

# Smell

## Smaksnøytrale proteiner fra makrell

AP1 delrapport

31 mars 2020



Nofima AS: Runar Gjerp Solstad, Birthe Vang, Mari Øvrum Gaarder, Tone Aspevik, Katinka Dankel, Sileshi Wubshet, Diana Lindberg (prosjektleder, [diana.lindberg@nofima.no](mailto:diana.lindberg@nofima.no))  
SINTEF AS: Peter Molesworth & Wilhelm Glomm

# Forord

Denne presentasjon er en del av en leveranse til prosjektet Smaksnøytrale protein fra makrell (SMELL), finansiert av Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF p.nr. 901534).

Presentasjonen inneholder figurer og tabeller fra delrapporten som utgjør den andre delen av leveransen. For en fullstendig beskrivelse av arbeidet som er blitt utført vises til denne delrapporten.

Leveransen har fokus på arbeidet som er utført i arbeidspakke 1 (AP1), for å kunne oppdatere industrien på de resultater som foreligger etter en første prosessoptimalisering i labskala. Det er viktig å påpeke at denne leveransen omhandler første trinn i SMELL-prosjektet, som fortsetter ut 2020, og må derfor anses som et foreløpig resultat fra prosjektet.



Overordnet prosjektmål i SMELL er å utvikle en prosess for å fremstille et lukt- og smaksnøytralt proteinkonsentrat fra limvann og hydrolysat av makrellavskjær for humant konsum i første omgang, og til *petfood* i andre omgang.

# Delmål i SMELL

Å karakterisere de forbindelsene som skaper uakseptabel lukt og smak på proteinkonsentrat fra limvann av makrellavskjær ved å:

- bruke en flertrinnstilnærming ved bruk av ulike kjemiske analyser for å karakterisere de viktigste vannløselige og flyktige komponentene
- bruke standardisert sensorisk metodikk med trent sensorisk panel for å karakterisere smak og lukt i løpet av prosjektet
- bruke statistiske analyse for å finne koblingene mellom prosessbetingelser samt resultater fra kjemisk og sensorisk analyse

Å utvikle en prosess hvor smak og lukt reduseres til et akseptabelt nivå for humant konsum ved å:

- Undersøke enzymatisk proteinhydrolyse samt prosessering av limvann for å få best mulig smak, kvalitet og proteinfraksjonsutbytte
- Bruke membranfiltrering for å fjerne smaks- og luktkomponenter fra limvann samt proteinfraksjon etter enzymatisk proteinhydrolyse

Å avklare beste metode for tilsetning av komponenter som skjuler smak og lukt og teste resultatene fra bruken av disse v.h.a. anerkjente metoder ved å:

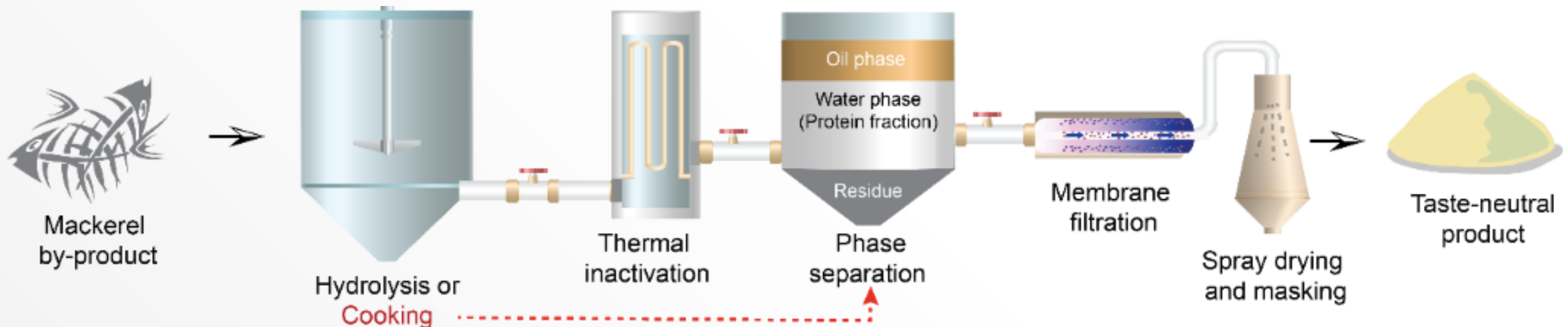
- Bruke kjente komponenter før og under spraytørking for å skjule uønsket lukt og smak
- Bruke analytiske og sensoriske metoder for å karakterisere resultatet

