



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2016 30 stp  
Institutt for kjemi, biokjemi og matvitenskap

## ***Ex vivo* fordøyelse av melk, nativ myse, WPC80 og en ukjent proteiningrediens. Effekt av varmebehandling på viskositet, proteindegradering og frigjøring av FAA.**

*Ex vivo* digestion of milk, native whey, WPC80 and an unknown protein ingredient. Effect of heat treatment on viscosity, protein degradation and release of FAA.

Kjersti Wanggaard Nilsen

Matvitenskap, retning produksjon og utvikling av næringsmidler.



## Forord

Denne studien ble utført ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for miljø- og biovitenskap. Oppgaven utgjør 30 studiepoeng og er det avsluttende arbeidet i min mastergrad i Matvitenskap, retning «produksjon og utvikling av næringsmidler». Arbeidet ble utført i perioden februar til juni 2016, og alt praktisk arbeid er utført ved NMBU. Takk til Tine SA for godt samarbeid og økonomisk støtte til gjennomføring av oppgaven.

Først og fremst vil jeg gi en stor takk til hovedveileder professor Gerd Vegarud og medveileder Anne-Grethe Johansen. Takk for gode diskusjoner og konstruktive tilbakemeldinger, oppgaven hadde ikke blitt den samme uten dere. Jeg setter pris på deres engasjement og all hjelpen jeg har fått underveis. Tusen hjertelig takk til doktorgradsstipendiat Gyrd Omholt Gjevstad, for muligheten til å delta i dette prosjektet. Uten ditt engasjement og din forskning, ville ikke denne oppgaven blitt til. Jeg vil deretter rette en stor takk til laboratorieingeniør Irene Comi og Kari Olsen for analyser av enzymer, frie aminosyrer og god veiledning underveis. Takk til Guro Dørum og Trygve Almhøy for hjelp når jeg hadde gått meg bort i statistikkens verden, dere fikk meg på rett spor. Tusen hjertelig takk til øvrig laboratoriepersonale og medstudenter for gode samtaler, råd, felles lunsj og en kaffekopp i to-draget, dere har alle vært fantastiske og har bidratt til at dette semesteret har blitt et riktig fint semester. I tillegg vil jeg takke «mentor- Guro» som på daglig basis har holdt ut med meg som har hengt en måned etter alle andre. Du har svart på alt, uansett om det gjelder statistikk, fag eller om jeg faktisk bør forlate lesesalen til fordel for en bedre middag med deg. Takk, du har gjort mastertåka vanvittig mye lettere. Tusen takk til familie og venner, for daglig støtte, korrekturlesing og motivasjon underveis dette semesteret.

Ved å sitere den kjente fysikeren Edvard Teller; «Dagens forskning er morgendagens teknologi», håper jeg med dette at mine resultater kan bidra til å føre forskningen et lite steg videre.

God fornøyelse.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.

Ås, 29. juni 2015

---

Kjersti Wanggaard Nilsen.

## Sammendrag

Melk og produkter av melk har i en årrekke vært kjent som et viktig næringsmiddel, som følge av deres sammensetning av essensielle aminosyrer og bioaktive peptider. De siste årene har fokuset på myse forandret seg. For å dekke etterspørselen etter ulike myseingredienser utvikles nå ny teknologi for å utnytte råvaren best mulig, og for å dra nytte av forskjeller i funksjonelle egenskaper. Målet for denne oppgaven var å sammenligne om forskjellig varmebehandling hadde innvirkning på viskositet, proteinnedbrytning og dannelse av essensielle frie aminosyrer før og etter fordøyelse i ulike produkter. *Ex vivo* fordøyelse med humane mage- og tarmenzymer ble gjennomført på melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X, etter to ulike varmebehandlinger; pasteurisering og UHT- behandling i tillegg til ubehandlet produkt.

Varmebehandling av viste signifikant økning i viskositet etter pasteurisering og UHT behandling i melk, nativ myse og WPC80 sammenlignet med ubehandlet produkt. Det ble sett en signifikant reduksjon i ukjent X som følge av varmebehandling. Det ble observert en signifikant forskjell i produkt på viskositet, hvor nativ myse var signifikant forskjellig fra melk og ukjent X, men ikke WPC80. Det ble sett signifikant forskjell mellom WPC80, melk og ukjent X. *Ex vivo* fordøyelse av melk, nativ myse, WPC80 og et ukjent X førte til forskjell i proteindegradering og frigjøring av BCAA som følge av varmebehandling. Degradering av kaseiner og BSA var fullstendig etter 60 min. fordøyelse i magesekk. Det ble sett fullstendig degradering av  $\beta$ -Lg D120 i samtlige produkter med unntak av pasteurisert melk og UHT-behandlet nativ myse. Degradering av  $\alpha$ -La varierte som følge av varmebehandling da UHT- behandling av melk, nativ myse, WPC80 og i mindre grad ukjent X viste aggregering av  $\alpha$ -La i D120. Samme trend ble ikke sett etter pasteurisering, hvor  $\alpha$ -La var fullstendig degradert i D120 i samtlige produkter med unntak av pasteurisert melk. Pasteurisering viste høyest grad av frigjøring av Leu, Ile og Val, sammenlignet med ubehandlet og UHT-behandlet produkt. Det ble sett forskjeller i frigjøring av BCAA som følge av produkt. Nativ myse hadde større frigjøring av Leu og Ile sammenlignet med WPC80, ukjent X og melk i pasteurisert og UHT- behandlet produkt. Nativ myse hadde større frigjøring av Val enn WPC80 og melk i pasteurisert og UHT-behandlet produkt.

## Abstract

Milk and products of milk are widely known as an important nutrient, because of their composition of essential amino acids and bioactive peptides. In recent years, the focus on whey have changed. To meet the demand for various whey ingredients, new technology is continuously developed to exploit the full potential of the raw material, and to take advantage of differences in functional properties. The aim of this study was to compare the effect of different heat treatment on viscosity, protein degradation and release of essential free amino acids before and after digestion in various products. *Ex vivo* digestion with human gastrointestinal enzymes was conducted on milk, native whey, WPC80 and an unknown protein ingredient. Two different heat treatments was tested; pasteurization and UHT- treatment in addition to the untreated product.

Heat treatment showed a significant increase in viscosity after pasteurization and UHT treatment of milk, native whey and WPC80 compared with untreated products. A significant reduction in unknown X was seen as a result of heat treatment. A significant difference in viscosity was observed. Native whey was significantly different from milk and unknown X, but not WPC80. The results showed a significant difference between WPC80, milk and unknown X. *Ex vivo* digestion of milk, native whey, WPC80 and an unknown X led to the difference in protein degradation and release of BCAA was seen because of heat treatment. Degradation of casein and BSA was complete after 60 min. digestion in the stomach. Complete degradation of  $\beta$ -Lg was observed in D120 in all products, except for pasteurized milk and UHT-treated native whey. Degradation of  $\alpha$ -La varied because of heat treatment. In UHT- treated milk, native whey WPC80 and to a lesser extent unknown X showed aggregation of  $\alpha$ -La in D120. The same trend was not seen after pasteurization, in which  $\alpha$ -La was completely degraded in D120 in all products except pasteurized milk. Pasteurization showed the highest degree of release of Leu, Ile and Val, as compared with untreated and UHT-treated products. It was observed differences in the release of BCAA was seen as a result of different products. Native whey had higher release of Leu and Ile, compared with WPC80, unknown X and milk in both pasteurized and UHT-processed products. Native whey had greater release of Val than WPC80 and milk in pasteurized and UHT-treated products.

Forord.....	I
Sammendrag .....	II
Abstract .....	III
Forkortelser .....	VIII
1 Innledning.....	1
1.1 Hensikt .....	1
2 Teori.....	3
2.1 Melk .....	3
2.2 Melkens proteiner .....	4
2.2.1 Kaseiner .....	4
2.2.2 Myseproteiner .....	5
2.2.3 $\beta$ -Laktoglobulin ( $\beta$ -Lg) .....	6
2.2.4 $\alpha$ -Laktalbumin.....	7
2.2.5 Frie aminosyrer .....	7
2.3 Filtrering av melk.....	8
2.3.1 Mikrofiltrering .....	9
2.3.2 Ultrafiltrering .....	10
2.3.3 Diafiltrering.....	10
2.3.4 Produkter av myse, myseproteinkonsentrat (WPC80) og nativ myse (NWP).....	11
2.4 Reologi.....	11
2.4.1 Generelt.....	11
2.4.2 Klassifisering av flytende væsker. ....	13
2.4.3 Måling av viskositet.....	14
2.5 Statistiske analyser.....	14
2.5.1 Variansanalyse .....	14

2.5.2	Boksplokk	15
2.5.3	Tukeys metode	15
2.6	Human fordøyelse	16
2.6.1	Inndeling av fordøyelsessystemet	17
2.6.2	Munn, svelg og spiserør	17
2.6.3	Magesekk (ventrikkel)	17
2.6.4	Tynntarm (duodenum, jejunum og ileum)	18
2.6.5	Fordøyelse av proteiner	18
2.6.6	Tykkertarm (Colon)	19
2.7	<i>Ex vivo</i> fordøyelse	19
3	Metode	23
3.1	Råstoff	23
3.1.1	Behandling av råstoff	23
3.2	Fordøyelse av melk, WPC80, nativ myse og ukjent X	24
3.2.1	Humane mage og tarmsafter	24
3.3	Proteinseparering og degradering	26
3.3.1	Proteinseparering ved natriumdodecyl sulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS- PAGE)	27
3.3.2	Tillaging av prøveløsninger til SDS-PAGE	27
3.3.3	Tillaging av SDS polyakrylamidgel og elektroforese	27
3.3.4	Identifisering av proteinbånd i SDS PAGE	28
3.4	Analyse av frie aminosyrer ved RP-HPLC	29
3.5	Viskositetsmåling av produkt ved bruk av reometer	30
3.6	Statistiske analyser	30
4	Resultater	33
4.1	Viskositetsmåling av melk, nativ myse WPC80 og et ukjent proteinpreparat	33

4.1.1	Variasjon i data .....	34
4.1.2	Statistiske analyser og interaksjonseffekter. ....	35
4.2	Proteindegradering av melk, nativ myse, WPC80 og en ukjent proteiningrediens med mage og tarmsaft. ....	38
4.3	Frigjøring av frie aminosyrer før og etter <i>ex vivo</i> fordøyelse (HPLC) .....	41
4.3.1	Frigjøring av forgrenede aminosyrer (BCAA) før og etter <i>ex vivo</i> fordøyelse.....	42
4.3.2	Frigjøring av andre essensielle aminosyrer etter <i>ex vivo</i> fordøyelse .....	44
5	Diskusjon.....	49
5.1	Effekt av varmebehandling .....	49
5.1.1	Effekt av varmebehandling på viskositet i nullprøver. ....	49
5.1.2	Effekt av varmebehandling på proteindegradering ved fordøyelse med HGJ og HDJ. 51	
5.1.3	Effekt av varmebehandling på frigjøring av essensielle frie aminosyrer etter fordøyelse med HGJ og HDJ.....	54
5.2	Effekt av variasjon i råmateriale .....	56
5.2.1	Effekt av variasjon av råmateriale på viskositetsendring i nullprøver.....	56
5.2.2	Effekt av produkt på proteindegradering. ....	57
5.2.3	Effekt av produkt på frigjøring av essensielle aminosyrer .....	59
6	Konklusjon.....	60
7	Til ettertanke og videre forsøk.....	61
7.1	Svakheter ved forsøksoppsett. ....	61
7.2	Videre forskning .....	61
	Vedlegg.....	A
	Vedlegg 1. Oppskrifter på elektrolyttløsninger.....	B
	Vedlegg 3. Gjennomsnitt gjentak på målinger av viskositet.....	C
	Vedlegg 2. Resultater fra HPLC .....	D





