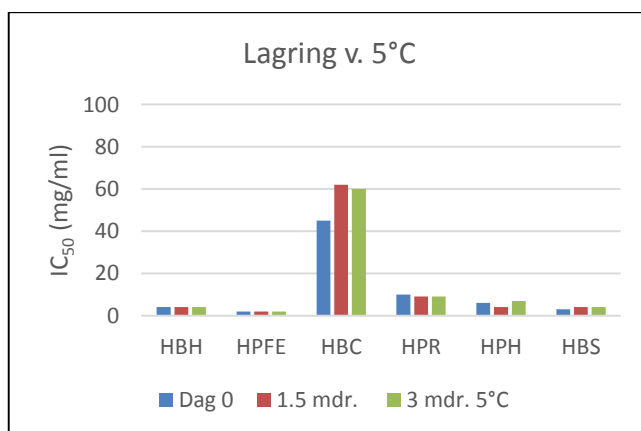


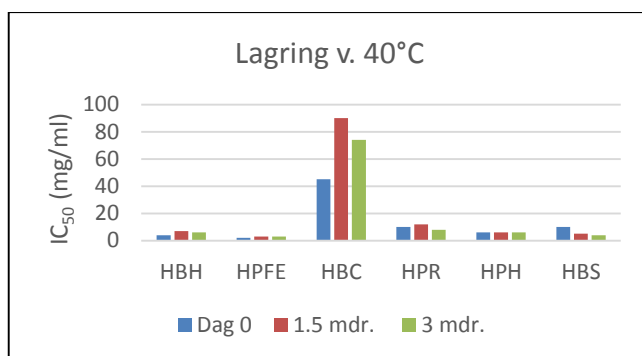
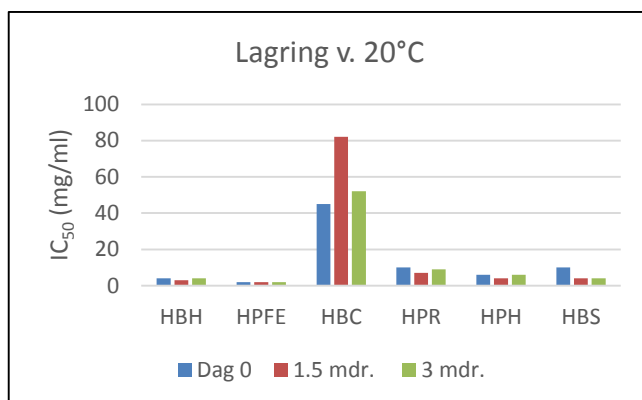
Figur 12. Procentvis svarfordeling af forbrugerholdninger til proteintilskud.

Holdbarhed

ACE-inhiberende effekt

For størstedelen af hydrolysaterne var der minimal effekt af såvel lagringsperiode som opbevaringstemperatur på ACE-aktiviteten, jf. figur 4. Det var primært den ACE-inhiberende aktivitet i hydrolyseret oksehud, der viste ustabile ACE-værdier. Her blev aktiviteten reduceret fra dag 0 til dag 45 ved samtlige lagringstemperaturer, men blev øget igen fra dag 45 til 90, ved 20°C og 40°C. Dette kan ikke umiddelbart forklares, og der er ikke tale om analysefejl. Hydrolyseret oksehud havde en væsentlig lavere ACE-inhiberende aktivitet (høj IC_{50} værdi) sammenlignet med de øvrige hydrolysater, hvilket kan have medvirket til at give de varierende ACE-værdier. Den lave aktivitet betyder, at der til analysen skal tilsættes en meget større mængde af hydrolysat til assayet, og dette kan medføre varierende resultater. Analysen blev ikke kørt om for hydrolyseret oksehud, da den konsekvent og markant lavere ACE-inhiberende aktivitet betyder, at oksehud som naturlig ACE-hæmmer er uinteressant.