Å fremstille et prøveparti på 20 kg til smaks- og markedstest

# AP1. Optimalisert labskala produksjon av smaksnøytralt limvann og hydrolysat

Mål for arbeidspakken

- Enzymatisk proteinhydrolyse samt prosessering av limvann for å få best mulig smak, kvalitet og proteinfraksjonsutbytte
- Bruke membranfiltrering for å fjerne smaks- og luktkomponenter fra limvann samt proteinfraksjonen etter enzymatisk proteinhydrolyse



## Task 1.1. Hydrolyse av makrellrygg

- Rund fryst makrell ble filetert for å fremskaffe rygger
- Råstoffet ble hakket før hydrolyse
- Hydrolyse: En time med 0,5% protease (w/w), unntatt Alcalase & Flavourzyme der 0,25% (w/w) av begge proteasene ble brukt. Temperatur for hvert protease på neste lysbilde



Analyse råstoff	% av tørrstoff
Protein	18,6
Vann	59,4
Aske	1,8
Fett	18,6
Karbohydrater	1,9

# Proteaser som ble brukt

Den temperatur som er oppgitt er også optimal temperatur for proteasene

Protease	Leverandør	Temperatur (°C)
Corolase 8000	AB Enzymes, Tyskland	60
Bromelain	Enzybel, Indonesia	55
Alcalase	Novozymes A/S, Danmark	55
Foodpro PNL	Danisco/du Pont, Danmark	60
Endocut 01	Tailorzyme A/S, Danmark	50
Flavourzyme	Novozymes A/S, Danmark	55
Flavourpro 766	Biocatalysts Ltd, UK	50
Foodpro 51 FP	Danisco/du Pont, Danmark	52
Flavourpro 839	Biocatalysts Ltd, UK	50
Promod 950L	Biocatalysts Ltd, UK	55
Alcalase og Flavourzyme (miks)	Novozymes A/S, Danmark	55

