



Slutrapport

Alternativ anvendelse af blod

Mari Ann Tørngren

30. december 2021

Projektnr. 2007982 (2020)

Projektnr. 2008806 (2021)

Version 1

MATN/mt

Baggrund

Ved projektets opstart blev blod primært anvendt til foder i pelsdyrindustrien, men dels er denne afsætningsmulighed fjernet, dels er der et uudnyttet økonomisk potentiale, som kan realiseres, hvis blod i højere grad kan bruges til produkter rettet mod human og medicinsk anvendelse. Blod indeholder værdifulde komponenter som fx immunoglobuliner, der blandt andet anvendes i lægemiddelindustrien og til at modvirke maveinfektioner både humant og i foder hos produktionsdyr. Specifikke proteiner i blod har gode funktionelle egenskaber og kan anvendes til emulgering og gelering samt som teksturgivere i fødevarer. Den voksende efterspørgsel på protein generelt betyder, at der på verdensmarkedet i fremtiden vil være et stort underskud af protein til humant konsum, hvilket giver forøgede muligheder for at anvende protein fra blod til fx proteinberigelse af fødevarer. Fordelen ved protein fra blod er, at det har en aminosyresammensætning med høj næringsværdi sammenlignet med fx plantebaserede proteiner, og at der ikke er erkendte problemer med allergener, som det ses ved både mælkebaserede og plantebaserede proteiner.

Projektet byggede videre på den viden, som blev opnået i projektet "Sidestrømme med høj funktionalitet", hvor der blev arbejdet med ekstraktion af protein fra sidestrømme i både laboratorie- og pilotskala. Som del af processen blev der arbejdet med membranfiltrering, som også forventes at kunne anvendes til oprensning og separation af værdifulde komponenter fra blod og andre sidestrømme.

Nytteværdi for branchen

Blod indeholder værdifulde komponenter som fx immunoglobiner eller proteiner med gode ernæringsmæssige og funktionelle egenskaber. Det økonomiske potentiale vil derfor i højere grad kunne realiseres, hvis anvendelsen bliver rettet mod humankonsum og/eller medicinsk anvendelse.

Projektets mål:

- Nye procedurer for oprensning af blod
- Dokumentation for blodkomponenternes egenskaber
- Scenarier for en økonomisk rentabel og optimal anvendelse af blod

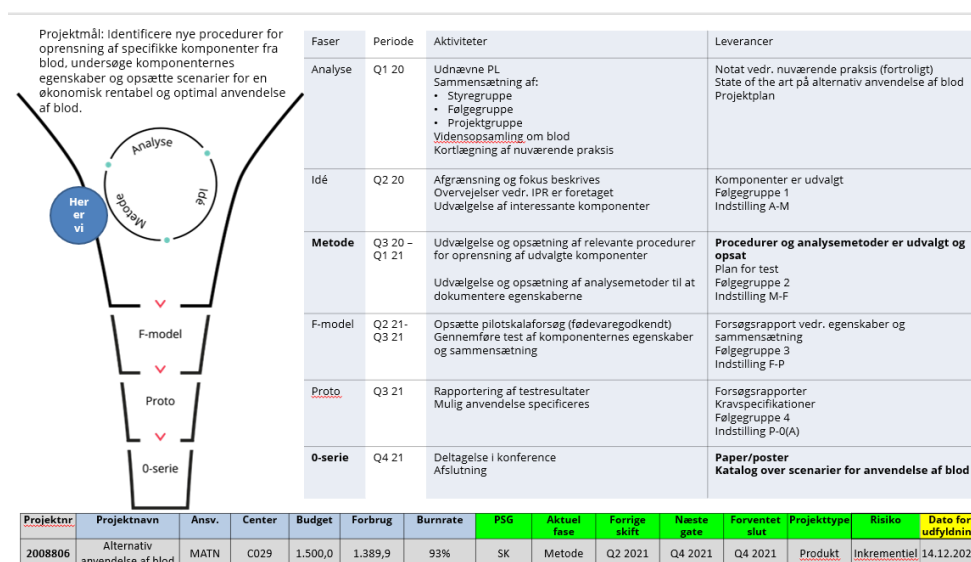
Status

Der blev identificeret 5 potentielle fokusområder:

1. Funktionelle ingredienser
2. Farmaceutiske produkter
3. Passiv immunisering
4. Bio-plast
5. Komponenter til ernæringsrigtige fødevarer

Fokusområde 3, 4 og 5 blev udvalgt af følgegruppen som særlig interessante, og der blev udarbejdet scenarier for disse områder, mens udviklingsaktiviteter blev afgrænset til prototypefremstilling af ernæringsrigtige ingredienser til fødevarer og/eller snacks.

Fremadrettet danner dette projekt grundlaget for det efterfølgende projekt "Blod som næringsbooster til petfood og fødevarer".



Figur 1. Projektet "Alternativ anvendelse af blod" afbildet ved DMRI's innovationsmodel.

Formål

Formålet med projektet var at skabe et vidensgrundlag, der i højere grad gør det muligt at anvende proteiner og andre komponenter fra blod til human anvendelse og/eller medicinske formål.

Mål

Målet var at identificere nye procedurer for oprensning af specifikke komponenter fra blod, undersøge komponenternes egenskaber og opsætte scenarier for en økonomisk rentabel og optimal anvendelse af blod.

Indhold

Projektet indeholdt tre aktiviteter:

Aktivitet 1. Vidensopsamling og kravspecifikation (2020)

En vidensopsamling om blod mhp. human anvendelse blev udarbejdet med baggrund i den tilgængelige videnskabelige litteratur og suppleret med en opdateret kortlægning af den nuværende praksis for opsamling, opbevaring, anvendelse og distribution af blod fra slagterierne. Ud fra vidensopsamlingen og dialog med følgegruppen blev de økonomisk mest interessante komponenter i blod udvalgt, og deres mulige anvendelse specificeret. Desuden blev de teknologier identificeret, der kunne anvendes til at udvinde de udvalgte komponenter fra blodet, så kvaliteten blev optimal i relation til den videre anvendelse, samt de analysemetoder der kunne anvendes til at dokumentere komponenternes egenskaber.