Figur 4. ACE-aktivitet for hydrolyserede svine- og okseprodukter lagret ved 5°C, 20°C og 40°C med udtag 0 dage, 45 dage og 90 dage. HBH oksehjerte; HPFE svinefedtende; HBC oksehud; HPR svinesvær; HPH svinehjerter; HBS oksemellemgulv

Farve

Ud fra VideometerLab-farvemålingerne er der beregnet farvedifferens (ΔE) baseret på de målte L^* -, b^* - og a^* -værdier for de seks hydrolysater efter 0, 45 og 90 dages lagring ved 5, 20 og 40 °C.

I tabel 4 er ΔE -værdierne angivet for de tre tidsintervaller, hvor det væsentligste bidrag kommer fra L - og b -værdierne. Resultaterne fra disse parametre viste overordnet set, at hydrolysater baseret på svine- og oksehjerte blev mørkere (mere gullige) under opbevaring, mens oksemellemgulv- og svinefedtendehydrolysater blev lysere. Hydrolysater baseret på oksehud og svinesvær var de mest farvestabile under lagring.

Tabel 4. Farvedifferens (ΔE) fra dag 0 til dag 45, fra dag 45 til dag 90 og fra dag 0 til dag 90. $\Delta E = 0-1$ indikerer en usynlig forskel og $\Delta E = 1-2$ indikerer en lille forskel, der kan ses af et trænet øje. $\Delta E = 2-3,5$ indikerer synlige forskelle (lyserød markering), $\Delta E = 3,5-5$ er tydelige forskelle (mellemrød markering) og endelig indikerer $\Delta E = >5$ meget tydelige forskelle (mørkerød markering).

	5°C			20°C			40 °C		
	0-45 dage	45-90 dage	0-90 dage	0-45 dage	45-90 dage	0-90 dage	0-45 dage	45-90 dage	0-90 dage
Oksehjerte	1,3	8,6	8,9	8,8	0,4	9,0	12,4	0,3	12,7
Oksehud	0,5	0,2	1,7	1,4	0,4	1,8	1,8	0,1	1,8
Oksemellemgulv	0,4	5,4	5,4	4,8	0,6	5,3	4,4	0,7	4,6
Svinehjerte	0,6	10,4	9,9	10,2	0,4	10,1	13,8	1,0	13,5
Svinesvær	0,3	0,4	0,6	0,5	0,6	1,0	2,7	0,3	2,5
Svinefedtende	0,3	13,3	13,1	13,1	1,4	13,7	12,1	0,5	11,8

Overordnet diskussion

I dette studie blev applikation af hydrolyserede råvarer fra svin og okse udvalgt på baggrund af deres ACE-inhiberende aktivitet og testet i en tomatsuppe. Flere studier har vist, at det er afgørende, at produkter er genkendelige mht. type og smag, hvis man vil opnå succes, når nye produkter introduceres på markedet. Tomatsuppe er som udgangspunkt et velkendt produkt på tværs af alder og kulturer, hvorfor det blev vurderet velegnet til et applikationsforsøg. Derudover kan suppe både spises som hoved- og mellemmåltid.

Hovedfundet i dette forsøg var, at den bevarede ACE-inhiberende aktivitet i det færdige suppeprodukt var af en størrelsesorden, der muliggør indtagelse af en mængde, der svarer til den minimale vedligeholdelsesdosis for medicinske ACE-hæmmere. Som eksempel kan nævnes, at suppe tilsat 8% hydrolyseret svinefedtende skal indtages i en mængde på ca. 200 ml, hvilket svarer til en normal suppeportion.

Hydrolyserede råvarer fra slagting af svin og kvæg anvendt i dette forsøg er i tidligere forsøg blevet beskrevet med markant bismag, og dette bekræftedes i dette studie. Især bitter eftersmag øgedes med stigende hydrolysatdosering, og generelt var forbrugerliking mindre for supper tilsat hydrolysat end kontrolsuppen.

Desuden viste den indledende screening af kommercielle suppevarianter potentiale for tilsætning af op til 8% hydrolyseret svinefedtende. Tomatsuppen har i dette forsøg være et genkendeligt produkt, men smagsmæssigt har selv kontrolproduktet ikke været sammenligneligt med velkendte produkter på markedet, da kun 55% af forbrugerne kunne lide kontrolsuppen. Smagsintensiteten af tomatsuppen kunne ikke opveje hydrolysatets bismag. Jo mere hydrolysat, der tilsættes, jo mere neutraliseres tomatomaen, samtidig med at cremetheden og tykkelsen øges. Derfor skal viskositeten af suppen overvejes inden tilsætning af hydrolysatet.

