



Rapport

Blod som næringsbooster til petfood og fødevarer

Enzymatisk hydrolyse med enzymer fra Novozymes (internt refereret til som forsøg 3, uge 42, 2022 og forsøg 6, uge 11, 2023)

6. september 2023

Proj.nr. 2009647

2010415

Version 1

Init. ERPE/MT/MAHD

Resume

For at komme af med den røde farve og den metalliske smag i blod skal man have fjernet hæmjernet, som er bundet i hæmoglobinet. Til dette formål kan man behandle blodet med proteinnedbrydende enzymer, såkaldte proteaser/peptidaser, i det, der kaldes en enzymatisk hydrolyse. I denne proces frigives hæmjernet og kan ved den rette pH-værdi udfældes og adskilles fra proteinet. Det fremstillede proteinprodukt vil ofte have en bitter smag, som skyldes dannelsen af hydrofobe peptider, men denne bitterhed kan reduceres ved yderligere enzymbehandling, og man kan tilmed frembringe en umamismag, som kan dominere smagsindtrykket. Denne rapport beskriver en række af forsøg, hvor blodceller er blevet behandlet med forskellige kombinationer af enzymer, og hvor effekten, både kemisk og sensorisk, er blevet undersøgt.

Et bittert smagende hydrolysat fremstillet med endoproteasen Alcalase kunne ved behandling med exopeptidasen Protana Prime frembringe et hydrolysat med reduceret bitterhed, og ved yderligere behandling med glutaminasen Protana UBoost blev umamismagen intensiveret. Dette skyldtes exopeptidasens nedbrydning af bitre peptider til frie aminosyre og en kraftig tilvækst af aminosyren glutamin samt glutaminasens omdannelse af glutamin til den umamismagende glutamat. Proteinudbyttet var tilfredsstillende (>60%) ved en hydrolysetid på sammenlagt tre timer med en enzymkoncentration af hver af de tre enzymer, Alcalase, Protana Prime og Protana UBoost på 1,6%. Affarvningen var ligeledes tilfredsstillende, og det kunne samtidig konstateres, at en øvre grænse for hydrolysegraden ikke var relevant at fastsætte ved behandling med denne enzymkombination.

Ved en sensorisk test af hydrolysatopløsninger med proteinkoncentrationer på hhv. 0,5%, 1,0% og 2,0% viste koncentrationen 2,0% sig at være den bedste af de tre i forhold til at smage de fire smagsattributter "bitter", "umami", "metal" og "salt".

Næste skridt er at teste hydrolysatprodukter i fødevarematricer for at vurdere de sensoriske og funktionelle egenskaber i samspil med andre smagsgivere og konsistens. Optimalt set vil hydrolysatprodukterne blive testet i både animalske, vegetar- og hybridprodukter.

Baggrund

Denne rapport afspejler gennemførelsen af en række forsøg i aktivitet 1 (2022) "Pilotproduktion af blodprotein" og udgør et led i opfyldelse af milepæl 1: "Beskrivelse af pilotproduktion med kritiske procestrin samt relevante enhedsoperationer er udarbejdet (2022-23)".

Med udgangspunkt i det tidligere SAF-projekt "Alternativ anvendelse af blod" (2020-21) videreudvikles laboratoriemetoden for enzymatisk hydrolyse af hæmoglobin fra griseblod.

Hydrolyse af hæmoglobin med endoproteaserne Papain og Alcalase har i tidligere forsøg givet hydrolysater med højt niveau af bitterhed (forsøg 2, uge 22, 2022). Eksterne studier har vist, at hydrolyse af blod med en kombination af endo- og exopeptidase kan mindske bitterheden af hydrolysaterne^{1,2}, mens behandling med glutaminase kan forstærke umamismagen³. Disse studier bakkes op af Novozymes' beskrivelser^{4,5,6} af enzymerne, som er anvendt i forsøgene beskrevet i denne rapport.

I de to forsøg udvides metoden fra enzymatisk hydrolyse behandlet udelukkende med endoprotease (Alcalase fra Novozymes⁴) til ekstra behandling med exopeptidase (Protana Prime fra Novozymes⁵) og med glutaminase (Protana UBoost fra Novozymes⁶).

Der er defineret en række succeskriterier for tilfredsstillende affarvning af blod:

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

Succeskriterierne var afledt af den forudsætning, at hæmoglobinet hydrolyseres udelukkende med endoprotease, og at hydrolysen skal afbalanceres i forhold til hydrolysegrad og udbytte. Baggrunden for dette er, at høj grad af hydrolyse vil aflede høj grad af bitter smag, og at hydrolysegraden derfor skal begrænses til højst 20%. Ved introduktion af enzymer med exopeptidaseaktivitet og glutaminaseaktivitet bør den øvre grænse for hydrolysegrad revurderes, da en høj hydrolysegrad er forventelig i denne behandlingsmetode, uden at give anledning til høj bitterhed. I denne rapport vil der derfor laves en vurdering af, hvorvidt parameteren hydrolysegrad skal have en grænse i forhold til succeskriteriet, når der behandles med kombinationer af enzymer.

Formål

Forsøg 1

Formålet med forsøg 1 var at teste enzymatisk hydrolyse af grisehæmoglobin behandlet med enzymerne Alcalase, Protana Prime og Protana UBoost. I testen blev enzymkoncentrationer samt hydrolysetider varieret, hvorpå hydrolysen blev vurderet ud fra målinger på parametrene: affarvning (visuel), hydrolysegrad (DH%), proteinudbytte (recovery%) og peptid størrelsesfordeling (SEC-HPLC).

Den optimale hydrolysetid og enzymkoncentrationer i forhold til forsøgsopsætning og metode blev identificerede og anvendt i forsøg 2.

Forsøg 2

Formålet med forsøg 2 var at teste hydrolysatoopløsninger af grisehæmoglobin behandlet med kombinationer af enzymerne Alcalase, Protana Prime og Protana UBoost i et internt sensorisk panel.

På baggrund af den sensoriske test blev der lavet en vurdering af, hvilken protein-koncentration af hydrolysat der bedst kunne anvendes til vurdering af smagsattri-butterne: bitter, umami, salt og metal.

Mikrobiologiske parametre blev målt i råvarer samt i hydrolysat opbevaret i op til en uge på køl efter endt forsøg for at dokumentere holdbarhed af hydrolysat samt kvaliteten af råvaren.

Metode

Følgende metode blev brugt i forsøg 1 og forsøg 2:

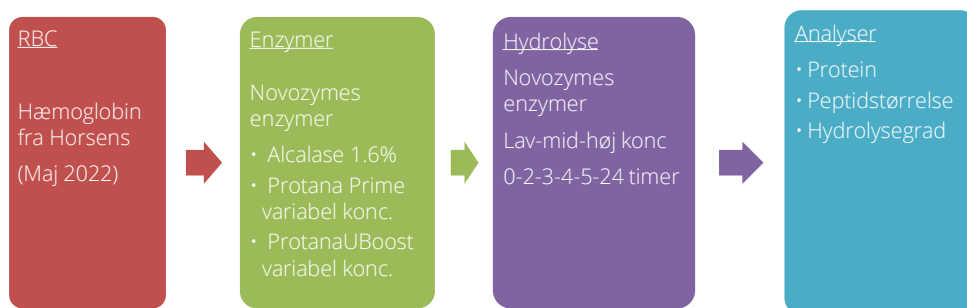
1. 500 ml batch i blue cap-flaske
2. 1 del hæmoglobin (RBC): 4 dele vand, 500 g i alt
3. Placering i 55°C vandbad
4. Omrøring af hæmoglobinopløsning (RBC) i 30 min = hæmolyse
5. Opløsningens temperatur indstilles til 55°C
6. Enzymtilsætning ved tiden T=0
7. Efter endt hydrolyse opvarmes til 90°C = enzyminaktivering i 15 min
8. Nedkøling til 20°C
9. pH-justering til udfældning af hæmjern
10. Centrifugering ved 4600 omdrejninger/min i 30 min
11. Dekantering af klar væske (hydrolysat) til ny beholder

De præcise metodebeskrivelser for forsøg 1 og forsøg 2 samt holdbarhedsforsøg er angivet i vedlagte bilag 1.

Forsøgsdesign

Forsøg 1

Figur 1 viser det overordnede forsøgsdesign for hydrolysen af hæmoglobin udført i forsøg 1. Der blev brugt AM/PM godkendt grisehæmoglobin hjemtaget fra Horsens i maj 2022. Hæmoglobinet blev optøet fra -18°C, fortyndet 1:4 med vand og hydrolyseret med enzymer. De anvendte enzymer, Alcalase, Protana Prime og Protana UBoost fra Novozymes, blev testet ved tre enzymkoncentrationer: lav, middel og høj (tabel 1). Prøver til analyse blev udtaget ved hydrolysetiderne 2, 3, 4, 5 og 24 timer (figur 1). Alle prøver blev analyseret for proteinudbytte, hydrolysegrad og af-farvning (visuel), samt peptid størrelsesfordeling (SEC-HPLC).



Figur 1. Forsøgsdesign – forsøg 1.

Tabel 1. Beskrivelse af de tre hydrolyseopsætninger og metode.

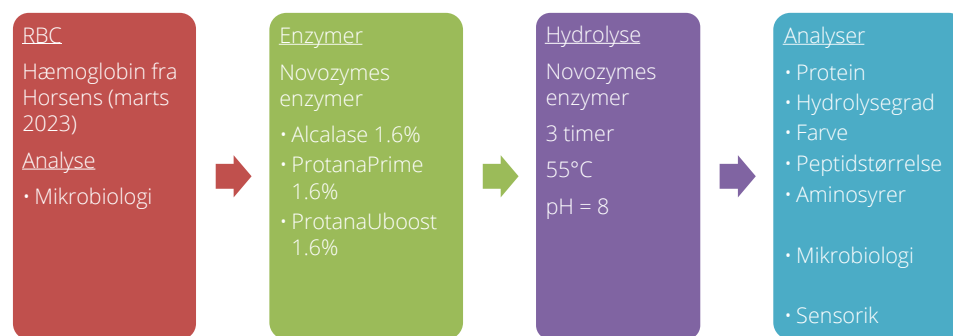
Enzym + konc. (%) + fortyndingsfaktor	pH	Tid	Temperatur
Novozymes lav: Alcalase 1,6% Protana Prime 0,016% (100 X fort.) Protana UBoost 0,16% (10 X fort.)	8,0	Tilsat ved 0 t Tilsat efter 2 t Tilsat efter 2 t	55°C
Novozymes middel: Alcalase 1,6% Protana Prime 0,16% (10 X fort.) Protana UBoost 1,6% (ingen fort.)	8,0	Tilsat ved 0 t Tilsat efter 2 t Tilsat efter 2 t	55°C
Novozymes høj: Alcalase 1,6% Protana Prime 1,6% (ingen fort.) Protana UBoost 1,6% (ingen fort.)	8,0	Tilsat ved 0 t Tilsat efter 2 t Tilsat efter 2 t	55°C

Forsøg 2

Figur 2 viser det overordnede forsøgsdesign for hydrolysen af hæmoglobin udført i forsøg 2. Der blev brugt AM/PM godkendt grisehæmoglobin hjemtaget fra Horsens i marts 2023. Hæmoglobinet blev efter modtagelsen indfrosset ved -18°C. Dagen før hydrolyse blev hæmoglobinet optøet i vandbad ved 4°C.

