



Rapport

Blod som næringsbooster i petfood og fødevarer

Pilotforsøg – test af proces og mikrobiologisk kontrol

Forsøget blev udført fra 24. til 28 april 2023

Dato 21.11.2023

Proj.nr. 2010415

Version 1

Init. BGS/ERPE

Mål

I to separate forsøg, der er grundlag for denne rapport, er målet:

- At teste opsætningen af 500 liter pilotanlæg til hydrolyse af blod. Herunder styring af temperatur, tid, pH, flow, omrøring, separering og opsamling af produkter, samt mikrobiologisk kontrol af proces og udstyr.
- I samarbejde med ekstern specialist og udstyrsleverandør, At undersøges i hvilken grad blodhydrolysat egner sig til at blive spraytørring.

Formål

Formålet er at tilpasse hydrolyseprocessen af blodceller til en pilot proces hvor der anvendes udstyr sammenligneligt med udstyr anvendt i industrien for at demonstrere at processen kan opskaleres.

Forsøgsdesign

Tilpasning i forhold til laboratorie

Procesbeholder

I laboratoriet blev hydrolyseprocessen udført i blue-cap flasker i vandbad med magnetomrøring. I pilotopsætningen bruges 2x 800L rustfrie ståltanke med varme/kuldekapper, motorstyret omrøring og bundudtag.

Køling

Til køling af det varme hydrolysat blev en Alfa Laval varmeveksler anvendt (M3-base drænbar veksler med 29 plader). Som kølemedie blev der anvendt koldt vand fra vandhanen. I en industriel opsætning vil kølemediet oftest blive recirkuleret igennem et køleanlæg, for eksempel et glykol-kølesystem.

Pumpe

Til at pumpe produktet fra procestank til procestank/varmeveksler/separator blev der anvendt en Reform B-FU 500-1000 L/h fødevaregodkendt impellerpumpe fra Schneider Maschinebau GmbH.

Slanger

Alle slanger anvendt til produkt var levnedsmiddelgodkendte slanger fra Alfotech.



Figur 1. Procesudstyr som anvendt i pilotforsøget

En oversigt over hydrolyseprocessen er vist i bilag 4

Opvarmning før enzymtilsætning

For at sikre at procestiderne overholdes blev der foretaget nogen ændringer i forhold til processen udført i laboratoriet. I laboratoriet blev kold RBC blandet med koldt vand i forholdet 1:4, sat på omrøring for hæmolyse i 30 minutter, justere pH og derefter opvarmet til den ønskede hydrolysetemperatur, i dette tilfælde 55°C. Dette trin ville i pilotanlægget tage for lang tid pga. mindre overfaldekontakt mellem væske og varmekilde i forhold til volumenet der skal opvarmes, og derfor vurderes opvarm-

ning på denne måde overstige den grænse der er blevet fastsat for at holde den mikrobiologiske vækst til et minimum. Derfor blev det besluttet at opvarme vandet der skulle blandes med den kolde RBC til 65°C før sammenblandingen, jf. test 1 i følgende link: ..\..\..\Projektstyring\ERPE\opskalering_pilot\Køle test DMRI - Test1.2.3.4.xlsx.

Temperaturen ligger efter blanding tæt på eller lige under 55°C da RBC'en har en koldere temperatur end vandet anvendt i føromtalt test. Temperaturen kan derefter finjusteres til 55°C, optimummet for anvendte enzym. Hæmolyse og pH justering blev derfor udført ved 55°C og ikke koldt som i laboratoriet. Dette vurderes ikke at have nogen kemisk betydning for processens, men kan have en betydning for den mikrobiologiske udvikling og vil derfor inddrages i den samlede risikovurdering.

Separation

Til separation af udfældet produkt og flydende produkt var det tiltænkt at benytte DMRI's Clara 20 centrifuge fra Alfa Laval. Det blev dog klart under forsøget at mængden af udfældet materiale var for højt til at centrifugen kunne nå at skyde det ud, hvilket resulterede i blokering af centrifugen. Som alternativ blev der udtaget prøver af hydrolysatet efter køling og pH justering, som blev centrifugeret i laboratoriecetrifuge ved 4600 omd/min i 30 minutter ved 4°C.

Enzym

Endoproteasen Alcalase 4.0 fra Novozymes blev brugt som hydrolyseenzym. Enzymet har i tidligere forsøg vist sig effektivt til at nedbryde hæmoglobin og frigive hæmjern, hvilket synliggøres ved god affarvning af hydrolysatet efter centrifugering. Derudover har Alcalase 4.0 vist sig at give produkt med acceptabelt proteinniveau med en recovery % på >60%.

Enzymet blev ligesom i tidligere forsøg tilsat i en enzym-substratkonzentration på 1,6%. med en samlet mængde substrat (protein) på 33 kg blev mængden af enzym tilsat beregnet til $33000\text{g} \cdot 0,016 = 528\text{ g}$. Enzymet blev opløst i et par liter vand før tilsætning og beholderen blev skyllet efter med lidt vand efterfølgende.

Tabel 1. Enzymspecifikationer

Enzym	Konzentrati-on	hydrolysetid	pH optimum	Temperatur optimum
Alcalase 4.0 AU-A/g	1,6%	3 timer	8.0	55°C

Metode

Metoden som anvendt i forsøget er vist i bilag 2.

Mikrobiologisk prøveudtagning

Udstyr blev efter rengøring (på dag 2) analyseret for tilstedeværelse af skadelige mikrobiologiske organisme. Det blev gjort med svaberklude og sterile poser. Der blev taget prøver af overflader der blev vurderet til: at repræsentere en procesenhed der vil komme i berøring med produkt; at være et punkt/sted i proceslinjen med øget risiko for ophobning af mikrobiologiske organismer; at være et punkt/sted i proceslinjen med begrænset mulighed for rengøring. Prøvetagningsstederne er angivet i tabel 10, bilag 3.

Der blev taget prøver af materialet under processen, både råvare (RBC) og produkt, fem prøver af hver. Da centrifugeringen ikke virkede efter hensigten, blev produktprøverne taget efter justeringen af pH til 5 og udfældningen af hæm-jern. En oversigt over udtagningerne er angivet i bilag 3.