## Forkortelser

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
BCAA	Forgrenede aminosyrer
BSA	Bovint serumalbumin
$\text{Ca}^{2+}$	Kalsium
$\text{CaCl}_2$	Kalsiumklorid
EAA	Essensielle aminosyrer
FAA	Frie aminosyrer
$\gamma$	Gamma
HCl	Hydrogenklorid
HPLC	Høytrykk væske kromatografi (fra engelsk; high-pressure liquid chromatography)
HTST	Høy temperatur, kort tid pasteurisering (fra engelsk; high temperature short time)
$\kappa$	Kappa
MF	Mikrofiltrering
mL	Milliliter
NaOH	Natriumhydroksid
SDS-PAGE	Natrium dodecylsulfat- polyakrylamid gel elektroforese
TCA	Triklorreddiksyre (fra engelsk; trichloroacetic acid)
UF	Ultrafiltrering
WPC	Myseproteinkonsentrat (fra engelsk; whey protein concentrate)

# 1 Innledning

Melk og produkter av melk har lenge vært benyttet som næringsmiddel for en stor del av befolkningen. Myseproteiner fra osteproduksjon ble lenge sett på som biprodukt og enten benyttet til dyrefôr eller produksjon av brunost. I senere tid har synet på myseproteinene snudd på bakgrunn av deres funksjonelle egenskaper så vel som sin ernæringsmessige gode sammensetning. Det har blitt satt fokus på utnytting av råvaren og å benytte dets fulle potensial. For å produsere fremtidens mat, med helsepåstander med vitenskapelig grunnlag, er det viktig å utvikle en underliggende kunnskap og forståelse om hvordan maten påvirkes, endres og absorberes under human fordøyelse (Norton et al. 2006). For å sikre suksessfull utvikling og forbrukeraksept er vitenskapelig basert forskning nødvendig for å underbygge helsepåstander (Gray et al. 2003). I dag benyttes myseproteinkonsentrater i dag i en rekke ulike produkter, ofte som tørkede preparater. Prosessen som benyttes for å fremstille disse preparatene påvirker produktene i forskjellig grad. Ostemysen går gjennom en syrning ved tilsetning av løpe under osteproduksjon, så vel som varmebehandling av melken og myseproteinet i form av pasteurisering, ved oppkonsentrering eller ved spraytørking. Alle disse prosessene påvirker både funksjonelle egenskaper og næringsinnholdet i produktet. De siste årene har det vært fokus på å filtrere mysen direkte ut fra skummetmelk, for å skape et produkt uten rester av løpe og som i prinsippet ikke trenger å ha vært gjennom unødvendig varmebehandling. Dette for å se på om de ernæringsmessige og funksjonelle egenskapene ble endret som følge av prosessen. Jomfrumyse eller nativ myse som den vil bli omtalt som er en spennende ingrediens som har nøytral pH og inneholder udenaturerte proteiner, er fri for rester fra osteproduksjon. Ved å benytte membranstørrelse på  $\leq 0,2 \mu\text{m}$ , kan produktet benyttes uten videre varmebehandling, da produktet omtales som sterilt. Dette er et veldig spennende produkt som jeg ønsket å finne ut mer om i samarbeid med parallellgående prosjekter.

## 1.1 Hensikt

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke i hvilken grad proteiner fra fire ulike produkter degraderes og frie aminosyrer frigjøres i human fordøyelse. Produktene jeg har undersøkt er melk, nativ myse, WPC80 og et industrielt framstilt protein. Undersøkelsen er gjort ved bruk av en *ex vivo*-fordøyelsesmodell med humane enzymer. Det skulle avdekkes i hvilken grad

temperaturbehandling ved 63 °C i 30 minutter og 90 °C i 120 minutter hadde innvirkning på viskositeten til produktene og om dette hadde innvirkning på fordøyelsen og dermed frigjøringen av frie aminosyrer. I tillegg ville jeg undersøke om det er forskjell mellom produktene i funksjonelle og ernæringsmessige egenskaper.

Nullhypotese  $H_0$ : Det er ingen forskjell i viskositet eller frigjøring av frie aminosyrer mellom produktene som følge av temperaturbehandling og/ eller de ulike fordøyelsesstegene.

Alternativ hypotese  $H_1$ : Det er en reell forskjell i viskositet og/eller frigjøring av aminosyrer som følge av temperaturbehandling og/eller de ulike fordøyelsesstegene.

## 2 Teori

### 2.1 Melk

Melk og melkens bestanddeler benyttes i dag som ingredienser under produksjon av ulike næringsmidler. Melk har en rekke viktige fysiologiske funksjoner hos mennesket, deriblant at nyfødte skal dekke sitt næringsbehov til å fremme vekst og styrke immunforsvaret (Fox et al. 2015b). Det finnes mange ulike typer melk med ulik sammensetning, og i denne oppgaven ligger fokus på kumelk og ingredienser produsert av proteiner fra kumelk. Kumelk omtales heretter som «melk» med mindre annet er oppgitt. Melk består hovedsakelig av vann, laktose, fett, proteiner, salter og mineraler (Walstra et al. 2005c). Tabell 1 viser komposisjon av de ulike bestanddelene i melk. Melk er basisingrediens ved produksjon av en rekke meieriprodukter som for eksempel ost og syrnede produkter som yoghurt, fløte og rømme. De ulike komponentene utnyttes i forskjellig grad, og som et biprodukt av osteproduksjon benyttes myseproteiner til å produsere en rekke ulike proteinkonsentrater. Proteinkonsentratene kan tørkes og benyttes som ingrediens i en ulike produkter som følge av deres funksjonelle egenskaper (De Wit 1990; Morr & Ha 1993). De siste årene har etterspørselen etter proteinkonsentrater økt som følge av økt bruk i sportsernæring, barnemat og helsekost (Lagrange et al. 2015).

Tabell 1: Variasjon og gjennomsnitt av komponenter, hhv. vann, totalt tørrstoff, fett, proteiner, laktose, mineraler og energiinnhold i melk (Bylund & Systems 2015b; Fox et al. 2015b; Walstra et al. 2005b)

<b>Kumelk</b>	<b>Variasjon (%)</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>
<b>Vann</b>	85,5 – 89,5	87,5
<b>Totalt tørrstoff</b>	10,5 - 14,5	13,0
<b>Fett</b>	2,5 - 6,0	3,9
<b>Total protein</b>	2,9 -5,0	3,4
<b>Totalt kaseiner</b>		26 % av total protein
$\alpha$ -S1- kaseiner		10 % av total protein
$\alpha$ -S2- kaseiner		2,6 % av total protein
$\beta$ - kaseiner		9,3 % av total protein
$\kappa$ - kaseiner		3,3 % av total protein
<b>Totalt myseprotein</b>		6,3 % av total protein
$\alpha$ -Laktalbumin		1,2 % av total protein
$\beta$ - Laktoglobulin		3,2 % av total protein
Bovint Serumalbumin		0,4 % av total protein
<b>Laktose</b>	3,6 - 5,5	4,8
<b>Mineraler</b>	0,6 - 0,9	0,8
<b>Energiinnhold (kJ/kg)</b>		2,763

## 2.2 Melkens proteiner

Melk inneholder vanligvis mellom 2,9 -5,0 % protein, men konsentrasjonen varierer under laktasjonen, spesielt under de første dagene etter fødsel hvor den største forskjellen ligger i mysefraksjonen (Bylund & Systems 2015b; Fox et al. 2015a; Fox et al. 2015b). Melkeproteiner bidrar til å forsyne organismer med essensielle aminosyrer (EAA) for å kunne utvikle muskelvev og forsyne andre deler av kroppen med biologisk aktive proteiner, immunoglobuliner, vitamin- og metallbindende proteiner samt ulike hormoner (Fox et al. 2015a). Egenskapene til melkeproduktet avhenger av de fysiologiske og kjemiske egenskapene til de ulike melkeproteinene. Melkeproduktet avhenger av de fysiologiske og kjemiske egenskapene til de ulike melkeproteinene, og kjennetegnes med ulike funksjoner sånn som vannbinding, gel-, skum- og emulgeringsegenskaper (Swaisgood 1993).

Melk kan fraksjoneres i to ulike definerte grupper. Ved syring, pH 4,6, ved 30°C, vil 80% av proteinene felle ut, denne fraksjonen kalles ofte iso elektrisk (sure) kaseiner (Fox et al. 2015a). Proteiner som forblir løselig i serum omtales som serum- eller myseproteiner.

### 2.2.1 Kaseiner

I følge Walstra et al. (2005b) defineres kaseiner som de proteinene som felles ut fra melk ved pH 4,6. Om lag 80 % av proteinene i melken er en kombinasjon av fire ulike kaseiner:  $\alpha_{s1}$ -  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - og  $\kappa$ - kaseiner (Walstra et al. 2005c). De ulike kaseinene innehar ulike egenskaper som følge av variasjon i grad av fosforylering, disulfidbinding, hydrolyse av primere kaseiner ved plasminglykosylering og genetisk polymorfisme (Fox et al. 2015a).

I følge Fox et al. (2015a) er kaseiner svært varmestabile proteiner. Melk kan varmes opp til 100°C nøytral pH (6,7) i 24 timer uten å koagulere, mens kasein tåler å bli varmet opp til 140°C i 20 min. uten at den endrer struktur (Fox et al. 2015a). Walstra et al. (2005b) hevder derimot at oppvarming til 120°C vil føre til kjemiske forandringer som bidrar til lavere løselighet. Slik varmebehandling kan forårsake ulike forandringer i melka, blant annet produksjon av melkesyre fra laktose (Fox et al. 2015a). Dette resulterer i reduksjon i pH og forandringer i saltbalansen, noe som igjen påvirker utfellingen av kaseiner (Fox et al. 2015a). Reduksjonen i pH som følge av varmebehandling kan derfor bidra til utfelling av kasein i melk (Walstra et al. 2005b).

### 2.2.2 Myseproteiner

Synet på myseproteiner har forandret seg de siste årene. Tidligere ble myse sett på som et biprodukt fra osteproduksjon, som enten ble benyttet til fôr eller gjødsel (Fox et al. 2015b). I dag er det et høyt verdsett produkt som blant annet benyttes som ingrediens i morsmelkerstatning, konsistensforbedrer, i fôr og til produksjon av proteinkonsentrater til idrett- og kroppsbyggermiljøet (Lagrange et al. 2015).