## Tørrvekt- og proteinutbytte resultat, samt pris på proteasene

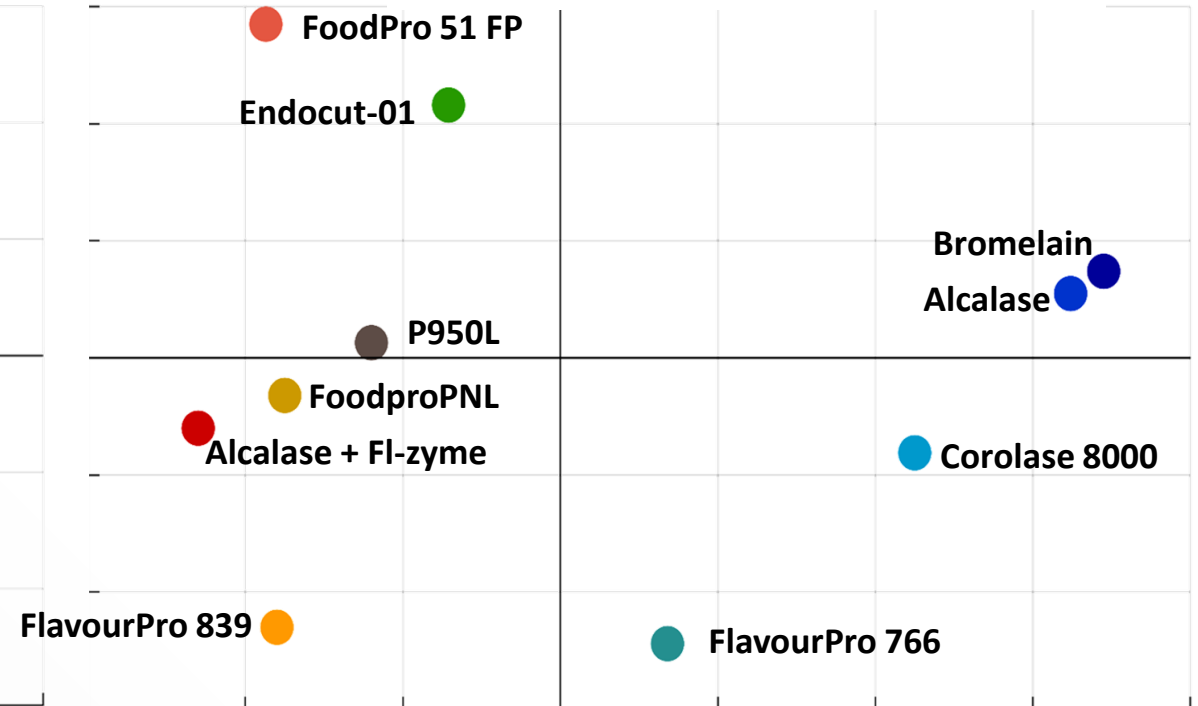
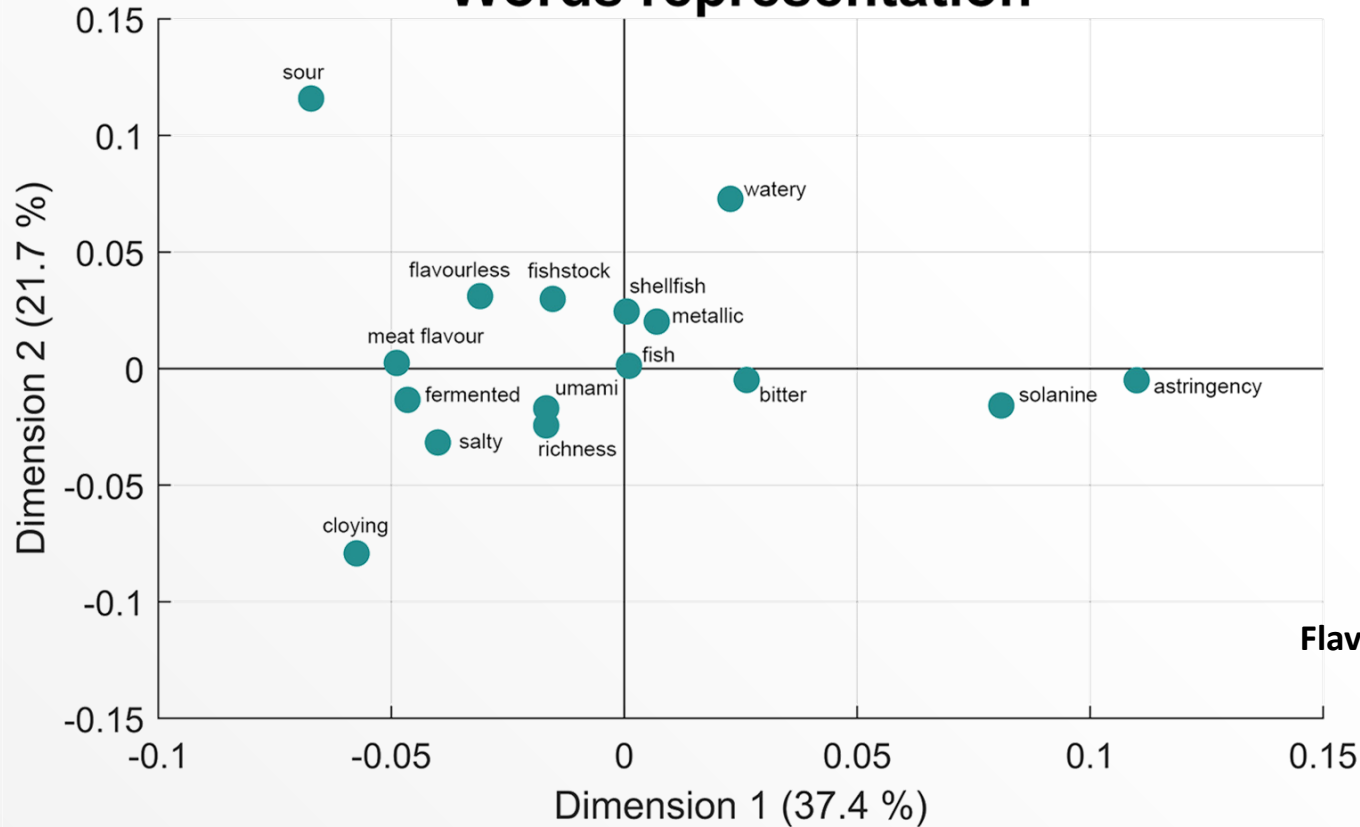
Protease	Tørrvekt utbytte (%)	Proteinutbytte (%)	Pris og dato for når pristilbud ble sendt
Bromelain	27	52	55,25 \$/kg (mars 2016)
Alcalase	24	44	397,8 kr/kg (juni 2019)
Flavourpro 839	21	37	125,2 £/kg (aug 2019)
Corolase 8000	20	37	28,5 €/kg (mai 2018)
Flavourpro 766	19	33	62,2 £/kg (aug 2019)
Promod 950L	18	32	11,04 £/kg (aug 2019)
Endocut 01	17	30	24 €/kg (aug 2019)
Foodpro 51 FP	16	29	1106,00 DKK/kg (juli 2019)
Foodpro PNL	15	27	152,5 DKK/kg (juli 2019)
Alcalase og Flavourzyme	15	26	1069 kr/kg (fl.z) (juni 2019)