Kemisk prøveudtagning

Der blev analyseret for proteinindhold (Kjeldahl) på råvaren og de to hydrolyseringsprodukter: bundfald og centrifugat. OPA-test blev foretaget på T-3 hydrolysat med T-0 som reference for at beregne hydrolysegrad. Der blev lavet SEC-HPLC analyse på T-3 hydrolysat for sammenligning med tidligere forsøg. Oversigt over prøveudtag er angivet i tabel 9, bilag 3.

Råvarer Den anvendte Hæmoglobin blev opsamlet og hjemtaget fra DC Horsens d. 25. april og blev ved modtagelse sat på køl ved 0°C.

Forsøgslog Der blev under udførelsen af pilotforsøget ført forsøgslog som angivet i tabel 2.

Tabel 2. Forsøgslog fra pilotforsøget.

Tid	Procesbeskrivelse	Temperatur	pH
Dag 1			
	Opsætning af udstyr		
Dag 2			
	Rengøring og Mikrobiologisk kontrol Forud for forsøget blev en grundig rengøring af al udstyr udført. Rengøringen omfattede: 1. CIP af procestank 1 og 2, ventiler, slanger, pumpe og pladekøler. - o Recirkulering af rengøringsmidler gennem alle dele iht tabel X angivne tid/temperatur/koncentration 2. rengøring/desinficering af centrifuge. 3. rengøring/desinficering af løsele som kommer i kontakt med råvare og produkt. Efter rengøringen blev der taget prøver fra kritiske procesdele (blind-spots/ventiler/centrifuge/pladekøler mm) til analyse i mikrobiologisk laboratorie (se afsnittet Mikrobiologisk Laboratoriu i planen ...\\P2AAF8~1\Fagligt\HYDROL~1\FORSG2~2\PILOTF~1\PLAN_P~2.DOC).		
14:00	Blod modtages fra DC Horsens og sættes på køl ved 0°C		
15:00	400 liter ionbyttvand blev fyldt i procestank 2 og blev sat til opvarmning til 65°C. Til brug som procesvand dag 3		
Dag 3			
	Før processtart på dag 3 blev vægten af vandet noteret til 400,63kg	65°C	

7:30	Processtart Hæmoglobinet blev udtaget fra 0°C kølerum og tilsat til procestank 2 under omrøring. Vægt af vand+hæmoglobin = 509,2kg	53°C	
7:40	<u>Hæmolyse start</u> Omrøring = 35 Hz	53°C	
7:50	Temperaturmåling	55°C	
7:10	pH måles og det vurderes at der ikke er behov for pH-justering da værdien ligger inde for de 8,0±0,5	55°C	7,7
8:25 (T0)	Enzymtilsætning Enzymafvejning = 528g Opløst i ca. 3 liter ionbyttvand Beholder skyllet efter med ionbyttvand Omrøring = 30 Hz	55°C	7,7
9:58	Det registreres at der er høj skumkegle og omrøringshastighed sættes ned til 20 Hz		
10:00	Vandprøve nr. 1 til Lab M tages: det vand der har siddet i pladekøler efter CIP på dag 2.		
10:26	Temperaturregistrering procestank 2	54°C	
10:40	0,5% Oxonia kørt gennem pumpe + pladekøler + procestank 1		
11:20	Opvarmning af procestank 2 startet. pH måling	54°C	7,4
11:25	3 timers hydrolyse overstået.		
11:25 (T3)	Opvarmning (startet 11:20) Temperaturen øges herfra til en enzym-inaktiveringstemperatur på +80°C	55°C	7,4
12:00	Temperatur måles til 80°C. Inaktivering i 20 minutter starter	80°C	
12:10 - 12:25		85°C	
12:25	Nedkøling startes. Pumpehastighed sættes til 15,29 Kølevand (postevand): 1800L/timen Temperatur udgangsvand = 36,3°C Pumpehastighed justeres undervejs for at justere temperaturen på hydrolysatsat.	22,6°C (kølet hydrolysat)	
13:00	Nedkøling slut. Nedkølingstiden registreres til 35 min.	16°C	7,3
13:05	4 M Fosforsyre tilsætning +5 liter +2,5 liter +2,5 liter I alt 10 liter pH måles til 5,0		6,1 5,5 5,0
13:20	0,5 % Oxonia gennem centrifuge Derefter vand		
13:45	Centrifugering startet Skudtid 160 sek		

	Flowhastighed: 0,29 m ³ /time		
13:55	Centrifuge blokerede og vi stoppede		
14:00	Prøver til K lab og M lab taget fra det ikke-separerede hydrolysat. Opbevaret på is. Resten af hydrolysatet blev opbevaret i procestank 1 med fuld køling til dagen efter. <i>Det blev besluttet at vi ville skille centrifugen ad, vaske den og afprøve igen dagen efter.</i>		
14:00 - 15:00	Oprydning		
Dag 4			
7:00	Skille centrifugen ad for at kunne vaske, hvorefter den blev samlet igen. Ikke hygiejnisk.		
8:00	Kørsel af centrifuge med vand		
9:00	Ny kørsel med hydrolysatet fra procestank 1. Skudtid: 120sek		
9:15	Centrifugen blokerede igen. Det besluttes at prøve at separere på dekanter, GEA Westfalia Separator. Den er i stand til at separere højere indhold af uopløseligt materiale		
10:30	Afprøvning af dekanter. Dekanteren kører uden at blokere, men produktet er skum. Det skyldes sandsynligvis at der ikke er et modtryk (varipond) på dekanteren, hvilket resulterer i et markant skift i tryk fra højt til lavt som gør at proteinet i væsken skummer op.		
11:30	Forsøget stoppes		
11:30 -	Oprydning		

Resultater

Kemisk
laboratorie

Tørstofindhold

For at bestemme tørstofindholdet blev der foretaget vandanalyse på bundfald og supernatant. De blev målt til:

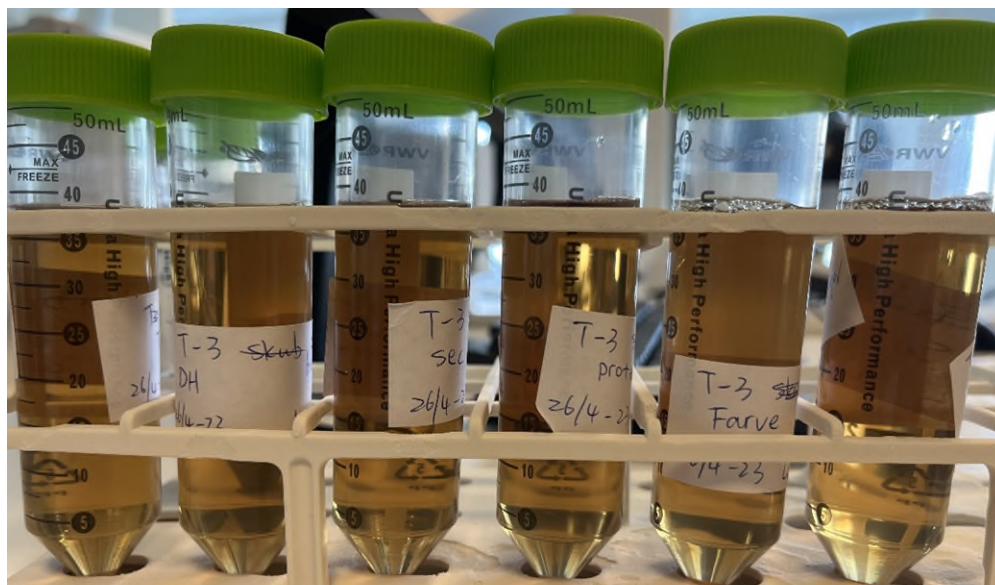
Bundfald_{vandindhold} = **80,6** g/100g svarende til et tørstofindhold på
Bundfald_{tørstof} = 100 – 80,6 g/100g = **19,4** g/100g

Supernatant_{vandindhold} = **93,9** g/100g svarende til et tørstofindhold på
Supernatant_{tørstof} = **6,1** g/100g

Affarvning

Efter centrifugering af hydrolysatet blev supernatanten dekanteres fra det udfælde-

de bundfald. Figur 2 viser en visualisering af produktet (supernatanten).



Figur 2. visuel affarvning af hydrolysatet efter centrifugering

En visuel inspektion kan beskrive produktet som en gennemsigtig væske med et gullig-brunt skær. Der er ingen til meget lidt rød farve i opløsningen hvilket vidner om en effektiv frigivelse og udfældning af hæmjern.

Hydrolysegrad

Hydrolysegraden (degree of hydrolysis, DH%) er et mål for hvor nedbrudt proteinet er blevet under hydrolysen. DH% bestemmes ved OPA test som er udviklet af (Nielsen et al., 2001), men findes i flere modificerede versioner. Ved OPA-test, måles på spektrofotometer ved 340nm. OPA-reagenset skal være friskfremstillet for at kunne få en optimal blindværdi (blank OD = 0,07).

Hydrolysegraden DH% blev beregnet til **18,9%**

Proteinudbytte

Proteinudbytte (recovery%) beregnes ud fra hydrolysatets proteinindhold analyseret ved Kjeldahl analyse. Det er et mål for hvor meget af proteinet fra det ubehandlede hæmoglobin der tilbage i hydrolysatet, når hæm-jern fraktionen er centrifugeret fra.

To prøver af det færdige hydrolysat blev centrifugeret ved 4600 omd/min i 30min ved 4°C for at separere supernatant fra bundfald. Vægten af de to fraktioner blev noteret og anvendt ved efterfølgende udregninger (se bilag 5).

Dobbelbestemmelser af proteinindhold blev ved Kjeldahl analyse målt i supernatant og bundfald og på baggrund heraf blev proteinudbytte og massebalancen udregnet.

Proteinudbyttet blev beregnet til **70,2 %**, svarende til 25,2 kg af den samlede mængde protein på 35,8 kg i RBC-fraktionen. Proteinindholdet i bundfaldet blev udregnet til 17,2 %, svarende til 6,5 kg protein samlet set. Massebalancen/genfundet protein blev udregnet til 86 % (bilag 5).

*Egnethed til
spraytørring*

Resultaterne udarbejdet af ekstern leverandør findes i den udarbejdede rapport:
<..\..\..\Korrespondancer\GEA\Nal 24781 - Hemoglobin - Teknologisk Institute.pdf>

Resultatet viste at supernatanten indeholdende det opløselige proteinprodukt er egnet til spraytørring i både SD (spray drying) og FSD (liquified spray drying) type spray tørre.

