



Notat

Proteinkvalitet af oksekød – bæredygtigt og sundt Kødproteiners fordøjelighed – fokus på betydningen af tilberedningstid og -temperatur samt måltidssammensætning

27. november 2020

Proj.nr. 2007994

Version 1

Init. KIJ/MT/MATN

Sammendrag

Kød har en lang tradition i vores kost, og det er svært at erstatte kødet af både ernæringsmæssige, sensoriske og forbrugeradfærdsmæssige årsager. Vores kostvaner er imidlertid udfordret af en klimadagsorden med fokus på kødproduktion og bæredygtighed, hvorfor kendskabet til de faktorer, der påvirker næringsværdien i kød, er vigtigt i fremtidens kostplanlægning.

Få andre proteinkilder har en lige så attraktiv aminosyresammensætning og høj fordøjelighed som kød. Med fokus på fordøjelighed, der indgår i meget komplekse biologiske systemer i forhold til absorptionskinetik, omfatter nærværende notat en litteraturopsamling, hvor betydningen af tilberedningsteknologier og måltidssammensætning er beskrevet.

Proteinfordøjeligheden kan fastlægges i *in vitro* eller *in vivo* studier. *In vitro* modeller kan anvendes til screening og opbygning af nye hypoteser, der vedrører forskellige faktoreres betydning. Til fastlæggelse af proteinkvalitet *in vivo* i humane studier anbefaler myndighederne i dag at anvende DIAAS-metoden.

Resultater har tidligere vist, at varmebehandling af kød ved lav temperatur (50-70 °C) kan øge proteinfordøjeligheden, og sandsynligvis også fordøjelseshastigheden, mens langvarig tilberedning sænker fordøjeligheden. Det er desuden kendt, at proteinstrukturen har betydning for fordøjeligheden, og at denne påvirkes af blandt andet varmebehandling (tilberedningstemperatur, kerntemperatur, tilberedningstid), forarbejdning (hakning, enzymmarinering, m.m.) og pakning (MAP, vakuum) samt fødevarematricens sammensætning. Det vil være værdifuldt at gennemføre en række systematiske *in vitro* modelstudier, hvor det kortlægges, hvordan de nævnte faktorer påvirker fordøjeligheden af kødproteiner. Anvendelse af isotopmærket kød åbner samtidig muligheder for at gennemføre humane interventionsstudier til vurdering af proteinkvalitet og potentiale af forskellige oksekøds-muskler.

Den mest optimale udnyttelse af kødprotein i forhold til bæredygtighed opnås ved at anvende en tilberedning af sammensatte måltider, der medfører maksimal fordøjelighed, samtidig med et minimalt tab af endogene proteiner, der sammen med ufordøjet protein kan sidestilles med "usynligt" madspild. Eksakt viden om ernæringskvalitet og optimal tilberedning af oksekød er imidlertid mangelfuld. En kortlægning af oksekødet's egenskaber i den sammenhæng vil være omfattende og kræve opstart af et større projektsamarbejde mellem den danske oksekødsbranche, vidensinstitutioner og foodservice. Resultaterne af et sådant forskningsprojekt skal være grundlagsskabende og vedrøre oksekødet's væsentlige rolle i forhold til såvel ernæring som bæredygtighed, med særligt fokus på reduceret madspild og kødindtag.

Indholdsfortegnelse

Baggrund	3
Behovet for proteiner i kosten	4
Officielle anbefalinger	4
Proteiners betydning for mæthed	4
Fordøjelse og absorption.....	4
Proteinkvalitet	5
Delkonklusion 1, proteinfordøjelighed, absorption og kvalitet.....	7
Effekt af tilberedningsteknologier på proteinfordøjeligheden.....	7
Varmebehandling – myofibrillære proteiner.....	8
Varmebehandling – kalvekød	9
Varmebehandling – oksekød	9
Varmebehandling – myofibrillære proteiner.....	9
Varmebehandling – oxidativ stabilitet	9
Enzymaktivitet – effekt af forskellig varmebehandling.....	10
Lav temperatur i lang tid (LTLT).....	10
Varmepåvirkning på aminosyreniveau	11
Tilsætning af enzymer	11
Effekt af MA-pakning.....	12
Delkonklusion 2, effekt af tilberedningsteknologier	12
Betydning af måltidssammensætning	12
Kulhydrater – stivelse, sukker og kostfibre	13
Effekt af sukkerarter	13
Effekt af opløselige/uopløselige kostfibre.....	13
Strukturelle effekter – mælk.....	14
Polyfenoler – frisk frugt og grønt vs. ekstrakt	15
Proteintætte fødevarer	15
Delkonklusion 3, betydning af måltidssammensætning	15
Samlet konklusion	16
Litteratur.....	17
Bilag 1. Oversigt over <i>in vivo metoder</i> til fastlæggelse af sand proteinfordøjelighed med isotopmærkede prøver.....	21
Bilag 2. Metoder til bestemmelse af proteinkvalitet (wikipedia.org).....	22

Baggrund

Kød og kødprodukter i kosten er væsentlige faktorer i forhold til indtaget af energi, proteiner af høj biologisk værdi samt vigtige mikronæringsstoffer.

Det står dog klart, at kødforbruget vil være ændret i fremtidens samfund, hvor kødets rolle vil være påvirket af økonomi, klima og miljø samt etiske og helbreds-mæssige udfordringer. Kød har imidlertid en lang tradition i vores kost, og det er svært at fjerne kødet fra kosten af både ernæringsmæssige, sensoriske og forbru-geradfærdsmæssige årsager. Hvordan det fremtidige scenarie for indtag af kød end bliver, vil kendskabet til de faktorer, der påvirker næringsværdien i kød, være yderst relevant, når ernæringsrigtige og klimamæssige forudsætninger skal opti-meres i fremtidens kostplanlægning.

Kød udgør en vigtig proteinkilde; få andre proteinkilder har en lige så attraktiv aminosyresammensætning og høj fordøjelighed. Med fokus på fordøjelighed om-fatter nærværende notat en litteraturopsamling, hvor betydningen af tilbered-ningsteknologier og måltidssammensætning for en optimal ernæringsmæssig kvalitet er beskrevet. Baggrunden er et tidligere SAF-finansieret projekt, "Mæt-tende kødprodukter til forebyggelse af overvægt" [1] samt nyere litteratur på om-rådet. Udgangspunktet for litteraturopsamlingen har været resultater, der vedrø-rer effekten af varmebehandling, forarbejdning og pakning samt tilstedeværelsen af andre fødevarer eller næringsstoffer, som fx kostfibre. Viden, der vurderes som værende generel, er citeret fra [1], mens der for konkrete forskningsresulta-ter er henvist til originallitteratur.

Litteraturopsamlingen skal desuden klarlægge, om der er mulighed for opstart af et større projektsamarbejde mellem den danske oksekødsbranche, vidensinstitu-tioner og foodservice. Projektets mål vil være en optimering af tilberedningsstra-tegier samt kortlægning af betydningen af måltidets sammensætning for den op-timale optagelse og udnyttelse af kødprotein, hvor den kulinariske og ernærings-mæssige kvalitet tilgodeses. Resultaterne af et sådant forskningsprojekt skal være grundlagsskabende og vedrøre oksekødets væsentlige rolle i forhold til såvel er-næring som bæredygtighed, med særligt fokus på reduceret madspild og kødind-tag. Projektet kan gennemføres ved hjælp af humane interventionsstudier, hvor der er isotopmærket kød til rådighed, der giver enestående muligheder for at monitorere og kvantificere proteinoptagelse og evt. inkorporering i muskler.