# Projective mapping (Napping®) resultat fra de 10 proteasene

Resultater fra smaking utført av sensorisk panel v/Nofima

## Words representation



# Seleksjon av de best egnede proteasene

Da smak er i fokus i SMELL ble de proteaser som ga mest nøytral smak selektert

Basert på Napping resultater og pris ble følgende proteaser selektert for videre arbeid:

- Foodpro PNL
- Endocut 01

## Task 1.2 - membranfiltrering for å redusere mengden lavmolekylære forbindelser

Hydrolysat ble fremstilt med to forskjellige konsentrasjoner (0,1 og 0,5%) under samme forhold som ble brukt i forrige trinn

Hydrolysatene ble deretter filtrert med 1kDa membranfilter, hvilket ga tre fraksjoner; crude (kun filtrert med papirfilter) og permeat samt retentat etter filtrering med 1 kDa cut-off

# Protein- og askeinnhold i crude hydrolysat og fraksjoner

Proteininnhold i de ulike hydrolysatfraksjonene (av totalt tørrstoff)

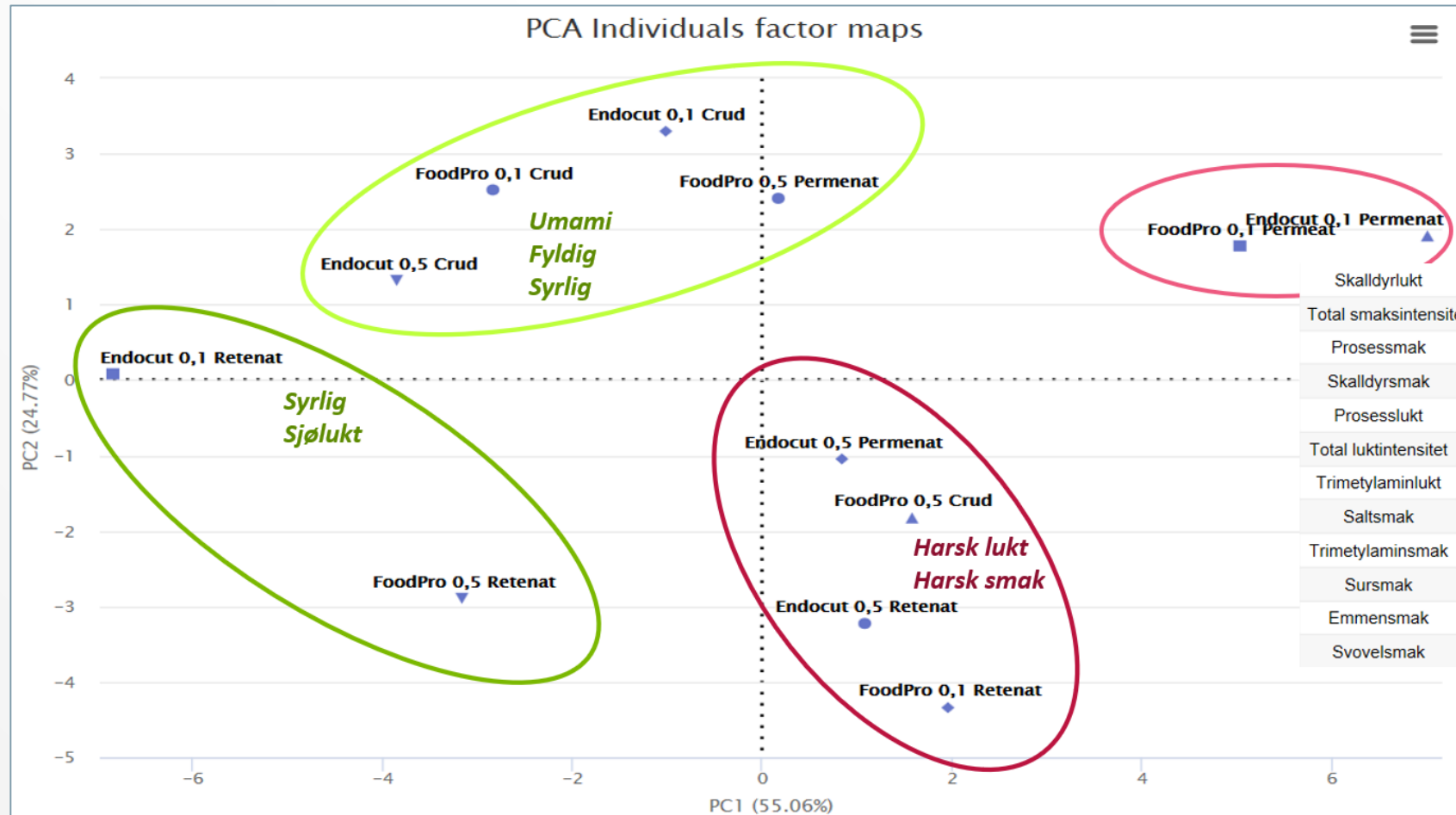
	Crude	Retentat	Permeat
Foodpro PNL 0,1 %	81 %	88 %	65 %
Foodpro PNL 0,5 %	82 %	92 %	65 %
Endocut 01 0,1 %	74 %	91 %	59 %
Endocut 01 0,5 %	84 %	86 %	79 %