I forhold til holdbarhed af de rene hydrolysater fandt vi i dette forsøg, at den ACE-hæmmende effekt for de 2 udvalgte hydrolysater ikke blev påvirket af en lagringstid eller opbevaringstemperatur. Dog er ikke alle hydrolysater lige farvestabile, og det kan derfor være en fordel, at bærerproduktets udseende udvælges, så det ikke påvirkes af dette. Fx vil det ikke bemærkes i en tomatsuppe, hvis den anvendte hydrolysattype skulle blive en smule mørkere i farven, da suppen er mørkere end hydrolysateret.

Fremadrettet vil det være relevant at undersøge betydning af processeringsparametre i den primære forarbejdning af animalske råvarer samt kvalitet af råvaren i relation til kvaliteten af slutproduktet, herunder hvilken betydning specifikke enzymer og hydrolysetid har for den ACE-inhiberende effekt samt bitterheden i hydrolysaterne. Derudover vil det være relevant at undersøge muligheder for filtrering af de specifikke fraktioner med ACE-inhiberende aktivitet med henblik på at opkoncentrere denne.

Anprisning af produkter indeholdende ACE-inhiberende peptider er endnu ikke mulig, da EFSA ikke har godkendt den ACE-hæmmende effekt grundet manglende dokumentation. En alternativ applikationsmulighed for hydrolyserede biprodukter kan derfor være proteinberigelse. I denne kontekst bidrager resultater fra dette studie til viden om vigtigheden af høj smagsintensitet med henblik på maskering af bismag, samt at der anvendes en fødevarematrice, der er mørkere end hydrolysateret pga. risiko for farveændring af slutproduktet under opbevaring.

Konklusion

ACE-inhiberende aktivitet

ACE-inhiberende aktivitet blev bevaret med 55-56% i suppe tilsat hydrolyseret svinefedtende i forhold til de rene hydrolysater, mens suppe tilsat hydrolyseret oksemellemgulv blev bevaret med 139-155%. Dette muliggør indtagelse af produktet i mængder svarende til normal portionsstørrelse for at opnå effekt svarende til minimal vedligeholdelsesdosis af medicinske ACE-hæmmere. Det kan ikke umiddelbart forklares, hvorfor aktiviteten stiger i tomatsuppen tilsat hydrolyseret oksemellemgulv, ift. det rene hydrolysat, men fænomenet er også set i kødpølse for både hydrolyseret oksemellemgulv og svinefedtende.

Sensorisk profil

Jo mere hydrolysat, der tilsættes suppen, jo mere intensiveres bismagen og jo mere neutraliseres suppens tomatsmag. Der blev endvidere set en generel øgning i cremethed ved tilsætning af hydrolysater.

Forbrugerpræference

Jo mere hydrolysat, der tilsættes, jo mindre kunne forbrugerne lide suppen. Forbrugerne oplevede supper tilsat hydrolysatprodukter som discountagtige og kunstige. Kun 55% af forbrugerne kunne lide kontrolsuppen, hvilket kan have bidraget til at skubbe den overordnede liking af tomatsuppen i en negativ retning. 41% af forbrugerne mente, at funktionelle fødevarer kunne gavne deres sundhed, hvorimod 33% mente, at de er uigennemskuelige. 52% mente, at proteinberigede fødevarer er unødvendige, hvorimod 48% kunne se relevansen i forhold til at sikre et optimalt proteinindtag, enten i forbindelse med træning eller til vedligehold af muskelmasse.