I tråd med ovenstående gennemfører Aarhus Universitet i perioden januar-de-cember 2020 et samarbejdsprojekt med fødevarer virksomheder, der omhandler fødevarerematrixens betydning for proteinfordøjelighed [2]. Målet er et værktøj til anvendelse ved produktudvikling i virksomhederne til vurdering af tilgængelig-hed og ernæringsmæssig udnyttelse af proteinet i en fødevarer.

Officielle anbefalinger

Behovet for proteiner i kosten

De forskellige kødudskæringer har et betydeligt proteinindhold (15-22%) af høj kvalitet og kan således medvirke til at sikre behovet for proteiner i kosten.

De officielle kostråd er baseret på Nordic Nutritional Recommendation, der anbefaler følgende indtag af protein [3], angivet som energiprocent (E%). E% udtrykker, hvor mange procent af madens samlede energiindhold der kommer fra hver af de enkelte næringsstoffer.

Tabel 1. Nordic Nutritional Recommendation-anbefalinger for indtag af protein [3].

	6-11 måneder	12-23 måneder	Børn 10-20 år	Voksne 18-64 år	≥65
E%	7-15	10-15	10-20	10-20	15-20

En energiprocent på 10-20 E% for voksne svarer til 0,8-1,5 g protein per kg kropsvægt [3].

Proteiners betydning for mæthed

Fødevarerproteiner har vist sig at være et af de mest mættende makronæringsstoffer, og i relation til appetitregulering er der bred enighed om, at proteinrige måltider (>20 E%) øger mæthedsfølelsen på kort sigt. Indtag af proteiner ser ud til at forøge energiomsætningen, stimulere appetitreguleringshormoner og øge koncentrationen af frie aminosyrer i plasma. Længerevarende indtag af måltider med højt proteinindhold leder således til vægttab og reducerer vægtøgningen over tid. Den proteininducerede mæthed er varierende og afhænger af proteinets aminosyresammensætning, struktur og proteinfordøjelighed [cf. 1].

Fordøjelse og absorption

Proteiner i kosten spaltes til aminosyrer under fordøjelsen. Nedbrydningen starter i mavesækken, hvor saltsyre og det proteinnedbrydende enzym pepsin omdanner proteinerne til peptider. Peptiderne nedbrydes til aminosyrer ved hjælp af enzymet peptidase, som bugspytkirtlen (pancreas) frigiver. Aminosyrerne bliver optaget i tyndtarmen og bliver via blodet transporteret ud til leveren. Herfra fordeles de ud til kroppens celler, hvor de bl.a. indgår i dannelsen af nye proteiner.

Proteinfordøjeligheden kan fastlægges *in vitro* eller *in vivo*. Humane *in vivo* studier anses for at være "The golden standard" til at fastlægge biotilgængelighed og fordøjelighed af fødevarer, mens *in vitro* modeller anvendes til screening og opbygning af nye hypoteser.

I *in vivo* studier med dyr og mennesker bestemmes proteinfordøjeligheden i prøver udtaget fra fæces eller ileum, der er den nederste del af tyndtarmen, hvor de fleste af næringsstofferne optages. FAO/WHO har siden 2011 anbefalet at anvende modeller baseret på prøver udtaget fra ileum fremfor fæcesprøver [4].

Forskellen mellem indtag via kosten og udskillelse i ileum/fæces udtrykkes som apparent eller tilsyneladende fordøjelighed. At der er tale om en tilsyneladende fordøjelighed skyldes, at ileum-/fæcesprøverne, foruden uabsorberede aminosyrer fra kosten, indeholder endogene aminosyrer udskilt fra fordøjelseskanalen.

En måde, hvorpå man kan skelne mellem eksogene og endogene aminosyrer er at anvende isotopmærkede fødevarer, hvorved "den sande fordøjelighed" kan bestemmes. I bilag 1 er der anført en række eksempler på *in vivo* metoder til fastlæggelse af sand proteinfordøjelighed med isotopmærkede prøver i interventionsstudier.

Der findes flere bud på *in vitro* modeller, der afspejler den humane fordøjelse af protein, og disse modeller repræsenterer forskellige grader af kompleksitet. Med udgangspunkt i INFOGEST konceptet [5] har Aarhus Universitet udviklet en fødevarematricemodel baseret på hydrokolloider, som er tilpasset og optimeret i forhold til generelle målinger af proteinfordøjelighed [2].

Proteinkvalitet

Begrebet proteinkvalitet omfatter den ernæringsmæssige værdi, der primært er bestemt af produktets aminosyresammensætning, hvor særligt indholdet af de essentielle aminosyrer er afgørende. Den biologiske aktivitet af de intakte proteiner i en fødevarer er en anden væsentlig parameter for proteinkvalitet, herunder proteinfordøjeligheden.

Der findes en lang række modeller til fastlæggelse af proteinkvaliteten, jf. bilag 2. Et ekspertudvalg under FAO anbefaler at anvende metoden DIAAS, Digestible Indispensable Amino Acid Score, der er en videreudvikling af den tidligere anbefalede metode PDCAAS, Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score [4]. Den praktiske konsekvens af den nye metode er, at den reelle forskel i kvaliteten af proteiner fra forskellige kilder, herunder vegetabiliske og animalske proteiner, nu kommer tydeligere frem, jf. tabel 2 [cf. 6]. En DIAAS score højere end 100 angiver, at det pågældende protein eller produkt har potentiale for at kunne berige andre produkter, hvilket er tilfældet for de animalske proteiner.

Table 2. DIAAS-rangering af proteinkvalitet for animalsk protein og planteprotein [cf. 6]

Animal Protein	DIAAS Protein Quality Score
Beef	111 (high quality)
Chicken	108 (high quality)
Eggs	113 (high quality)
Milk	114 (high quality)
Milk protein concentrate	118 (high quality)
Whey protein isolate	109 (high quality)
Plant Protein	DIAAS Protein Quality Score
Almonds	40 (low quality)
Chickpeas	83 (medium quality)
Lentils (red)	50 (low quality)
Lentils (yellow)	73 (low quality)
Pinto beans	70 (low quality)
Pea protein concentrate	82 (medium quality)
Red kidney beans	58 (low quality)
Soybean	99.6 (medium quality)
Soy protein	91.5 (medium quality)
Tofu	52 (low quality)

Da DIAAS scores er et relativt nyt begreb, er der endnu kun få værdier til rådighed. Tabellen er sammensat ud fra resultater fundet i [7, 8, 9, 10].

Resultatet for beef er anført i [9], men de nærmere forsøgsomstændigheder, fx muskel, tilberedning m.m., er ikke beskrevet. Det vil derfor være interessant at fastlægge DIAAS scores i forskellige oksekødsuskler som udtryk for en specifik råvares ernæringsmæssige potentiale under optimale, standardiserede tilberedningsforhold. Fx antages det, at kød med lidt bindevæv har en højere score for fordøjelighed og absorption sammenlignet med kød, der indeholder meget bindevæv. Et højt indhold af bindevæv (kollagen) kan samtidig medføre en reduceret næringsværdi, da kollagen kun indeholder 8 af de 9 essentielle aminosyrer. Der er isotopmærket kød fra forskellige muskler til rådighed på DMRI fra dyr slagtet i april 2019, hvilket giver muligheder for at gennemføre værdifulde humane interventionsstudier af den sande fordøjelighed.

Det er her vigtigt at inddrage forskellige målgrupper, eller have fokus på én, da viden ikke nødvendigvis kan overføres fra en målgruppe til en anden.