Askeinnhold i de ulike hydrolysatfraksjonene (av totalt tørrstoff)

	Crude	Retentat	Permeat
Foodpro PNL 0,1 %	18 %	8 %	33 %
Foodpro PNL 0,5 %	14 %	8 %	24 %
Endocut 01 0,1 %	20 %	9 %	34 %
Endocut 01 0,5 %	18 %	10 %	20 %

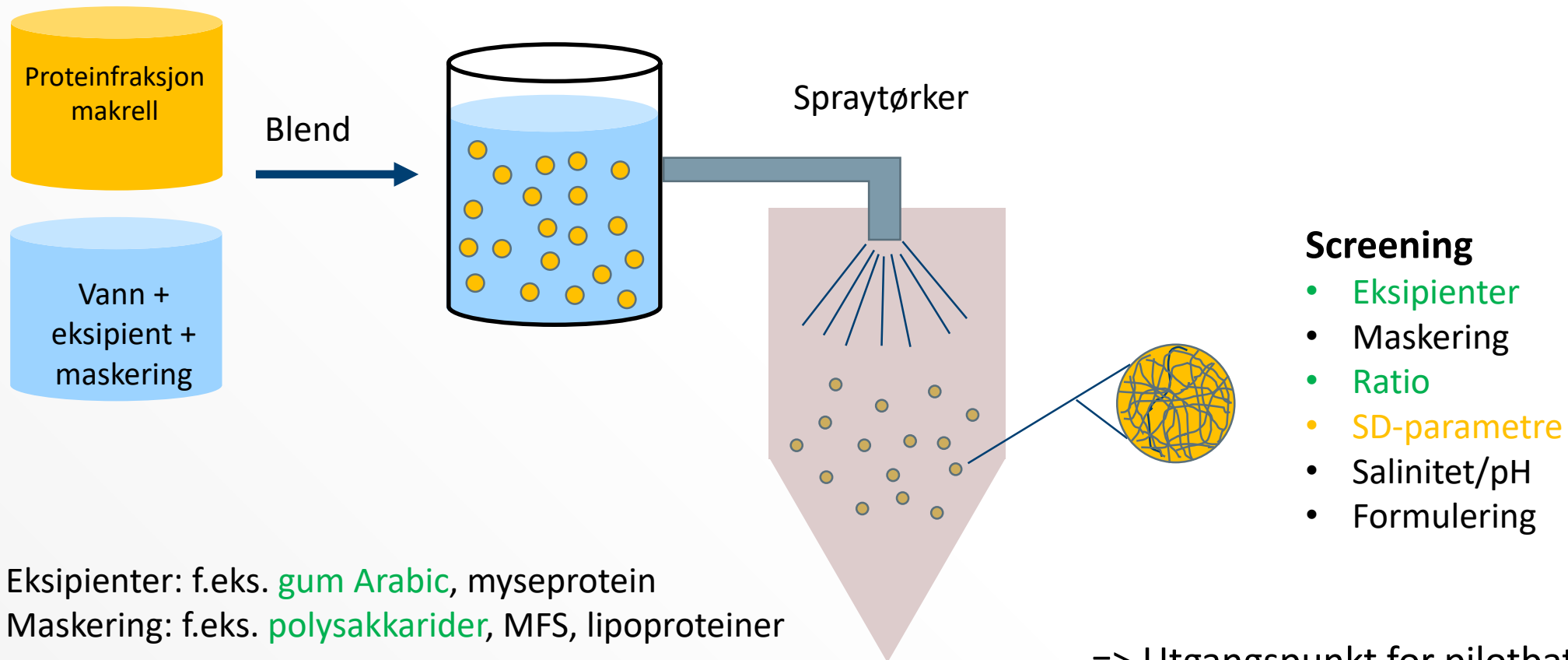
# Resultater fra kvantitativ beskrivende analyse (QDA) av crude hydrolysat og fraksjoner