Aktivitet 2. Fraktionering, oprensning og egenskaber (2020-2021)

Med afsæt i vidensopsamlingen (aktivitet 1) blev der opsat relevante procedurer for oprensning af de udvalgte komponenter og analysemetoder til at dokumentere egenskaberne. De oprensede komponenters egenskaber og sammensætning blev herefter undersøgt med relevante analysemetoder, der var specifikke for de udvalgte komponenter.

Aktivitet 3. Applikationsscenarier (2021)

Der blev udarbejdet et katalog, hvori der blev opstillet en række scenarier for alternativ anvendelse af blod, herunder en cost-benefit-vurdering af scenarierne. For hvert scenarie indgik en opdateret kravspecifikation for, hvordan blod skulle behandles før oprensning, oprensningsproceduren og det endelige produkt.

Milepæle

For at indfri de pågældende leverancer blev følgende milepæle defineret:

- Vidensopsamling inkl. kortlægning af nuværende praksis blev rapporteret (2020)
- Procedurer for oprensning og analysemetoder blev udvalgt og opsat (2020)
- Resultater fra aktivitet 2 blev rapporteret (2021)
- Udvalgte resultater blev præsenteret på international konference (2021)
- Katalog med scenarier for alternativ anvendelse af blod blev udarbejdet og præsenteret (2021)

Organisation

Ved projektets opstart blev der nedsat en følgegruppe med repræsentanter for slagterierne og andre interessenter. Organisering og eksekvering af projektet fulgte DMRI's innovationsmodel (se figur 1), og projektet var underlagt DMRI's porteføljestyregruppe for Sikkerhed og Kvalitet.

Virksomhedsfølgegruppen bestod ved projektets afslutning af repræsentanter fra Tican, DAT-Schaub samt Danish Crown.

Projektgruppen bestod af følgende kompetencer:

- Projektledelse: Mari Ann Tørngren i hele forløbet
- Litteraturreview: Birgitte Lund, Kjartan Kaas-Larsen, Lam Ngoc Trac
- Metodeudvikling: Birgitte Lund, Kjartan Kaas-Larsen, Lam Ngoc Trac
- Kemiske analyser: Lam Ngoc Trac, Maj-Britt Rolsted, Tina Frogne
- Fraktionering og reduktion af bitter smag: Louise Hededal Hofer
- Opskalering: Louise Hededal Hofer, Kjartan Kaas-Larsen

Finansiering

Projektets aktiviteter blev finansieret af Svineavgiftsfonden (SAF), men relaterede aktiviteter omkring indkøring af ny teknologi og analysemetoder blev gennemført sideløbende for resultatkontraktmidler (RK).

Tabel 1. Finansiering af aktiviteter vedr. alternativ anvendelse af blod

	2020	2021	Samlet
SAF	1.500	1.500	3.000
RK BF1		350	350
I alt	1.500	1.850	3.350

Resultater

I de følgende afsnit gennemgås aktiviteternes formål samt de vigtigste resultater.

Leverancer 2020

- Litteraturgennemgang inkl. prioritering af fokusområde
- Oprensning af udvalgte komponenter
- Komponenternes sammensætning og egenskaber

Leverancer 2021

- Scenarier for alternativ anvendelse af blod
- Konferencebidrag ved ICoMST 2021 (se, "Leverancer og Publikationer")
- Slutrapport

Aktivitet 1. Litteraturgennemgang

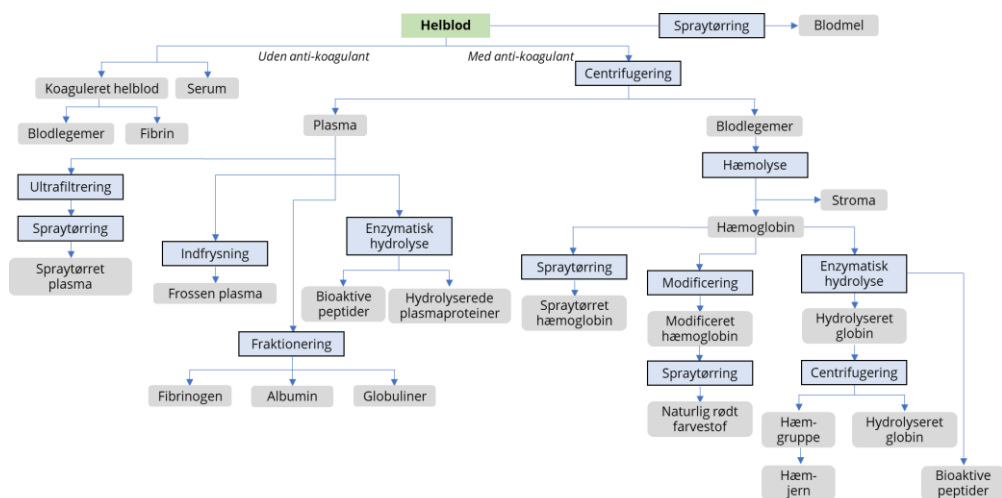
Formål At udarbejde et vidensgrundlag som støtteværktøj til prioritering af fokusområder i projektet.

Resultater Der blev udarbejdet en litteraturgennemgang samt redegjort for nuværende praksis for opsamling og anvendelse af griseblod på danske slagterier. På baggrund heraf blev der udarbejdet et beslutningsgrundlag for prioritering af projektets fremadrettede fokus.

Der blev identificeret 5 potentielle fokusområder:

1. Funktionelle ingredienser
2. Farmaceutiske produkter
3. Passiv immunisering
4. Bio-plast
5. Komponenter til ernæringsrigtige fødevarer.

Ved projektets første følgegruppegruppemøde blev fokusområde 3, 4 og 5 udvalgt som mest relevante fokusområder.



Figur 2. Anvendelsesmuligheder for helblod.

Konklusion

I samarbejde med følgegruppen blev projektet afgrænset til tre fokusområder ved enstemmig prioritering:

3: Passiv immunisering

4: Bio-plast

5: Komponenter til ernæringsrigtige fødevarer

Der blev derfor udarbejdet scenarier for disse tre områder.

Projektets faglige udviklingsaktiviteter blev afgrænset til prototypefremstilling af ernæringsrigtige ingredienser til fødevarer, hvor det blev undersøgt, om underudnyttede blodfraktioner kunne anvendes til fremstilling af en farve- og smagsneutral proteinfraktion.

Aktivitet 2. Oprensning af udvalgte komponenter

Formål

At identificere og opsætte metoder til at fjerne den røde farve fra blod.