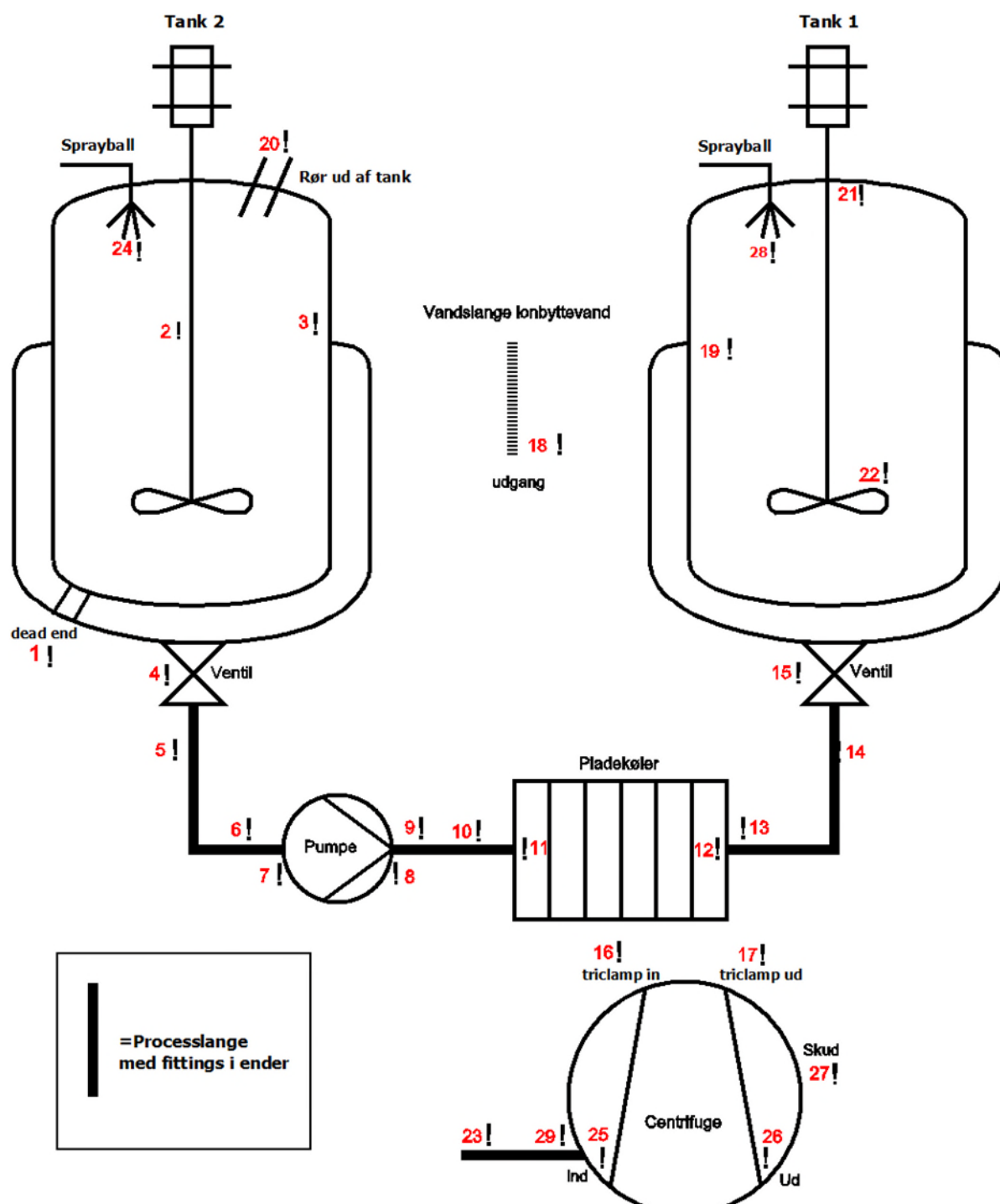
*Rengøringsprø-
ver*

Mikrobiologiske analyser

Der er taget rengøringsprøver (svaber) på udvalgte kritiske steder i proces-anlæg (figur 3) efter grundig rengøring med standard CIP-procedure. Resultaterne fremgår af tabel 3 og er sammenholdt med in-house krav til rengørings-standen på produkt-berørende overflader (tabel 4).

Det fremgår af de mikrobiologiske resultater, at der er flere kritiske punkter i produktions-anlægget med høje kimtal, der vurderes uacceptable, når sammenlignet med interne hygiejne-krav til produkt-berørende overflader.

5 uacceptable punkter er relateret til centrifuge og rørføringer hertil/fra samt en rørføring omkring pladekøler (markeret med orange/røde status i niveau 3, 4, og 5 tabel 3). Disse punkter bør optimeres inden fremtidig anvendelse af udstyret.



Figur 3. Prøvetagningssteder efter rengøringsproces

Tabel 3. Hygiejne-analyser (aerobt kimtal) efter rengøringsproces. Prøve nr. svarer til prøvetagningssted markeret på Figur 3.

Prøve nr.	Udstyr	Prøvested	Aerobt kimtal cfu/cm ₂	Status jf. Tabel
1	tank2	dead-end i bunden (ventil)	Ca. 3,2	1
2	tank2	omrører stang	< 0,31	1
3	tank2	side af kar	Ca. 0,056	1
4	tank2	bundventil	Ca. 0,49	1

5	Rørføring		< 1,4	1
6	Rørføring		Ca. 20	2
7	Pumpe	indgang	59	2
8	Pumpe	udgang	Ca. 25	2
9	Rørføring	incl. kødfnuller + indre gevind	< 1,4	1
10	Rørføring		< 1,4	1
11	Pladekøler	indgang	< 1,4	1
12	Pladekøler	udgang	36	2
13	Rørføring		1300	4
14	Rørføring	keglestub formet	Ca. 2,5	1
15	tank 1	bundventil	13	2
16	Centrifuge	indgang	31	2
17	centrifuge	udgang (incl. Snavs)	1100	4
18	vandslange (ionbyttet vand)	studs	Ca. 3,6	1
19	tank 1	indvendig	Ca. 0,7	1
20	tank 2	studs på top (dead end)	32	2
21	tank 1	underside af top-plade	< 0,056	1
22	tank 1	omrører stang	Ca. 0,06	1
23	rørføring		390	3
24	tank 2	sprayball + clips	< 0,5	1
25	centrifuge	Indgang	1000000	5
26	centrifuge	udgang_pool af slange og studs (svarer til 29+25)	100000	5
27	centrifuge	skud	43	2
28	tank1	som 24	Ca. 0,53	1
29	rørføring		14000	5
30	CIP frem	hvid slange	80	2
31	CIP frem	indgang rør-veksler	< 0,9	1

In-house krav til produktions-overflader i Pilot Plant

Tabel 4. Interne hygiejne-krav til produkt-berørende overflader i Pilot Plant.

Kimtal < 10	:	OK	1
10 < Kimtal < 100	:	Kan være bedre	2
100 < Kimtal < 1000	:	Skal være bedre	3
1000 < Kimtal < 10.000	:	Skal være meget bedre	4
Kimtal > 10.000	:	Helt uacceptabelt - må ikke forekomme	5

Vandprøver

Der er udtaget 2 vandprøver dagen efter grundig rengøring af systemet og inden produktionen er startet på mistanke om, at systemets bioburden ikke tillader henstand hen over natten inden produktion, hvorfor effekten af en ekstra CIP-rengøring om morgenen lige inden produktion blev introduceret. Prøve 1 er udtaget inden ekstra CIP om morgenen på produktionsdag, mens prøve 2 er udtaget efter ekstra CIP-rengøring. Vandprøverne er analyseret ved bioburden analyse af 50 ml vand. Det fremgår af resultaterne i **Tabel**, at proces-anlæggets hygiejne-status gavnes af en ekstra CIP-rengøring umiddelbart inden anvendelse.

Tabel 5. Hygiejne status af produktionsvand efter gennemløb i proces-anlæg.

Prøve nr.	Aerobt kimalt cfu/50 ml vand
Vand 1 (CIP ´et dagen før)	>100
Vand 2 (efter ekstra CIP på produktionsdag)	3,0

*Mikrobiologisk
analyse af råva-
re- og produkt-
prøver*

5 råvare-prøver og 2 produktprøver er analyseret for vegetative celler og sporetal (Tabel).