Myse defineres som den gruppen proteiner som er løselig i melk (serum) etter utfelling av kasein ved iso elektrisk punkt, pH 4,6 ved 20 °C (Farrell Jr et al. 2004). Det finnes ulike typer myse, og de to vanligste er sur myse fra syrefelling av kasein og søt myse fra løpekoagulert melk ved ysting (Schmidt et al. 1984).

De siste årene har det derimot blitt utviklet filtreringsteknologi som muliggjør direkte filtrering av skummetmelk for å produsere «nativ myse» (Brans et al. 2004). Serumproteiner omtales ofte som myseprotein, men er ikke en presis sammenligning ifølge Walstra et al. (2005b), da løpekoagulert myse også inneholder glykomakropeptid (GMP) fra  $\kappa$ -kasein. Omtrent 20% av det totale proteininnholdet i kumelk består av myseproteiner (Fox et al. 2015a). Proteiner som  $\beta$ -Laktoglobulin ( $\beta$ -Lg) og  $\alpha$ -Laktalbumin ( $\alpha$ -La) er de viktigste serumproteinene i melk (Fox et al. 2015a), i tillegg til mindre proteiner og enzymer som bovint serum albumin (BSA), immunoglobuliner (Ig) og laktoferrin (LF). Alle serumproteiner, med unntak av protose peptonefraksjonen (PEP), er globulære proteiner (Walstra et al. 2005b).

Mysen fra syre- og løpeinduserte prosesser inneholder peptider fra kaseinderivater samt PEP som er produsert av plasmin fra  $\beta$ -kasein (Fox et al. 2015a). I følge Mather (2000) er søt myse et biprodukt fra løpeindusert koagulering av melk ved produksjon av ost, og dette er den vanligste kilden til myse. Söt myse inneholder mindre serumproteiner og proteiner fra membranen til melkefettglobuler i tillegg til de øvrige serumproteinene. Nye metoder innenfor filtreringsteknologi utvikles for å sikre optimal utnyttelse av bestanddelene i melk. Brans et al. (2004) beskriver fraksjonering av melk ved hjelp av mikrofiltrering (MF) for å produsere en kaseinrik fraksjon i tillegg til nativ myse for å produsere et myseproteinkonsentrat uten GMP. Innholdet av  $\beta$ -Lg og  $\alpha$ -La i myse og nativ myse er henholdsvis 50 % og 20 % (Madureira et al. 2007). Myseproteinene er varmelabile, og denatureres ved oppvarming til 90 °C i 10 min. (Fox et al. 2015b).

### 2.2.3 $\beta$ -Laktoglobulin ( $\beta$ -Lg)

$\beta$ -Lg er et av de viktigste proteinene i melk og står for omtrent 50 % av totalt myseprotein, eller 12 % av totalt proteininnhold i melk (Fox et al. 2015b). Iso elektrisk punkt for  $\beta$ -Lg er  $\sim$ pH 5,2, og fremkommer i melk som dimere med en molekylvekt på 36,6 kDa (Walstra et al. 2005b).

Sammensetningen av aminosyrer og deres molekylvekt til noen viktige proteiner i melk vises i Tabell 2.

Tabell 2. Aminosyresammensetning og molekylvekt i de viktigste proteinene i kumelk. Kaseinene  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ - $\kappa$ -, samt myseproteinene  $\beta$ -Lg og  $\alpha$ -La (Fox et al. 2015b)

Aminosyre	$\alpha_{s1}$ -CN B	$\alpha_{s2}$ -CN A	$\kappa$ -CN B	$\beta$ - CN A <sup>2</sup>	$\beta$ -Lg A	$\alpha$ -La- B
Asp	7	4	4	4	11	9
Asn	8	14	7	5	5	12
Thr	5	15	14	9	8	7
Ser	8	6	12	11	7	7
Ser P	8	11	1	5	0	0
Glu	24	25	12	18	16	8
Gln	15	15	14	21	9	5
Pro	17	10	20	35	8	2
Gly	9	2	2	5	3	6
Ala	9	8	15	5	14	3
½ Cys	0	2	2	0	5	8
Val	11	14	11	19	10	6
Met	5	4	2	6	4	1
Ile	11	11	13	10	10	8
Leu	17	13	8	22	22	13
Tyr	10	12	9	4	4	4
Phe	8	6	4	9	4	4
Trp	2	2	1	1	2	4
Lys	14	24	9	11	15	12
His	5	3	3	5	2	3
Arg	6	6	5	4	3	1
PyroGlu	0	0	1	0	0	0
<b>Totalt antall enheter</b>	199	207	169	209	162	123
<b>Molekylvekt (MW)</b>	23,612	25,228	19,05	23,980	18,362	14,174
<b>H<math>\phi</math></b>	4,89	4,64	5,12	5,58	5,03	4,68

Ved pH under 3,5 vil  $\beta$ -Lg dissosiere til monomere på størrelse  $\sim$ 18 kDa, mens mellom pH 5,5 og 7,5 vil all  $\beta$ -Lg i kumelk danne dimere med molekylvekt på 36 kDa (Fox et al. 2015a). Ved pH over 7,5 vil  $\beta$ -Lg gjennomgå en strukturendring og dissosierer til to monomere samtidig som en tiolgruppe eksponeres. Dette gir mulighet til å bidra med en sulhydriyl-disulfid-utveksling (Fox et al. 2015a). Ved pH mellom 3,5 og 5,2, spesielt ved isoelektrisk punkt, vil  $\beta$ -Lg fra kumelk danne oktamere med molekylmasse på 144 kDa (Fox et al. 2015a; Walstra et al. 2005b).



Walstra et al. (2005b) hevder at det er lite sannsynlig at  $\beta$ -Lg har noen teknologisk eller ernæringsmessig betydning.

#### **2.2.4 $\alpha$ -Laktalbumin**

$\alpha$ -La står for 20 % av proteinene i myse, og konsentrasjonen er  $1-1,5 \text{ g/L}^{-1}$ , eller ca. 3,4 % av totalt proteininnhold i melk (Fox et al. 2015a; Swaisgood 1995).  $\alpha$ -La er et lite, kompakt protein med en molekylmasse på  $\sim 14 \text{ kDa}$ , samt iso elektrisk punkt på  $\sim \text{pH } 4,8$  (Walstra et al. 2005b).  $\alpha$ -La er et globulært protein og består av ca. 123 aminosyreenheter som fordelingen 26 %  $\alpha$ -heliks, 14 %  $\beta$ -struktur og 60 % underordnet struktur (Fox et al. 2015a; Redington et al. 2016).

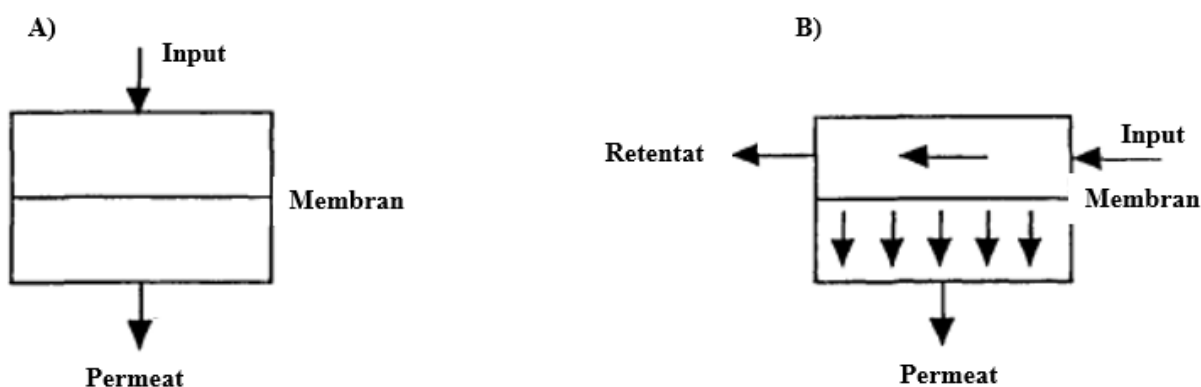
Aminosyreinnholdet i  $\alpha$ -la er gjengitt i Tabell 2.  $\alpha$ -la inneholder relativt store mengder tryptofan, i tillegg til sulfat, som er tilgjengelig i cystin og metionin. Som følge av evnen  $\alpha$ -La har til å binde kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), er  $\alpha$ -la det mest varmestabile myseproteinet (Fox et al. 2015a).  $\alpha$ -La har et spesifikt ueksponert bindingssete for et kalsiumion (Walstra et al. 2005b). Kalsium er sterkt bundet og stabiliserer proteinet, men ved reduksjon i pH til 4-5 vil asparginenheter bli protonert og miste deres evne til å binde  $\text{Ca}^{2+}$  (Fox et al. 2015a; Walstra et al. 2005b). Dette medfører en utfoldelse av proteinet og det metallfrie proteinet denatureres ved relativt lav temperatur, og renaturerer ikke ved nedkjøling (Fox et al. 2015a).

#### **2.2.5 Frie aminosyrer**

Innholdet av frie aminosyrer i kumelk er ifølge Fox et al. (2015b)  $578 \text{ } \mu\text{mol/L}$ , men variasjon vil forekomme som følge av blant annet kurase, laktasjonsperiode og sammensetning av ulike proteiner. Sarwar et al. (1998) fant et totalt innhold av frie aminosyrer på  $1061 \text{ } \mu\text{mol/L}$ . Glutamin, glutamat, glycin, alanin og serin er de aminosyrene som finnes i høyest konsentrasjon i kumelk (Fox et al. 2015a).

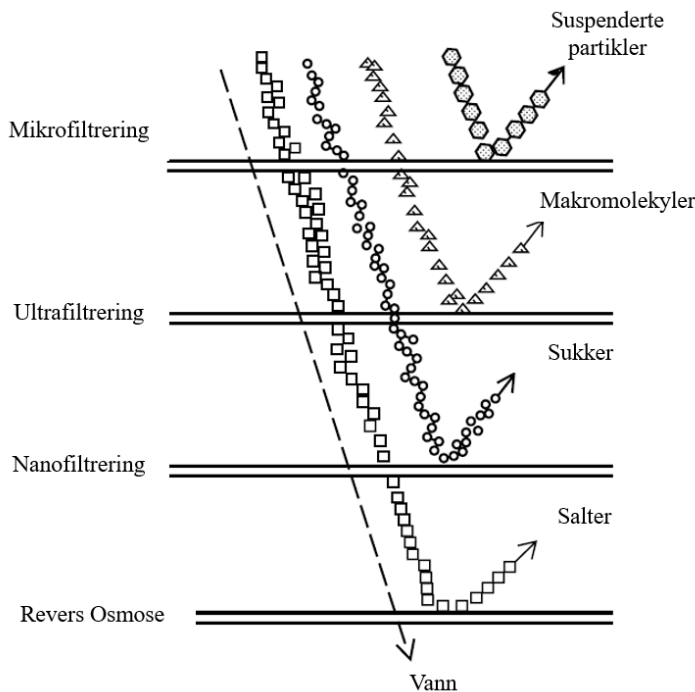
## 2.3 Filtrering av melk

Filtrering defineres som en trykkdrevet behandling av en råvare for å separere løselige og uløselige deler ved å benytte en porøs membran (Albert Ibarz 2002). Membranseparering benyttes for å skille én væske til to flytende væsker med ulik sammensetning (Walstra et al. 2005a). Filtrering er prosesser hvor uønsket materiale holdes igjen på den ene siden av filteret (Albert Ibarz 2002). Membranfiltreringsprosesser, som mikrofiltrering (MF), ultrafiltrering (UF), nanofiltrering (NF) og revers osmose (RO), benytter en tverrstrøms metode (Koros et al. 1996). Figur 1 viser en illustrasjon over filtreringsprosesser (A) og membransepareringsprosesser (B).