Sensorik

Tre hydrolyser med forskellige enzymkombinationer blev udført (tabel 2). Alcalase 1,6% blev anvendt som endoprotease i alle de tre enzymkombinationer. Protana Prime 1,6% blev anvendt som exopeptidase i hydrolyse 2 og 3. Protana UBoost 1,6% blev anvendt som glutaminase i hydrolyse 3. Enzymkoncentrationer, hydrolysetemperaturer og pH er angivet i tabel 4.



Figur 2. Forsøgsdesign – forsøg 2.

Tabel 2. Forsøgsopsætning – variation i enzym.

Sensorik	Enzym tilsat ved tiden T (timer)		
Hydrolyse 1	Alcalase (T=0)	-	-
Hydrolyse 2	Alcalase (T=0)	P. Prime (T=2)	-
Hydrolyse 3	Alcalase (T=0)	P. Prime (T=2)	P. UBoost (T=2)

Holdbarhedsstudie

Et hydrolysat behandlet med Alcalase blev fremstillet med henblik på analyse for mikrobiologisk holdbarhed (tabel 3).

Tabel 3. Forsøgsopsætning – holdbarhedsstudie.

Holdbarhedsforsøg	Enzym tilsat ved tid 0
Hydrolyse 4	Alcalase

Tabel 4. Enzymkoncentration, hydrolysetemperatur og hydrolyse pH.

Enzym	Enzymkonc. (%)	Temperatur (°C)	pH
Alcalase	1,6	55	8
Protana Prime	1,6	55	8
Protana UBoost	1,6	55	8

Analyseplan

Hydrolysekvalitet

De gennemførte hydrolyser blev analyseret for:

- Affarvning (foto)
- Proteinudbytte, Recovery% (Kjeldahl)
- Hydrolysegrad, DH% (OPA-analyse)

Proteinkvalitet

De hydrolyserede proteiner blev kvalitetsbestemt ved:

- Peptidfraktionsstørrelser (SEC-HPLC)
- Aminosyresammensætning (LC-MS)
- Sensorisk test (internt smagspanel)

Tabel 5. Analyseplan forsøg 1.

	T-0	T-2	T-3	T-4	T-5	T-24
Farve	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Protein	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DH %	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SEC-HPLC	✓	✓	✓	✓	✓	✓

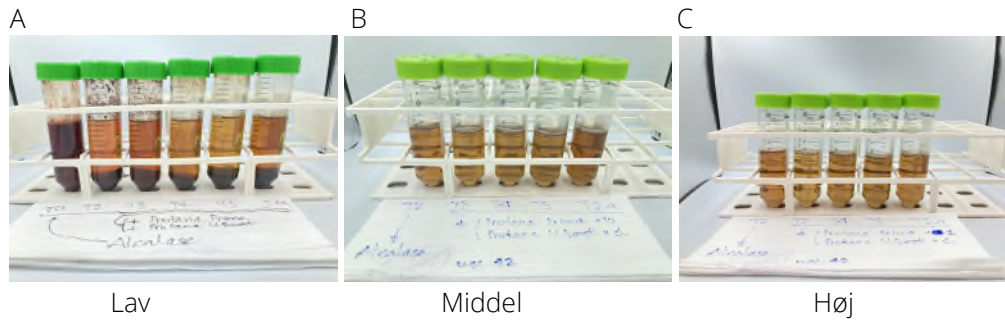
Tabel 6. Analyseplan forsøg 2.

	Råvarer	T-0	T-3
<i>Kemiske analyser</i>			
Farve	-	✓	✓
Tørstof %	-	-	✓
Protein	✓	✓	✓
DH %	-	✓	✓
SEC-HPLC	-	✓	✓
Aminosyrer	-	✓	✓
<i>Mikrobiologiske analyser</i>			
Aerobt kimtal	✓	-	✓
BBCA (Bacillus)	✓	-	✓
Clostridier	✓	-	✓

Resultater

Forsøg 1

Affarvning



Figur 3. Hydrolysater behandlet med Alcalase samt Protana Prime og Protana UBoost ved forskellige koncentrationer. Prøver er udtaget ved tiderne 0, 2, 3, 4, 5 og 24 timer, vist fra venstre mod højre. 0-prøven (før enzym tilføjes) er vist yderst til venstre i A.

Hydrolysaterne behandlet med Novozymes enzymer i forskellige koncentrationer viser fornuftig affarvning ved alle koncentrationer. Hydrolysater behandlet ved den lave koncentration har en rødlig farvenuance, mens middel og høj koncentration har en brunlig farvenuance. Der er ikke nogen tydelig forskel mellem affarvningen fra 2 til 24 timer i de tre hydrolyser.

Proteinudbytte- /Hydrolysegrad

Proteinudbytte (recovery%) beregnes ud fra prøvens proteinindhold analyseret ved Kjeldahlanalyse. Det er et mål for, hvor meget af proteinet fra det ubehandlede hæmoglobin der tilbage i hydrolysateret, når hæmjernfraktionen er centrifugeret fra.

Hydrolysegraden (degree of hydrolysis, DH%) er et mål for, hvor nedbrudt proteinet er blevet under hydrolysen. DH% bestemmes ved OPA-test, som måles på spektrofotometer ved 340 nm. OPA-reagenset skal være friskfremstillet for at kunne få en optimal blindværdi (blank OD = 0,07).

Novozymes

Analyseresultater for proteinudbytte og hydrolysegrad er angivet i hhv. tabel 7 og tabel 8. Sammenhængen mellem de to parametre er illustreret i figur 4.

For alle tre hydrolysater ses der en stigning i protein de første 3-4 timer, hvorefter kurverne flader ud og kun stiger meget lidt op til 24 timer. Hydrolysegraden ser ud til at stige kraftigt de første 3-5 timer, hvorefter kurvens hældning falder, men er stadig stigende helt op til 24 timer. Der ses en lille forskel i både recovery% og hydrolysegrad mellem lav koncentration og middel koncentration, hvilket indikerer, at mængden af Protana Prime og/eller Protana UBoost har en indvirkning på begge parametre. Samtidig ses en endnu større stigning i recovery% og hydrolysegrad fra middel til høj koncentration, hvilket indikerer, at mængden af Protana Prime har effekt på hydrolysen. Selvom hydrolysegraden for alle hydrolyserne er markant højere ved 24 timer i forhold til 5 timer, ses der ikke en markant ændring i recovery% fra 5 timer til 24 timer. Det indikerer, at peptidbindingerne fortsætter med at blive hydrolyseret uden at påvirke den samlede mængde peptid/aminosyre. Altså nås et næsten lige så stort proteinudbytte ved kortere hydrolysetid (3-5 timer) som ved 24 timer, blot med 3-4 procentpoints forskel (tabel 7), hvorimod der fra 5 til 24 timer ses en ændring i hydrolysegrad på 20-25 procentpoint, cirka svarende til en fordobling (tabel 8).

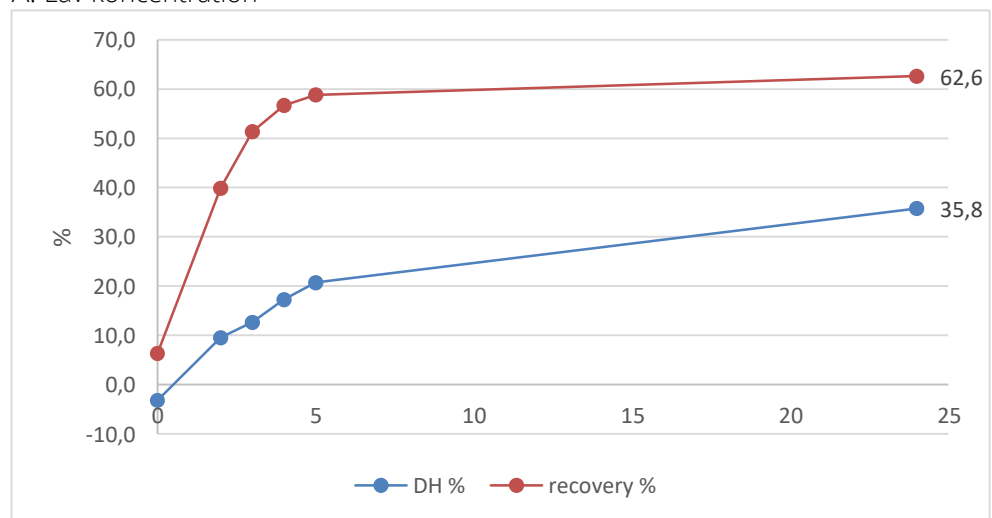
Tabel 7. Proteinudbytte (recovery%) for Novozymes hydrolysater.

Tid/timer	Lav koncentration	Middel koncentration	Høj koncentration
0	6,4	6,3	6,3
2	39,9	57,4	53,9
3	51,3	59,1	63,3
4	56,7	60,8	-
5	58,8	59,7	63,7
24	62,6	64,3	66,7

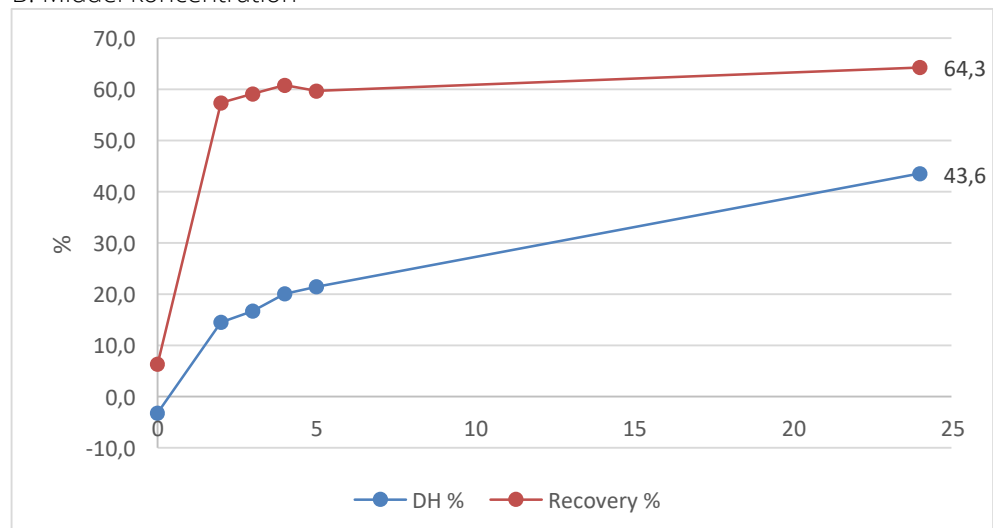
Tabel 8. Hydrolysegrad (DH%) for Novozymes hydrolysater.