Råvaren har et væsentlig bioburden, hvad angår total kimtal og indhold af hhv. *Bacillus*, og *chlostridier*. *KE.coli* i råvaren. Råvarens sporetal er lavt; lige omkring detektionsgrænsen på 10 cfu/g.

Kim- og sporetal i produktprøverne er lave og under detektionsgrænsen. Produktet har været varmebehandlet v. 80-85°C i 25 minutter, heraf v. 85°C i 10 min (se forsøg-slog i tabel 2).

Produktprøverne er udtaget lige inden afsluttende centrifugering, hvilket er et tidligere trin end forventet (se Forsøgslog i tabel 2). 5 rengøringsprøver relateret til centrifugen viste sig uacceptable (tabel 3Tabel) og det må formodes, at brug af centrifugen ville have øget produktets kimalt.

Tabel 6. Kimalt og sporetal for råvare- og produkt-prøver.

	Aerobt kimalt cfu/g	<i>Bacillus</i> cfu/g	<i>Clostridier</i> cfu/g	<i>E. Coli</i> cfu/g	<i>Salmonella</i> cfu/g
Råvare ^A , veg. Kimalt	54000 – 68000	32000 – 57000	26000 – 53000	ca. 40 – 170	< 10
Råvare ^B , sporetal	< 10 - ca. 20	< 10	< 10		
Produkt ^C , veg. kimalt	< 10	< 10	< 10		
Produkt ^D , sporetal	< 10	< 10	< 10		

^ABaseret på analyse af 5 prøver; standard kimalt; analyse af vegetative bakterie-celler.

^BBaseret på analyse af 5 prøver; sporetal, hvor produktet er analyseret efter varmebehandling v. 75° C i 10 min.

^CBaseret på analyse af 2 prøver; standard kimalt; analyse af vegetative bakterie-celler.

^DBaseret på analyse af 2 prøver; sporetal, hvor produktet er analyseret efter varmebehandling v. 75° C i 10 min.

*Fødevarerikker-
hed*

Vegetative celler af de patogene bakterier, som er fundet i råvaren samt toksin, der måtte være dannet i råvaren allerede, inaktiveres af den anvendte varmebehandling (80-85°C i 10-25 min).

For de sporedannende bakterier (*B. cereus*, *Cl. botulinum* og *Cl. perfringens*), vil langt de fleste sporer overleve varmebehandlingen. Iht. Tabel 7 er den anvendte varmebehandling ikke tilstrækkelig til at inaktiverer kuldetolerante *Chlostridium botulinum*, som kræver 90°C i 10 min for inaktivering. Ækvivalent varmebehandling ved 80°C, som svarer til 90°C/10 min, er 129 min v. 80°C.

Vækst skal forhindres for at sikre produktet, fx. Ved at øge temperatur under varmeinaktivering til 90°C/10 min i kombination med kølelagring af produktet ved 0-2°C.

Tabel 7. Faktorer til inaktivering af patogener (uddrag af (FVST, Bilag 1))

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Chlostridium botulinum</i> (mesofile)	<i>Chlostridium botulinum</i> (kuldetolerante)	<i>Chlostridium perfringens</i>	<i>E.coli</i> / <i>Salmonella</i>
Sporer	121°C i 3 min.	121°C i 3 min.	90°C i 10 min.	121°C i 3 min.	Ikke relevant (i.r)
Toksin	Varmelåbtil toksin: 75°C Emetisk toksin: 126°C	80°C i 10 min.	80°C i 10 min.	75°C	i.r. (toksindannelse sker u. human infektion)
Kølelagring	<4°C	<10-12°C	<3-4°C	<10-12°C	6,5/5,0°C
pH	<4,5	<4,6	<5,0	<5,5	<4
Vandaktivitet (a _w)	<0,92	<0,94	<0,97	<0,93	0,95/0,94

Bilag 1



Bakterieskema maj 2017.pdf

<https://foedevarestyrelsen.dk/Media/638181819258416746/Bakterier%20i%20f%20c3%b8devarer2022.pdf>

konklusion

Kritiske procestrin

Tid

På baggrund af forsøgsloggen vist i tabel 2 konkluderes det at procesparameteren "tid" er acceptabel i forhold til referenceforsøgene udført i laboratorie. Udvalgte procestrin blev tilpasset så procestiderne ikke blev kritisk lange ud fra et mikrobiologisk synspunkt.

Forvarmning af procesvand

Det var en forudsætning at forvarme procesvandet før blanding med blodcellefraktionen, da en opvarmning fra <20°C til 55°C blev vurderet at tage for lang tid. Ved at forvarme procesvandet til 65°C før tilsætning af blodcellefraktion var temperaturen straks efter sammenblanding på mellem 50-55°C, hvilket hurtigt ville kunne justeres til 55°C under hæmolysen.

Opvarmning efter hydrolyse

Tiden for opvarmning af produktet efter hydrolyse fra 55°C til 80°C blev målt til 40 minutter, hvilket blev godkendt af specialist i mikrobiologi og fødevarer, Birgit Groth Storgaard.

Nedkøling

Tiden for nedkøling af produkt fra 85°C til 16°C blev målt til 35 minutter, hvilket blev godkendt.

pH-justering

Tiden for justering af pH til 5,0 blev målt til 15 minutter, hvilket blev godkendt.

Separering Efter pH justering og udfældning af hæm-jern blev den 16°C kolde opløsning via pumpe ført til centrifugen. Centrifugen blokerede dog straks efter start og denne proces blev derfor afbrudt. En anden separeringsmetode med dekanter blev afprøvet. Denne proces virkede heller ikke efter hensigt da centrifugatet kom ud som rent skum.

Der er derfor ikke nogen tidtagning af en pilot skala separering.

Det vurderes efter dialog med specialister og kommercielle udstyrsleverandører, at der findes egnet separationsudstyr der effektivt kan adskille den opløselige produkt fra det udfældede uopløselige produkt. Der vil fremadrettet igangsættes aktiviteter der belyser egnede separationsmetoder med henblik på at finde den optimale løsning til separation af opløseligt produkt fra uopløseligt produkt på et industrielt niveau.