Resultater

Følgende metoder blev identificeret som mulige teknologier til affarvning af griseblod:

- Enzymatisk hydrolyse
- Elektrolytisk affarvning
- Adsorptionsprocesser
- Ozonering

Enzymatisk hydrolyse medfører en delvis nedbrydning af proteinet til mindre peptider. Hæmgruppen giver blodet den røde farve, og ved en delvis nedbrydning af proteinet kan jern frigives og separeres fra resten af proteinet ved fx centrifugering. Flere tidligere forsøg har vist, at hydrolyse af proteiner leder til en kraftig bitter smag, som skyldes opkoncentrering af mindre peptider. Der er veldokumenteret, at fx Alcalase og flere andre enzymer kan affarve blod, men om metoden kan tilpasses, så dannelse af bitterstoffer undgås, er endnu ikke vist. Dette giver anvendelsen af blod et fornyet potentiale, da en behandling til en mindre hydrolysegrad sandsynligvis vil medføre en hurtigere procestid, øget udbytte og bedre sensorisk kvalitet.

Indledningsvist blev der gennemført en række hydrolyseforsøg med følgende enzymer for at afklare, hvilket enzym der var bedst egnet til formålet.

Tabel 2. Optimale betingelser for udvalgte enzymer til hydrolyse af hæmoglobin.

Enzym	Temperatur	pH	Anbefalet dosis
Alcalase, NOVO	55°C	8,5	0,5%
Alcalase, Sigma	55°C	8,5	0,5%
Foodpro 30L	50°C	9,0-9,5	0,1-0,5%
Foodpro 51FP	50°C	6,0-8,0	0,02-0,2%
Protease A. Niger	42°C	3,0	0,01-0,015%
Papain	55°C	7,0	0,35%

Elektrolytisk affarvning har ved indledende forsøg vist at være en effektiv metode til affarvning af blod, men har også vist at der dannes hypoklorsyre under processen. Elektrolytisk affarvning blev derfor vurderet uegnet til levnedsmiddelformål og blev derfor fravalgt efter de indledende forsøg.

Adsorptionsprocesser viste sig relevante som efterbehandling til en proces, hvor blodproteinet var delvist affarvet og havde ændret struktur. Dette skyldes, at hæmoglobin udgør størstedelen af proteinet i hæmoglobinfraktionen, og derfor vil der reelt ikke være noget protein tilbage, hvis hæmoglobin fjernes. Da dette er en dyr teknologi, forventes den kun relevant til finpolering i tilfælde, hvor der ønskes et helt rent protein, fx efter en enzymatisk hydrolyse, hvor der stadig er en lille rest af rød farve tilbage.

Ozonering blev vurderet uegnet til affarvning af blod, da det vil kræve meget kraftig ozonering, hvis væsken skal blive klar og ikke brunfarvet. Affarvningen sker som følge af, at proteinet denaturerer og agglomerer til partikler. Der er med andre ord tale om, at farvefjernelsen skyldes, at protein fjernes, hvilket ikke er hensigtsmæssigt i denne sammenhæng.

Konklusion

Med udgangspunkt i ovenstående vurderinger og forsøg havde det efterfølgende arbejde fokus på enzymatisk hydrolyse til affarvning af blodet. Efter indledende test blev det klart, at potentialet var størst for enzymerne papain og protease A. Niger, mens Alcalase blev anvendt som referenceenzym.

Metoden blev gradvist opskaleret til forskellige batchstørrelser i laboratorieskala på hhv. 100 ml, 500 ml og 1000 ml, hvor 500 ml også blev gennemført under fødevarer-godkendte betingelser og dermed muliggjorde sensorisk bedømmelse af hydrolysaterne.

Procedurer

Efter en lang række optimeringsforsøg blev der udviklet to procedurer for optimal farvefjernelse i griseblod, dels metode 5 til laboratorieskala og dels metode 6 til pilot plant-skala. Forskellen på de to metoder fremgår af punkt 2:

1. Blod: Der blev udelukkende anvendt hæmoglobin (RBC), hvor plasmadelen var blevet separeret fra på slagteriet. Blodet kunne stå i køleskab en dag før hydrolyseforsøget eller opbevares på frost. Til sensoriske forsøg kræves, at blodet er både AM og PM godkendt.
2. Hæmolyse: Før hydrolyse blev RBC fortyndet 1:4 i vand. Det var vigtigt, at RBC var helt opløst i vandet og homogen i opløsningen. Der er forskellige metoder til at få homogen hæmolyse, fx omrøring, ultralyd, PEF osv. Efter en række optimeringsforsøg viste det sig, at det var bedst at anvende omrøring og ultralyd i kombination. Omrøringen fik RBC til at fordele sig jævnt i opløsning, mens ultralyden knækkede RBC og klumpede hurtigere (metode 5). Da ultralyd ikke var en mulighed i pilot plant, blev der tilføjet ekstra omrøring i metode 6.
3. Enzymaktivering: Enzymopløsningen skulle laves samme dag som hydrolysen. Opløsningerne skulle omrøres omhyggeligt, til væsken var klar, og der ikke var klumper i opløsningen (mindst 30 min med magnet i 50-100 ml kolbe). Det var vigtigt, at enzymet var helt opløst før tilsætning til RBC-opløsningen for at undgå ustabil enzymkinetik.

4. Inkubation: Enzymatisk hydrolyse af RBC skulle gennemføres ved de optimale betingelser for det enkelte enzym. I tabel 2 er angivet betingelser for de testede enzymer (temperatur, pH, enzymsubstratkonzentration).
5. Inaktivering: Enzymet skulle stoppes på rette tidspunkt, hvor succeskriterier for hydrolysegrad, affarvning og udbytte var tilfredsstillende indfriet. For at stoppe hydrolysen skulle enzymet inaktiveres, hvilket blev opnået ved opvarmning til 80-90°C i 10-15 min. Ved høj temperatur blev enzymet denatureret og var derfor ikke længere aktivt.
6. Justering af pH-værdi før separation: Efter inaktivering af enzymet blev pH justeret til 4 eller 5. Ved denne pH blev ikke-hydrolyserede proteiner udfældet. Disse proteiner indeholdt hæm og blev adskilt fra de opløste proteiner ved centrifugering. Efter centrifugeringen var det supernatanten, der indeholdt det farveløse blodprotein, som efterfølgende kunne anvendes, opkoncentreres eller oprenses yderligere.