Et ekspertudvalg under FAO har angivet en række metoder til bestemmelse af proteinkvaliteten, bl.a. en "dual tracer" teknik, der gør brug af isotopmærkning. Metoden udmærker sig ved at være skånsom overfor forsøgspersonen, da den ikke kræver kirurgiske indgreb i tarmen. Forekomsten af isotopmærkede aminosyrer i plasma, der stammer fra mærkede fødevarerproteiner, sam-

menlignes med et mærket standardprotein (^{13}C eller ^2H) med kendt fordøjelighed, der er indtaget samtidig [11]. Teknikken er bl.a. brugt til at fastlægge fordøjeligheden af æg og hønsekød samt bælgplanter [12, 13], jf. bilag 1.

Delkonklusion 1, proteinfordøjelighed, absorption og kvalitet

Proteinfordøjeligheden kan fastlægges i *in vitro* eller *in vivo* studier. *In vitro* modeller kan anvendes til screening og opbygning af nye hypoteser, der vedrører forskellige faktorerers betydning. Myndighederne anbefaler at anvende DIAAS-metoden til fastlæggelse af proteinkvalitet *in vivo* i humane studier. I dag findes der kun få generelle DIAAS scores for oksekød. Det vil være relevant at fastlægge DIAAS scores i forskellige oksekødsuskler som udtryk for en specifik råvares potentiale i forhold til proteinkvalitet under optimale, standardiserede tilberedningsforhold. Anvendelse af isotopmærket kød åbner muligheder for at gennemføre værdifulde humane interventionsstudier af den sande proteinkvalitet.

Effekt af tilberedningsteknologier på proteinfordøjeligheden

Kødproteiner er sammensat af *sarcoplasmatiske proteiner* (30 %), *myofibrillære proteiner* (65 %) samt *bindevæv* (5 %).

De *sarcoplasmatiske proteiner* omfatter globulære proteiner og enzymer, hvoraf nogle har betydning for mørheden af det varmebehandlede kød. De fleste sarcoplasmatiske proteiner denaturerer mellem 40 og 67°C, men aggregeringen forsætter op til 90°C. De aggregerede proteiner kan danne en gel i kødstrukturen og har således også betydning for teksturen af det varmebehandlede kød [14].

En varmpåvirkning af de *myofibrillære proteiner* medfører ved en temperatur på 65°C en kraftig stigning i overfladehydrofobiciteten, der reduceres igen, når temperaturen stiger. Dette antyder, at en del af de hydrofobiske sidekæder indgår i protein-protein interaktioner og dermed dannelse af netværk. Det mest labile myofibrillære protein er α -actinin, der denaturerer ved 50°C, mens det mest stabile er actin, der denaturerer ved 80-83°C. Denaturering af myofibrillære proteiner medfører sædvanligvis gel-dannelse [14].

Denaturering af *bindevæv* (kollagen) forløber i to trin. I første trin, ved 53-65°C, opløses den fibrillære struktur, hvorefter kollagenmolekylet sammentrækkes med op til en fjerdedel af den oprindelige længde. Det andet trin, gelatineringen, forløber ved 70-80°C og er forbundet med nedbrydningen af varmpåvirkelige intermolekylære bindinger. Antallet af varmpåvirkelige bindinger falder med dyrets alder. Ved varmebehandling under 60°C, er collagenase stadigvæk aktiv i kødet, og mørningseffekten er opretholdt efter 6 timer; det inaktiveres ved temperaturer mellem 70-80°C [14].

Varmebehandlingen påvirker proteinfordøjeligheden i mange fødevarer. I kød inducerer varme fysiske og kemiske ændringer af proteinerne, afhængigt af tilberedningstemperatur og tid. Tabel 3 viser en skematisk oversigt med de mulige modifikationer af kødproteiner under en tilberedning og pakning, der kan påvirke proteinfordøjeligheden [cf. 1].

Tabel 3. Mulige modifikationer af kødproteiner under tilberedning og pakning, der sandsynligvis kan påvirke proteinfordøjeligheden [mod.e. 1]

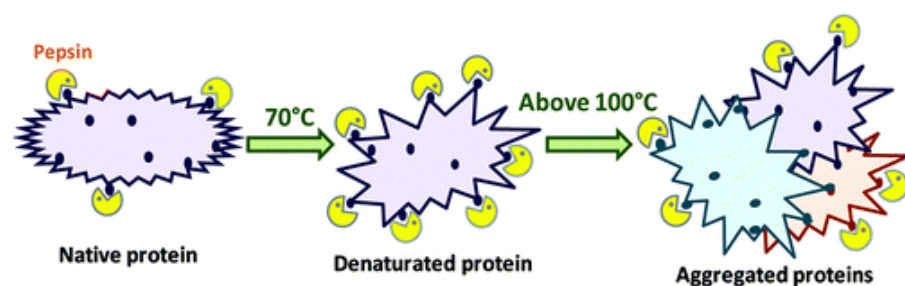
Proteinfordøjelighed	
Øget	Reduceret
<ul style="list-style-type: none"> • Proteindenaturering (↑ adgangen til spaltningsteder for proteolytiske enzymer) • Endogen proteolytisk aktivitet (↑ konc. af peptider og frie aminosyrer i kød) • Enzymbehandling, modning (↑ proteinfordøjelighed) 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteindenaturering (↑ hydrofobicitet på proteinoverflade, medfører ↑ risiko for aggregering) • Proteinaggregering (↓ adgangen til spaltningsteder for proteolytiske enzymer) • Proteinoxidation (↑ risiko for aggregering) • MA-pakning – proteinoxidation (↑ risiko for aggregering)

In vitro og *in vivo* forsøg har vist, at tilberedningstemperaturen i højere grad ændrer hastigheden af proteinfordøjeligheden, end mængden af de kødproteiner der fordøjes og absorberes [15, 16].

I det følgende er der anført en række forskningsresultater fra studier med forskellige tilberedningsteknologiers effekt på proteinfordøjeligheden.

Varmebehandling – myofibrillære proteiner

I et modelforsøg, der simulerer de fysiologiske forhold i mavesæk og tolvfingertarm (duodenum), er fordøjeligheden af myofibrillære proteiner, varmebehandlet ved 70, 100 og 140°C, sammenlignet [16]. Kogning ved 70°C forøgede pepsinbrydningen af proteiner sammenlignet med kogning ved 100°C og 140°C. På baggrund af disse resultater, samt andre fysiske og kemiske målinger, foreslås der en mulig mekanisme for pepsinbrydning af kødproteiner, jf. figur 1.



Figur 1. Foreslået mekanisme for påvirkning af pepsinbrydning af proteiner i relation til varmebehandling [16].

Opvarmning af protein inducerer konformationsændringer (udfolding af proteinerne), der medfører forøget pepsin-hydrolyse. Ved højere temperaturer (>100°C) modificeres proteinerne ved oxidation, der medfører proteinaggregering, hvilket nedsætter tilgængeligheden af spaltningsteder for pepsin. I overensstemmelse med den foreslåede mekanisme er der tidligere fundet en signifikant negativ korrelation mellem pepsinaktivitet og aggregatdannelse [17].