Tid/timer	Lav koncentration	Middel koncentration	Høj koncentration
0	-3,2	-3,2	-3,2
2	9,6	14,5	11,4
3	12,6	16,7	19,3
4	17,3	20,0	23,0
5	20,7	21,4	25,1
24	35,8	43,6	49,4

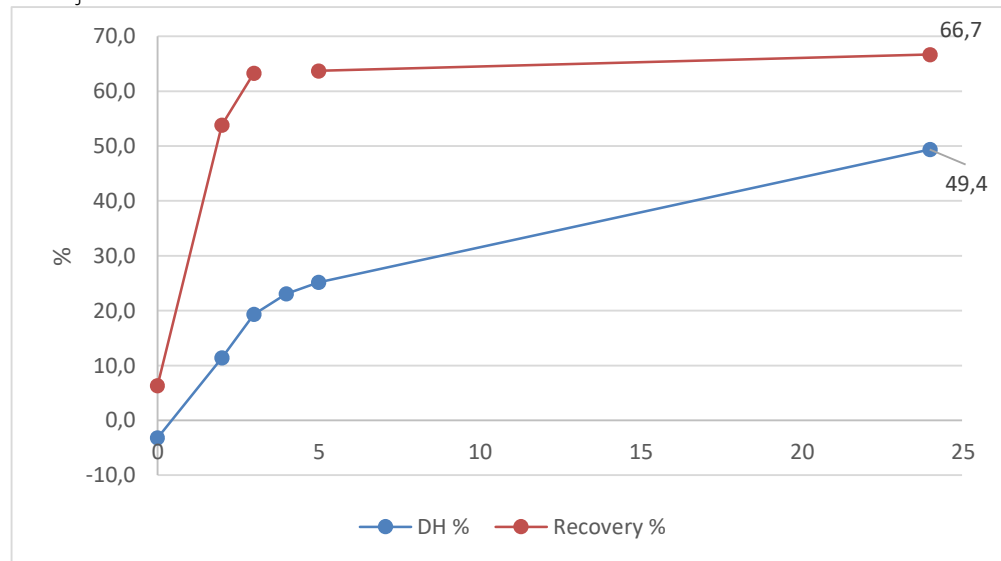
A. Lav koncentration



B. Middel koncentration

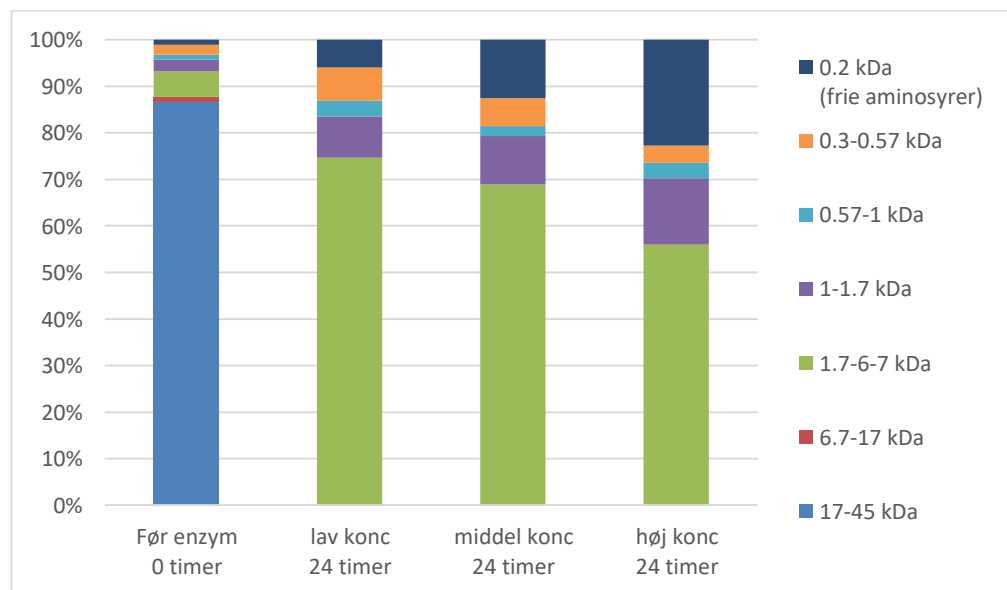


C. Høj koncentration

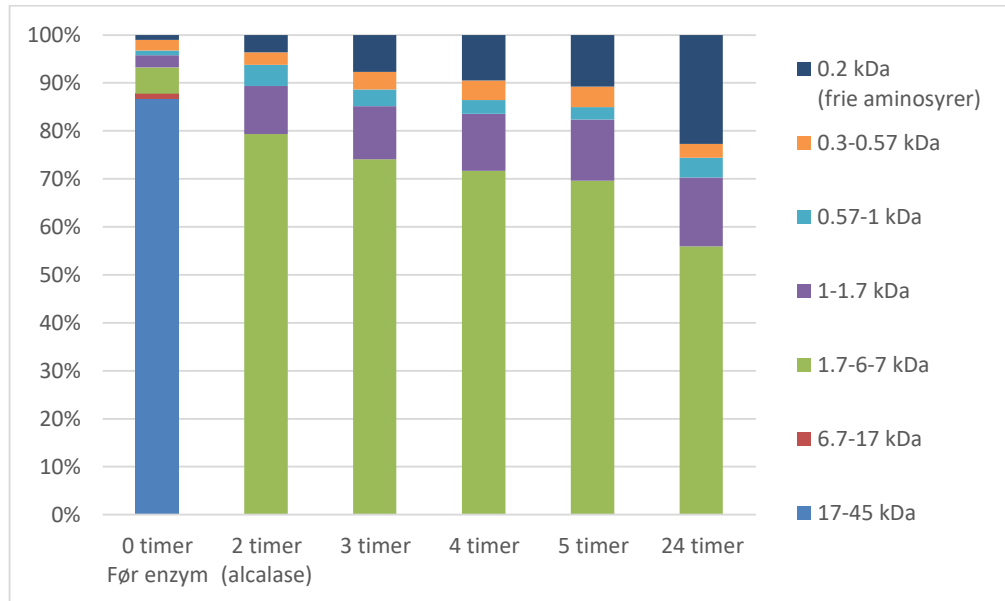


Figur 4. Sammenhæng mellem proteinudbytte (recovery%) og hydrolysegrad (DH%) ved de 3 enzymkoncentrationer: lav (A), middel (B) og høj (C).

SEC-HPLC Peptidstørrelses- fordeling



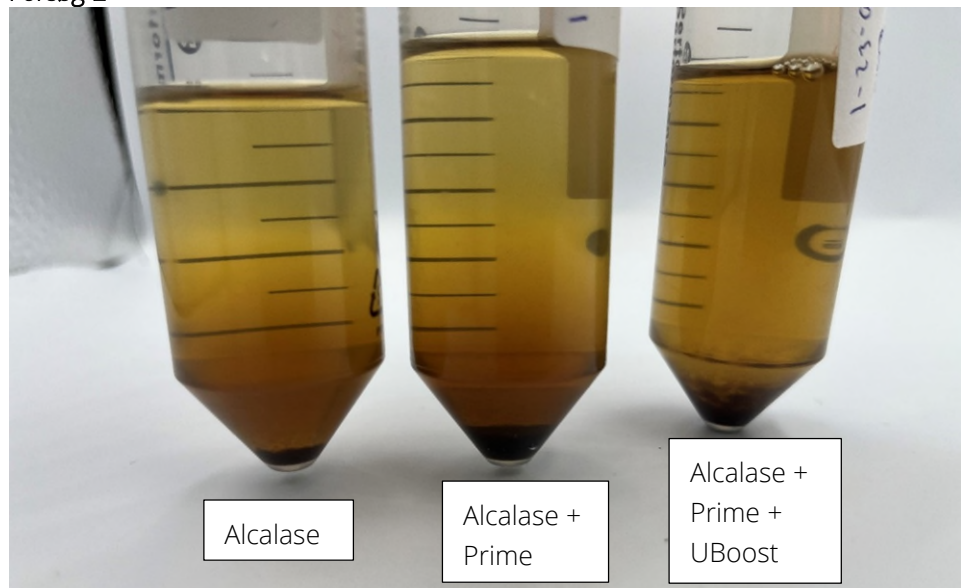
Figur 5. Peptidstørrelsesfordeling efter 24 timers hydrolyse ved lav, middel og høj enzymkoncentration.



Figur 6. Peptidstørrelsesfordeling fra i 0, 2, 3, 4, 5 og 24 timer ved høj enzymkoncentration. Ved 0 timer = Alcalase tilsat. Ved 2 timer = Prime+UBoost tilsat.

Affarvning

Forsøg 2

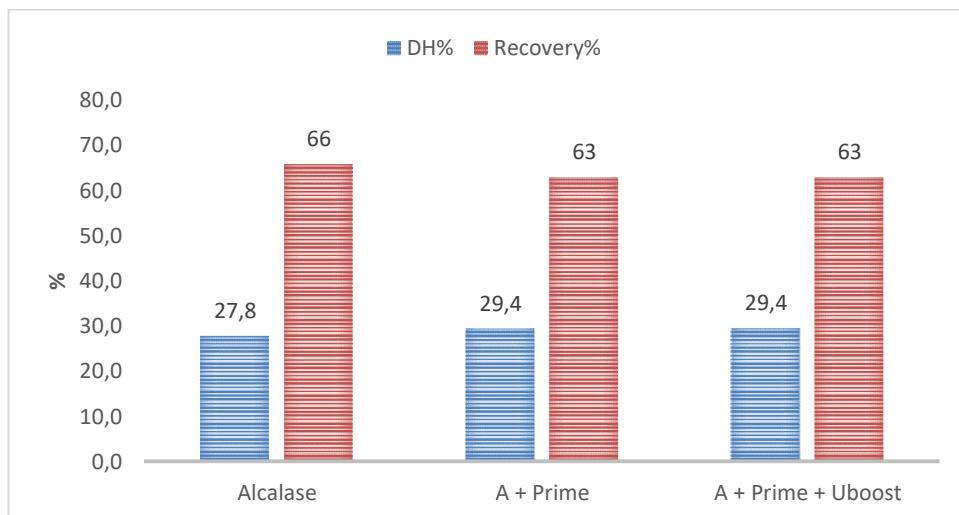


Figur 7. Visuel affarvning af hydrolysater behandlet med; 1: Alcalase, 2: Alcalase + Protana Prime, 3: Alcalase + Protana Prime + Protana UBoost.

I figur 7 ses det, at der er god affarvning i alle tre hydrolysater af grisehæmoglobin behandlet med tre forskellige kombinationer af enzymerne Alcalase, Protana Prime og Protana UBoost. Hydrolysaterne er gennemsigtige med et brunligt skær. Der er ingen røde farvenuancer i nogen af hydrolysaterne, hvilket indikerer, at hæmjernet er blevet effektivt fjernet under hydrolysen.

Affarvningsgraden (degree of decolouration, DD%) bestemmes ved en spektrofotometrisk måling på hydrolysater ved 405 nm både før og efter hydrolyse. DD% blev for de tre hydrolyser målt til >95%, hvilket indikerer en næsten komplet affarvning i forhold til før enzym blev tilsat.