Resultater fra smaking av sensorisk panel v/Nofima



0,1% Foodpro PNL ble valgt til videre arbeid i AP2 – pilot skala forsøk

## Task 1.3 – Maskering av smakskomponenter



Eksipienter: f.eks. gum Arabic, myseprotein

Maskering: f.eks. polysakkarider, MFS, lipoproteiner

=> Utgangspunkt for pilotbatch

# Resultater fra smaksmaskeringen

To hydrolysat ble brukt: Alcalase 0.5% og Bromelain 0.5% (begge filtrert før spraytørrking)

	Prøvebeskrivelser	SD utbytte (%)	Vannmengde (%)	Resultat
1	Alcalase	90	4.0	Tørrpulver
2	Bromelain	5	NA	Granulat
3	1:1 Alcalase:maltodextrin	90	4.0	Tørrpulver
4	1:1 Alcalase:Gum arabic	88	4.2	Tørrpulver
5	1:1 Bromelain:maltodextrin	42	4.0	Tørrpulver
6	1:1 Bromelain:Gum arabic	45	4.0	Tørrpulver

Alcalase er enklere å filtrere enn Bromelain

Tørrstoffinnholdet etter filtrering er ca. 1.25% (Alcalase) og 4.25% (Bromelain)

# Resultater fra smaksmaskeringen



Bromelain  
Utbytte: 5%  
Granulær form



Bromelain + 4% Gum arabic  
Utbytte: 44%  
Fint pulver



Bromelain/Gum arabic (venstre)  
Bromelain/Maltodextrin (høyre)



Alcalase/Gum arabic (venstre)  
Alcalase/Maltodextrin (høyre)

- Alcalase hydrolysat spraytørkers godt alene (90% utbytte)
- Bromelain hydrolysat er vanskelig å spraytørke alene (5% utbytte)
- Begge kan blandes/mikses godt med sakkarid som type maskering og plante-baserte geling agenter



## Hovedfunn i SMELL, AP1

- Valg av protease påvirker bitterismaken til proteinfraksjonene fra hydrolyse og det er mulig å få produsert hydrolysat med lav bitterhet fra makrellrygg.
- Membranfiltrering har vist potensiale for å redusere uønskede sensoriske smaksattributter.
- Metodevalg for å blande smaksmaskerende forbindelser med hydrolysater er vellykket, men valg av protease kan påvirke utbyttegraden.

# Leveranser AP1

WEFTA 2020: Vang, B., Gaarder, M.Ø., Wubshet, S.G., Solstad, R.G., Dankel, K., Aspevik, T., Kousoulaki, K., Steinsholm, S., Lindberg, D. **2019**. Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL)



Birthe Vang, Mari Ø. Gaarder, Sileshi G. Wubshet, Runar G. Solstad, Katinka R. Dankel, Tone Aspevik, Katerina Kousoulaki, Silje Steinsholm and Diana Lindberg  
Corresponding author: birthe.vang@nofima.no

The project "Taste-neutral proteins from mackerel (SMELL)" focuses on increasing the utilization of pelagic fish species for human consumption, with special emphasis on mackerel filleting residual material. One can expect sensory challenges in the protein/peptide rich products after processing of mackerel, due to the presence of oxidized unsaturated fats and endogenous pro-

teases, speeding up the formation of odorous secondary metabolites and trimethylamine. The core of SMELL is production of a peptide fraction with acceptable sensory quality. The sensory and chemical analysis will guide processing parameters to achieve the best possible product.