- Varmebehandling
– kalvekød* Resultaterne fra ovenstående studie er eftervist *in vivo* i minigrise. Her steg plasmakoncentrationen af aminosyrer hurtigt efter indtag af ¹⁵N-mærket kalvekød, der var varmebehandlet til kerntemperaturer på henholdsvis 60 og 75°C og sammenlignet med en kerntemperatur på 95°C [15]. Varmebehandlingstemperaturen havde ingen effekt på proteinfordøjeligheden målt som den sande fordøjelighed i ileum, der var høj (95-96 %) for alle tre kerntemperaturer. Dette indikerer, at proteinerne ikke er aggregeret ved de anvendte temperaturer.
- Varmebehandling
– oksekød* Den sande fordøjelighed er bestemt i ileum for ¹⁵N-mærket oksekød, der er varmebehandlet efter forskellige protokoller.
- I et rotteforsøg var proteinfordøjeligheden lavere i kogt oksekød (210 min. i kogende vand til en kerntemperatur på 100°C) sammenlignet med traditionelt stegt oksekød (35-40 min. i ovn ved 180°C til en kerntemperatur på 60-62°C), barbecue-stegt oksekød (15 min. over gløder på grill til en kerntemperatur på 60-64°C) og grillstegt oksekød (5-7 min. på en grill ved 240°C indtil en kerntemperatur på 60-64°C) [18].
- Et studie med unge, voksne forsøgspersoner viste tilsvarende et moderat fald i proteinfordøjeligheden af gennemstegt oksekød (dampovn ved 90°C i 30 min.) sammenlignet med indtag af halvstegt oksekød (dampovn ved 55°C i 5 min.) [19].
- Et tredje studie med ældre, raske forsøgspersoner, der omfattede ¹⁵N-mærket oksekød, viste modsat, ved en analyse af plasmaprøver, at biotilgængeligheden og assimilationen af aminosyrer fra kødproteiner var lavere i halvstegt oksekød [20]. Resultaterne viser, at forskellige grupper af forsøgspersoner reagerer forskelligt og understreger dermed vigtigheden af at inddrage forskellige målgrupper ved fastlæggelse af fordøjelighed, eller at have fokus på én målgruppe.
- Varmebehandling
– myofibrillære proteiner* Resultater fra en undersøgelse af *in vitro* fordøjeligheden af myofibrillære bovinproteiner efter kogning i henholdsvis vandbad ved 100°C i 5-45 min. eller ved 270°C i oliebad i 1 min. var ens [17]. I dette studie blev forskellige kombinationer af varmebehandlingstid og -temperatur sammenlignet, og det er derfor ikke klart, om effekterne på proteinfordøjeligheden stammede fra kogning ved lav temperatur eller fra den korte varmebehandlingstid.
- Varmebehandling
– oxidativ stabilitet* Effekten af varmebehandlingstid og oxidativ stabilitet af proteiner og lipider er undersøgt i lammekød. Lang varmebehandling (6-24 timer i vandbad) øgede lipid- og proteinoxidationen, uafhængig af temperaturen (60, 70, 80°C) [21]. Der er set tilsvarende oxidative ændringer (dannelse af carbonyler, frie thio-ler, øget hydrofobicitet og aggregering) samt ændringer i proteolysehastighed i [17]. Her blev der fundet en negativ, stærkt signifikant korrelation mellem pepsinaktiviteten og carbonyldannelsen, uanset temperatur og behandlingstid. Der blev ikke set en direkte sammenhæng mellem dannelse af carbonylgrupper og forekomsten af proteinaggregater. Disse oxidative modifikationer

af kødproteiner forventes at forringe den proteolytiske tilgængelighed af de endogene enzymer under fordøjelsen, hvorved proteinfordøjeligheden nedsættes [21], i overensstemmelse med illustrationen i figur 1.

Enzymaktivitet – effekt af forskellig varmebehandling

Sammenholdt med de fysiske og kemiske ændringer af kødproteinerne under varmebehandling må aktiviteten af de endogene proteolytiske enzymer også spille en rolle for proteinfordøjeligheden [1]. Hvis de proteolytiske enzymer forbliver aktive ved den anvendte varmebehandlingstemperatur og -tid, må dette forøge potentialet for proteolytisk nedbrydning af myofibrillære proteiner og derved koncentrationen af hydrolyserede peptider og frie aminosyrer i kødet [1].

I grisekød varmebehandlet ved lav temperatur (25, 40 og 55°C) forblev de endogene enzymer, cathepsin B og L, aktive efter 24 timer i vandbad, men ved 70°C var aktiviteten nedsat efter 1,5 time [22]. I et andet studie blev aktiviteten af cathepsin B og L undersøgt for effekten af kogetid og temperatur på to grisemusklervarmebehandlet *sous vide* (*M. Longissimus* og *M. Semitendinosus*) [23]. En stigning i tilberedningstemperaturen fra 48 til 70°C, og i mindre udstrækning forlængelse af kogetiden, medførte en øget aktivitet af cathepsin B og L. Aktiviteten var højest i *M. Semitendinosus* kogt ved 58°C i 17 timer sammenlignet med en kortere kogetid på 5 timer, der var tidsrummet for at nå en kerntemperatur svarende til vandbadets temperatur.

Lav temperatur i lang tid (LTLT)

På baggrund af resultaterne opnået i [23] blev der opstillet en hypotese med en forventning om, at varmebehandling ved lav temperatur i lang tid (LTLT) kunne øge kødproteins fordøjelighed. Et hurtigere mæthedsrespons, og dermed en øget mæthedsfølelse, ville samtidig medføre et lavere energiindtag efterfølgende [24].

Effekten af varmebehandlingsmetode (LTLT 58°C vs. konvektionsovn 160°C), LTLT-holdetider (17 timer vs. 72 min.) og kødstruktur (hakket kød vs. helmuskel) blev undersøgt på appetitreguleringen og *in vitro* fordøjelighed.

Behandlingerne påvirkede ikke appetitten, men der blev fundet en effekt på *in vitro* proteinfordøjeligheden. Resultaterne viste uventet, at en kortere LTLT holdetid (72 min.) forøgede den proteolytiske aktivitet og hastigheden af proteolyse sammenlignet med en lang holdetid (17 timer). Tidligere undersøgelser har vist, at forskellige strukturelle og kemiske ændringer med antagonistiske effekter på proteinfordøjelighed ser ud til at forløbe samtidig under varmebehandling (proteinaggregering og -udfoldning samt enzymatisk aktivitet) [cf. 1]. Resultater har antydnet, at holdetider på 20-24 timer medfører proteindenaturering [25], men samtidig øges aktiviteten af endogene enzymer under varmebehandling ved 58°C. Disse modifikationer kan potentielt øge proteinfordøjeligheden, idet proteindenaturering øger tilgængeligheden af spaltningsteder for de proteolytiske enzymer, jf. fig. 1. Ydermere kan en øget endogen proteolytisk aktivitet medføre flere frie aminosyrer, der letter absorptionen under fordøjelsen. En lang holdetid (24 timer) har imidlertid vist at øge dannelsen af carbonyler i LTLT-kogt lammekød, uafhængig af kogetempe-

ratur [21]. Proteinoxidation fremmer protein-protein interaktioner, der medfører aggregering [16]. Øget hydrofobicitet på proteinoverfladen, som en følge af kogning, fremmer ligeledes aggregering af protein [17]. Det antages derfor, at der ved 17 timers LTLT-behandling sker en proteinaggregering, der reducerer tilgængeligheden af spaltningsteder på de udfoldede proteiner. Herved modvirkes enzymaktiviteten, hvilket medfører en generel lavere fordøjelseshastighed sammenlignet med varmebehandling i 72 min.

Resultaterne fra sammenligning af hakket kød versus helmuskel viste ingen forskelle i fordøjelighed og absorption. Det antages, at dette også skyldes følgerne af den lange varmebehandlingstid, der har udlignet den forventede positive effekt af hakning [24].