Proteinudbytte/ hydrolysegrad



Figur 8. Proteinudbytte (Recovery) og hydrolysegrad (DH%) på de tre hydrolysater behandlet med hhv. Alcalase; Alcalase og Protana Prime (A + Prime); Alcalase + Protana Prime + Protana UBoost (A + Prime + UBoost).

Når man sammenligner resultaterne fra forsøg 1, "Novo_høj konc" med resultaterne fra den ækvivalente hydrolyse i forsøg 2, "A + Prime + UBoost", ses det, at proteinudbyttet (recovery%) i begge tilfælde ligger på omkring 63% ved 3 timer. Hvis man derimod kigger på hydrolysegraden (DH%), ligger de noget forskelligt ved 19,3% i forsøg 1 og 29,4% i forsøg 2. Årsagen kan ikke forklares med sikkerhed, da både enzymkoncentration, pH og temperatur har været ens i de to forsøg. At hydrolysegraden for "Alcalase" og "A + Prime" i forsøg 2 også ligger tilsvarende højt, på hhv. 27,8 og 29,4, indikerer, at aktiviteten fra Alcalase er den primære årsag til den høje hydrolysegrad.

Proteinindhold og tørstofindhold

Proteinindholdet samt tørstofindholdet i de tre hydrolysater er angivet i tabel 9.

Tabel 9. Proteinindhold og tørstofindhold i hydrolysaterne behandlet med enzymer.

Hydrolysat	Protein (g/100g)	Tørstof (g/100g)
Alcalase	4,9	5,3
Alcalase + Prime	4,9	5,4
Alcalase + Prime + UBoost	4,9	5,4

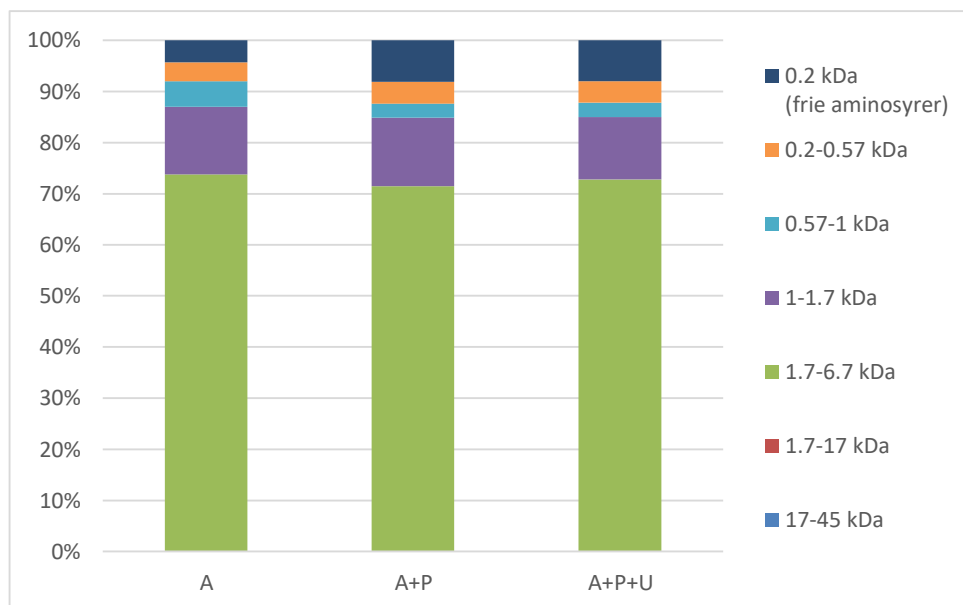
Med udgangspunkt i det målte proteinindhold i hydrolysaterne samt det målte proteinindhold i råvaren (målt til 30,5 g/100 g) blev proteinudbyttet (recovery%) udregnet (angivet i figur 8).

SEC HPLC

Størrelsesfordelingen af peptider i hydrolysaterne er målt ved anvendelse af SEC HPLC med 130Å kolonne.

Figur 9 viser størrelsesfordelingen af peptider/aminosyrer i de tre hydrolysater. Den vigtigste observation er, at mængden af frie aminosyrer er fordoblet i de to hydrolysater behandlet med Protana Prime i forhold til hydrolysatet behandlet kun med Alcalase, fra 4,3% (A) til 8,1% (A+P) og 8,0% (A+P+U). Dette stemmer overens med forventningerne om, at exopeptidase genererer frie aminosyrer^{1,2,5}. Der er stor lighed mellem størrelsesfordelingen i de to hydrolysater behandlet med Protana Prime,

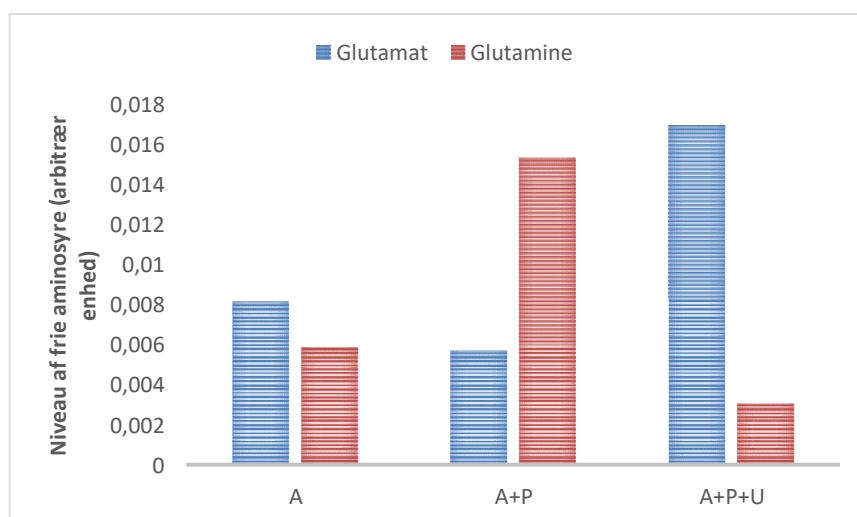
hvor det ene er tilsat glutaminasen Protana UBoost. Dette er også forventeligt, da glutaminasen omdanner glutamin til glutamat og ikke ændrer på størrelsen af molekylet^{3,6}.



Figur 9. Peptidstørrelsesfordeling i hydrolysat behandlet med Alcalase (A); Alcalase og Prime (A+P); Alcalase, Prime og UBoost (A+P+U).

Aminosyrebestemmelse

LC-GCMS blev brugt til at bestemme mængden af aminosyrerne glutamin og glutamat i fri form i de tre hydrolysater. Metoden er brugt til at afgøre, om mængden af de to aminosyrer bliver påvirket af behandlingen med exopeptidasen Protana Prime og glutaminasen Protana UBoost.



Figur 10. Forhold mellem indhold af Glu og Gln i de tre hydrolysater behandlet med A=Alcalase, P=Protana Prime og U=Protana UBoost.

Figur 10 viser, at hydrolysatet behandlet med endoproteasen Alcalase og exopeptidasen Protana Prime (A+P) har et forhøjet niveau af glutamin i forhold til hydrolysatet behandlet kun med endoprotease Alcalase (A), fra <0,006 til 0,015. Et forhøjet niveau af glutamin ved behandling med Protana Prime er forventet, da enzymet i

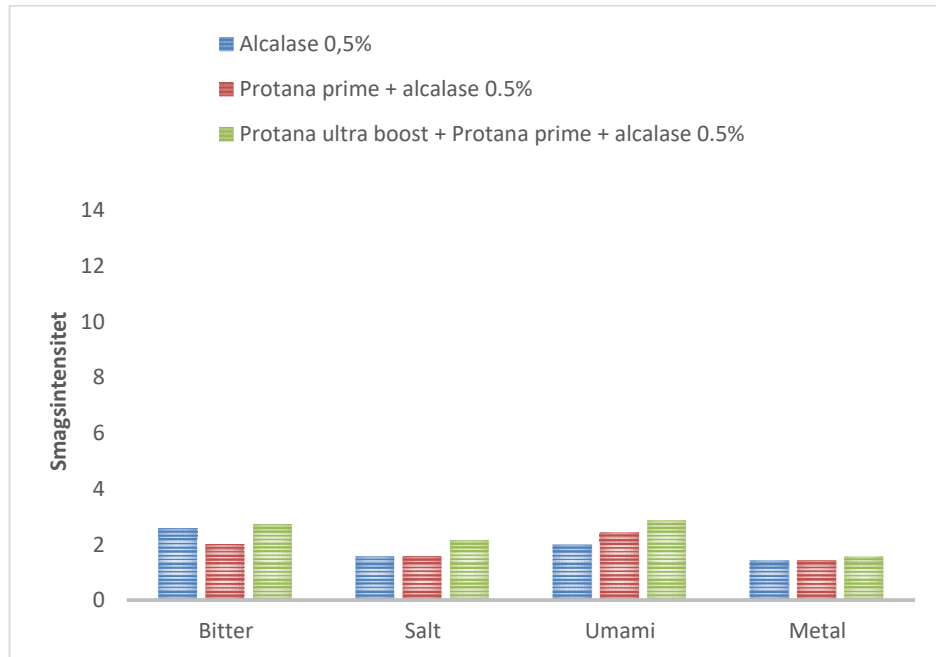
henhold til specifikationen fra Novozymes genererer frie aminosyrer og i særdeleshed glutamin. Niveauet af glutamat i de to hydrolysater er derimod ikke så forskelligt fra hinanden, ca. 0,008 og 0,006 i hhv. A og A+P. Kigger man på hydrolysatet behandlet med glutaminasen Protana UBoost (A+P+U), er niveauet af glutamin faldet markant i forhold til hydrolysatet uden tilsat glutaminase (A+P), fra 0,015 til 0,003. Samtidig er niveauet af glutamat steget tilsvarende i hydrolysatet behandlet med glutaminase, fra <0,006 til 0,017. Den mistede glutamin svarer omtrent til stigningen i glutamat, hvilket stemmer godt overens med den forventede virkning ved behandling med glutaminase, som efter specifikationen fra Novozymes omdanner glutamin til glutamat.

Sensorisk test

De tre hydrolysater blev bedømt internt af et panel bestående af 6 smagsdommere. Dommerne skulle hver især bedømme intensiteten (skala fra 0-15, hvor 0 er ingen smag, og 15 er meget intenst) af attributterne bitter, umami, metal og salt i fortyndinger af hydrolysaterne. Fortyndingerne var 0,5%, 1% og 2% opløsninger beregnet ud fra indholdet af protein i hydrolysaterne. Koncentrationen af protein blev i alle tre hydrolysater målt til 4,9%. Fortyndingerne blev fremstillet ud fra, at proteinindholdet i hydrolysaterne var 5%. Dette på baggrund af at den eksakte proteinkoncentration ikke var kendt, da fortyndingerne blev fremstillet, men ud fra et estimat set i forhold til tidligere forsøg. Det vurderes ikke at have nogen signifikant betydning, og fortyndingerne vil derfor fortsat været opgivet som 0,5%, 1% og 2%.