<i>Lagringstid og -temperatur</i>	Temperatur og lagringsperiode påvirkede den ACE-inhiberende aktivitet minimalt. ACE-inhiberende aktivitet for hydrolyseret oksehud viste varierende værdier hen over lagringsperioden, hvilket imidlertid tilskrives den meget lave ACE-inhiberende aktivitet i dette hydrolysat, som kan medføre større måleusikkerhed.
<i>Farve</i>	For hydrolysater af oksehud og svinesvær påvirkede lagringstid og temperatur ikke farven væsentligt. Derimod blev hydrolysater baseret på svine- og oksehjerte mørkere under opbevaring, mens oksemellemgulvs- og svinefedtendehydrolysater blev lysere.

Referencer

Christel N., Kronborg, C. N., Hallas, J., and Jacobsen, I. A., Prevalence, awareness, and control of arterial hypertension in Denmark. *Journal of the American Society of Hypertension* 3(1) (2009) 19–24

Ibsen H., Jørgensen T., Jensen G.B., Jacobsen I.A. Hypertension – forekomst og behandling. *Ugeskrift for læger* 2009; 171: 1998-2000.

Meinert, L. og Jensen, K. Rapport: Applikation af hydrolysater med ACE-aktivitet. 2013. DMRI.

Jensen, K. Notat: Pille eller pølse? 2013. DMRI

World Health Organization (WHO), A global brief on hypertension – silent killer, global public health crisis 2013, Geneve, Schweiz

World Health Organization (WHO), Global status report on noncommunicable diseases 2014, Geneve, Schweiz

World Health Organization (WHO), World Statistics 2014, Geneve, Schweiz

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. *Appetite* 51, 456-467.

Bilag 1. ACE-inhiberende aktivitet for de rene hydrolysater, hydrolysater tilsat kødpølse, kontrolkødpølserne samt bevaret effektivitet.

Hydrolysat	IC₅₀ Hydrolysat	Kødpølse	IC₅₀ Kødpølse	Effektivitet (%) Kødpølse i forhold til rent hydrolysat
Svinesvær	15	4%	159	158
		8%	75	160
Svinehjerte	9	4%	330	53
		8%	157	60
Svinefedtender	7	4%	72	159
		8%	52	141
Oksehud	64	4%	406	175
		8%	331	159
Oksehjerte	10	4%	132	147
		8%	70	144
Oksemellemgulv	8	4%	126	137
		8%	55	145
		Kontrol svin	-	
		Kontrol svin/okse	-	

Bilag 2. Recept og fremgangsmåde ved fremstilling af tomatsuppe

<i>Ingredienser</i>	<i>Mængde [g]</i>	<i>% af totalt vægt</i>
Løg	200,0	7,8
Hvidløg	10,0	0,4
Soltørrede tomater	50,0	2,0
Tomatpuré	70,0	2,7
Hakkede tomater (dåse)	800,0	31,4
Olivenolie	48,0	1,9
Æblecidereddike	50,0	2,0
Honning	45,0	1,8
Balsamicoeddike	15,0	0,6
Timian	2,0	0,1
Vand	1200,0	47,1
Salt	10,0	0,4
Total	2550,0	100,0
*1 bouillonterning (11 g + 500 ml kogt vand)		

Løg og hvidløg blev snittet og svitset i ca. ½ dl olie ved mellemvarme (ej branket). Dernæst blev tomatpuré tilsat sammen med hakkede tomater, og der blev rørt rundt. Bouillonterning blev opløst i kogt vand og tilsat sammen med 8 dl vand. Blandingen blev bragt til kogepunktet, og herefter simrede den i 20 min. Balsamicoeddike, honning og salt blev tilsat. Suppen blev nedkølet, inden den blev blendet sammen med frisk timian og resten af olien.

Bilag 3.