Resultaterne viser desuden, at ovnstegning ikke er en velegnet metode sammenlignet med fx LTLT-behandling, idet en præcis styring af temperaturen under processen er nødvendig.

Varmepåvirkning på aminosyreindholdet

Oksekød har generelt et højere indhold af valin, lysin og leucin sammenlignet med lam og gris, men det kan påvirkes af varmebehandlingen. Det er således fundet, at 90% af lysinindholdet var tilgængeligt efter en varmebehandling ved 70°C, mens der kun var 50% tilbage efter en varmebehandling ved 160°C, [cf. 26]. Der er ikke anført oplysninger vedrørende kerntemperaturer i kødet ved varmebehandlingerne.

Tilsætning af enzymer

Der er en lang tradition for at anvende enzymer til at fremme mørheden i kød, navnlig planteenzymer, men også enzymer og proteaser fra bakterier og svampe. Brugen af kiwifrugtenzymer (actinidin) til at øge proteinfordøjeligheden i muskelproteiner er afrapporteret i mange studier [cf. 27]. *In vitro* proteinfordøjelighed af oksebryst behandlet med actinidin, varmebehandlet med *sous vide* ved 70°C i 30 min. viste positive effekter på proteinfordøjeligheden [27]. Tilsvarende effekter er set i et forsøg med slagtesvin, hvor foderet indeholdt protein fra enzymbehandlet oksekød. Foruden en generel øget proteinfordøjelighed blev der observeret en øget fordøjelighed af proteiner med en høj molekylvægt [28].

Enzymbehandlet kød, i form af et hydrolysat, er sammenlignet med hakket kød i et studie med 6 unge raske mænd [29]. Kødet, der var mærket med d_5 [phenylalanin], indgik i et testmåltid, der bestod af henholdsvis 70 g hakkebøf og 140 ml vandigt kødhydrolysat. Hakkebøffen var *sous vide*-behandlet ved 90°C i 20 min. Hydrolysatet blev fremstillet ved opblanding af hakket kød med vand og efterfølgende behandlet med protease og peptidase (Protamex® og Flavorzyme®). Testmåltiderne havde samme proteinindhold, men forskelligt fedtindhold, henholdsvis 24,6 og 9,8 E% i bøf og hydrolysat. Der blev registreret et hurtigere og højere respons i indholdet af d_5 [phenylalanin], leucin og totalaminosyreindhold i plasma fra forsøgspersoner, der havde indtaget det hydrolyserede kød.

Effekten af naturligt udviklede enzymer under et modningsforløb er undersøgt i et *in vitro* studie med tørsaltede skinker [30]. Her indgik bl.a. måling af partikelstørrelse efter *in vitro* fordøjelse. Partikelstørrelsen reflekterer graden af proteinnedbrydning og kan betragtes som et udtryk for absorptionskapaciteten i kroppen. Der blev fundet signifikant effekt af såvel modningsperiode som forarbejdningsproces, med en positiv korrelation mellem fordøjelighed og partikelstørrelse. Langtidsmodnet kød kan således indgå i kosten som en let fordøjelig proteinkilde [30].

Effekt af MA-pakning

Fersk hakket kød er ofte centralpakket i modificeret atmosfære (70-80% oxygen, 20-30% kuldioxid) af hensyn til farvestabiliteten. Når kød forarbejdes, ødelægges cellestrukturen, og forskellige endogene prooxidanter kan komme i direkte kontakt med proteinerne. Under tilstedeværelse af ilt bliver proteinerne sårbare overfor reaktive oxygenspecies (ROS) [cf. 31], der kan forårsage aggregering og dermed reducere proteinfordøjeligheden, jf. tabel 3. Da hakket oksekød er et stort marked i Danmark, vil det være interessant at undersøge effekten af MA-pakning kontra vakuumpakning på proteinfordøjeligheden.

Delkonklusion 2, effekt af tilberedningsteknologier

Resultaterne fra ovenstående eksempler viser, at varmebehandling af kød ved lav temperatur (50-70°C) kan øge proteinfordøjeligheden, og sandsynligvis også fordøjeshastigheden, mens langvarig tilberedning (17-24 timer) sænker fordøjeligheden hos unge forsøgspersoner. Ved gennemførelse af fremtidige forsøg til at afdække påvirkningen af strukturelle og kemiske ændringer som følge af varmebehandling anbefales sous vide-tilberedning, da standardisering af forsøgsbetingelserne her er lettere end ved ovnstegning [1]. Udover betydningen af varmebehandlingen (tilberedningstemperatur, kernetemperatur, tilberedningstid) vil en systematisk undersøgelse af forarbejdnings (hakning, enzymmarinering m.m.) samt pakning (MAP, vakuum) være interessant at undersøge i forhold til proteinfordøjeligheden. Til det formål er det hensigtsmæssigt at anvende en passende fødevarematricemodel fx den, der er udviklet på Aarhus Universitet [2]. Dette vil også give mulighed for en sammenligning med resultater fra andre proteinkilder, fx planteprotein.

Betydning af måltidssammensætning

For at kunne sammensætte det ideelle kødmåltid ud fra et ernæringsmæssigt synspunkt er kendskabet til betydningen af såvel tilberedning som måltidsmatrice væsentlig. Optimerede tilberedningsstrategier skal derfor suppleres med en kortlægning af, hvordan måltidets sammensætning influerer på optagelse og udnyttelse af kødprotein. Indflydelsen af måltidssammensætningen er et forholdsvis nyt forskningsområde og er derfor for nuværende mangelfuldt belyst. Som tidligere nævnt foretages en sådan kortlægning i dag bl.a. på Aarhus Universitet [2].

I det følgende er der eksempler på specifikke næringsstoffers effekt på proteinfordøjeligheden.

Kulhydrater – stivelse, sukker og kostfibre

Kulhydrater kan inddeles i tre hovedgrupper; stivelse, sukkerarter (fx ren sukker og frugtsukker) og kostfibre. Stivelse og sukkerarter er de største kilder til energi i kosten, mens kostfibre er en klasse af ufordøjelige polysakkarider, hvor hovedkomponenterne er tre, eller flere, monomerenheder fra nedbrudte plantecelle vægge.

Der har længe været fokus på kostfibre i forhold til deres potentielle rolle i energireguleringen via deres positive effekt på energiindtag og mæthedsfornemmelse. Studier har imidlertid vist en negativ sideeffekt ved tilsætning af kostfibre i forhold til proteinfordøjelighed, idet en øget masse og viskositet af indholdet i fordøjelsessystemet medfører en reduceret fordøjelighed og absorption af næringsstoffer. Samtidig kan fibre stimulere sekretionen fra slimhinden i tyktarmen (mucosa), der medfører et tab af endogene proteiner/aminosyrer.

Effekt af sukkerarter

Effekten af kulhydrat på proteinfordøjeligheden er undersøgt i et studie med 24 yngre mænd og 25 raske, ældre mænd. I et randomiseret studie indtog forsøgspersonerne en drik indeholdende isotopmærket kasein (L-[1-13C] phenylalanin) med og uden tilsat kulhydrat (dextrose/maltodextrin). Tilsætning af kulhydrat medførte en forsinket proteinfordøjelighed og absorption, men påvirkede ikke muskeltilvæksten [32].

Effekt af opløselige/uopløselige kostfibre

Effekten ved korttids- og langtidsindtag af forskellige viskøse, opløselige kostfibre (xanthan og guar gummi) er undersøgt i et studie med rotter. Resultaterne viste en signifikant reduktion af proteinfordøjeligheden ved et langtidsindtag af kostfibre [33].