Figur 1. Forskjell i filtreringsprosesser (A), hvor strømmen går tvers gjennom filteret fører til at større partikler hopper opp på filtersiden, og membranseparering (B), hvor en tverrstrøm deler et flytende medie i to ulike deler, retentat og permeat, med ulik sammensetning. (Adaptert fra Koros et al. (1996)).

Separasjon av komponenter i næringsmidler er nødvendig for å kunne produsere produkter med økt konsentrasjon av et spesifikt næringsstoff, for eksempel kasein- og myseproteinpreparater (Albert Ibarz 2002). Flere ulike filtreringsmetoder benyttes for å produsere ulike produkter av myseproteiner, deriblant MF, UF, NF og RO (Schmidt et al. 1984). Filtreringsprosesser av proteinfraksjoner kan være energikrevende, men separering med membranfilter er derimot mindre energikrevende ifølge Albert Ibarz (2002). Dette har ført til en økning i bruk av membranfiltrering de siste årene. I meieriindustrien erstatter membranseparering eldre separasjonsmetoder (Walstra et al. 2005a). Ved ultrafiltrering benyttes en porøs semipermeabel membran, hvor egnet membranfilter med en satt porestørrelse for det produktet som ønskes og bidrar til seleksjon av hvilke komponenter som krysser membranen. Figur 2 viser en klassifisering av de ulike membranprosessene og hvilke partikler som blir avvist (retentat) eller går gjennom membranen (permeat).



Figur 2. Klassifisering av ulike membranprosesser og hvilke partikler som holdes igjen av filteret i henholdsvis mikrofiltrering, ultrafiltrering, nanofiltrering og revers osmose på bakgrunn av molekylstørrelse. (Albert Ibarz 2002).

### 2.3.1 Mikrofiltrering

Mikrofiltrering omtales som en prosess som er en mellomting mellom vanlig filtrering og UF (Walstra et al. 2005a). Native kaseinmiceller kan bli fjernet fra skummetmelk ved å benytte mikrofiltrering ved hjelp av membraner med porestørrelse på 0,1 til 0,8 $\mu$ m (Fox et al. 2015b). Ved å benytte denne metoden vil kaseinmicellene holdes tilbake i retentatet, mens løselige bestanddeler fra melk, som laktose, mineraler og myseproteiner, når gjennom til permeatet (Bylund & Systems 2015a). Bakterier og fett holdes også igjen av membranen, og derfor benyttes denne metoden til pasteurisert skummetmelk (Saxena et al. 2009; Walstra et al. 2005a). Mikrofiltrering benyttes da i kombinasjon med HTST-pasteurisering som alternativ til ultra-pasteurisering for å øke holdbarheten til kjølelagret skummetmelk (Elwell & Barbano 2006). Som med UF av skummetmelk, vil det under MF være faktoren for volumkonsentrasjonen fra diafiltreringen som bestemmer den endelige proteinkonsentrasjonen og ratio mellom kasein og

myse i retentatet (Fox et al. 2015b). Ved omfattende konsentrering og diafiltrering, er det da mulig å generere et retentat med høyere proteinkonsentrasjon enn utgangspunktet (Fox et al. 2015a). Deretter tørkes retentatet for å produsere et pulver som er rikt på native kaseinmiceller (>90 % av total proteinkonsentrasjon) og har en rekke bruksområder. Isolater av kasein benyttes i stor grad til berikning av ystemelk og som ingrediens i næringsmidler. Permeatstrømmen fra denne prosessen er ifølge Fox et al. (2015a) bra startmateriale for produksjon av myseproteinkonsentrat ved hjelp av tørking. MF-permeat fra skummetmelk inneholder hverken starterkultur, løpe eller forandring i pH som følge av fermentering, og har generelt bedre kvalitet enn tradisjonell, søt myse. Som følge av disse årsakene omtales denne mysen som «uforandret» eller «nativ» myse.

### **2.3.2 Ultrafiltrering**

Ultrafiltrering (UF) er en metode som benytter en porøs semipermeabel membran som selekterer makromolekyler som kan krysse membranen på grunnlag av molekylvekt, størrelse eller utforming (Albert Ibarz 2002). Komponenter som kaseinmiceller, somatiske celler, fettgobuler og bakterier holdes igjen ved ultrafiltrering (Walstra et al. 2005a). Figur 2 viser en klassifisering av de ulike membranprosessene og hvilke partikler som blir avvist (retentat) eller går gjennom membranen (permeat). UF oppkonsentrerer partikler med molekylvekt mellom 300- 500000 Dalton (Da) eller ved porestørrelse på 3 til 300 nanometer (nm) (Walstra et al. 2005a). Ved å benytte en membran med størrelse på 10 til 20 kDa holdes både kaseiner og myseproteiner tilbake i retentatet, mens laktose og løselige salter er permeable. I melk vil fett og protein oppkonsentreres, mens laktose og salter transporteres gjennom membranen sammen med vann (Albert Ibarz 2002; Walstra et al. 2005c).

### **2.3.3 Diafiltrering**

Diafiltrering er en prosedyre der vann tilsettes til mysen under filtreringsprosessen for å vaske ut lavmolekylære komponenter som kan passere membranen, hovedsakelig laktose og mineraler (Bylund & Systems 2015a). Dette fører til en ytterligere oppkonsentrering av større molekyler i retentatet (Walstra et al. 2005a). Metoden benyttes for å redusere laktoseinnhold i forbindelse med ultrafiltrering av melk.

### **2.3.4 Produkter av myse, myseproteinkonsentrat (WPC80) og nativ myse (NWP)**

Myse kommer hovedsakelig fra to prosesser; enten som et biprodukt fra osteproduksjon (søt myse) eller under produksjon av syrnede produkter som cottage cheese, yoghurt eller kasein (sur myse) (Lagrange et al. 2015). To relativt nye og hurtigvoksende kilder er ifølge Lagrange et al. (2015) myse fra mikrofiltrering av skummetmelk, «nativ myse» og myse produsert under separasjonsprosessen av Gresk yoghurt, «Greek whey» eller «sur myse». Hovedforskjellen mellom myseproteinkonsentrat (WPC) laget av nativ myse sammenlignet med WPC fra ostemyse er mangelen på GMP i førstnevnte (Svanborg et al. 2016). I tillegg til forskjell i GMP, kan WPC fra nativ myse inneholde mindre fett og denaturerte proteiner, avhengig av prosessbetingelser og typen membranfiltrering som benyttes (Morr & Ha 1993).

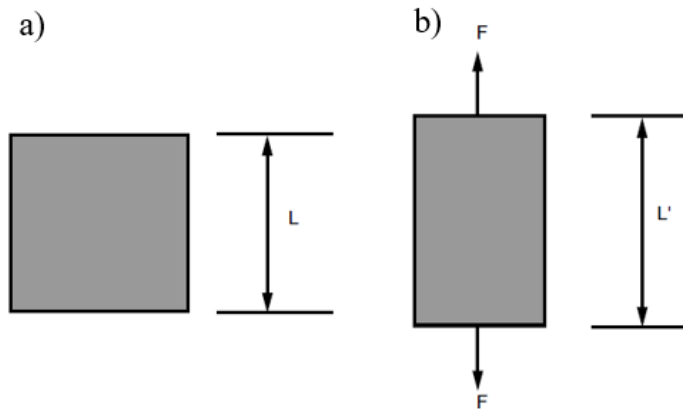
WPC har god aminosyreprofil med høyt innhold av tilgjengelig lysin (Lys) og cystein (Cys) (Bylund & Systems 2015a). WPC-pulver produseres ved å tørke retentat fra ultrafiltrering av myse og navngis som følge av proteininnhold i tørrstoff, som varierer fra 35 % til 80 % (Bylund & Systems 2015d). For å produsere et 35 % WPC-pulver, vil væsken oppkonsentreres seks ganger (Bylund & Systems 2015d)

## **2.4 Reologi**

### **2.4.1 Generelt**

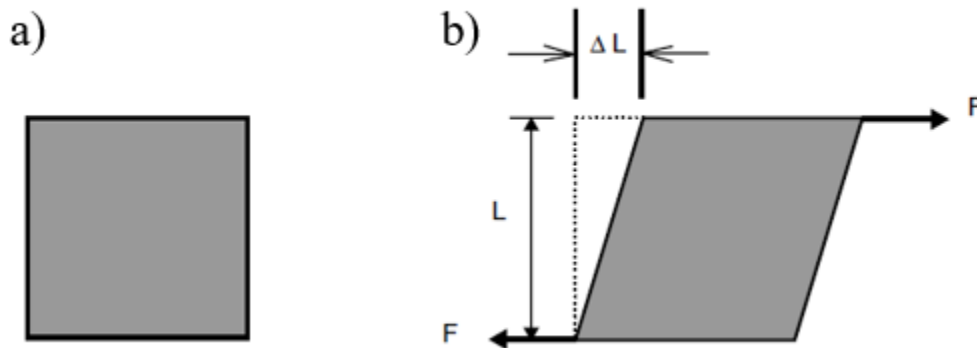
Reologi beskriver vitenskapen om flyt og deformasjon av fast stoff og væsker under påvirkning av mekaniske krefter (Albert Ibarz 2002; Steffe 1996). For å studere reologiske egenskaper er det nødvendig å benytte seg av reometri for å få kjennskap til ulike stoffers oppførsel under gitte betingelser. For å sikre tilfredsstillende prosess- og produktkvalitet, kan reologiske parametere være avgjørende i industrien. Når en kraft (F) påføres et legeme, er den observerte responsen forskjellig. Dette avhenger av materialet kraften virker på (Albert Ibarz 2002). Når en kraft påføres et elastisk legeme, vil det deformeres, men vil gjenoppta opprinnelig form når kraften opphører. Stress ( $\sigma$ ) defineres som den kraften (F) som virker på et område (Areal/A) og oppgis i Pa ( $\text{N/m}^2$ )(Albert Ibarz 2002; Bourne 2002). Kraften virker ned på et areal og fører til en

forlenging eller forkorting av et elastisk materiale avhengig av retningen på kraften. Figur 3 viser en skjematisk forklaring over hvordan normalt stress påvirker et materiale.