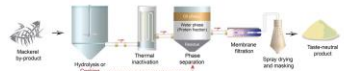


Illustration modified from Wubshet et al., 2018 (Wubshet, S.G. et al. Food Bioprocess Technol (2018) 11:2032)

## Materials and methods

Optimization of enzymatic hydrolysis of mackerel backbones with ten different enzymes was performed. All enzymatic hydrolyses were performed for 1 hour on 500 grams of raw material added water and 0.5 % enzym v/w. Optimal temperature was adjusted to suit the individual enzymes. A projective technique named projective mapping\* (Risvik et al., 1994) was used to evaluate the 10

different hydrolysates on two sensory modalities, flavour and mouthfeel. The whole sample set was cooled and presented at a time to a trained sensory panel. The assessors tasted and evaluated each sample on similarities and differences within the two sensory modalities. The data were analyzed using MFA to obtain a two-dimensional plot. SEC was performed using 20 mg/mL solutions of rehydrated hydrolysate samples. The injection vol-

ume was 10 µL and separation was performed at 25°C using a BioSep-SEC+2000 column. Isocratic elution was carried out using a flow rate of 0.9 mL/min for 20 minutes using 30% CH<sub>3</sub>CN + 0.05 % TFA as a mobile phase. Average molecular weight (Mw) was calculated using molecular weight calibration standards.

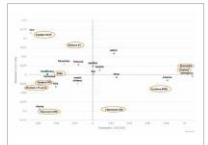


Figure 2. The results showed that the 10 hydrolysates, as expected, differed in both flavour and mouthfeel. Sensory attributes such as bitter, astringent, and mouthfeel were described as astringent, bitter and with astringent taste. They were also the most bitter samples. On the other end of the dimension, L-amino acid oxidase (LAAO) and Pepsin hydrolysates and Pepsin were located. They were described by the sensory attributes salty, bitter and meat flavour. While the most neutral samples were Aspartic DCP and Ficus F10 described as sour and bitter.

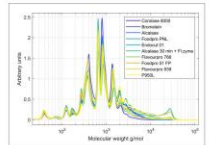
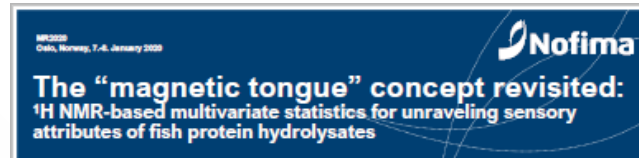


Figure 2. Treatments with different proteases resulted in different molecular weight distributions. The average molecular weight of the 10 different hydrolysates were found to be in the range of 848 g/mol (Bromelain) to 2706 g/mol (Aspartic DCP) (Risvik et al., 2019).

**Concluding remarks**  
 • Further investigation is underway to identify the constituents eliciting the distinct sensory attributes (e.g., bitterness) of mackerel backbone hydrolysates.  
 • Hydrolysates that were associated with astringency and bitterness generally showed a higher share of lower molecular weight peptides

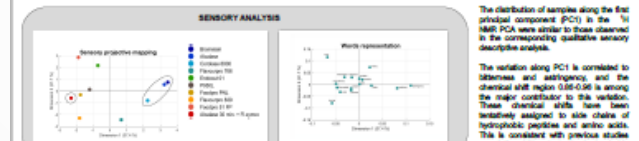
MR2020: Dankel, K., Gaarder, M.Ø., Lindberg, D., Vang, B., Solstad, R.G., Aspevik, T., Wubshet, S.W. **2020**. The "magnetic tongue" concept revisited: <sup>1</sup>H NMR-based multivariate statistics for unraveling sensory attributes of fish protein hydrolysates



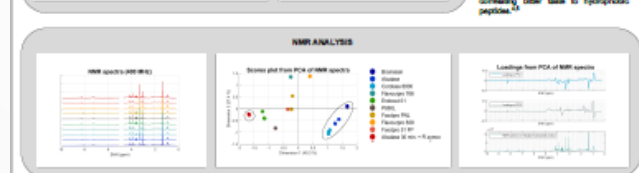
Birthe Vang DANDEL, Mari Ørum GAARDER, Diana LINDBERG, Birthe VANG, Runar Øystein SOLSTAD, Tone ASPEVIK, Sileshi G. WUBSHET  
Nofima, Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research, Chobinsen 1, NO-1420 Ås, Norway. E-mail: birthe.vang@nofima.no