I et *in vitro* studie, der eftergør forholdene i mavesæk og tarm, er effekten af uopløselige og opløselige kostfibre undersøgt på fordøjeligheden af proteiner i surimi (fiskeprodukt, der har været igennem en omfattende industriproces). Proteinfordøjeligheden faldt gradvist ved øget tilsætning af kostfibre, hvor den største, signifikante effekt blev fundet ved tilsætning af de opløselige kostfibre. Den nedsatte proteinfordøjelighed kunne primært tilskrives viskositet og kvældning af de opløselige kostfibre [34].

Uopløselige kostfibre, ligniner, tanniner og lectiner, går under fællesbetegnelsen ANF (Anti-Nutritive Factors). De er fra dyreforsøg kendt for at reducere fordøjeligheden af næringsstoffer, samt øge sekretionen fra mucosa i tarmen.

I et forsøg med smågrise blev et foder baseret på kasein som proteinkilde suppleret med ANF (canola, hvedeklid, byg, lignin, kidneybønner (lectin kilde) og tanniner). Ingredienserne med højt fiberindhold, primært hemicellulose, som findes i byg og hvedeklid, nedsatte protein- og aminosyrefordøjeligheden signifikant. Data viste samtidig, at indtag af hemicellulose-fibre stimulerede sekretionen fra mucosa [35].

I et andet forsøg med unge grise blev effekten af skaldele fra hestebønner tilsat foder med 6 forskellige proteinkilder undersøgt. Hestebønner går ind under kategorien ANF pga. indhold af kondenserede tanniner i skaldelene. Resultaterne viste i overensstemmelse med ovenstående, at tanniner fra hestebønner interagerer med både endogene proteiner og proteiner i grisens fordøjelsessystem. Det reducerede den sande fordøjelighed af foderprotein og forøgede det endogene proteintab [36].

Effekten af fibertilsætning i form af bagasse (træstof fra sukkerrør) og majsblade er undersøgt i to fodringsforsøg med grise [37]. I det ene forsøg blev der tildelt et proteinfrit foder suppleret med varierende mængder fibre. Det andet forsøgsfoder indeholdt protein i form af sojakoncentrat og kasein, der blev suppleret med bagasse og majscolber som fiberkilde. Bagasse indeholder primært cellulose, mens halvdelen af kulhydratindholdet i majscolber består af hemicellulose. I det proteinfrie foder blev der generelt set en signifikant stigning i det endogene tab af aminosyrer og protein med stigende fiberiveau. I det andet forsøg blev der set en nedsat effekt på protein- og aminosyrefordøjelighed, men den kunne relateres til proteinkilden og ikke fiberkilden. Kasein og soja er begge letfordøjelige proteinkilder, men deres fordøjelsesproces er forskellig. Kasein udfældes i mavesækken, hvor den hydrolyseres til små peptider, der udskilles til tarmen, mens soja hurtigt passerer gennem maven og fordøjes af pancreaszymer fra bugspytkirtlen [cf. 37]. Resultatet af fibrenes manglende negative indvirkning på proteinfordøjeligheden forklares ved, at de uopløselige fibre kun påvirker fordøjeligheden af de proteiner, der er bundet hertil, og denne effekt er næsten fraværende her.

I et tidligere forsøg med rotter, hvor der fandtes en nedsat proteinfordøjelighed i forskellige fødevarer ved tilsætning af fibre, konkluderes det, at det dels skyldes proteinets art, dels fibrenes funktion som fysisk barriere mod den enzymatiske nedbrydning [38].

Strukturelle effekter - mælk

Effekten af fysiokemiske og strukturelle egenskaber for minigrises fordøjelighed af mælkeproteiner er undersøgt i 6 mejeriprodukter med ens næringsstofsammensætning. Studiet viser store forskelle i kinetikken bag aminosyreabsorptionen. Dette kan fuld ud forklares på baggrund af fødevarermatrixens fysiokemiske forskelle og dermed forskellige påvirkning af forholdene i mavesækken [39].

En mælkematrixens indvirkning på proteinfordøjelighed og absorptionskinetik for kasein er undersøgt i et studie med 32 ældre, raske mænd. Resultaterne viste, at micellært kasein i en matrice af mælk fordøjes og absorberes langsommere, sammenlignet med indtag af rent micellært kasein [40]. Forskellen tilskrives indholdet af kulhydrat i mælkematrixen (~ 30 g laktose) og dermed energiniveauet, der i tidligere forsøg har vist at påvirke proteinfordøjeligheden og absorptionen [32, 41].

Polyfenoler – frisk frugt og grønt vs. ekstrakt

Det er velkendt, at polyfenoler har en høj affinitet for protein og fiber. Binding til proteiner nedsætter proteinfordøjeligheden, enten ved interaktion med fordøjelsesenzymer eller ved at beskytte proteiner mod enzymnedbrydning, [cf. 42]. Polyfenoler tilsættes ofte fødevarer som antioxidanter, hvorfor det kan have en u hensigtsmæssig effekt for personer, hvor underernæring er et problem.

Effekten er bl.a. vist i et fodringsforsøg med minigrise, hvor det blev undersøgt, om der var forskel på polyfenoler, der enten blev indtaget i et kødfoder i form af frugt og grønt (F&V), eller som et ekstrakt af dette (PE). Resultaterne viste, at PE nedsatte hastigheden og effektiviteten af proteinfordøjeligheden signifikant, mens F&V medførte en forsinket stigning i aminosyrekoncentrationen i plasma. Effekten af F&V tolkes som forlængelse af opholdstiden i mavesækken [42].

Proteintætte fødevarer

Mælk og kød er almindelige proteintætte fødevarer i kosten i den vestlige verden, hvor det står for en stor del af det daglige proteinindtag. Med henblik på at fastlægge effekt af fødevarematrice blev 12 raske unge mænd tildelt en proteintæt kost, der indeholdt 30 g isotopmærket protein (L-[1-¹³C]phenylalanin), i form af skummetmælk eller hakket oksekød. Proteinfordøjelighed og absorptionskinetik samt den efterfølgende muskelsyntese blev undersøgt [41]. Måltiderne indeholdt forskellige mængder kulhydrat og fedt og var dermed også forskellige i energiindhold, der var højest i skummetmælk. Der blev set en hurtigere proteinfordøjelighed i kødmåltidet. Dette er i overensstemmelse med resultater fra tidligere studier, hvor der blev fundet en negativ korrelation mellem energiindhold og såvel proteinfordøjelighed som absorption [32].

I et studie med 6 unge, raske mænd blev effekten af tilsætning af kartofler og smør til en isotopmærket valledrik undersøgt [29]. De to testmåltider indeholdt hver 20 g valleprotein, men havde forskelligt indhold af kulhydrat og fedt. Aminosyrekoncentrationen i plasma var hurtigere og mere udtalt for forsøgspersonerne, der havde indtaget den rene valledrik, og er således også i overensstemmelse med tidligere studier, der påviser effekt af energiindtag.

Delkonklusion 3, betydning af måltidssammensætning

Resultaterne fra ovenstående eksempler viser, at proteinfordøjelighed og absorptionskinetik indgår i meget komplekse biologiske systemer, hvor fødevarematricens sammensætning og struktur har en væsentlig betydning. Det vil derfor være værdifuldt at gennemføre en række systematiske modelstudier for at kortlægge, hvordan fordøjeligheden af kødproteiner påvirkes af fødevarematricen. Som beskrevet tidligere kan fremgangsmåden være den *in vitro* fordøjelighedsmodel, der p.t. anvendes på Aarhus Universitet til fastlæggelse af fødevarematricens betydning for proteinfordøjelighed [2].