Figur 3. Normalt stress a) ingen stress påvirker materialet og materialet ligger i ro, b) normalt stress påvirker materialet og materialet beveger seg dermed som følge av stresset som ble påført (Albert Ibarz 2002).

Skjærkrefter ( $\gamma$ ) virker tangentialt på materialets overflate, samtidig som materialets bunn påvirkes av en kraft som går parallelt i motsatt retning (Albert Ibarz 2002; Bourne 2002). Figur 4 viser en skjematisk forklaring over hvordan skjærkrefter påvirker et materiale.



Figur 4: Skjærkrefter virker tangentialt på materialet. A) Ingen skjærkrefter virker på materialet og materialet ligger dermed i ro, b) skjærkrefter virker på materialet, og materialet forskyves (Albert Ibarz 2002).

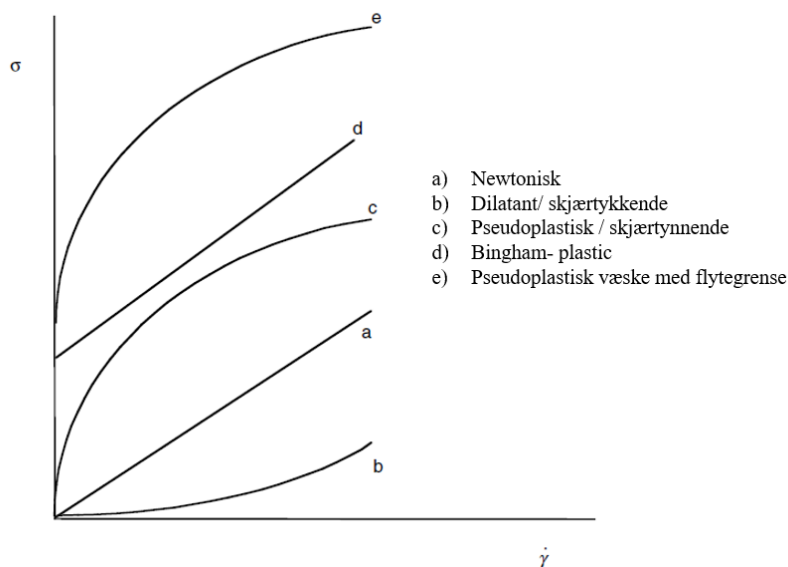
Et stoff som deformeres under påvirkning av en kraft, men går tilbake til opprinnelig form ved opphør av kraften, har elastiske egenskaper. Ved tap av deformasjonsenergi er materialet viskøst og energien går tapt som følge av varmeproduksjon (Albert Ibarz 2002). Materialer som har både viskøse og elastiske egenskaper, kalt viskoelastiske stoffer, er svært vanlig i næringsmidler. Hvis

et produkt har Newtoniske egenskaper, som for eksempel vann, vil det fortsette å flyte når kraften stopper. Viskositet defineres som den interne friksjonen i en væske eller dens tilbøyelighet for å motstå flyt (Albert Ibarz 2002). Viskositet benyttes for å kalkulere parameterne moment og energitransportfenomener. Enheten for viskositet er Pascal sekund (Pa·s), som tilsvarer 1000 mPas eller 1000 Centipose (cP). Pascalsekund kan også beskrives som kg/m/s (Albert Ibarz 2002).

#### **2.4.2 Klassifisering av flytende væsker.**

Væsker deles hovedsakelig inn i to grupper; væsker med og uten Newtoniske egenskaper. Dette avhenger av om deres reologiske egenskaper kan beskrives av Newtons lov om viskositet (Albert Ibarz 2002). Egenskapene til matvaren påvirkes av tiden skjærkraften virker på dem, og påvirker dermed både struktur og flyteegenskaper (Albert Ibarz 2002; Bylund & Systems 2015a).

Newtoniske væsker har konstant viskositet avhengig av temperatur, men uavhengig av påført skjærrate (Bylund & Systems 2015c). Skjærstrømning oppstår som følge av strømning mellom parallelle plan, virvelstrøm mellom koaksiale sylindere der en sylindere er stasjonær og en av sylindere roterer (Bylund & Systems 2015a). Adferden til væsker er tidsavhengige og en funksjon av skjærspenning (Albert Ibarz 2002). Viskositeten er ved gitt temperatur avhengig av skjærraten. I Newtoniske væsker er viskositetsfunksjonen konstant, og verdien er Newtonisk viskositet. I ikke-Newtoniske væsker er funksjonen ikke konstant, og kan enten være avhengig eller uavhengig av tid. I ikke-Newtoniske væsker kan vi ikke måle viskositet, da forholdet mellom påført skjærkraft og skjærraten ikke er konstant. Stoffer som ved økende skjærrate får lavere viskositet betegnes som pseudoplastiske (skjærtynnende), mens de som får høyere viskositet ved økt skjærrate omtales som dilatante (skjærtykkende). Figur 5 viser en oversikt over de ulike egenskapene til Newtoniske og ikke-Newtoniske væsker (Albert Ibarz 2002).



Figur 5. Klassifisering av egenskapene til tidsavhengige Newtoniske og ikke-Newtoniske væsker. A) Newtonsk, b) dilatant, c) pseudoplastisk, d) Bingham plastic, e) pseudoplastisk væske med flytegrense angitt på y-aksen stress ( $\sigma$ ), x-aksen representerer skjærrate( $\dot{\gamma}$ ) (Albert Ibarz 2002).

### 2.4.3 Måling av viskositet

Ved måling av viskositet er det nødvendig å ta høyde for representative målinger med hensyn til skjærrate og temperatur (Bylund & Systems 2015c). Reologiske egenskaper til ulike produkter vil i mange tilfeller endres med tid og temperatur. Det er derfor nødvendig å påse at de reologiske undersøkelsene gjøres i så nær i tid som mulig med hensyn til det gitte prosessen for å kunne sikre representative målinger (Bylund & Systems 2015c).

## 2.5 Statistiske analyser

### 2.5.1 Variansanalyse

Variansanalysen ANOVA benyttes for å sammenligne forventet verdi ( $\mu$ ) i to eller flere grupper (i) samtidig for å se om det er signifikante forskjeller mellom gruppene (Montgomery 2008). Det benyttes ofte to hypoteser, der nullhypotesen kan forkastes om det er signifikante forskjeller mellom gruppene.

$H_0$  (nullhypotesen): Gruppene er like, det vil si at det ikke er noen forskjell mellom resultatene for de ulike gruppene testen gjennomføres på. Verdiene ( $\mu$ ) er like,  $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i$ .



$H_1$ : Gruppene er ulike, det vil si at det er en reell forskjell mellom resultatene for de ulike gruppene som testen utføres på. Verdiene ( $\mu$ ) er ikke like, og minst to er forskjellige.

I dag gjøres beregning av signifikante verdier sjeldent for hånd. I beregningene for dette prosjektet benyttes statistikkprogrammet «R» (versjon 3.2.4, 16.03.2016, <http://www.r-project.org/>) og tilleggsprogrammet «R Commander» (<http://repository.umb.no/R/>).

Programmene oppgir p-verdi i tillegg til alle verdier som kan regnes for hånd. Ved signifikansnivå på 0,01% ( $\alpha=0,01$ ) kan nullhypotesen forkastes dersom p- verdien er lavere enn 0,01.

### **2.5.2 Boksplott**

Et boksplott er en grafisk fremstilling av observasjonene som viser fordelingen i et datasett (Montgomery 2008). I et boksplott vises den minste og den største observasjonen sammen med gjennomsnittet, medianen, nedre kvartil og øvre kvartil. Ved nedre kvartil ligger 25 % av observasjonene enten under eller på kvartilet, mens ved øvre kvartil ligger 75 % av observasjonene. Krysset i boksen markerer gjennomsnittet, mens medianen er markert som en linje. Denne linjen er som regel 1,5 ganger boksens lengde. Resultater som går utenfor denne linjen markeres med sirkler og inneholder observasjoner som er mye større eller mindre enn det som normalt observeres. Vertikale linjer indikerer variasjonen henholdsvis nedenfor og ovenfor nedre og øvre kvartil. I noen tilfeller avviker resultatene i stor grad. Dette kan skyldes både at det er et reelt avvik, men kan også skyldes feil i datasettet. Dersom de avvikende resultatene fjernes og resultatene fremdeles er de samme, vil konklusjonen styrkes. Dersom konklusjonene avviker fra hverandre, vil det være hensiktsmessig å vurdere i hvilken grad dataene er valide (Montgomery 2008).

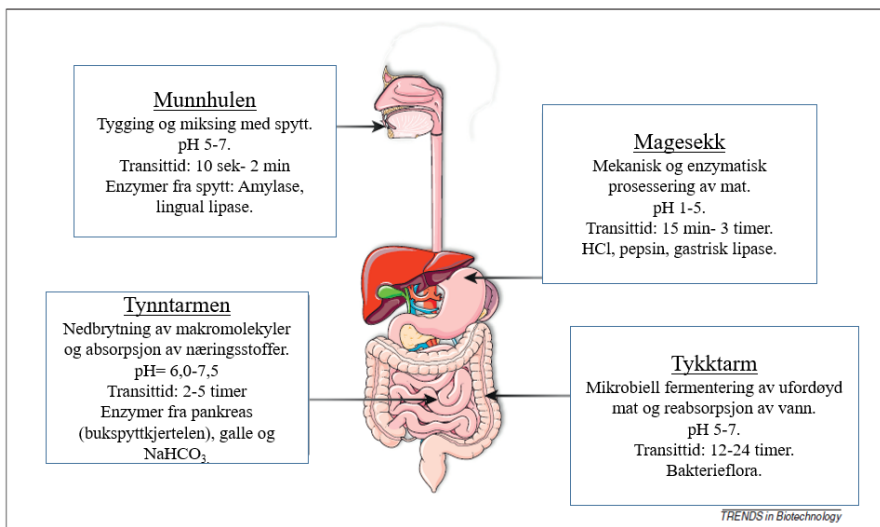
### **2.5.3 Tukeys metode**

Ved å benytte Tukeys metode kan en sammenligne parvise gjennomsnitt (Montgomery 2008; Tukey 1949). Tukeys metode avklarer om to gjennomsnitt er signifikant forskjellige dersom den absolutte verdien av prøvene overstiges. Tukeys test er en et-trinns sammenligningsprosedyre som vurderer flere gjennomsnitt mot hverandre. Metoden kan benyttes alene eller i forbindelse med ANOVA-analyse (post-hoc)(Montgomery 2008). Tukeys test kan gjennomføres for hånd, samt ved bruk av statistiske programmer. Tukeys test er basert på en formel som er svært lik

vanlige t-tester. Tukeys test regnes som en t-test som tar høyde for sannsynligheten for å gjøre et eller flere falske funn, eller type 1 feil, blant hypotesen når det utføres flere hypotesetester (Tukey 1949).