Aktivitet 3. Komponenternes sammensætning og egenskaber

Formål At undersøge de oprensede komponenters egenskaber og sammensætning.

Resultater Med afsæt i aktivitet 1 og 2 blev proteinets sammensætning og egenskaber undersøgt ved analyse af:

- Affarvningsgrad (DD%)
- Hydrolyseringsgrad (DH%)
- Protein recovery%
- Aminosyresammensætning
- Størrelsesfraktionering ved size exclusion
- Sensorisk bedømmelse i test matrice

Til vurdering af de forskellige udviklingstrin blev der defineret en række succeskriterier for optimal affarvning af blodet:

1. Affarvningsgrad, DD% = Svag gullig /rosa
2. Hydrolyseringsgrad, DH% = Lav (< 20)
3. Udbytte/recovery = Høj (60-70%)

Affarvningsgrad (DD%)

Affarvningsgraden (degree of decoloration, DD%) blev bestemt ved en spektrofotometrisk måling på hydrolysatet ved 405 nm både før og efter hydrolyse.

$$DD\% = \left(1 - \frac{ABS \text{ efter hydrolyse}}{ABS \text{ før hydrolyse}}\right) * 100$$

Hydrolyseringsgrad (DH%)

Hydrolyseringsgraden (degree of hydrolysis, DH%) kan bestemmes ved OPA-test, som er udviklet af (Nielsen et al., 2001). Den findes dog i flere modificerede versioner, Rene Lametsch refererer fx til (Spellman et al., 2003).

Ved OPA-test måles på spektrofotometer ved 340 nm. OPA-reagenset skal være friskfremstillet for at kunne få en optimal blindværdi (blank OD = 0,07). Hvis man analyserer samme dag, som hydrolysen gennemføres, kan man bruge fortyndingerne fra DD-analysen. Hvis prøverne er optøede, laves nye fortyndinger.

Procedure

1. Fortynd prøven i samme fortynding som farvemålingen
2. Gennemfør 2 x Blank + 2 x Standard
3. Gennemfør analyse på hydrolysat (prøve)
4. Gennemfør 2 x Standard + 2 Blank

Standard: 200 µL serine std. opl. + 1,5 mL OPA opl. står præcis 2 min og måles ved 340 nm.

Blank: 200 µL vand + 1,5 mL OPA opl. står præcis 2 min og måles ved 340 nm.

Prøve: 200 µL prøve opl. + 1,5 mL OPA opl. står præcis 2 min og måles ved 340 nm

Hydrolyseringsgraden bestemmes ved: $DH = \frac{h}{h(tot)} * 100$

Hvor, $h = \frac{\text{serine-NH}_2 - \beta}{\alpha} \frac{\text{meqv}}{g} \text{protein}$

Serine-NH₂ = $\frac{OD(\text{Sample}) - OD(\text{Blank})}{OD(\text{Std}) - OD(\text{Blank})} * \frac{0,9516 \text{ meqv/L} * 0.1 * 100}{X * P}$

$\alpha + \beta + h(tot) = \text{konstanter}$

Protein recovery%

Protein recovery% er et udtryk for, hvor meget af det oprindelige blodprotein der kan genfindes i supernatanten (produkt) efter hydrolysen, og hvor stor en andel der er gået tabt i bundfaldet (spild). Til bestemmelse af protein recovery gennemføres først en proteinbestemmelse (Kjeltec 8420) på supernatanten (2-4 ml) og i nogle tilfælde bundfaldet (0,2-0,5 g). Til beregning af recovery er det vigtigt, at man kender vægten på supernatanten og bundfaldet. Derfor skal centrifugeglas været afvejet inden start af hydrolysen. Efterfølgende vejes de to faser (supernatanten og bundfaldet), når hydrolysen er udført.

Protein recovery var et af de tre succeskriterier, hvor målet var 60-70% i supernatanten. Dette blev opnået for alcalase efter 2 timer, for A. Niger fra opstart af hydrolysen, men resultatet var lidt svingende for papain, hvor succeskriteriet blev opnået efter 5+ timer.

Forsøgsrække Uge 15

A. Niger



T0_0	T0	T2	T3	T4	T5	T24
69	67	58	55	55	55	55

Papain



T0_0	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T24
9	25	29	38	46	56	60	65

Papain



T0_0	T0	T2	T3	T4	T5	T24
10	36	33	35	46	46	62

Alcalase



T0_0	T0	T2	T3	T4	T5	T24
9	47	65	60	58	61	70

Aminosyresammensætning

Der blev lavet en indledende vurdering af proteinkvaliteten, der blev baseret på blodhydrolysaternes aminosyresammensætning (AAS), hvilket betyder, at der ikke blev taget højde for fordøjelse eller manglende fordøjelse af de essentielle aminosyrer. Analysen blev gennemført af Eurofins, baseret på ISO 13903:2005 (IC-UV) og EU 152/2009 (LC-FLD).

Undersøgelsen af blodcellekoncentratet og hydrolysater fra de testede enzymer (tabel 2) viste, at indholdet af essentielle aminosyrer generelt lå højt bortset fra isoleucin, der lå under detektionsgrænsen for hydrolysaterne.

Det lave indhold af isoleucin var forventet (Pearson, 1988; Aaslyng, 2015) og gør, at der i et ernæringsrigtigt produkt med blodhydrolysat som ingrediens bør indtænkes en anden kilde til isoleucin. Dette kunne fx være protein fra cerealier, som kan have et højt indhold af isoleucin (Haard, 1999). Protein fra cerealier og protein fra blodhydrolysater komplementerer også hinanden godt ved indholdet af lysin, som typisk er lavt for cerealier (Pearson, 1988; Sa et al., 2020). Baseret på denne undersøgelse vurderes, at alle de anvendte enzymer resulterer i samme proteinkvalitet og dermed samme ernæringskvalitet.

Størrelsesfraktionering ved size exclusion (HPLC)

For at få en bedre forståelse af hydrolysaternes sammensætning blev de karakteriseret i forhold til proteinernes molekylvægt. Til dette formål blev en specifik metode beskrevet til size exclusion chromatography (SEC) af hydrolysater fra blod og protein fra griselunger.