Temperatur

Temperaturen i procestankene var målbar igennem hele forsøget via inline temperaturprober. Temperaturen kunne fastholdes på en temperatur via en termostat forbundet til termometeret og varmekappen og det var dermed muligt at holde en stabil temperatur i procestankene under hydrolysen. Ved køling kunne det varme medie i kapperne skiftes ud med nedkølet medie som var tilsluttet glykol-køleanlægget. Dermed var det muligt at køle og holde temperaturen ned til <5°C. Hydrolysatproduktet blev holdt ved denne temperatur mellem procesdag 1 og 2 for at holde en eventuel mikrobiologisk udvikling af produktet til et minimum. Produktet var ikke tiltænkt at skulle anvendes i sensorisk test, hvorfor mikrobiologiske analyser ikke blev foretaget på produktet i procesdag 2.

Inaktivering af enzym Alle planlagte temperaturer blev opnået i tilfredsstillende omfang.

I opvarmningstrinet hvor enzymet bliver inaktiveret ved >80°C nåede temperaturen op på 85°C efter 10 minutter af de i alt 20 minutters holdetid. Dette forstærker effekten af inaktivering og har derfor ikke nogen negativ effekt.

Inaktivering af mikroorganismer Mikrobiologisk anbefales det at inaktiveringstemperaturen øges til 90°C i 10 minutter da dette er nødvendigt for at inaktivere kuldetolerante *Chlostridium botulinum* (se tabel 7).

Nedkøling Det var vanskeligt at bestemme den eksakte temperatur på det afkølede hydrolysatprodukt da en temperaturmåler ikke var installeret på udgangen af pladekøleren. Temperaturen kunne derfor først aflæses når væskestanden i procestank 1 var nået op til temperaturproben. Temperaturen endte med at være 16°C efter nedkøling hvilket var lidt koldere end hvad den forventede succesramme var (20-25°C). Dette vurderes ikke at have nogen negativ effekt på produktet ud fra et mikrobiologisk synspunkt, da koldere temperatur hæmmer vækstbetingelserne for patogene mikrober. Ved pH justering blev de målte værdier korrigeret i forhold til den aktuelle temperatur i opløsningen. Separeringen gik, som tidligere nævnt, ikke efter planen, men årsagen til dette blev vurderet at være et for højt indhold af udfældet materiale i forhold til centrifugens kapacitet, og ikke temperaturen.

pH

pH-værdien blev målt manuelt ved prøveudtag.

pH måling før

enzymtilsætning

Ved pH måling på varm opløsning før enzymtilsætning blev den udtagne prøve målt direkte på den varme prøve med temperatur korrigering, samt efter nedkøling til stuetemperatur. Den varme (43,4°C) blev ved korrigering målt til pH=7,5 og den nedkølede (24,7°C) blev målt til 7,7. Der var altså lidt forskel på målingerne, hvilket der bør medregnes som en målbar usikkerhed hvis der kun måles på varm prøve. pH måling ved stuetemperatur vurderes at være den mest præcise og derfor blev pH-værdien 7,7 registreret. Da pH optimum for enzymet var angivet til pH=8,0±0,5 blev pH ikke justeret før enzymtilsætning.

pH justering

efter nedkøling

Efter nedkøling blev pH værdien målt til 7,3. Altså er pH værdien faldet fra 7,7 til 7,3 under den mellemliggende proces hvilket kan ses i Tabel 2 hvor det også ses at faldet til 7,4 sker under selve hydrolysen. Man bør altså måle og justerer pH-værdien under hydrolysen så enzymerne har de bedste betingelser. På den måde kan den overordnede enzymaktivitet forbedres og dermed proteinudbyttet i sidste ende.

Procestanke

Rengøring

Resultaterne af rengøringsprøverne (figur 3 og tabel 3) viser at procestankene generelt bliver rengjort godt, med undtagelse af bundventilen på tank 1 (prøve nr. 15) med et aerobt kimtal på 13 cfu/cm₂ og røret i toppen af tank 2 (prøve nr. 20) med et aerobt kimtal på 32 cfu/cm₂. Det vurderes ikke at være kritisk og rengøringen af tankene vurderes at være acceptabel.

Kølesystem:

Slanger, pumpe og varmeveksler

De aerobe kimtal målt på kølesystemet mellem procestankene (pkt. 5-14 i figur 3) svinger meget. Især en måling på SMS-slangekobling fra udgangen af pladekøleren, pkt. 13, skiller sig ud med et kritisk højt aerobt kimtal på 1300 cfu/cm₂. Resten af systemet ligger under 100 cfu/cm₂, men vurderingen er at rengøringen generelt skal forbedres.

Centrifuge, kob-

linger og slanger

De aerobe kimtal målt på centrifugesystemet efter rengøring er generelt meget høje. Både indgang og udgang af centrifugen hvor slangerne er koblet på ligger med aerobe kimtal over 10.000 cfu/cm₂ (se tabel 3). Dele af den målte overflade er ikke i direkte kontakt med produktet og bliver derfor heller ikke rengjort, men der vurderes at være en stor risiko for at "skubbe" snavs ind i produktberørte områder når slangerne af- og påmonteres. Dette **skal** forbedres ved fremtidig brug af centrifugen. Slangerne som produkt føres igennem til og fra centrifugen (pkt. 23) har også problematisk højt aerobt kimtal på 390 cfu/cm₂.

Vandprøver

Vandprøve fra CIP'et udstyr taget dagen efter rengøring viste et aerobt kimtal på >100 cfu/50 mL vand, og efter ekstra CIP på produktionsdagen blev det aerobe kimtal målt til 3 cfu/50 mL vand (se tabel 5). Det vurderes derfor at udstyret skal rengøres umiddelbart før der køres produktion, da udstyret et døgn efter rengøring ikke er tilstrækkeligt hygiejnisk.

Forbedringer til bedre mikrobiologisk kontrol

Koblingerne vurderes generelt at være hygiejnisk problematiske og fremadrettet skal

der være ekstra opmærksomhed på disse under rengøring. Koblingerne på slanger og fast udstyr bør vaskes manuelt med antimikrobielt rengøringsmiddel før tilkobling og CIP, og bør så vidt muligt være i "lukket system" tilstand indtil kørsel. Triclamp koblingerne og pakningerne på ind- og udgang af centrifugen (pkt. 16,17, 25 og 26 fig. 2) bør ligeledes rengøres manuelt, før samling og CIP.