Samlet konklusion

Litteraturopsamlingen har vist, at proteinfordøjelighed og absorptionskinetik indgår i meget komplekse biologiske systemer, hvor tilberedningsteknologier og måltidssammensætning har væsentlig betydning. Den mest optimale udnyttelse af protein fra oksekød i forhold til bæredygtighed opnås i teorien ved at anvende en tilberedning af sammensatte måltider, der medfører maksimal fordøjelighed samtidig med et minimalt tab af endogene proteiner. Sidstnævnte kan sammen med ufordøjet protein sidestilles med "usynligt" madspild. Eksakt viden om ernæringskvalitet og fordøjelighed af oksekød er imidlertid mangelfuld. Kvalitet og potentiale af de forskellige muskler kan fastsættes ved humane interventionsstudier i form af DIAAS scores, hvor det er vigtigt at inddrage forskellige målgrupper eller have fokus på én. Betydningen af tilberedningsteknologier og måltidssammensætning for proteinfordøjeligheden kan estimeres ud fra *in vitro* studier. En kortlægning af oksekødets egenskaber i forhold til ernæringsværdi og bæredygtig tilberedning vil være omfattende og kræve opstart af et større projektsamarbejde mellem den danske oksekødsbranche, vidensinstitutioner og foodservice.

Litteratur

- [1] Kehlet, U. Meat and appetite regulation – effects of fiber addition and cooking methods. Ph.D. thesis 2017.
- [2] Fødevarematricens betydning for protein fordøjelighed. Aarhus Universitet/Danish Food Innovation (DFI). Januar-december 2020.
- [3] Nordic Council of Ministers, NC of M. Nordic Nutrition Recommendations 2012. Nord Nutr Recomm 2012, 2008;5 (11):1-3
- [4] FAO Food and Nutrition Paper 92: “Dietary protein quality evaluation in human nutrition”. Report of an FAO Expert consultation, 31 March-2 April 2011, Auckland, New Zealand. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome 2013. ISBN 978-92-5-107417-6
- [5] Egger, L. et al. The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. Food Research International 88, 217–225, 2016
- [6] Joseph, M. Animal Proteins vs. Plant Proteins: How Do They Compare? Aug. 2019 <https://www.nutritionadvance.com/animal-protein-vs-plant-protein/>
- [7] Marinangeli, C.P.F. & House, J.D. Potential impact of the digestible indispensable amino acid score as a measure of protein quality on dietary regulations and health. Nutrition Reviews Vol 75(8):658-667. 2017
- [8] Phillips, S.M. Current concepts and unresolved questions in dietary protein requirements and supplements in adults. Frontiers in Nutrition. Vol. 4, art.13, 2017.
- [9] Ertl, P. et al. An approach to including protein quality when assessing the net contribution of livestock to human food supply. Animal 10:11, pp 1883-1889. 2016.
- [10] Nosworthy, M.G. et al. Effect of processing on the in vitro and in vivo protein quality of beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vicia Faba*). Nutrients. Jun: 10(6):671. 2018.
- [11] FAO. Research approaches and methods for evaluation the protein quality of human foods. Reports of an FAO expert working group. Rome: FAO 2014.
- [12] Kashyap, S. et al. Ileal digestibility of intrinsically labeled hen's egg and meat protein determined with the dual stable isotope tracer method in Indian adults. American Journal of Clinical Nutrition 108(6), 2018.
- [13] Devi, S. et al. Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. Am. J. Clin. Nutr. 2018 Jun; 107(6): 984–991.
- [14] Palka, K. and Wesierska. Cooking of meat. Physics and chemistry. Encyclopedia of meat sciences. Pp. 404-409. Devine, C. and Dikeman, M. 2014.

- [15] Bax, M.L. et al. Effects of meat cooking, and of ingested amount, on protein digestion speed and entry of residual proteins into the colon: A study in Minipigs. *PLoS One*. 2013;8(4).
- [16] Bax, M.L. et al. Cooking temperature is a key determinant of in vitro meat protein digestion rate: investigation of underlying mechanisms. *J Agric Food Chem*. 2012;60(10):2569-2576.
- [17] Santé-Lhoutellier, V. et al. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *J Agric Food Chem*. 2008;56(4):1488-1494.
- [18] Oberli, M. et al. Compared with raw bovine meat, boiling but not grilling, barbecuing, or roasting decreases protein digestibility without any major consequences for intestinal mucosa in rats, although the daily ingestion of bovine meat induces histologic modifications in. *J Nutr*. 2016;146(8):1506-1513.
- [19] Oberli, M. et al. High true ileal digestibility but not postprandial utilization of nitrogen from bovine meat protein in humans is moderately decreased by high-temperature, long-duration cooking. *J Nutr*. 2015;145(10):2221-2228.
- [20] Buffière, C. et al. In the elderly, meat protein assimilation from rare meat is lower than that from meat that is well done. *American Journal of Clinical Nutrition* 106, pp 1257-66. 2017.
- [21] Roldan, M. et al. Effect of different temperature-time combinations on lipid and protein oxidation of sous-vide cooked lamb loins. *Food Chem*. 2014;149:129-136.
- [22] Ertbjerg, P. et al. The effect of temperature and time on activity of calpain and lysosomal enzymes and degradation of desmin in porcine longissimus muscle. 58th International Conference of Meat Science and Technology (2012).
- [23] Christensen, L. et al. Effect of prolonged heat treatment from 48°C to 63°C on toughness, cooking loss and color of pork. *Meat Sci*. 2011;88,280-285.
- [24] Ursula Kehlet, Bhaskar Mitra, Jorge Ruiz Carrascal, Anne Raben, Margit D. Aaslyng. The satiating properties of pork are not affected by cooking method, LTLT holding time and pork structure – a randomized cross-over meal test study. *Nutrients* 2017, 9, 941.
- [25] Christensen, L. et al. Protein denaturation and water-protein interactions as affected by low temperature long time treatment of porcine longissimus. *Meat Sci*. 2011;88(4):718-722.
- [26] Ahmad, R. S. et al. Nutritional Composition of Meat. In book: *Meat Science and Nutrition*, pp 62-77, 2018.

- [27] Zhu, X. et al. Actinidin pretreatment and sous vide cooking of beef brisket: Effects on meat microstructure, texture and *in vitro* protein digestibility. *Meat Science*, Volume 145, pp 256-265, 2018.
- [28] Montoya et al. Actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) increases the digestion and rate of gastric emptying of meat proteins in the growing pig. *British Journal of Nutrition*. 111(6), 957-967. 2014.
- [29] Reitelseder, S. et al. Phenylalanine stable isotope tracer labeling of cow milk and meat and human experimental applications to study dietary protein-derived amino acid availability. *Clinical nutrition* 2020. In press.
- [30] Wang, W. et al. Changes in the extent and products of *In vitro* protein digestion during the ripening periods of Chinese dry-cured hams. *Meat Science*, 171, pp 1-9, 2021.
- [31] Lauridsen, L. Oxidation under lagring – en litteraturgennemgang af protein- og lipoxidation i svinekød. DMRI, 2003.
- [32] Gorissen S.H. et al. Carbohydrate coingestion delays dietary protein digestion and absorption but does not modulate postprandial muscle protein accretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 99(6):2250-8, 2014.
- [33] Chen, M. et al. The effect of viscous soluble dietary fiber on nutrient digestion and metabolic responses II: *In vivo* digestion process. *Food Hydrocolloids*. 107, 1-8, 2020.
- [34] Lin, Y. et al. Characterization of dietary fiber from wheat bran (*Triticum aestivum* L.) and its effect on the digestion of surimi protein. *LWT – Food Science and Technology*. 102, pp 106-1112, 2019.
- [35] Myrie, S.B. et al. Effect of common antinutritive factors and fibrous feedstuffs in pig diets on amino acid digestibilities with special emphasis on threonine. *J Anim. Sci*. 86(3):609-19, 2007.
- [36] Jansman, A.J.M. et al. Effects of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low or high content of condensed tannins on the apparent ileal and fecal digestibility of nutrients and the excretion of endogenous protein in ileal digesta and feces of pigs. *J Anim Sci*. 73: pp 118-127, 1995.
- [37] Marical-Landin, G. et al. Neutral detergent fiber increases endogenous ileal losses but has no effect on ileal digestibility of amino acids in growing pigs. *Animal Science Journal*, 88, pp 322-330, 2017.
- [38] Mongeau, R. et al. Relationship between dietary fiber levels and protein digestibility in selected foods as determined in rats. *Plant Foods for Human Nutrition* volume 39, pp 45–51, 1989.
- [39] Le Feunteun, S. et al. Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig *In Vivo* Data. *Food and Bioprocess Technology* volume 7, pp1099–1113, 2014.