## 2.6 Human fordøyelse

Human fordøyelse innebærer en kompleks prosess der mat brytes ned til mindre partikler og næringsstoffer tas opp gjennom tynntarmen (Guerra et al. 2012). Næringsstoffer blir brukt av kroppen til vekst, vedlikehold av celler og som energi (Saladin 2012). Under fordøyelsen er det to hovedprosesser som finner sted samtidig; mekanisk bearbeiding, som reduserer størrelsen på komponentene, og enzymatisk nedbrytning hvor komponenter hydrolyseres til mindre nedbrytningsprodukter. Nedbrytningsproduktene blir deretter transportert over tarmepitelecellene og kan deretter tas opp i blodstrømmen. I munnhulen foregår en mekanisk nedbrytning av maten som inntas, samtidig som spytt tilsettes. I magesekken (ventrikkel), senkes pH som følge av utskillelse av fordøyelsessekreter og HCl til pH 1-5 (Guerra et al. 2012). Fall i pH og tilstedeværelse av pepsin starter hydrolyse av proteiner, mens gastrisk lipase har betydning for fettfordøyelse (3-30%) (Guerra et al. 2012; Saladin 2012). Full enzymatisk fordøyelse og opptak av næringsstoffer skjer i hovedsakelig i tynntarmen. I Figur 6 vises hovedtrekkene i det humane fordøyelsessystemet.



Figur 6. Hovedtrekkene over humant fordøyelsessystem hvor hovedtrekkene beskrives. Deriblant endring i pH, mekanisk- og kjemisk nedbrytning samt utskillelse av ulike fordøyelsessekreter i henholdsvis munnhulen, magesekken, tynntarmen og endetarmen (Guerra et al. 2012).

Forskere stiller spørsmål til hvordan fordøyelsesprosessen påvirkes av ernæringsstatus, toksikologi og mikrobiologi (Guerra et al. 2012). Å studere human fordøyelse er vanskelig som følge av mange ulike årsaker. *In vivo* undersøkelser er kostbart- og teknisk vanskelig, i tillegg til å være vanskelig å gjennomføre på en etisk forsvarlig måte.

### **2.6.1 Inndeling av fordøyelsessystemet**

Fordøyelsessystemet har to anatomiske inndelinger, fordøyelseskanalen og tilhørende organer (Saladin 2012). Fordøyelseskanalen er en 5 til 9 meter lang muskelfylt kanal som strekker seg fra munnhulen til anus. Området fra magesekk til tynn- og tykktarm omtales ofte som gastrointestinal (GI) traktus, hvor tilhørende organer som spyttkjertler, lever, galleblære og bukspyttkjertel bidrar med fordøyelsesenzymmer. Selve fordøyelsen deles inn i mekanisk- og kjemisk fordøyelse (Guerra et al. 2012). Den mekaniske fordøyelsen omhandler den fysiske oppmalingen av maten til mindre nedbrytningsprodukter, som starter med tygging i munnhulen, men fortsetter i magesekk og tynntarmen ved hjelp av sammentrekninger. Den mekaniske bearbeidingen bidrar til å øke overflaten til matvaren, samt å gjøre den mer tilgjengelig for fordøyelsesenzymmer. Kjemisk fordøyelse består av en serie med hydrolytiske reksjoner som bryter større makromolekyler ned til deres mono- og dimere (Saladin 2012). Proteiner brytes ned til aminosyrer ved hjelp av pepsin. Enkelte komponenter absorberes uten å måtte brytes ned, deriblant vitaminer, frie aminosyrer, mineraler, kolesterol og vann. Blodstrømmen, motiliteten og sekresjonen av fordøyelsesenzymmer styres av det enteriske nervesystemet.

### **2.6.2 Munn, svelg og spiserør**

Fordøyelsen starter i munnhulen, ved mekanisk bearbeiding og innblanding av spytt ved pH 6.8-7 (Guerra et al. 2012; Saladin 2012). Oppholdstiden i munnhulen er kort, men tygging vil ha en viktig effekt på den generelle fordøyelsesprosessen og tømmehastigheten i magesekken (Saladin 2012). Spyttet består av en løsning 97,0 % til 99,5 % vann i tillegg til fordøyelsesenzymmer, for karbohydrat- og fettnedbrytning, mens slim binder sammen og smører maten. Tygging av maten er første steg i den mekaniske nedbrytningen.

### **2.6.3 Magesekk (ventrikkel)**

Primærfunksjonen til magesekken er å oppbevare mat, tilføre væske og bearbeide maten mekanisk og kjemisk i påvente av videre fordøyelse i tynntarmen (duodenum) (Saladin 2012). Kjertler i celleveggen produserer daglig 2-3 liter magesaft som består av vann, saltsyre (HCl) og

fordøyelsesenzymet pepsin. Magesaft inneholder store andeler HCl, som har en pH på ca 0,8. Magesyren har flere viktige funksjoner; blant annet å aktivere enzymer som pepsin og lingual lipase, oppbrytning av bindevev og planteceller, tilføre væske og forme kymen. McConnell et al. (2008) har målt fastende pH i magesekken til 1,0-2,5, mens Ekmekcioglu (2002) har sett større variasjon i pH på 1,0- 3,5. Inaktive enzymer, zymogener, blir utskilt i magesekken, og aktiveres ved å fjerne enkelte aminosyrer (Saladin 2012). Celler i magesekken «chief-cells» skiller ut zymogenet pepsinogen som ved nærvær av HCl omdannes til pepsin. Pepsin har en auto katalyserende effekt, siden pepsin bryter ned protein, mens pepsinogen er et protein i seg selv, vil tilstedeværelse av pepsin bidra til økt omdanning av pepsinogen til pepsin. Optimal funksjon for pepsin er å omdanne proteiner fra næringsmidler til kortere peptidkjeder, før fordøyelse i tynntarmen.

#### **2.6.4 Tynntarm (duodenum, jejunum og ileum)**

Nesten all kjemisk fordøyelse og opptak av næringsstoffer foregår i tynntarmen (Saladin 2012). Tynntarmen deles inn i tre regioner; tolvfingertarmen (duodenum), jejunum og ileum. Duodenum opptar de første 25 cm, og strekker seg fra pylorus ringmuskelen forbi pankreas (bukspyttkjertelen) til overgangen til jejunum. Duodenum mottar kymus fra ventrikkelen, galle fra galleblæren og sekret fra pankreas. Zymogenet trypsinogen, utskilles fra pankreas og omdannes til trypsin ved hjelp av enterokinase, et enzym som utskilles fra slimhinnen i tarmepitelet. Trypsin er autokatalytisk, det dannes mer trypsin fra trypsinogen ved tilstedeværelse av trypsin. I tillegg til å omdanne to andre zymogener, kymotrypsin og karboksypeptidase, vil hovedoppgaven til trypsin være å bryte ned protein fra næringsmidler. Kymotrypsin og karboxypeptidase vil også bidra til nedbrytning av protein. Kymus fra magesekken har av pH (1-5), og vil nøytraliseres av sekret fra pankreas og galle. Pankreatiske enzymer tar over den kjemiske nedbrytningen, samtidig som pepsin inaktiveres på bakgrunn av økning i pH. Hovedvekten av fordøyelsen og opptaket av næringsstoffer skjer i denne delen av tynntarmen, som følge av god blodtilførsel.

#### **2.6.5 Fordøyelse av proteiner**

Aminosyrene som absorberes i tynntarmen kommer fra tre kilder; maten som inntas, fordøyelsesenzymer, og fra epitelceller som fordøyes av enzymene (Saladin 2012). Endogene aminosyrer utgjør ifølge Saladin (2012) om lag 30 g/dag sammenlignet med 44 til 60 g/dag fra

maten som inntas. Fordøyelse av proteiner avhenger av utslipp av de human-spesifikke proteasene; trypsin, kymotrypsin, elastase, karboksy- og aminopeptidase i gastrointestinaltrakten (Devle et al. 2014). Pepsin hydrolyserer peptidbånd mellom tyrosin og fenyylalanin, og fordøyer 10 til 15 % av proteiner fra maten til kortere polypeptider og en liten mengde frie aminosyrer (FAA) (Saladin 2012). Optimal pH for pepsin er 1,5 til 3,5, derfor inaktiveres den i tynntarmen i nærvær av basisk sekret fra galle og pankreas. Ved hjelp av hydrolyse brytes polypeptider ned til mindre oligopeptider. Karboxypeptidase fjerner deretter aminosyrer fra syreenden av kjeden, mens aminopeptidase fjerner fra aminenden, før dipeptidase splitter dipeptider på midten og frigjør de to siste aminosyrene før overføring til tarmepitelet ved hjelp av aktiv og passiv transport. Typen proteiner som inntas påvirker ifølge Boirie et al. (1997) total muskelanabolisme som følge av opptak av FAA i tarmen. Kasein metaboliseres sakte, trolig på grunn av deres evne til å koagulere i surt miljø i magesekken, som bidrar til en forsinkelse i tømming av ventrikkelen (Boirie et al. 1997). Kasein bidro her til en bedre netto leucinbalanse etter syv timer med inntak av et kaseinpreparat og et mysepreparat.  $\beta$ -Lg regnes som et relativt raskt metabolisert protein (Mahe et al. 1996), på tross av immunitet mot fordøyelse av pepsin i magesekken (El-Zahar et al. 2005; Mandalari et al. 2009).

#### **2.6.6 Tykktarm (Colon)**

Proteinfordøyelsen påvirkes i ingen eller liten grad i tykktarmen. Enkelte epitelceller og proteiner skilles ut, men ellers påvirkes ikke proteinfordøyelsen. Det foregår små kjemiske forandringer i tykktarmen, hovedoppgaven er å re-absorbere vann og salter (Saladin 2012).

### **2.7 *Ex vivo* fordøyelse**

Simulering av fordøyelsessystemet er viktige modeller og anvendt i mange felt innenfor mat- og ernæringsrettet forskning (Minekus et al. 2014). Humane forsøk er ofte svært kostbare, teknisk vanskelige, resurskrevende, og etiske aspekter er diskutabile (Guerra et al. 2012). Som følge av dette er det benyttet *in vitro*-modeller som alternativ for å kunne bestemme endepunkter i biotilgjengelighet i næringsstoffer eller graden de ulike mikronæringsstoffene fordøyes, for å kunne bygge nye hypoteser *in vivo*. Et bredt spekter av *in vitro* modeller er tilgjengelig, både statiske og dynamiske modeller (Guerra et al. 2012). Metoder som benyttes til fordøyelse av proteiner involverer ofte bruk av enzymer. Mange proteaser er tilgjengelige for dette formålet,

hvor hver enkelt har ulike karakteristika og spesifisitet, effektivitet og optimale fordøyelsesforhold (Switzar et al. 2013). Det har blitt benyttet mange ulike metoder, og ulike enzymkilder fra blant annet gris, kanin og menneske, som naturlig nok har ulik sammensetning- og enzymaktivitet. Enzymkilder fra ulike arter har forskjellig spesifisitet og aktivitet (Minekus et al. 2014). Dette har gjort sammenligningsgrunnlaget av de ulike forsøkene vanskelig.