Slanger og koblinger (push-in fittings) på centrifugen er blevet skiftet til Venasil 650 VP levnedsmiddelgodkendt silikoneslange med sanitære påpresnings-kapper monteret med 10mm triclamp kobling (til montage på centrifuge) i den ene ende og DN25 DIN krave med omløber (til montage på pumpe) i den anden ende. Ligeledes er push-in koblingerne der kunne monteres på pumpen ved brug af centrifugen blevet udskiftet til hygiejniske og fødevarer godkendte DIN koblinger.

CIP-processen og rengøring vurderes fremadrettet at skulle udføres samme dag og umiddelbart før forsøget/processen udføres.

Temperaturen ved enzyminaktivering vil i fremtiden blive 90°C i stedet for 80°C i 10 min for at sikre inaktivering af alle *Chlostridium botulinum*.

Samlet vurdering

Det vurderes at hydrolyseprocessen er mulig at opskalere til pilot skala da de kritiske procesparametre blev godkendt samtidig med at der blev opnået en acceptabel af-farvning og et godkendt proteinudbytte. Det vurderes samtidig at der kan opnås mikrobiologisk kontrol i hydrolyseprocessen såfremt ovenstående forbedringer bliver implementeret.

Mulighederne for en optimal separationsmetode skal i samarbejde med relevante udstyrsleverandører undersøges og denne proces skal sidenhen vurderes i forhold til kritiske procesparametre og mikrobiologisk kontrol.

Supernatanten indeholdende det opløselige protein efter hydrolysen er egnet til spraytørring og produktet kan derfor tørres til et pulverprodukt som kan forbedre lagerstabilitet og anvendelsesmulighederne.

Næste skridt

Et holdbarhedsstudie på det tørrede produkt vil blive udført i 2024 hvor produktet, i en periode på 6 måneder, vil blive undersøgt for oxidation og kemiske ændringer under lagring, samt mikrobiologisk vækst.

Det tørrede produkt vil i 2024 planmæssigt blive testet i fødevarer matricer for at vurdere sensoriske og funktionelle egenskaber når anvendt som ingrediens.

Hydrolyse Metode

1. 400 L vand opvarmes til 65°C i tank 2
2. Udtag 5g RBC til protein analyse
3. 100L RBC (Red Blood Cell fraktion) overføres til tank 2 med 400L, 65°C vand (1:4).
4. RBC-opløsning sættes til omrøring i 30 min og temperaturen justeres til 55°C.
5. RBC-opløsningen pH-justeres med 4M H₃PO₄ og 4M NaOH til pH=8,0±0.5
6. Når opløsningen har stået under omrøring i 30 min udtages 27mL T-0-prøve(reference) til lab K. Prøven udtages hygiejnisk.
7. Tilsæt 530 g Alcalase (1,6%). Tid 0
8. efter 3 timers hydrolyse opvarmes til 80°C. Noter opvarmningstiden. Temperaturen holdes på 80°C i 15 min.
9. Den varme opløsning afkøles til 20°C ved overførsel til afkølet tank gennem pladekøleren. Hastigheden på overførslen justeres efter temperaturen på hydrolysatet ved udgangen af pladekøleren.
10. pH indstilles til 5,0 med 4 M fosforsyre (20°C).
11. væsken pumpes til centrifugen hvor opløsningen centrifugeres og deles i retentat (vandig del) og skud (uopløselig del).
12. retentatet opsamles i den tank der er tom (skylles med rent, koldt vand først). Ved hver centrifugeindstilling opsamles 20 liter i ny og ren 20 liters dunk. Halvejs i centrifugeringen opsamles 3 liter i en ny, ren 3 liters dunk til GEA.
13. Der udtages en prøve af retentat og af skud umiddelbart efter start af centrifugering til analyse i lab M (hygiejnisk).
14. Undervejs afprøves indstillinger på centrifugen, skudtid, flow etc. For hver ca. 100 L hydrolysat.
15. Der udtages 3 prøver af hhv. retentat og skud (20 g prøver til afvejede centrifugerør+3 g til tørstofanalyse). En prøve efter de første ca. 20 liter er kørt igennem. En prøve når ca. halvdelen er kørt igennem. En prøve umiddelbart inden afslutningen af centrifugering. Der kan evt. tages flere prøver undervejs (en prøve pr. centrifugeindstilling) hvis det vurderes at være nødvendigt. Prøverne sættes på frost indtil analyse i lab K.
16. Der udtages en prøve af retentat og af skud til analyse i lab M (hygiejnisk). En prøve når de første 20 liter er kørt og en prøve umiddelbart før afslutningen af centrifugering.
17. Prøverne (centrifugerør) til lab K afvejes før de indfryses ved -18°C indtil analyse.
18. De opsamlede fraktioner (20 liters dunke+ 3 liters dunk) indfryses ved -18°C.