- [40] Churchward-Venne, T. A. Ingestion of Casein in a Milk Matrix Modulates Dietary Protein Digestion and Absorption Kinetics but Does Not Modulate Postprandial Muscle Protein Synthesis in Older Men. *J Nutr.* 45(7):1438-45, 2015.
- [41] Burd. N.A. et al. Differences in postprandial protein handling after beef compared with milk ingestion during postexercise recovery: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 102, pp 828-36, 2015.
- [42] Dufour, C. et al. The matrix of fruit & vegetables modulates the gastrointestinal bioaccessibility of polyphenols and their impact on dietary protein digestibility. *Food Chem.*1; 240:314-322, 2018
- [43] Khodorova, N.V. et al. Urinary Metabolomics Profiles Associated to Bovine Meat Ingestion in Humans. *Mol. Nutr. Food Res.*63, 2019.

Bilag 1. Oversigt over *in vivo metoder* til fastlæggelse af sand proteinfordøjelighed med isotopmærkede prøver.

Formål	Produkt/ mærkning	Forbehandling af prøver	Forsøgsperso- ner	Testmåltid	Observationstid	Analyse (matrice)	Reference
Effekt af varmebe- handling	Oksekød, ¹⁵ N mærket	Dampovn (55°C i 5 min. /90°C i 30 min.)	10 raske, ældre mænd (70-82 år)	135 g hakket kød ~ 30 g protein	8 timer, prøve- udtag hver time	Blodplasma – ami- nosyrer/leucin	Buffière, C. et al. 2017 [20]
Effekt af varmebe- handling	Oksekød, ¹⁵ N mærket	Dampovn (55°C i 5 min. /90°C i 30 min.)	16 raske, unge mænd/kvinder (20-36 år)	120 g hakket kød ~ 27 g protein	8 timer, prøve- udtag hver time	N i blod, urin, og tyndtam	Oberli, M. et al. 2015 [19]
Effekt af varmebe- handling	Oksekød, ¹⁵ N mærket	Dampovn (55°C i 5 min. /90°C i 30 min.)	24 raske, unge mænd/kvinder (20-36 år)	120 g hakket kød	T=0 T=8 timer	Urin – meta- bolic profil	Khodorova, N.V. et al. 2019 [43]
Videreudvikling af Dual-tracer metode DIAAS	Kikærter/mungbøn- ner, ² H mærket		6 raske mænd/kvinder (18-45 år)	Minimåltider hver time. Kogte ris med ghee og curry	8 timer, prøve- udtag hver time	Udåndingsluft og blodprøver Aminosyrer -> DIAAS	Devi, S. et al. 2018 [13]
Opgradering af for- døjelighedsdata Dual-tracer	Æg, æggehvite, høn- sekød ² H mærket	Æg/hvide kogning 20 min. Kød, tryk- kogning 40 min.	6 raske, ikke-ry- gere i hver test- gruppe	Minimåltider hver time. Kogt æg/kød	8 timer, prøve- udtag hver ½ time fra 5.-8. t., hver time	Blodplasma Aminosyrer -> DIAAS (IAA)	Kashyap, S. et al. 2018 [12]
Effekt af måltidssam- mensætning/hydro- lyse	Oksekød/mælk/ proteinhydrolysat, d ₅ [phenylalanin] mær- ket	Hakket kød (HK), sous vide-be- handlet (90°C i 20 min). Hydrolysat: HK enz.	2 x 6 unge, ra- ske mænd	70 g hakkebøf/ 140 ml hydro- lysat	6 timer, prøve- udtag hver time	Aminosyreniveau i blodplasma	Reitelseder, S. et al. 2020 [29]
Effekt af måltidssam- mensætning	Oksekød/mælk (L-[1- ¹³ C]phenyl-ala- nin) mærket	Hakkebøf, grill- stegt skummetmælk (SM) fra pulver	12 raske, unge mænd	158 g hakke- bøf/ 350 mL SM ~ 30 g protein	5 timer, prøve- udtag hver ½ time	Blodplasma/biop- sier	Burd, N.A. et al. 2015 [41]

Bilag 2. Metoder til bestemmelse af proteinkvalitet (wikipedia.org)

<i>BV – Biologisk værdi</i>	BV udtrykker den andel af fordøjet protein, der er tilgængelig til syntese af celler i organismen. BV bestemmes som forskellen mellem indtag af protein-N og udskillelse af total-N. Der tages således ikke hensyn til faktorer, der påvirker fordøjelighed, idet der bestemmes det maksimale potentiale.
<i>PER – Protein Efficiency Ratio</i>	PER er baseret på en forsøgspersons vægtændring i en testperiode i forhold til indtaget af et givet protein. Mængden af protein til vedligehold af kropsvæv er således ukendt.
<i>NPU – Net Protein Utilization</i>	NPU er forholdet mellem mængden af aminosyrer, der omdannes til proteiner, og mængden, der indtages. NPU er i nogen grad påvirket af optaget af essentielle aminosyrer i kroppen, men påvirkes væsentligst af niveauet af begrænsende aminosyrer i et levnedsmiddel.
<i>PDCAAS – Protein digestibility corrected amino acid score</i>	Ved PDCAAS metoden rangeres proteinkvaliteten for et specifikt protein ved at sammenligne aminosyreprofilen med en standardaminosyreprofil, der har den højeste mulige score på 1,0. Hvis en essentiel aminosyre helt mangler i et protein, vil dette medføre en PDCAAS score på 0. PDCAAS scoren er således et udtryk for, hvor komplet aminosyrestrukturen er. PDCAAS evaluerer proteinkvaliteten ud fra et referenceprotein med en aminosyrekombination, der ligger nærmest ved menneskets behov.
<i>DIAAS – Digestible Indispensible Amino Acid Score</i>	DIAAS baseres som PDCAAS på en sammenligning af fødevarerproteiner med et referenceprotein. En væsentlig forskel er, at DIAAS vurderer fordøjeligheden af den enkelte aminosyre, mens PDCAAS bruger det intakte proteins fordøjelighed i beregningen. I modsætning til PDCAAS rundes scoren ikke ned til 1, hvilket har betydning for animalske proteiner, der kan have et højere indhold af specifikke aminosyrer end referenceproteinet. En score højere end 1 angiver, at det pågældende protein eller produkt har et potentiale for at kunne berige andre produkter. Med DIAAS fastlægges fordøjeligheden ideelt set i ileum hos mennesker.