Beskrivelse af de bedømte sensoriske egenskaber

Egenskab	Sans	Skala	Ordforklaring
Løft låget, og bedøm lugtene			
Tomat	LUGT	Lidt→meget	Intensitet af tomatlugt
Syrlig	LUGT	Lidt→meget	Intensitet af syrlig lugt
Krydret	LUGT	Lidt→meget	Intensitet af krydret lugt
Gammel, hengemt	LUGT	Lidt→meget	Intensitet af gammel, hengemt lugt
Gæret korn	LUGT	Lidt→meget	Intensitet af gæret kornagtig lugt
Bedøm udseende			
Farve	UDSEENDE	Orange →Brunlig	
Bedøm konsistens ved at tag en skefuld og hælde det ned i glasset			
Flydende	KONSISTENS	Lidt→meget	Fra tynd til flydende konsistens
Bedøm smagene			
Tomat	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af tomatsmag
Syrlig	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af syrlig smag
Eddikesur	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af eddikesur smag
Bitter	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af bitter smag
Sød	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af sød smag
Bouillon	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af bouillon, umamismag
Krydret	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af krydret smag
Gammel, hengemt	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af gammel, hengemt smag
Gæret korn	SMAG	Lidt→meget	Intensitet af gæret kornagtig smag
Bedøm konsistens i munden			
Cremet	MUNDFORNEM- MELSE	Lidt→meget	Intensitet af cremet mundfornemmelse
Bedøm eftersmagen			
Gammel, gæret korn	EFTERSMAG	Lidt→meget	Intensitet af gammel, gæret kornagtig eftersmag

Bedømmelsesskala:

Lidt = lav intensitet og 15 = høj intensitet

Bilag 4. Spørgeskema

Kære forbruger

Du skal nu smage på 5 supper.

For hver suppe skal du angive, hvor godt du kan lide suppen, og derefter hvor godt du synes, hvert af de 6 ord beskriver suppen.

Mange tak for din hjælp!

Sådan gør du:

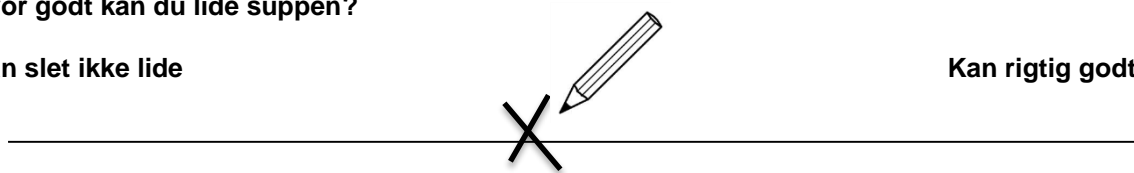
1. Du skal smage supperne i den angivne rækkefølge (nummeret står i øverste højre hjørne), derfor har du måske ikke samme rækkefølge som sidemanden.
2. Smag på suppen, og vurder, hvor godt du kan lide den ([eksempel 1](#)) på linjeskalaen og derefter for de seks ord ([eksempel 2](#)) (**sæt kryds ved alle 6 ord for hver suppe!**)
3. Skyl med vand
4. Gå videre til næste suppe

Eksempel 1:

Hvor godt kan du lide suppen?

Kan slet ikke lide

Kan rigtig godt lide

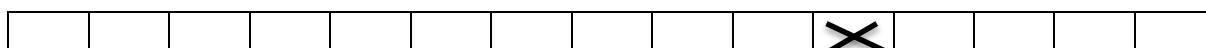


Eksempel 2:

I ringe grad

Velkendt

I høj grad



I ringe grad

Spændende

I høj grad

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

I ringe grad

Kunstig

I høj grad

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

I ringe grad

Indbydende

I høj grad

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

I ringe grad

Velkendt

I høj grad

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

I ringe grad

Discount

I høj grad

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

I ringe grad

Eksklusiv

I høj grad

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Til sidst et par spørgsmål om dig:

Jeg er (sæt kryds):

Kvinde Mand

Alder: _____

Hvad synes du om funktionelle fødevarer fx Becel og probiotisk yoghurt? (sæt ét kryds):

Det kan gavne min sundhed

Det er uigennemskueligt

Jeg har aldrig hørt om det

Ved dårligt helbred ville jeg overveje at bruge det

Hvad synes du om produkter tilsat ekstra protein (sæt ét kryds):

Det er unødvendigt

Det er en god måde at sikre et optimalt proteinindtag

Det er kun relevant i forbindelse med træning

Det er en hjælp til at vedligeholde min muskelmasse og en god fysik

Mange tak for din deltagelse!

Med venlig hilsen

Eva H. de L. Broge

Konsulent i Råvarekvalitet