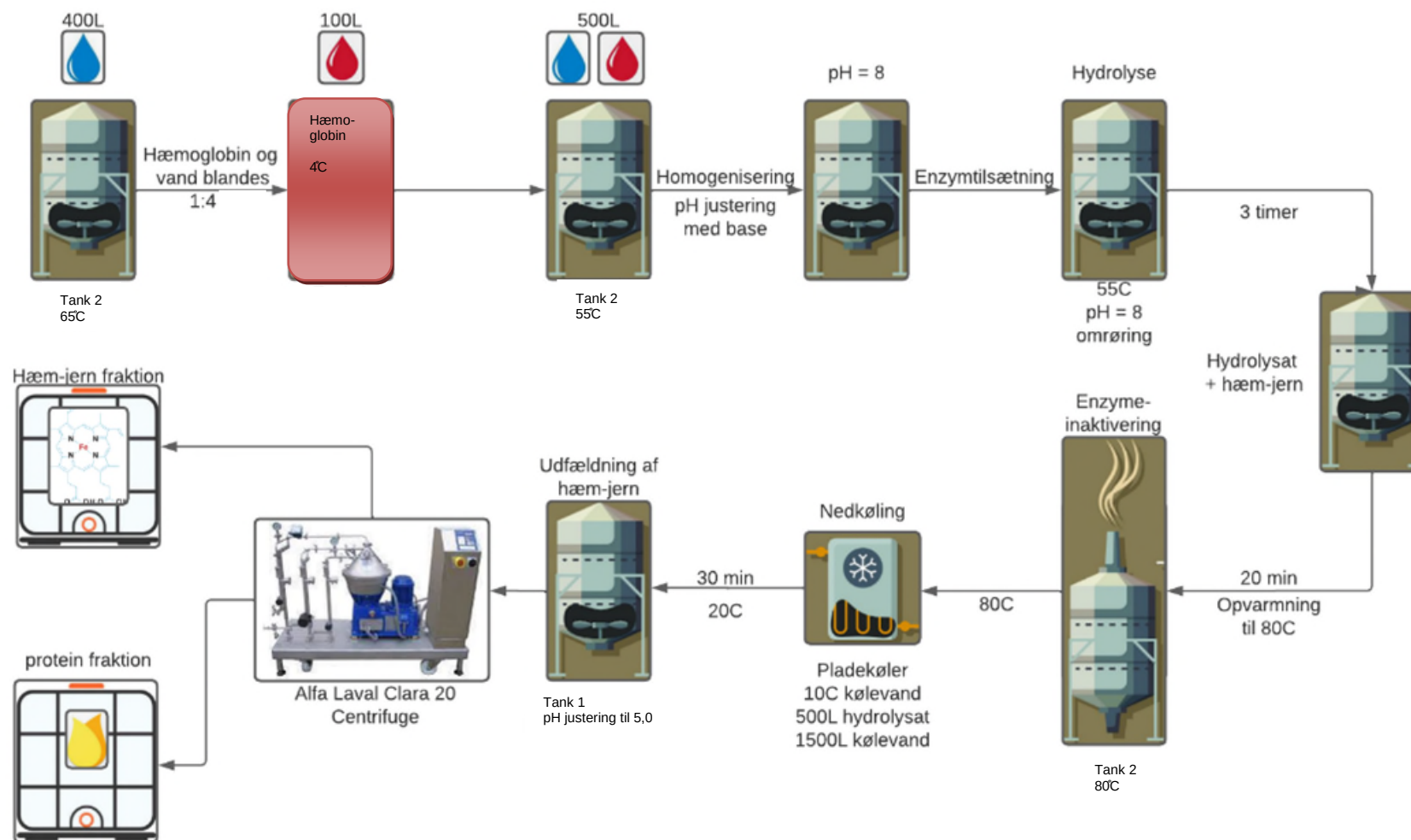


Tabel 2. Analyser som foretages af kemisk laboratorie

Lab K	Råvarer (hæmoglobin)	T-0 før enzym- tilsætning	Efter hydrolyse	Efter køling	T-3 Hydrolysat	T-3 Skud
Tørstof %	-	-	-	-	✓	✓
Protein	✓	✓	-	-	✓	✓
Farve	-	✓	-	-	✓	-
DH	-	✓	-	-	✓	-
SEC HPLC	-	✓	-	-	✓	-
LC-MS	-	✓	-	-	✓	-

Tabel 10. Analyser som foretages af mikrobiologisk laboratorie

Lab M	Råvarer (hæmoglobin)	T-0 før enzym- tilsætning	Efter hydrolyse	Efter køling	T-3 Hydrolysat	T-3 Skud
Salmonella	✓	-	-	-	-	-
E. Coli	✓	-	-	-	-	-
Aerobt kimal	✓	-	-	-	✓	-
Aerobt sporetal	✓	-	-	-	✓	-
BBCA(Bacillus)	✓	-	-	-	✓	-
Bacillus sporetal	✓	-	-	-	✓	-
Clostridier	✓	-	-	-	✓	-
Clostridier spore- tal	✓	-	-	-	✓	-





Vand total = 400,6kg | RBC total = 108,6kg | Proteinindhold RBC = 33% | Proteinindhold RBC total (108,6L) = 35,8kg | vægt ekstra = 14,5kg*

	Bundfald				Supernatant				Samlet		
Hydrolyse ID	Vægt prøve	Vægt total	Protein i prøve	Protein total	Vægt prøve	Vægt total	Protein i prøve	Protein total	Protein i alt	Proteinudbytte Supernatant	Massebalance genfundet protein %
	m_{bund}	$m_{bund,tot}$	$\%_{prot,bund}$	$m_{prot,bund}$	m_{sup}	$M_{sup,tot}$	$\%_{prot,sup}$	$m_{prot,sup}$	$m_{prot,tot}$	$\%_{recovery}$	$\%_{m-bal}$
Prøve 1A	3,4g	36,1kg	16,9%	6,1kg	44,8g	473,1kg	5,2%	24,4kg	30,5kg	70,0%	87,5%
Prøve 1B	3,1g	35,9kg	17,2%	6,2kg	40,5g	473,3kg	5,2%	24,6kg	30,8kg	70,7%	88,5%
Prøve 2A	3,6g	37,4kg	17,7%	6,6kg	45,1g	471,8kg	5,2%	24,6kg	31,2kg	70,5%	89,5%
Prøve 2B	3,1g	37,6kg	17,2%	6,5kg	39,5g	471,6kg	5,1%	24,3kg	30,7kg	69,7%	89,5%
gennemsnit	3,3g	36,8kg	17,2%	6,3kg	42,5g	472,4kg	5,2%	24,5kg	30,8kg	70,2%	88,2%

Bergninger:

ϵ = Korrigeringskoefficient** = $0,972 = (m_{vand} + m_{RBC}) / (m_{vand} + m_{RBC} + m_{vægt\ ekstra})$

$$m_{prot,bund} = m_{bund,tot} \times \frac{\%_{prot,bund}}{100} = 36,8kg \times \frac{17,2\%}{100} = 6,3kg \mid m_{prot,sup} = m_{prot,tot} \times \frac{\%_{prot,sup}}{100} = 472,4kg \times \frac{5,2\%}{100} = 24,5kg$$

$$\%_{recovery} = \frac{m_{prot,sup} / m_{prot,RBC}}{\epsilon} \times 100 = \frac{24,5kg / 35,8kg}{0,972} \times 100 = 70,2\%$$

$$\%_{m-bal} = \frac{m_{prot,bund} + m_{prot,sup} / m_{prot,tot}}{\epsilon} \times 100 = \frac{6,3kg + 24,5kg / 35,5kg}{0,972} \times 100 = 88,2\%$$

*enzymopløsning+base+syre | **korrigerer for ændret masse ved tilsætning af enzymopløsning og pH-justering