SEC anvendes i vid udstrækning til at bestemme molekylvægten af analytter af interesse, fx polymer, proteiner osv. Analysen blev foretaget, ved at prøven blev ført gennem en kolonne, der var pakket med partikler med forskellige porestørrelser. Prøvens molekyler eluerede fra kolonnen alt efter deres størrelse. Molekyler med størst molekylvægt eluerede først, mens mindre molekyler eluerede sidst, da de skulle "rejse" en længere vej gennem kolonnens porer. SEC kan bruges som et selvstændigt system eller kan integreres i et HPLC-system.

I dette projekt blev SEC HPLC brugt til at bestemme størrelsesfordeling af proteinprodukterne efter hydrolyse af blod. Formålet med analysen var at danne et vidensgrundlag for efterfølgende oprensning/filtrering til optimering af den sensoriske kvalitet af blodhydrolysater ved at reducere indholdet af bitre peptider.

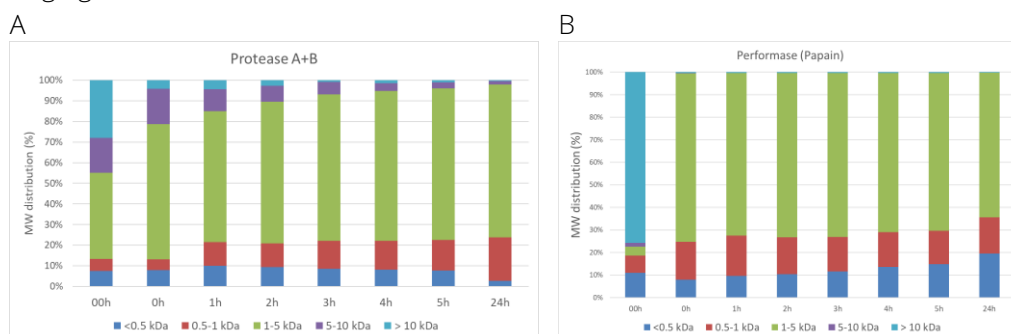
Der er adskillige hypoteser angående udvikling af bitter smag:

- Et peptidmolekyle med et højt indhold af aminosyrer med hydrofobe sidekæder vil udvikle bitter smag (Matoba & Hata, 1972).
- Aminosyrerne i en peptidkæde bidrager uafhængigt til bitterhed uanset aminosyresekvenser og konfiguration (Matoba & Hata, 1972).
- Alle peptider med høj hydrofobicitet, 1400 cal res-1 eller højere, er bitre (Guigoz & Solms, 1976).

Derudover afhænger bitterhed også af størrelsen på peptiderne, som kan relateres til hydrolysegraden (DH). Der er dog mange forskellige bud på, hvilke peptidstørrelser der er de bitre, men fælles for de flere videnskabelige artikler er, at det er de små peptider, som er de mest bitre, særligt for hæmoglobin i området 500-5000 Da (Aubes-Dufau & Combes, 1997).

Separationen blev i dette projekt udført med Agilent AdvanceBio SEC 130Å 2,7 µm 4,6 x 300 mm kolonne og tilhørende forkolonne. Agilent AdvanceBio SEC 130 Å proteinstandardkit blev brugt til at skabe kalibreringskurve til molekylvægtberegninger. Prøverne og standarderne blev kørt med 150 mM fosfatbuffer pH 7, ved et flow på 0,35 ml/min og en temperatur på 35°C. Detektion blev opnået med både DAD (ved 220 nm) og RI-detektorer.

Figur 3 viser resultaterne fra SEC HPLC ved hydrolyse af hydrolyseret hæmoglobin med A. Niger (protease A+B) og Performase (Papain) i 0-24 timer. Figuren viser, at kun en mindre del af proteinet er større end 6000 Da og dermed for stort til at interagere med smagsreceptorerne (Coultate, 2009). Det vil sandsynligvis være peptider fra den grønne og den røde fraktion, der bidrager til bitterhed, men hvilke og hvor meget er fortsat uvist. Da det vil betyde en enorm udbyttereduktion at fjerne disse fraktioner, skal det fremadrettede arbejde fokusere på yderligere fraktionering og samt sensorisk test af fraktionerne.



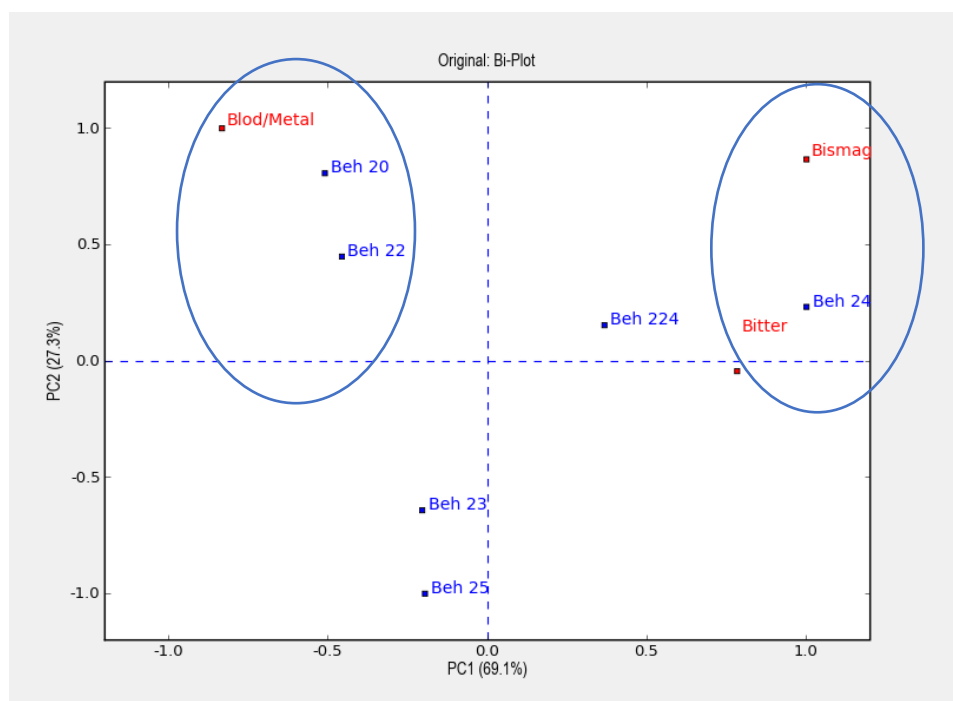
Figur 3. Størrelsesfordeling af proteiner ved anvendelse af HPLC med 130Å kollonne under hydrolyse af hæmoglobin med enzymerne A. Niger (protease A+B) og Performase (Papain) i 0-24 timer.