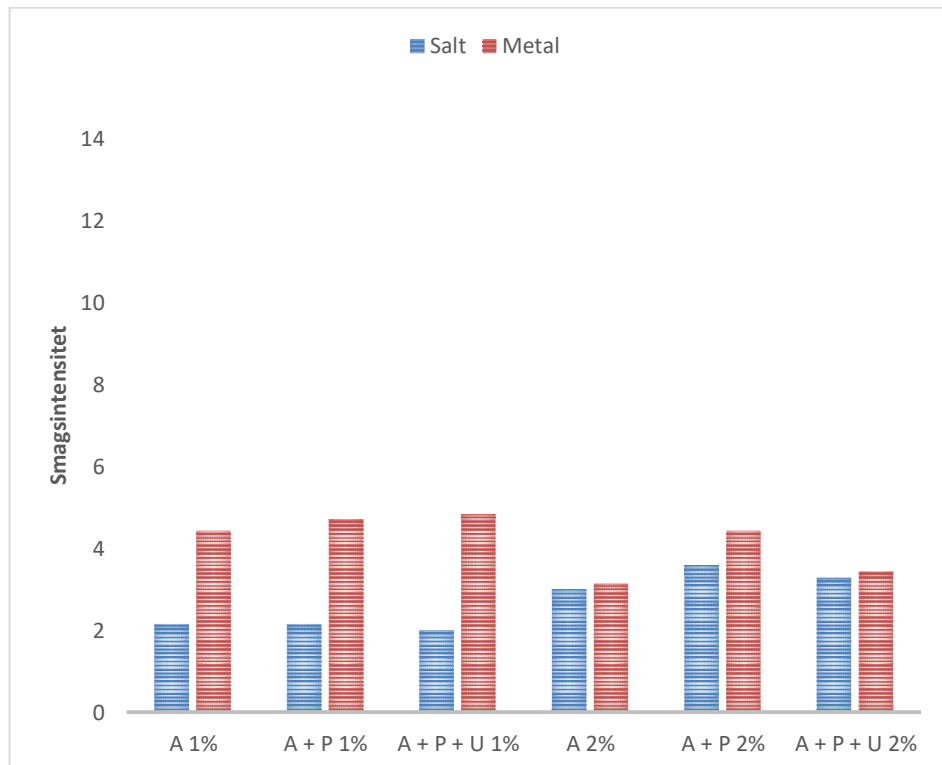
I behandlingen af resultaterne er gennemsnittet af dommernes bedømmelser angivet. Der var forskelligt, hvordan de enkelte dommere brugte skalaen, så spredningen var generelt høj dommerne imellem. Det vurderes, at gennemsnittene giver en god indikation af, hvor intense smagene er, og er derfor et udtryk for tendenser.

I figur 11 er angivet bedømmelsen af de fire smagsattributter i opløsningerne med 0,5% protein. Alle bedømmelser ligger så lavt, at det vurderes, at 0,5% er for tynd en opløsning, til at dommerne kan skelne smagene tilstrækkeligt fra hinanden.



Figur 11. Sensorisk bedømmelse af hydrolysaterne med proteinindhold på 0,5%. Skala: 0=ingen smag; 15=meget intens smag.

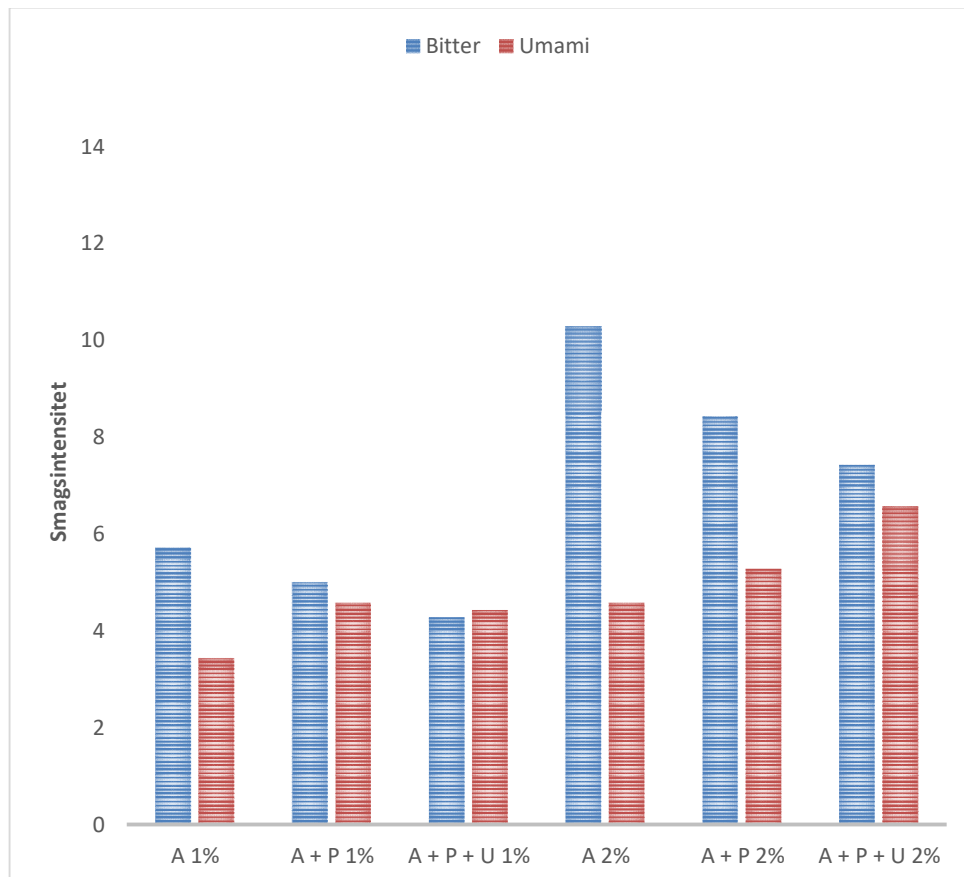
Det vurderes ud fra samme præmis, at attributterne salt og metal i bedømmelserne af opløsningerne 1% og 2% generelt blev scoret for lavt, og desuden meget ens, til at der er nogen forskel mellem hydrolysaterne (se figur 12). Den lave bedømmelse af metal vurderes at være positivt og giver en indikation af, at alle hydrolyser har været effektive til at fjerne hæmjern, som er hovedårsagen til den metalliske smag i ubehandlet blod og RBC-fraktion.



Figur 12. Sensorisk bedømmelse af smagsattributterne "salt" og "metal" i hydrolysaterne med et proteinindhold på 1% og 2%. Skala: 0=ingen smag; 15=meget intens smag.

I bedømmelserne af smagsattributterne "bitter" og "umami" i opløsningerne 1% og 2% (figur 13) ses der nogle tendenser, som ikke var tydelige i opløsningen på 0,5%. I hydrolysaterne behandlet med endoproteasen Alcalase ses det, at bitterhed er mere intens end umamismagen. Dette er mest udtalt i 2%-opløsningen, hvor "bitter" bliver bedømt til 10,3 mens "umami" bliver bedømt til 4,6. Når vi kigger på hydrolysatet behandlet med Alcalase samt exopeptidasen Protana Prime, ser vi, at bitterheden er faldet, og umamismagen er steget i både 1%- og 2%-opløsning. I 2%-opløsningen er "bitter" nu målt til 8,4 og "umami" til 5,3. Det indikerer, at exopeptidasen har en effekt på smagen, bedst observeret i den reducerede bitterhed. Bliver hydrolysatet yderligere behandlet med glutaminasen Protana UBoost, ses et yderligere fald i bitterhed og en stigning i umamismag. I opløsningen 2% er "bitter" bedømt til 7,4, mens "umami" er bedømt til 6,6. Dette indikerer, at glutaminasen også har en effekt på den overordnede smag af hydrolysatet og styrker umamismagen og reducerer bitterheden.

Det skal dog påpeges, at en ændring i intensiteten i en smagsattribut "A" kan ændre den oplevede intensitet af en anden smagsattribut "B", uden at der reelt er nogen ændring i mængden af smagsattribut "B". Derfor er det vanskeligt at sige med sikkerhed, at mængden af den bitre smagende substans falder, og mængden af den umamismagende substans stiger ved behandling med Protana Prime og Protana UBoost. Vi kan derimod godt sige, at der er en tendens til, at den oplevede smagsintensitet for bitterhed er faldende og for umamismag er stigende, når hydrolysaterne behandles med Protana Prime og Protana UBoost. Tendenserne er dog kun tydelige i opløsningerne med 2% protein.



Figur 13. Sensorisk bedømmelse af smagsattributterne "Bitter" og "Umami" i hydrolysaterne med proteinindhold på 1% og 2%. Skala: 0=ingen smag; 15=meget intens smag.

Holdbarhedsfor- søg

Den mikrobiologiske holdbarhed af hydrolysat fra 0 til 7 dage, opbevaret ved 0°C og 5°C, samt den mikrobiologiske kvalitet af råvaren hjemtaget 07.02.2023 fra DC Horsens fremgår af den udarbejdede risikovurdering, som kan ses her: \\.\Hu-man konsum Risikovurdering\2023\RISIKOVURDERING_Uge 11_2023.docx

Konklusion

Forsøg 1

Hydrolysaterne behandlet med Novozymes enzymer viser en lidt svagere affarvning end hydrolysaterne behandlet med Papain, men vurderes at ligge inden for det acceptable område. Uanset enzymkoncentration ses der ikke nogen tydelig forskel mellem farven på hydrolysaterne fra 2 til 24 timer, hvilket indikerer, at den indledende behandling med Alcalase i de første 2 timer, gør en stor del af arbejdet i forhold til at få frigjort hæmjernet. Der anes en lidt mørkere farve i hydrolysaterne behandlet med den lave enzymkoncentration, hvilket taler for at bruge enten middel eller høj koncentration. Der er ikke nævneværdig forskel på farverne mellem middel og høj koncentration.

Både hydrolysetid og enzymkoncentration har en effekt på recovery% og hydrolysegraden af hydrolysen. Efter 3 timers hydrolyse har høj enzymkoncentration nået recovery% på over 60%, hvor det ved middel enzymkoncentration opnås ved 4 timer, og ved lav enzymkoncentration først er nået ved 24 timer. Da der samtidig ses en hydrolysegrad, der efter 4 timer har oversteget 20% i hydrolysaterne ved middel og høj koncentration (lav koncentration efter 5 timer), kan man, hvis de hidtidige sukseskriterier følges, argumentere for, at hydrolyserne bringes til ende ved 3 timers

hydrolyse, hvor hydrolysegraden er <20%. Det udfordrer dog succeskriterierne for hydrolysegrad, at Protana Prime og Protana UBoost i forhold til teorien mindsker bitterheden og forstærker umamismagen, da succeskriteriet netop er defineret på baggrund af, at for meget hydrolyse vil generere for meget bitterhed. Hvis nogen af de bitre peptider så, via exopeptidase og/eller glutaminase, bliver omdannet til ikke-bitre, men umami-boostende peptider/aminosyrer, kan man diskutere, om en øvre grænse for hydrolysegrad er nødvendig, når disse typer enzymer anvendes. Dette bliver yderligere diskuteret i forsøg 2, hvor effekten af Protana Prime og Protana UBoost på sensoriske aspekter vil blive testet.