Ulike fordøyelsesmodeller benyttes til å undersøke grad av fordøyelighet, strukturelle endringer og frigjøring av ulike komponenter, under forhold som etterligner *in vivo* fordøyelse (Hur et al. 2011). Det er derimot vanskelig og etterligne *in vivo* fordøyelse, da det er komplekse fysiologiske og fysiokjemiske forhold som er vanskelige å etterligne. *In vivo* forsøk på fordøyelse er vanskelig å rettferdiggjøre på en god økonomisk, etisk og teknisk måte, derfor benyttes det i dag ulike *in vitro* modeller. Det finnes i hovedsak to typer *in vitro* fordøyelsesmodeller- statiske og dynamiske. Den mest benyttede modellene er de statiske ifølge Guerra et al. (2012). Statiske modeller karakteriserer kjemisk fordøyelse, men de tar ikke høyde for den mekaniske påvirkningen fra fordøyelseskanalen. Mekanisk påvirkning bidrar til mekanisk og kjemisk nedbrytning av maten, så vel som absorpsjon og transport (Ferrua & Singh 2010). Dynamiske *in vitro* modeller har fordel av at de i større grad etterligner *in vivo* forhold (Amorim-Carrilho et al. 2014), og benyttes i større grad for å få et mer realistisk resultat. Enkelte modeller som er styrt av datamaskiner viser forskjell i utslipp av enkelte komponenter sammenlignet med forsøk med samme produkt i statiske modeller (Roman et al. 2012). Dette tyder på at bruk av ulike modeller bidrar til varierende resultater ved forsøk på samme produkt. Som følge av mange ulike *in vitro* modeller, er det derfor vanskelig å sammenligne resultater. En rekke forskere på fordøyelse fra ulike land har utarbeidet «COST action InfoGest FA1005 INFOGEST», en standardisert og praktisk statisk *in vitro* metode basert på fysiologiske relevante forhold (Minekus et al. 2014). Ved bruk av en felles metode, vil det i fremtiden være mulig i større grad å sammenligne forsøk. Det er i denne metoden benyttet kommersielle enzymer, derav navnet. For å danne et mer realistisk bilde på human fordøyelse er det i dette forsøket benyttet humane enzymer, aspirert fra frivillige personer. Dette er et steg nærmere *in vivo* fordøyelse, og derfor benyttes terminologien *ex vivo* fordøyelse. Sammenlignet med dynamisk *in vitro* fordøyelse med kommersielle enzymer vil denne typen studie være nærmere human fordøyelse basert på valg av enzymkilde (Aarak et al. 2013; Eriksen et al. 2010).

Enkelte svakheter finnes imidlertid ved bruk av en slik metode. Fiksert pH med HCl, vil kunne gi både for rask økning/reduksjon under ulike steg i fordøyelsen. Dette kan påvirke produktet som fordøyes på en måte som ikke stemmer over ens med human fordøyelse hvor utslipp av enzymer, HCl ol. styres av sentralnervesystemet. Tidsvariasjon i de ulike fasene av fordøyelsen kan avvike fra *in vivo* fordøyelse. En annen svakhet er mangelen på absorpsjon av nedbrytningsproduktene fra «tarmen», og hvilken innvirkning dette har på netto nedbrytning av ulike næringsstoffer, i dette tilfellet frigjøring av aminosyrer fra proteiner. Sammenlignet med fysiologiske situasjoner mangler denne modellen en membran, hvor vannløselige fordøyde produkter fjernes kontinuerlig, produktene vil akkumulere over tid og fordøyelsen vil muligens stoppe opp.





## 3 Metode

### 3.1 Råstoff

Lettmelken som ble benyttet ble kjøpt inn fra leverandør A. Melken var pasteurisert og hadde et proteininnhold på 3,2 %. Myseproteinkonsentratet (WPC80) og nativt myseprotein (NWP) ble innhentet direkte fra leverandør B. WPC80 hadde et proteininnhold på 77,4 %, og var produsert fra tørking av pasteurisert ostemyse. Den native mysen hadde en proteinkonsentrasjon på 9,9 %, og var produsert av upasteurisert skummetmelk. Den proteinbaserte ingrediensen ukjent X, ble innhentet fra leverandør C og hadde en proteinkonsentrasjon på 83 %. Det ble ikke opplyst om varmebehandlingshistorien til ukjent X.

#### 3.1.1 Behandling av råstoff

Det ble gjennomført to varmebehandlinger av produktene henholdsvis melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X. Alle varmebehandlingene ble gjort i vannbad (Leuda AL18, Tyskland), men ved ulike temperaturer. Første varmebehandling gjenspeilte en «in vat» lavpasteurisering, 63 °C i 30 min. Andre varmebehandling ble gjennomført ved 90°C i 120 min for å simulere en langtids UHT-behandling av melk. Optimalt burde disse produktene vært varmebehandlet slik de vil bli behandlet i industrien, høy temperatur, kort tid (fra engelsk; high temperature, short time, HTST) pasteurisering ved 72 °C i 15 sek. og UHT-behandling ved 135-145 °C i et par sek. Som følge av for små mengder prøvemateriale og påbrenning av flatene i pilotanlegg, kunne industriell varmebehandling ikke benyttes. Figur 7 viser nativ myse og forandring i utseende etter de ulike behandlingene.



Figur 7. Viser fra venstre mot høyre; ubehandlet nativ myse, pasteurisert nativ myse og UHT-behandlet nativ myse etter «in vat» varmebehandling i vannbad.

## 3.2 Fordøyelse av melk, WPC80, nativ myse og ukjent X.

### 3.2.1 Humane mage og tarmsafter

Anskaffelse av humane fordøyelsesenzymmer ble gjort ved aspirasjon av magesaft (Human gastric juice, HGJ) og tarmsaft (Human duodenal juice, HDJ) fra frivillige utført ved Lovisenberg Diakonale Sykehus (Oslo, Norge) og Sykehuset i Moss (Moss, Norge). Metoden er beskrevet av Holm et al. (1988) og Ulleberg et al. (2011). 20 frivillige (7 menn og 13 kvinner) i alderen 20 til 42 år (Gjennomsnitt  $25 \pm 5$  år) fastet i mer enn 8 timer før aspirasjon av fordøyelsesenzymene. Metoden er godkjent av Norges forskningsetiske komité, og alle deltagere leverte skriftlig samtykke.

*In vitro* fordøyelsesmodell basert på Minekus et al. (2014), ble benyttet med enkelte modifikasjoner. Prøvene ble ikke eksponert for oral fase i dette forsøket. Det ble benyttet humane enzymer, i istedenfor kommersielle enzymer for å kunne relatere forsøket i større grad mot *in vivo* fordøyelse. Metoden omtales derfor videre som *ex vivo* fordøyelsesmodell. Pepsinaktivitet i magesaft (HGJ) og trypsinaktivitet i tarmsaft (HDJ) ble målt som beskrevet i henhold til Minekus et al. (2014). Det ble benyttet en pepsinaktivitet i HGJ på  $2000 \text{ U mL}^{-1}$  og en trypsinaktivitet i HDJ på  $100 \text{ U/mL}^{-1}$  per 1 mL prøve. Det ble benyttet to ulike batcher med magesaft (HGJ). Pepsinaktiviteten i batch 1 ble målt av laboratorieingeniør Irene Comi til  $9090 \text{ U/mL}$  (Irene Comi, 10.09.15, NMBU, Ås) og batch 2 med HGJ til  $4980 \text{ U/mL}$  (Irene Comi, 08.03.16, NMBU). Trypsinaktiviteten i tarmsaft (HDJ) ble målt til  $219 \text{ U/ml}$  (Irene Comi, 10.09.15, NMBU, Ås).

Til å fordøye 2 ml prøve ble det benyttet henholdsvis  $0,880 \text{ mL}$  HGJ fra batch 1, og  $1,604 \text{ mL}$  av batch 2. Elektrolyttløsninger for fordøyelse i magesekk (SGF) og tynntarmen (SIF) ble laget i henhold til Minekus et al. (2014), det ble tilsatt  $10 \mu\text{L}$  fersk  $0,3 \text{ M}$  kalsiumklorid ( $\text{CaCl}_2$ ) i tillegg til elektrolyttløsningene. Oppskriftene er gitt i vedlegg 1. Tabell 3 viser et eksempel på tilsatt mengde SGF, HGJ, samt andre tilsetninger under *ex vivo* fordøyelse av de ulike prøvene.

Tabell 3: Viser en oversikt over tilsatt mengde elektrolyttløsning (SGF), humane enzymer fra magesekk (HGJ),  $\text{CaCl}_2$ ,  $1 \text{ M HCl}$  og vann per 2 mL prøvemateriale. \*Elektrolyttløsningen SGF og HGJ utgjorde 80% av totalt volum. Mengden HCl og vann som ble tilsatt varierte som følge av bufferkapasitet for å nå pH 3. \*I batch 2 ble det ikke tilsatt  $\text{dH}_2\text{O}$ , men heller benyttet SGF, siden lav enzymaktivitet bidro til ingen plass for elektrolyttløsning.

Ingrediens	Mengde	
	Batch 1	Batch 2
*Simulated Gastric Fluid electrolyte stock solution (SGF)(1.25x)	$720 \mu\text{L}$	$256 \mu\text{L}^*$

<b>*HGJ</b>	880 µL	1604 µL
<b>0.3 M CaCl<sub>2</sub></b>	10 µL	10 µL
<b>1 M HCl</b>	130	130
<b>Vann (dH<sub>2</sub>O)</b>	200	-
<b>Total</b>	2000 µL	2000 µL

Trypsinaktivitet i HDJ ble målt til 219U/mL. For å oppnå en trypsinaktivitet på 100 U/1mL ble det benyttet 3,653 mL HDJ per 2 ml prøve. Tabell 4 viser en oversikt over tilsatt mengde enzymer, elektrolyttløsning og andre tilsetninger i duodenal fordøyelse.