Sensoriske egenskaber

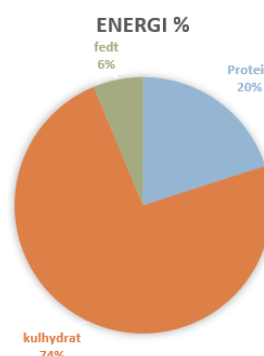
Til bedømmelse af sensorisk kvalitet af hydrolysaterne blev der udviklet en metode til direkte smagning på supernatanten efter hydrolyse samt en smagsneutral fødevaretestmatrice til test af forskellige koncentrationer af oprenset protein.

Smagning direkte på hydrolysatet bør gennemføres på maks. 8 prøver, da hydrolysaterne kan være meget kraftige i smagsindtrykket. Derfor bør antallet af egenskaber heller ikke overstige 3-4 egenskaber. I de indledende test blev der anvendt en 4-trinsskala, men det anbefales at anvende en sensorisk 5-trinsskala i stedet (0 = ingen, 1 = lidt, 2 = mellem, 3 = betydeligt, 4 = markant). Desuden bør dommerne trænes inden bedømmelsen, da ekstremerne kan variere betydeligt afhængig af de valgte procesparametre. Det bør desuden overvejes, om frisk bold kan inddrages som reference.

Nedenstående bi-plot viser smagning af 6 blodhydrolysater behandlet i 0-24 timer med alcalase. Af figuren ses, at prøverne adskiller sig på egenskaberne blod/metal versus bitter/bismag og indikerer, at smagsindtrykket går fra intens blodsmag mod intensiveret bitter smag ved øget hydrolysetid. Der er desuden udviklet et elektronisk bedømmelsesskema, der faciliterer hurtig resultatopgørelse efter bedømmelsen.



Fødevaretestmatrice: Til sensorisk bedømmelse af nye proteiningredienser i fødevarer blev en relativ smagsneutral testmatrice udviklet. Det var boller bestående af vand, mel og proteinpulver, samt et minimum af salt og gær. Testmatricen kan også indfarves, hvis det er nødvendigt at maskere evt. restfarve fra proteinet.



Pr. 100 g
 Energi: 763 kJ
 Protein: 9 g
 Kulhydrat: 33 g
 Fedt: 1,3 g

Diafiltrering

Til yderligere oprensning af hydrolysatet – med det formål at fjerne mindre peptider og dermed bitter bismag – blev diafiltrering testet. Til dette formål blev det ny-erhvervede diafiltreringsudstyr (Hollowfibers) anvendt. Indkøbet af dette er støttet af Norma og Frodes Fond. Udstyret giver mulighed for at fraktionere hydrolysatet ved 1 kDa (afventer levering), 3 kDa, 5 kDa og 10 kDa. Dette arbejde påbegyndes i det nye projekt 2022-23.

Aktivitet 4. Scenarier for alternativ anvendelse af blod

Formål

At udarbejde et katalog, hvori der opstilles en række scenarier for alternativ anvendelse af blod, herunder en cost-benefit-vurdering af scenarierne. For hvert scenarie indgår en kravspecifikation for, hvordan blod skal behandles før oprensning, oprensningsproceduren og det endelige produkt.

Resultater

I nedenstående tabel er angivet hovedkonklusioner for de tre scenarier.

	Scenarie1 Ernæringskomponent til fødevarer	Scenarie 2 Bio-plast	Scenarie 3 Passiv immunisering
Formål	At isolere smags- og farveløst protein fra hæmoglobin og udnytte den gode protein-kvalitet i fødevarer/snacks m.m.	At anvende blodmel til fremstilling af bio-plast. Metode til processering af blodprotein til bio-plast blev demonstreret (Waikato University, NZ).	At isolere immunoglobuliner (IgG) fra plasma, til-sætte det til foder og dermed beskytte smågrise mod diarré ved fravæning
Udfordringer	Relativt lavt udbytte efter hydrolyse, samt sensorisk kvalitet. Konsistente resultater ved opskalering af proces. Holdbarhed af flydende blodingrediens.	Udfordringer ligger i fremstilling af råvaren til plasten. Barriereegenskaber, skrøbelighed, migration m.m.	EU-krav: Opvarmning til mindst 80°C vil ødelægge en del af antistofferne. At inaktivere virus (OBS 1:3 modelvirus er undersøgt på DTU).
Behov	Booster til animalske fødevarer og petfood.	Primært nonfood. Anden anvendelse kræver coating.	Fra 1. juni 2022 er det forbudt at ordinere medicinsk zink til griseproduktionen.
Værdi	Med nuværende dansk produktion er produktionen estimeret til 4.000 tons protein pr. år, hvilket potentielt kan opnå en værdi på 150-700 mio. kr. Derfra skal fratrækkes udgifter til investering, drift og bortskaffelse af restprodukter.	Med nuværende dansk produktion er produktionen estimeret til 4,5 tons pellets pr. år. Standardudstyr indenfor plastindustrien kan også anvendes til bioplast fx laminering, termoforming, injektionsstøbning.	Med nuværende dansk produktion er produktionen estimeret til 225 tons pr. år, hvilket dækker ≈ 5% af danske smågrise. Men det er kun en del af løsningen og skal suppleres med andre tiltag fx fokus på alder ved fravæning, foderstrategi (form, tidspunkt, protein m.m.), hygiejne og immunitet (IgG, E-coli vaccine).

Konklusion

Der er potentiale for anvendelse af griseblod til andre formål end biogas og foder til pelsdyr, fx funktionelle ingredienser, farmaceutiske produkter, passiv immunisering, bio-plast eller som ingrediens til ernæringsrigtige fødevarer.

Projektets faglige fokus har været afgrænset til udvikling af procedurer for oprensning af blodets hæmoglobindel til en ernæringsrigtig, farveneutral proteiningrediens.

Det er vist, at det er muligt at opnå et tilfredsstillende resultat ved hjælp af enzymatisk hydrolyse.

Blodproteinets ernæringsmæssige og sensoriske egenskaber er desuden blevet undersøgt og viser, at valg af enzym og dosis/behandlingstid påvirker proteinernes størrelsesfordeling og den sensoriske profil, ved at gå fra intens blodsmag til intens bitter smag.