Ud fra dette forsøgs resultater konkluderes det, at succeskriteriet for proteinudbytte opnås efter 24 timer ved lav enzymkoncentration, efter 4 timer ved middel enzymkoncentration og efter 3 timer ved høj enzymkoncentration. Affarvningen vurderes at være acceptabel ved alle enzymkoncentrationer efter 2 timer. Hydrolysegraden stiger for alle enzymkoncentration over tid. DH% er steget til over 20% efter 5 timer ved lav koncentration og efter 4 timer ved middel og høj koncentration. Disse vurderes ikke uden for succeskriteriet, da omstændighederne for denne grænse, som beskrevet tidligere, ophører ved introduktionen af exopeptidase og glutaminase.

Ud fra SEC-HPLC-resultaterne kan det konkluderes, at både hydrolysetid og enzymkoncentration har en effekt på peptidstørrelserne. Længere hydrolysetid giver flere mindre peptider og færre mængde større peptider. Højere enzymkoncentration giver ligeledes flere mindre peptider og færre mængde større peptider. Ud fra forsøgets opsætning (forsøg 1) kan det derfor konkluderes, at øges koncentrationen af tilsat Protana Prime, så forskydes mængden af peptider fra større mod mindre og frie aminosyrer. Det kan derimod ikke konkluderes, at Protana UBoost har nogen effekt på størrelsesfordelingen af peptider. Dette er dog heller ikke relevant, da Protana UBoost efter specifikationerne omdanner glutamin til glutamat, hvilket ikke kan registreres i forhold til SEC-HPLC, da størrelsesforskellen på de to aminosyrer er meget lille.

Forsøg 2

Den høje hydrolysegrad i forsøg 2 i forhold til forsøg 1 er umiddelbart svær at forklare, men årsagen kan være en ny batch enzym, små forandringer i forsøgsproceduren eller lignende.

Det kan konkluderes, at proteinudbyttet i alle tre hydrolyser er acceptabelt i forhold til det fremsatte succeskriterie på minimum 60%. Hydrolysater behandlet med Alcalase havde et proteinudbytte på 66%, mens de to hydrolysater behandlet med Protana Prime med og uden Protana UBoost havde proteinudbytter på 63%.

Den visuelle affarvning var for alle tre hydrolysater god og indikerede effektive hydrolyser med god adskillelse af hæmjern og proteinfraktion.

Mængden af frie aminosyrer fordobledes ved behandling med exopeptidasen Protana Prime, og samtidig øgedes mængden af glutamin fra 0,0059 til 0,0153, altså næsten tre gange højere. Ved yderligere behandling med glutaminasen Protana UBoost faldt niveauet af glutamin til 0,0030, mens niveauet af glutamat øgedes fra

0,0057 til 0,017, altså et tre gange højere niveau. Det stemmer godt overens med hypotesen om, at glutaminase omdanner glutamin til glutamat.

De sensoriske test viste, at ændringerne forårsaget af Protana Prime og Protana UBoost også giver udslag i den sensoriske opfattelse, mest udtalt ved koncentrationen på 2%. Behandlingen med de to enzymer gav et mindre bittert hydrolysat med en kraftigere umamismag. At forskellene er tydeligst ved 2% proteinkoncentration, mindre tydelige ved 1%, og at forskellene ikke kan detekteres ved 0,5%, indikerer, at en 2% opløsning med fordel kan benyttes ved fremtidige sensoriske test.

Observationer fra den sensoriske test indikerer, at det er muligt at frembringe hydrolysater, der sensorisk kan moduleres i retninger, som gør dem anvendelige som ingrediens i fødevarer. Måske endda med smagsgivende egenskaber. En interessant idé kunne være at anvende blodhydrolysat som alternativ til smagsgiveren mononatriumglutamat, en umamismagende ingrediens, som er meget anvendt i eksempelvis industrielt fremstillede bouilloner og færdigretter. Her ville man ud over den smagsmæssige påvirkning potentielt kunne opnå en forhøjet ernæringsmæssig kvalitet på grund af blodproteinets gode ernæringsmæssige kvaliteter.

Næste skridt er at afprøve proteinprodukterne i fødevarerematricer. Det vil formodentlig give en bedre sensorisk oplevelse i forhold til de rene hydrolysater, da smag og aroma fra hydrolysatproduktet vil udgøre en nuance i det samlede smagsindtryk, i forhold til at dominere smagsindtrykket.

Referencer

1. Yu Fu, Jing Liu, Erik T. Hansen, Wender L.P. Bredie, René Lametsch, Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma, *Food Chemistry*, Volume 257, 2018, Pages 163-171
2. Yu Fu, Kathrine H. Bak, Jing Liu, Cristian De Gobba, Marie Tøstesen, Erik T. Hansen, Mikael A. Petersen, Jorge Ruiz-Carrascal, Wender L.P. Bredie, René Lametsch, Protein hydrolysates of porcine hemoglobin and blood: Peptide characteristics in relation to taste attributes and formation of volatile compounds, *Food Research International*, Volume 121, 2019, Pages 28-38
3. Li Q, Liu J, De Gobba C, Zhang L, Bredie WLP, Lametsch R. Production of Taste Enhancers from Protein Hydrolysates of Porcine Hemoglobin and Meat Using *Bacillus amyloliquefaciens* γ -Glutamyltranspeptidase. *J Agric Food Chem*. 2020 Oct 21;68(42):11782-11789. doi: 10.1021/acs.jafc.0c04513. Epub 2020 Oct 7. PMID: 32942857.
4. <https://www.novozymes.com/en/products/animal-protein/alcalase>
5. <https://www.novozymes.com/en/products/animal-protein/protana-prime>
6. <https://www.novozymes.com/en/products/animal-protein/protana-uboot>

Hydrolysemetode

Forsøg 1

1. RBC (Red Blood cell Concentrate) fortyndes 1:4 i 500 ml flaske
 2. RBC-opløsning sættes på omrøring i 30 min. ved stuetemperatur
 3. RBC-opløsningen pH-justeres med 1M HCl og 1M NaOH til pH 8,0 (tabel 1).
 4. Sæt flasken på vandbad (med magnetomrører 200 omdrejninger/min.) der er indstillet til 55°C (tabel 1).
 5. RBC-opløsningen opvarmes til 55°C. Noter den tid, det tager for RBC-opløsning at opnå 55°C.
 6. 27 mL prøver udtages til centrifugerør til analyse (tid 0). indfryses ved -18°C.
 7. Tilsæt enzymet (Papain 0,35%, Alcalase 1,6%). Tid 0.
 8. Tilsæt enzymerne Protana Prime og Protana UBoost efter 2 timer til Alcalasehydrolysen
 9. Udtag 27mL prøver af hydrolysater efter 2, 3, 4, 5 og 24 timer til centrifugerør. Papain kun ved 3 timer, hvor hydrolysen bringes til ende (se pkt. 10)
 10. Prøverne varmebehandles i 90°C i 15 min, derefter køles til stuetemperatur i vandbad
 11. pH indstilles til $5,0 \pm 0,1$ ved stuetemperatur
 12. Prøven centrifugeres ved 4600 omdrejninger/min i 45 min. ved 4°C
 13. Supernatanten overføres (dekanteres) til ny beholder
- Prøverne indfryses ved -18°C indtil videre test/analyse

Forsøg 2

1. Udtag 5 g RBC til proteinanalyse
2. 100 g RBC (Red Blood cell Concentrate) fortyndes med 400 g (1:4) i 500 ml blue cap-flaske.
3. RBC-opløsning sættes på omrøring i 30 min. ved stuetemperatur
4. RBC-opløsningen pH-justeres med 1M HCl eller 1M NaOH til pH $8,0 \pm 0,1$ (tabel 4).
5. Sæt flasken på vandbad (med magnetomrører 200 omdrejninger/min.) der er indstillet til 55°C (tabel 4).
6. RBC-opløsningen opvarmes til 55°C under omrøring.
7. Når opløsningen har nået angivet temperatur, udtag 27mL 0-prøve (reference)
8. Tilsæt 10mL Alcalase (1,6%). Tid 0
9. Efter 2 timers hydrolyse tilsættes 10mL Protana Prime (1,6%) og 10mL Protana UBoost.
10. Efter 3 timers hydrolyse opvarmes prøverne til 80°C i 30 min, og derefter køles til stuetemperatur i koldt vandbad
11. pH indstilles til $5,0 \pm 0,1$ med 1 M saltsyre ved stuetemperatur.
12. Afvej 4 centrifugerør med og uden låg (**Ved holdbarhedsforsøg – se metode til Holdbarhedsforsøg**)
13. 4 x 50 g hydrolysat overføres til 4 x 50 mL afvejede centrifugerør. Afvej centrifugerør med hydrolysat
14. Prøverne centrifugeres ved 4600 omdrejninger/min i 30 min. ved 4°C.
15. Supernatanten overføres (dekanteres) til nye afvejede centrifugerør. Afvej centrifugerør med efterladt pellet (udfældning)
16. Udtag 20 g prøver til afvejede centrifugerør til analyser. Noter vægt. Prøver indfryses ved -18°C og indtil analyse
17. Udtag 3 g hydrolysat til tørstofanalyse, som udføres samme dag
18. Hvis sensorisk test **udføres dagen efter**, opbevares hydrolysaterne **på køl ved 4°C** indtil sensorisk test
19. Hvis sensorisk test **ikke udføres dagen efter**, indfryses hydrolysaterne **ved -18°C** indtil dagen for sensorisk test

Holdbarhedsforsøg

1. Efter pkt. 11 i metode 1 udtages 2 prøver a 200 g (minimum 150 g) til steril beholder mærket med hhv. 0°C og 5°C.
2. **0°C prøve** opbevares i kølerum 1072 i pilot (0°C)
3. **5°C prøve** opbevares i køleskab i mikrobiologisk lab indstillet til 5°C. På dag 1, 2 og 7 udtages de pågældende prøver af køleskab og analyseres i mikrobiologisk lab (se [..\..\Human konsum Risikovurdering\2023\RISIKOVURDERING Uge 11 2023.docx](#)).