**Introduction**  
 • Enzymatic protein hydrolysis is a well-recognized biotechnology with a wide industrial application for recovery of peptides and proteins from food by-products.  
 • Among the major challenges preventing the utilization of fish protein hydrolysates in food formulation is unwanted sensory attributes, such as bitterness.  
 • A series of mackerel by-product hydrolysates produced using different enzymes have been analyzed using <sup>1</sup>H NMR, and the spectra have been explored using multivariate statistics.  
 • The protein hydrolysates have been evaluated by a sensory panel, to provide qualitative sensory descriptive analysis.

**Materials and methods**  
**HYDROLYSIS:** Mackerel backbones were rinsed with water (1:1) and treated to the optimal temperature for the individual enzymes before 0.5 % w/w enzyme was added. The hydrolysis processes were run for 1 h after enzyme inactivation at T + 50 °C for 10 min, the water phase was collected, filtered and spray-dried to produce light yellow powders.  
**SENSORY:** 1 % solutions (pep) of hydrolysates were presented to a highly trained sensory panel to be evaluated for sensory attributes (flavour and mouthfeel). The samples were categorized according to similarities and differences, and descriptive words were associated with different groups of samples. The results from this Projective Mapping\* (Risvik) were analyzed using MFA to obtain a two-dimensional plot.  
**NMR SPECTRA ANALYSIS:** NMR samples of hydrolysates were prepared in D<sub>2</sub>O and <sup>1</sup>H NMR spectra were acquired in three technical replicates using a Bruker Avance 400 MHz instrument. The spectra were preprocessed by removing the residual water peak, peak shift alignment, spectral binning (0.05 ppm) and normalization to unit integral. A Principal Component Analysis (PCA) of the NMR spectra was performed. The scores on the first two principal components were used to do an unsupervised mapping of the sample.



The distribution of samples along the first principal component (PC1) in the <sup>1</sup>H NMR PCA were similar to those observed in the corresponding qualitative sensory descriptive analysis. The variation along PC1 is correlated to bitterness and astringency, and the chemical shift region 0.85-0.96 is among the major contributor to the variation. These chemical shifts have been tentatively assigned to side chains of hydrophobic peptides and amino acids. This is consistent with previous studies correlating bitter taste to hydrophobic peptides.



**Conclusion**  
 The current study is an initial step towards understanding and identifying chemical constituents eliciting unwanted sensory attributes in mackerel hydrolysates. The combination of the sensory projective mapping and a PCA score plot of the corresponding NMR spectra shows that there is a potential for developing taste-accepting combinations of mackerel protein hydrolysates. Such chemical interpretation of sensory attributes can serve as a vital step towards the development of taste-neutral hydrolysates suitable for human consumption.

Dankel, K. et al. (2020) Multivariate statistics for unraveling sensory attributes in mackerel hydrolysates. Food Quality and Preference, 82(2020) 104382. doi:10.1016/j.foodqual.2020.104382  
 Wubshet, S.G. et al. (2018) Hydrolysis of mackerel backbones with ten different enzymes. Food Quality and Preference, 68(2018) 104-112. doi:10.1016/j.foodqual.2018.05.005  
 Vang, B. et al. (2020) Qualitative Bioprocess Technology in the Food Industry. Journal of Food Processing and Preservation, 44(2020) 15122. doi:10.1111/jfpp.15122  
 Financial support from the Norwegian Research Council (FRP) through project no. 301188 is gratefully acknowledged.

## Populærvitenskapelig:

Avskjær fra makrell skal bli proteinpulver uten lukt og smak. Fiskeribladet.no. 27. juni 2019. <https://fiskeribladet.no/tefkisk/nyheter/?artikkel=67710>

Smaksprosjekt med smell – for makrell. Nofima.no 27 juni 2019. <https://nofima.no/nyhet/2019/06/smaksprosjekt-med-smell-for-makrell/>

Skal lage lukt- og smakfritt proteinpulver av makrell-rester. Forskning.no 27 juni 2019. <https://forskning.no/nofima/skal-lage-lukt--og-smakfritt-proteinpulver-av-makrell-rester/1351716>