Det er formodentligt for kraftig nedbrydning af proteinet til bitre peptider, der forårsager den uønskede bitre smag. Derfor er der arbejdet på at optimere proceduren og bestemme det "vindue", hvor blodsmagen er reduceret tilstrækkeligt, og den bitre smag endnu ikke er dominerende.

Opnås et tilfredsstillende resultat ved en kortere hydrolysetid, vil det betyde en mere rentabel proces, da en hydrolyse, der køres til ende, ofte tager op til 24 timer, mens en tilfredsstillende affarvning allerede opnås efter 3-4 timers inkubation. Dette undersøges i et efterfølgende projekt.

Perspektivering

Skal proteinet anvendes til fødevarer, bør de sensoriske egenskaber optimeres yderligere. Dette kan evt. ske ved hjælp af oprensning med diafiltrering, hvor små bitre peptider fjernes fra hydrolysaten inden opkoncentrering.

En oprensning vil betyde lavere udbytte. Derfor kan det også være relevant at se på andre anvendelser end fødevarer, hvor bismag kan være en fordel fx ved at bruge blodet til dyrefoder til enten fisk eller kæledyr.

Leverancer og publikationer

Nedenfor er angivet projektets leverancer i 2020 og 2021.

Leverancer som angivet i ansøgningen	2020	2021
Større udredninger/analyser/rapporter o.l.	1	
Nye koncepter/strategier/processer/praksisser o.l.		1
Mindre udredninger/analyser/notater o.l.		1
Formidling af viden i form af indlæg på møder, konferencer o.l.		1

Projektets resultater er offentliggjort på [Teknologisk Instituts hjemmeside](#).

Rapporter

1. Mosby Jespersen, C. (2020). Kortlægning af nuværende praksis (fortrolig)
2. Kaas-Larsen, K. (2020). Litteraturstudie – Alternativ anvendelse af blod
3. Kaas-Larsen, K. (2020). Teknologier til affarvning af blod (notat)
4. Faurschou, P., Rolsted, M. og Lund, B. W. L. (2020). Hydrolyse af blod med enzymer (notat)
5. Trac, L. N. (2021). Opsamling af resultater og erfaringer igennem hydrolyseforsøg i 2021
6. Rejserapport vedr. studietur til Danish Crown, Ringsted (fortrolig)
7. Mosby Jespersen, C. og Tørngren, M. A. (2021). Scenarier for alternativ anvendelse af blod
8. Tørngren, M. A. Slutrapport for Alternativ anvendelse af blod (2021)

Konferencebidrag

1. Tørngren, M. A., Trac, L. N., Hofer, L. H., Lund, B. W. L., Kaas-Larsen, K. B., Rolsted M. og Mosby Jespersen, C. (2021). A method for upgrading porcine blood into a decolourized and tasteful protein ingredient. International Conf 67th International Congress of Meat Science and Technology (Hybrid Congress). August 23-27, 2021, KRAKÓW.

Referenceliste

Aubes-Dufau, I., & Combes, D. (1997). Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 67(1-2), 127-138. <https://doi.org/10.1007/bf02787847>

Coulter, T. (2009). *Food. The chemistry of its components*. 5th edition. RSC Publishing.

Guigoz, Y., & Solms, J. (1976). Bitter peptides, occurrence and structure. *Chemical Senses and Flavor*, 2(1), 71-84. <https://doi.org/10.1093/chemse/2.1.71>

Haard, N. F., Odunfa, S.A., Lee, C., Quintero-Ramirez, R., Lorence-Quinones, A., Wachter-Radarte, C. (1999). Fermented cereals. A global perspective. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Matoba, T., & Hata, T. (1972). Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(8), 1423-1431. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860410>

Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>

Pearson, A. M., Dutson, T.R. (ed). (1988). *Edible meat by-products*. Advances in meat research. Vol. 5. Elsevier.

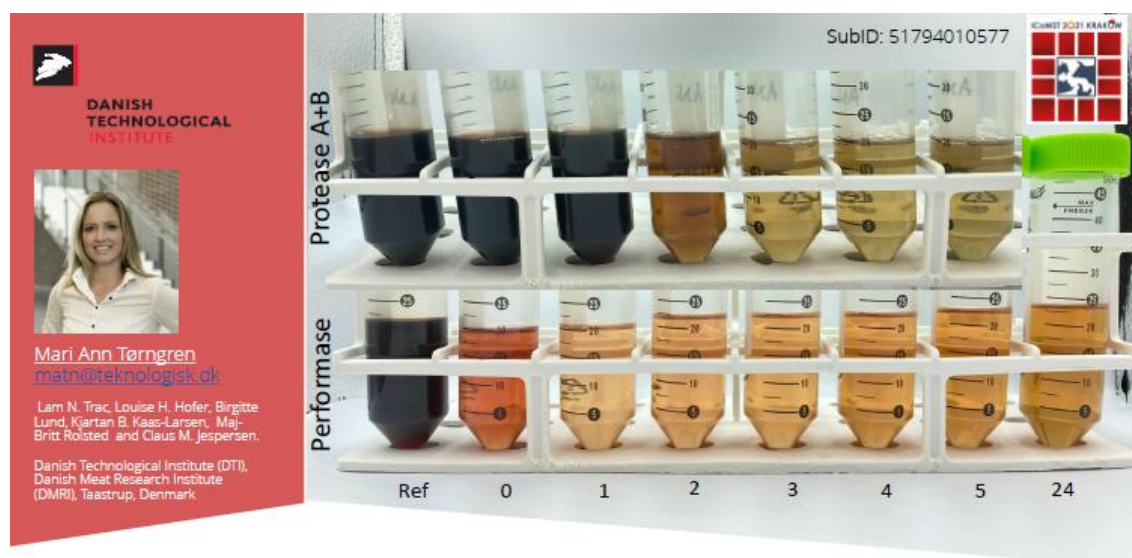
Sa, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170-184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(03)00053-0)

Aaslyng, M. (2015). Litteraturopsamling. Nye blodprodukter med bedre funktionelle egenskaber. DMRI-rapport. <https://www.teknologisk.dk/projekter/maaltider-med-svinekoed-raavarer-teknologi-og-ernaering/35881?cms.query=nye+blodprodukter>