SEC HPLC-resultater fra forsøg 1

I diagram 1 ses det, at hydrolysens forløb er afhængig af hydrolysetiden, illustreret ved forskelle i topenes højde ved de forskellige tider. Samtidig ses det efter de tre første toppe (største peptider ved $RT > 10$), at de højeste toppe er repræsenteret af de korteste tider $T2 > T3 > T4 > T5 > T24$, hvor de ved de mindre peptider ($RT < 10$) er repræsenteret ved de længste tider $T24 > T5 > T4 > T3 > T2$. Altså er der en større repræsentation af større peptider jo kortere hydrolysetid, og omvendt, en større repræsentation af mindre peptider ved længere hydrolysetid. I diagram 2 ses samme tendens som i diagram 1, men hvor større peptider ($RT > 10$) er repræsenteret i højere grad i hydrolysatet behandlet med lav koncentration, lav > middel > høj, samtidig med at de mindre peptider ($RT < 10$) er højest repræsenteret i hydrolysatet behandlet med højere enzymkoncentration, høj > middel > lav. Dette indikerer, at hydrolysen er mere effektiv ved høj koncentration af enzym. Kigger man på diagram 3 ses det, at peptidstørrelserne ligger under 6,7 kDa. Samtidig ses det, at der genereres en del frie aminosyrer, illustreret ved toppen ved 0,2 kDa. Denne top ved $RT = 15$ ses også i diagram 1 og 2 som værende højst jo længere hydrolysetid og højere enzymkoncentration.



Diagram 1. SEC HPLC af hæmoglobin behandlet med Novozymes enzymer i 2, 3, 4, 5 og 24 timer

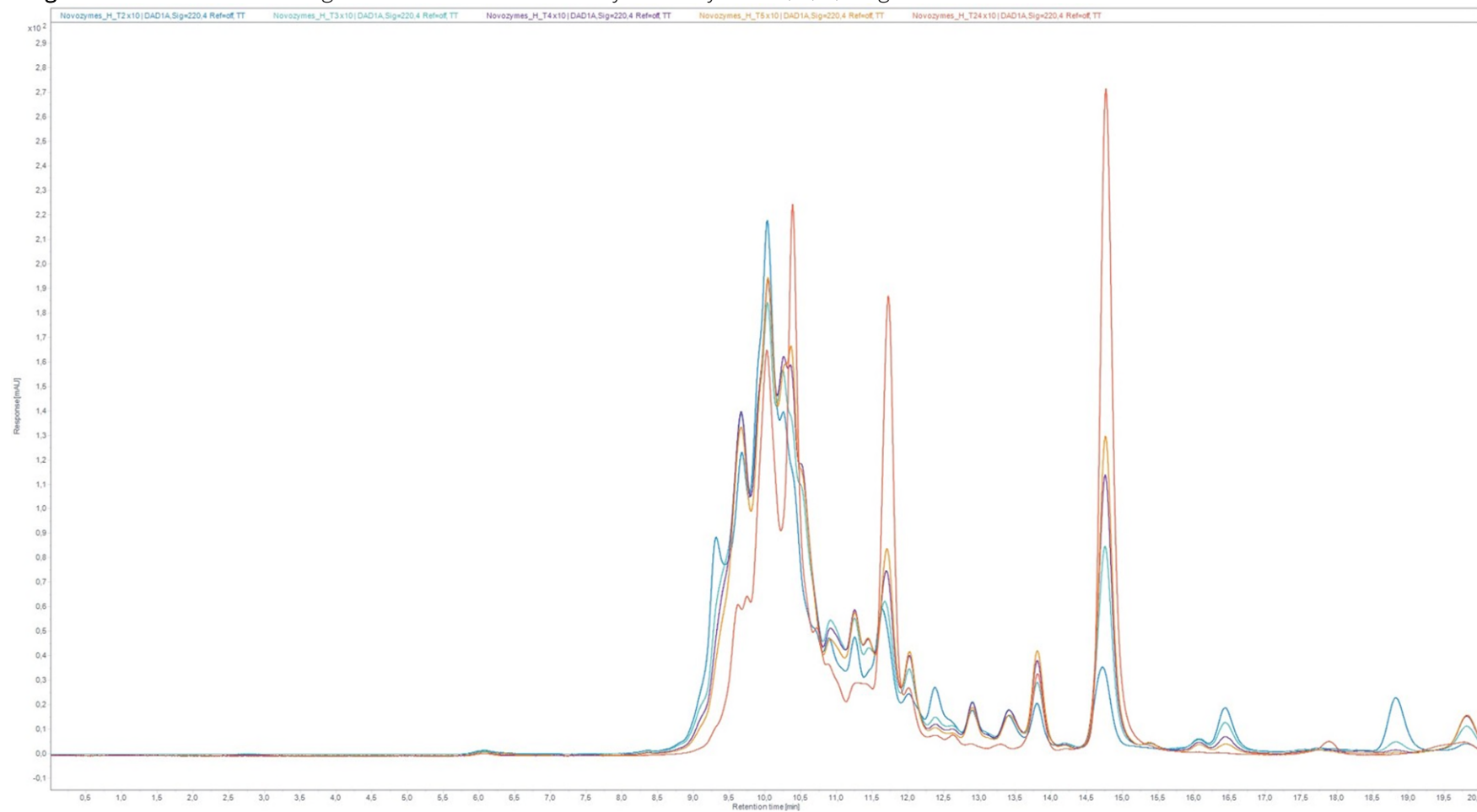


Diagram 2. SEC HPLC af hæmoglobin behandlet med Novozymes enzymer ved lav(blå), middel(gul) og høj(lilla) koncentration i 24 timer

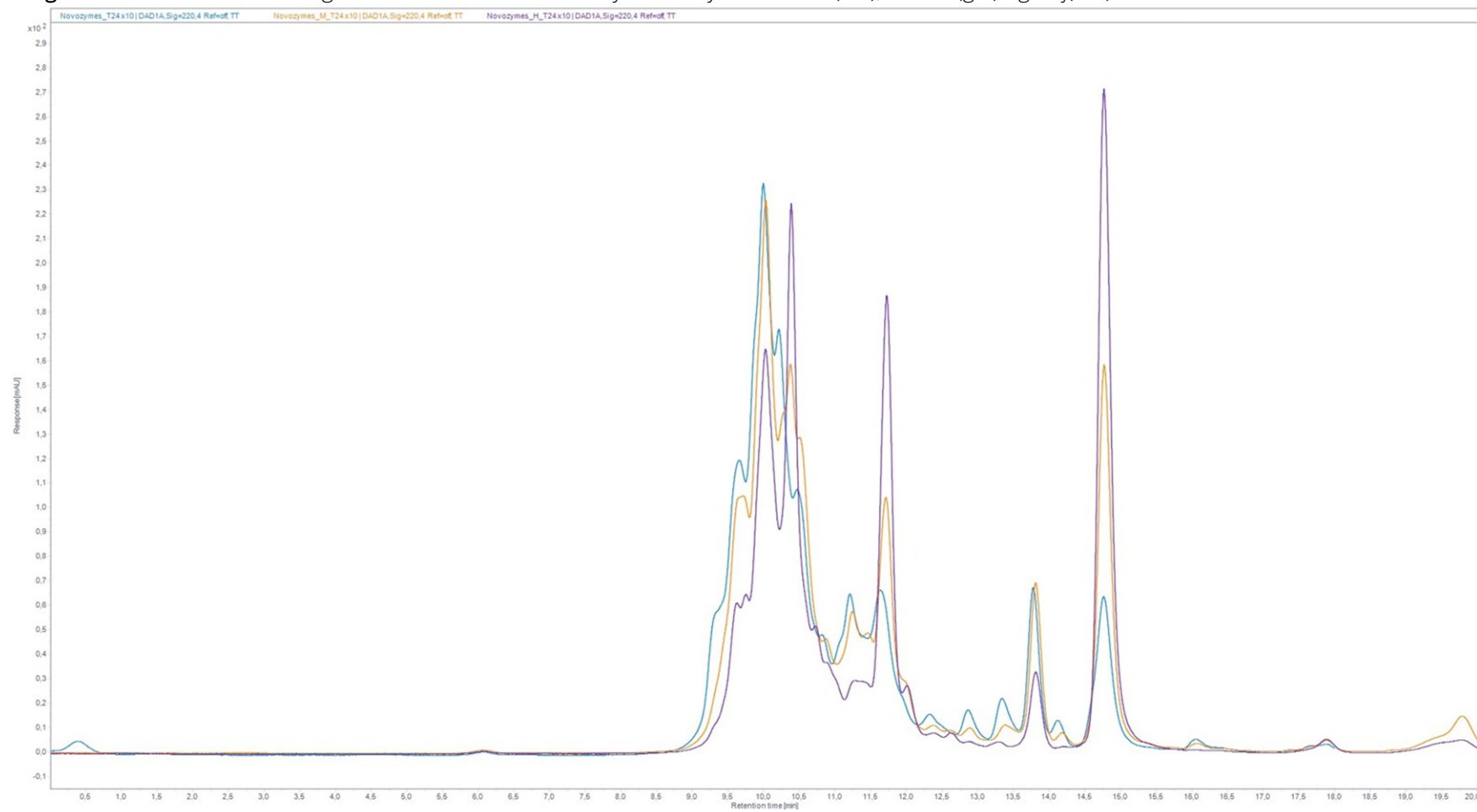
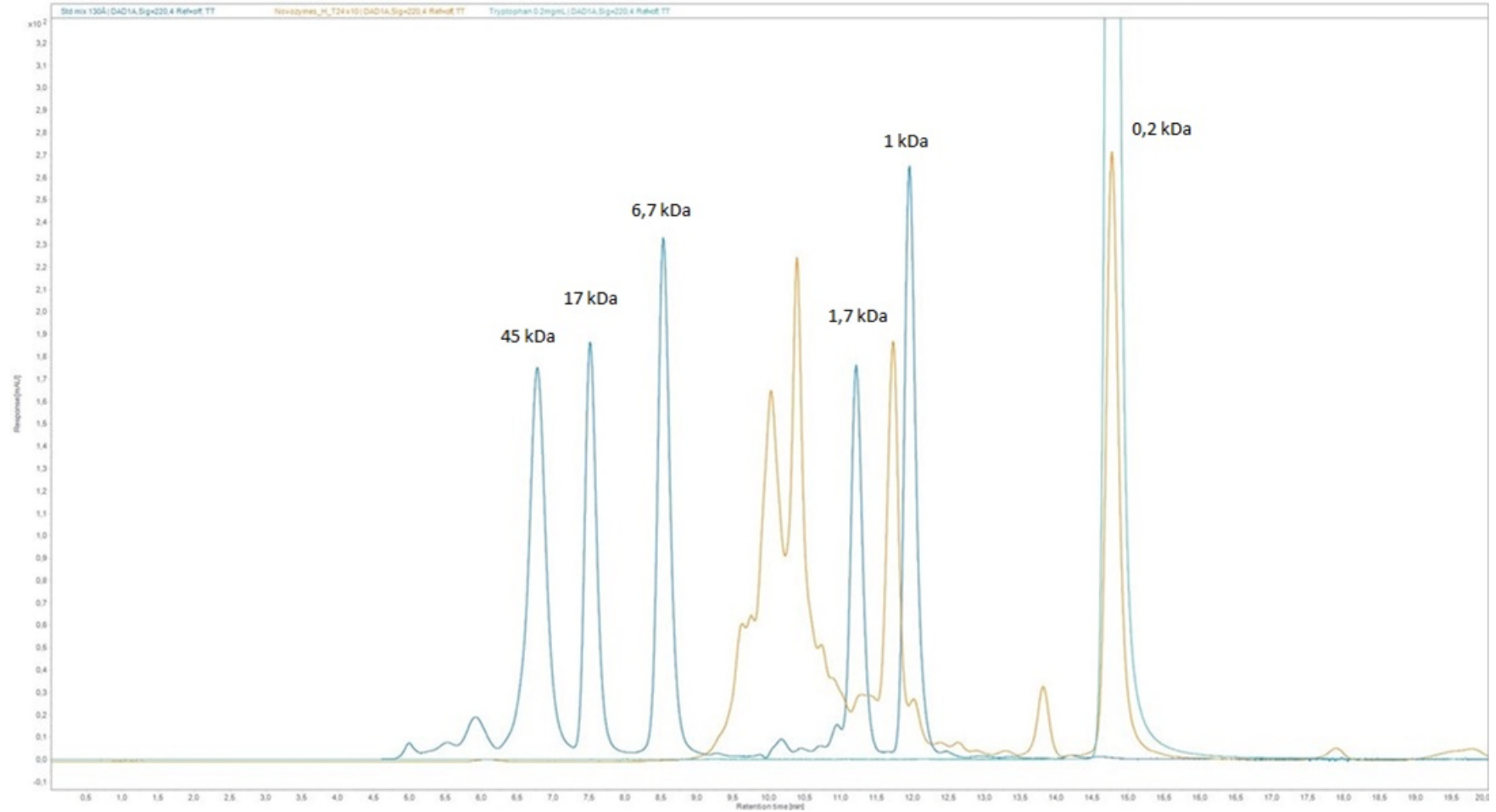


Diagram 3. SEC HPLC af 24 timers hydrolyse behandlet med enzym i høj konc. (gul) mod std. referencer (blå, 1-45kDa) og tryptofan (turkis, 0,2kDa)





SEC HPLC-resultater fra forsøg 2

Diagram 4-6 viser størrelsesfordelingen af peptid og aminosyre i de tre hydrolysater behandlet med hhv. Alcalase – Alcalase og Protana Prime – Alcalase, Protana Prime og Protana UBoost. Fordelingerne er angivet i Kilodalton (kDa) og giver en indikation om peptidernes størrelse, samt hvor stor en andel af den samlede mængde aminosyre der er nedbrudt til frie aminosyre. Koncentrationerne, som er angivet i % af den samlede mængde protein/peptid, er udregnet ved integration af arealet under toppene. Toppene repræsenterer molekyler, i dette tilfælde overvejende peptider, af en specifik størrelse. Toppen ved RT=15 min repræsenterer frie aminosyrer, fastsat ud fra en standard bestående aminosyren Tryptofan=0,2 kDa. Derudover er en standard med Met-enkephalin=0,57kDa, Angiotensin=1kDa, Neutrotensin=1,7kDa og Aprotinin=6,7kDa, anvendt til at estimere størrelsesfordelingen af resten af peptiderne.

Diagram 4. SEC HPLC-diagram, som viser størrelsesfordelingen af peptider/aminosyre i hydrolysat behandlet med Alcalase

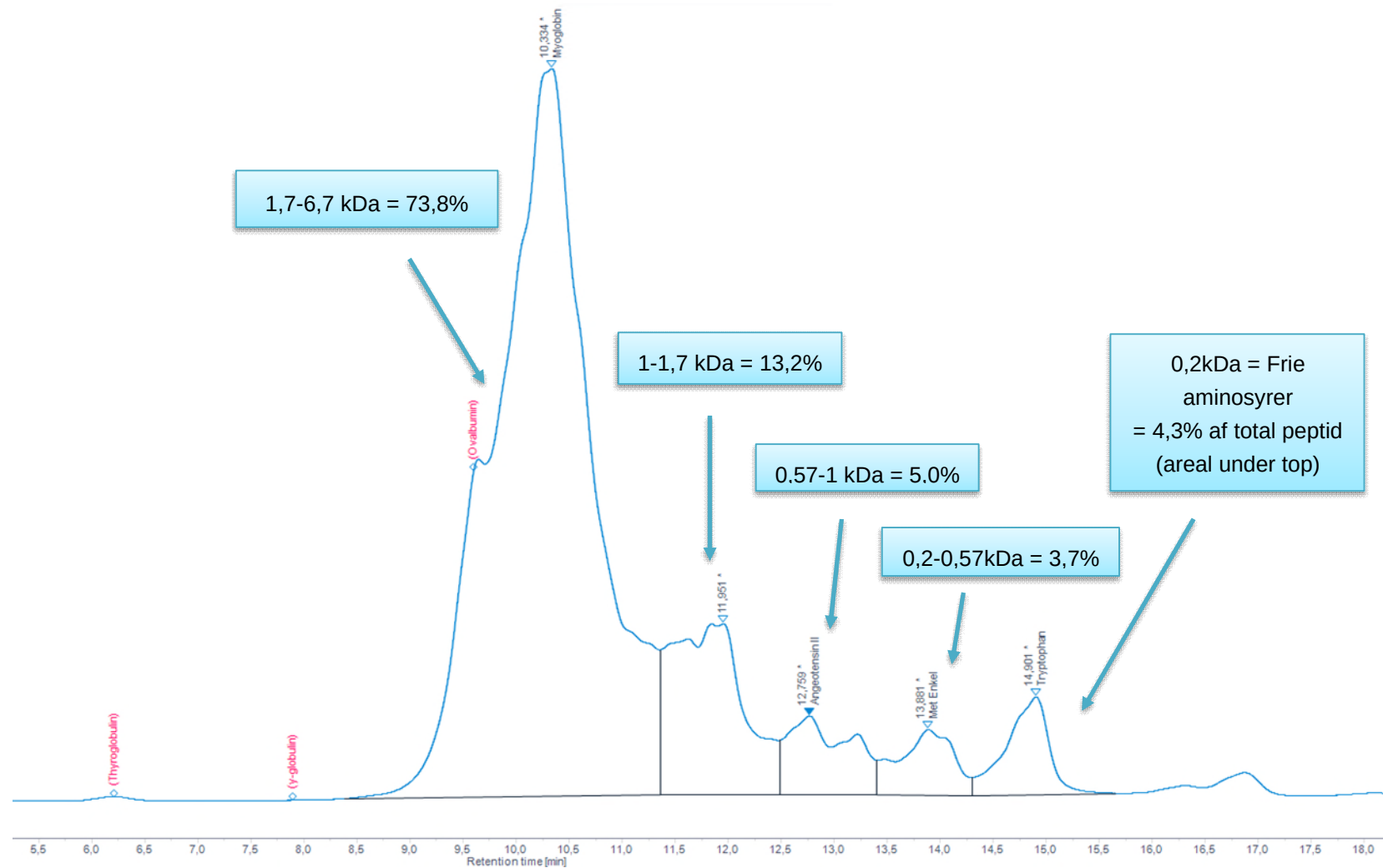


Diagram 5. SEC HPLC-diagram, som viser størrelsesfordelingen af peptider/aminosyre i hydrolysat behandlet med Alcalase og Protana Prime

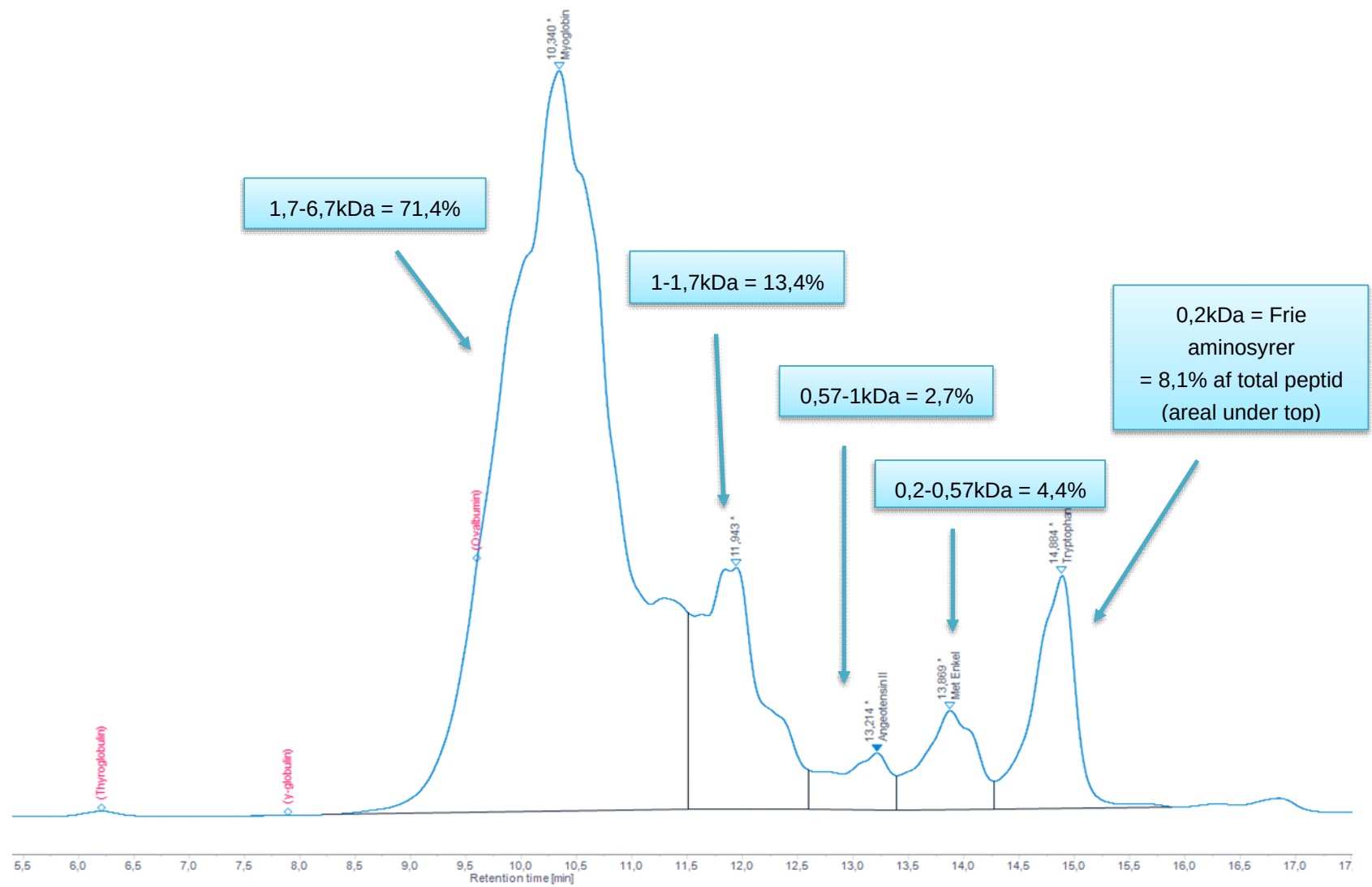


Diagram 6. SEC HPLC-diagram, som viser størrelsesfordelingen af peptider/aminosyre i hydrolysat behandlet med Alcalase, Protana Prime og UBoost.