AKTIVITET	START	SLUT	NOTE
Analysefase	1. kv. 2020		Opstartsmøder Udarbejdelse af projektplan
Litteratur Review	Jan. 2020	Marts 2020	Der blev udarbejdet et notat vedr. nuværende praksis for håndtering af blod samt litteraturreview vedr. anvendelse af blod til funktionelle ingredienser, farmaceutiske produkter, passiv immunisering, bio-plast og nye ernærings-rigtige ingredienser.
1. følgegruppemøde	d. 25.03.2020		Mødets primære formål var at afgrænse projektet og udvælge de mest interessante anvendelser for blod. Top-3 var enstemmigt: 3. Passiv immunisering 4. Bio-plast 5. Ernæringsrigtige fødevarer Derfor blev der udarbejdet scenarier for disse, mens udviklingsaktiviteter blev afgrænset til prototypefremstilling af ingredienser
Gate: Analyse til idéfase	2. kv. 2020 (16.04.21)		<u>Faseskift fra analyse- til idéfase:</u> - Vidensopsamling vedr. nuværende praksis - Litteraturreview vedr. alternativ anvendelse af blod - Projektplan - Referat af følgegruppemøde med indstilling - Projektafgrænsning - Indstilling til porteføljestyregruppen <u>Faseskift fra idé- til metodefase:</u> - Specifikation af projekt-output - Referat af følgegruppemøde med indstilling - Indstilling til porteføljestyregruppen
Udvikling af metode til affarvning af blod	Marts 2020	Dec. 2020	Indkøring af lab-metode 100 ml Opskalering af metode til 500 ml Indkøring af levnedsmiddelgodkendt metode
Komponenternes sammensætning og egenskaber	Marts 2020	Dec. 2020	Affarvning (DD%), hydrolyseringsgrad (DH%), proteinindhold/recovery%, size exclusion af hydrolysat, aminosyresammensætning
2. følgegruppemøde	12.03.2021		Godkendelse af succeskriterier for affarvning, hydrolysegrad og recovery% samt plan for kommende forsøg blev godkendt og indstilling til faseskift
Gate: Metode til F-model	1. kv. 2021 (26.03.21)		<u>Faseskift fra metode- til F-model:</u> - Procedurer og analysemetoder udvalgt og opsat - Plan for test forelå 2. følgegruppemøde afholdt - Indstilling metode til F-model blev godkendt

AKTIVITET	START	SLUT	NOTE
Konferencebidrag	23. aug. 21	27. aug. 21	Deltagelse ved ICoMST 2021. 67 th International Congress of Meat Science and Technology (Hybrid Congress) August 23-27, 2021, KRAKÓW med abstract og poster "A method for upgrading porcine blood into a decolorized and tasteful protein ingredient".
Gate: F-model til metode	2. kv. 2021 (23.06.21)		Faseskift fra F-model- til metodefase: Idet procedurer og analysemetoder ikke var tilfredsstillende indkørt.
Konferencebidrag	3. nov. 2021		Deltagelse ved TI's fødevarekonference 2021, Fremtidens fødevareproduktion – omstilling til klimaneutral værdikæde, med stand om animalske sidestrømme.
Studiebesøg	Nov. 2021		Proteingruppen besøgte Danish Crown, Ringsted for at opnå en samlet forståelse af slagteriets håndtering af sidestrømme bl.a. blod.
Scenarier for alternativ anvendelse af blod	Nov. 2021	Dec. 2021	Der blev udarbejdet scenarier for fokusområderne: Passiv immunisering, Bio-plast og Ernæringsrigtige ingredienser til fødevarer.
Gate: Metode til afslutning	4. kv. 2021		Faseovergang fra metodefase til 0-seriefase blev godkendt. Projektets resultater blev samlet i en slutrapport, og der blev taget afsæt herfra i et nyt blodprojekt i 2022-23
Slutrapport	Dec. 2021	Dec. 2021	Link til hjemmesiden



A method for upgrading porcine blood into a decolourized and tasteful protein ingredient

AIM

The aim of this study is to develop an enzymatic method to produce a decolourized and tasteful porcine bloodprotein ingredient

INTRODUCTION

Porcine blood from Danish abattoirs has mainly been used for animal feed of mink, before the COVID-19 outbreak led to a total lockdown. If the great nutritional and economic potential of blood protein is to be exploited, the blood proteins should be upgraded for human nutrition.

METHODS & MATERIALS

Enzymatic hydrolysis of RBC was done using Performase® and "Protease A+B" derived from *Aspergillus niger*. RBC was diluted 1:4 (w/w), temperature and pH were adjusted and an enzyme-substrate conc. of 0.35% (w/w) for papain and 0.25% (w/w) for Protease A+B was added. Stirring (200 rpm/min) was applied for 1, 2, 3, 4 and 5 h during hydrolysis, and stopped by heating to 80°C for 15 min. The samples were adjusted to pH 5.0 ± 0.1, centrifuged at 7000 g for 45 min. Size exclusion was performed on a Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 2.7 µm, 4.6 x 300 mm Column.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Danish Pig Levy Fund and by a grant from the Danish Agency for Higher Education and Science.

CONCLUSION

This study indicates that the method can be used to identify a "window of success" for enzymatic hydrolysis of porcine blood.

RESULTS

Exp 1

- The DH% increased for both enzymes as the treatment time increased.
- The sensory evaluation indicated an acceptable degree of off-flavour after 4 hours treatment for both enzymes

Exp 2

- DD%-values >96% were obtained after 1 hour for papain, and after 3 hours for Protease A+B
- A satisfying colour along with a recovery of ≥ 55% was obtained after 4 hours for Performase® and after 3 hours for Protease A+B.

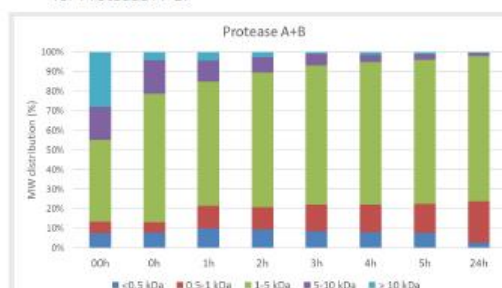


Figure 1. Size exclusion chromatography (SEC) showed a decreasing amount of large protein, and increasing amount of smaller peptides during hydrolysis (data for performase® not shown). Next step is to remove the bitter fraction before up-scaling of the process.