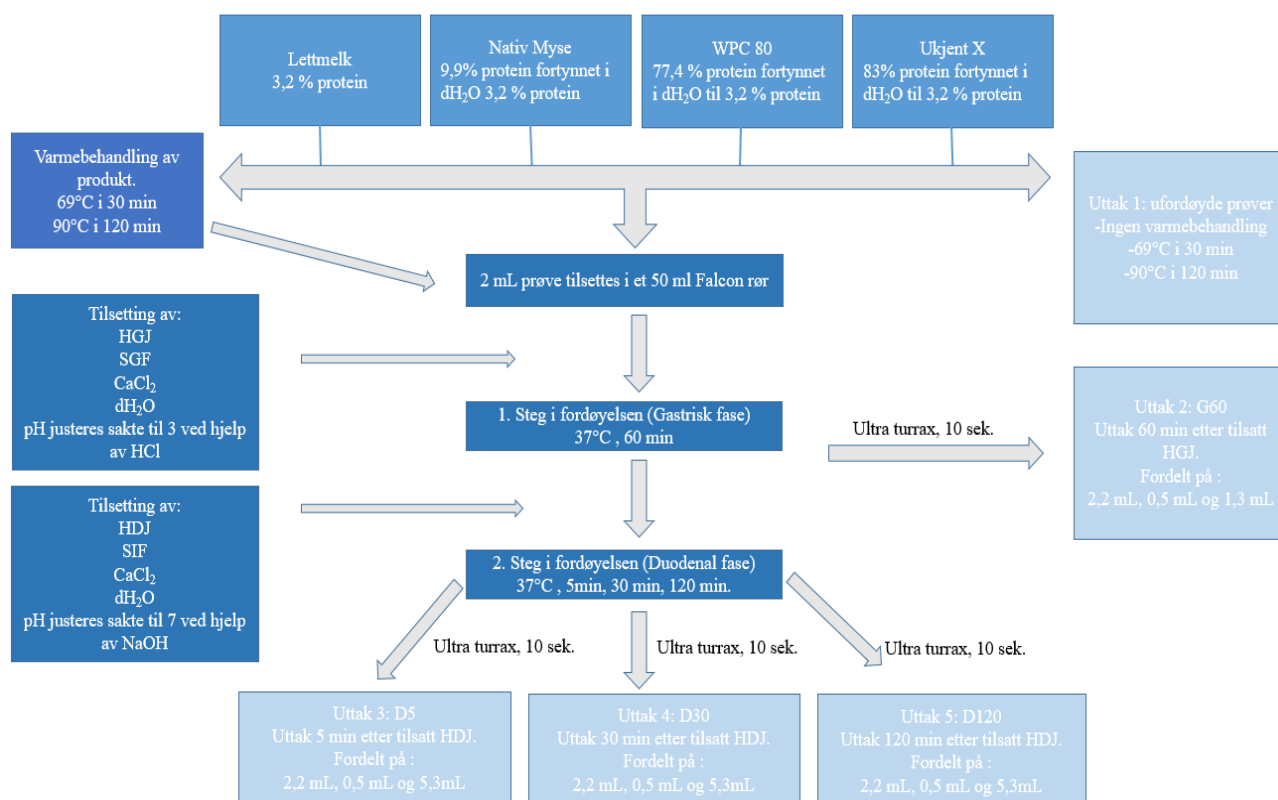
*Tabell 4: Viser eksempelvis mengde tilsatt av de ulike ingrediensene i duodenal fase. Elektrolyttløsning (SIF) og tarmenzymer (HDJ) utgjorde over 80% da det ikke var mulig å opprettholde mengden, som følge av lav enzymaktivitet. Det ble derfor ikke tilsatt noe vann utover det som finnes naturlig i fordøyelsesvæske, og elektrolyttløsning.*

<b>Ingrediens</b>	<b>Mengde</b>
<b>*Simulated Intestinal Fluid electrolyte stock solution (SIF) (1.25x)</b>	200 µL
<b>*HDJ</b>	3653 µL
<b>0.3 M CaCl<sub>2</sub></b>	10 µL
<b>1 M NaOH</b>	137 µL
<b>Vann (dH<sub>2</sub>O)</b>	-
<b>Total</b>	4000 µL

Prøvene som ble fordøyd, henholdsvis melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X ble standardisert til melkens proteinkonsentrasjon, 3,2 %. Nativ myse, WPC 80 og Ukjent X, ble fortynnet i destillert vann (dH<sub>2</sub>O), fra en utgangskonsentrasjon på henholdsvis 9,9 %, 77,4 % og 83 %. Produktene ble overført til 100 ml glassflasker med skrukork og varmebehandlet ved henholdsvis 63 °C i 30 min., og 90 °C i 120 min. i vannbad (Leuda AL18, Tyskland).

2 ml prøve ble pipettert over i et 50 ml plastrør, en liten magnetrører ble tilsatt for å sikre tilstrekkelig rotasjon i fordøyelsen (hastighetstrinn 5) på magnetplaten (IKAMAG RET200-250V, GmbH, Tyskland). Rørene ble holdt på is og tilsatt magesaft (HGJ) henholdsvis 880 µL og 1604 µL, elektrolyttløsninger (SGF), pH ble justert sakte til  $3,0 \pm 0,1$  ved hjelp av 1M HCl (Merck, Tyskland) og pH-meter (Methrom 827 pH lab, Sveits). Deretter ble prøvene ristet på vortex (Vortex Genie 2, Heigal Scientific industries, Bohemia, N.Y, USA) før prøvene ble satt i vannbad (37 °C) i 60 min. Etter 60 min. ble prøve 2 (G60) tatt ut, homogenisert ved hjelp av ultra turrax (Yellowline DI 18 basic, Tyskland), hastighet 6 i 10 sekunder, og fordelt til henholdsvis analyser av frie aminosyrer (2,2 ml) og gel elektroforese (500µl), resten ble oppbevart som backup ved -20 °C. Alle prøvene fryst ved hjelp av flytende nitrogen og oppbevart ved -20 °C. Den duodenale fordøyelsen ble satt i gang 15 min etter G60, for å sikre tid til å justere pH i prøven, samt tilsette duodenale enzymer. Tarmsaft (HDJ, 219 U/ml) og duodenal elektrolyttløsning (SIF) ble tilsatt. PH

ble justert til  $7,0 \pm 0,1$  med 1M NaOH (Merck, Tyskland) før prøvene ble satt i vannbad. Etter homogenisering ved ultra turrax ble det tatt ut prøver etter 5 min. (D5), 30 min. (D30) og 120 min. (D120). Alle enzymer, prøver ol, ble oppbevart på is og tint i isvann, med unntak av elektrolyttløsninger som ble oppbevart i vannbad. Figur 8 viser en oversikt over de ulike stegene i fordøyelsesprosessen og prøveuttak.



Figur 8. Flytskjema over *ex vivo* fordøyelse. Produkter ble standardisert, pasteurisert (69°C, 30 min) og UHT behandlet (90°C 120 min). Prøver, enzymer og elektrolyttløsninger ble tilsatt før justering av pH. Det ble foretatt uttak etter 60 min i gastrisk fase (G60), 5 min (D5), 30 min (D30) og 120 min (D120) i duodenal fase. Prøvene ble umiddelbart homogenisert 10 sek i ultra turrax og fryst ved hjelp av flytende nitrogen. Prøvene ble deretter lagret ved -20°C

### 3.3 Proteinseparering og degradering.

Identifisering av proteiner skjer ofte ved hjelp av fire ulike analysemetoder (O'Donnell et al. 2004). Proteinseparering, protein fordøyelse, MS analyser av peptider, samt observerte peptider sammenlignes med en database. Separering av proteiner kan gjøres på flere ulike måter, enten ved gel elektroforese eller væske kromatografi. Dette avhenger av hvilke fokusområder som skal

omtales. I denne oppgaven er det benyttet proteinseparering ved hjelp av Sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS- PAGE).

### **3.3.1 Proteinseparering ved natriumdodecyl sulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS- PAGE).**

SDS- PAGE er en metode der proteiner og andre makromolekyler separeres i henhold til størrelse ved bruk av elektroforese i en polyakrylamid gel (Laemmli 1970). Før elektroforesen ble prøvene tilsatt natriumdodecyl sulfat (SDS), som er en anionisk detergent. SDS tilsettes for at alle proteinene skal få en netto negativ ladning og videre kan separeres på bakgrunn av sin molekylvekt (MW). Prosedyren ble gjennomført i henhold til Bio Rad standard basert på Laemmli metoden. Alle løsninger som ble benyttet er basert på Bio-rad Laboratories anbefaling (Laboratories 2010). Prøvene opparbeides til samme konsentrasjon og tilsettes SDS-prøvebuffer tilsatt dithiotheitol (DTT) før proteinprøvene tilsettes. Prøvene ristes på vortex og varmes opp til 100 °C i 5 min., for denaturering av proteinene. Etter oppvarming avkjøles prøvene på is. Deretter tilsettes 7 µL prøvemateriale i hver brønn, før start av gel elektroforese. Etter kjøring ved 200V i omlag 40 min ble gelene fiksert, farget med Comassie Blue og tatt bilde av. Gelene ble oppbevart i preserveringsløsning.

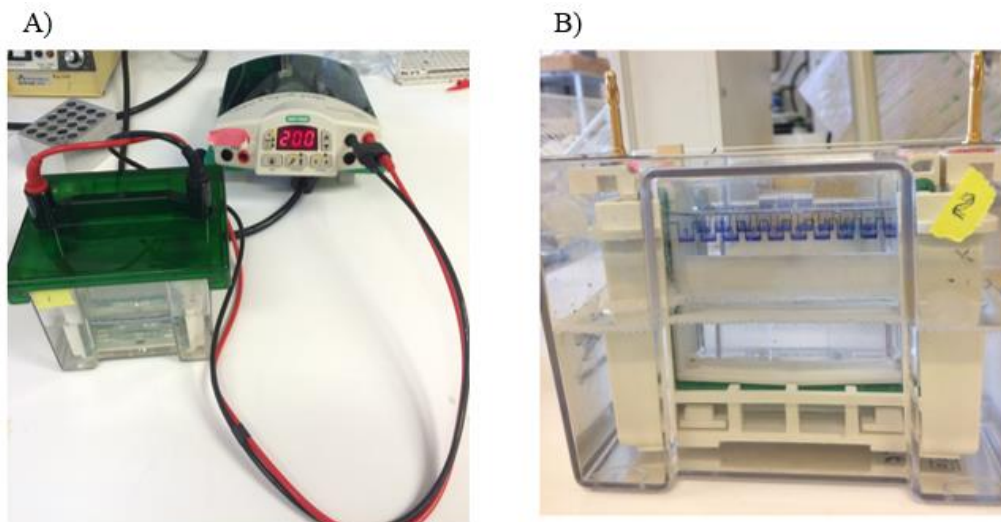
### **3.3.2 Tillaging av prøveløsninger til SDS-PAGE**

På grunn av ulik proteinkonsentrasjon etter fordøyelse ble ufordøyde prøver og G60- prøvene til samtlige produkter fortynnet med destillert vann (dH<sub>2</sub>O) tilsvarende duodenalfase (1:4). Prøvene ble oppbevart på is før tilsetting av prøvebuffer (Laboratories 2010). Prøvebuffer ble tilsatt DTT (Sigma, Aldrich, USA) rett før prøvelaging. 100 µl prøvemateriale ble fortynnet 1:1 med prøvebuffer og blandet på vortex (Vortex Genie 2, Heigal Scientific industries, Bohemia, N.Y, USA). Prøvene ble kokt på varmeblokk (Thermolyne Type 17600 Dri Bath, USA) ved 100 °C i ca. 5 min., for denaturering av proteinene. Prøvene ble deretter fryst ned til -20 °C og oppbevart fram til de skulle benyttes til gel elektroforese.

### **3.3.3 Tillaging av SDS polyakrylamidgel og elektroforese.**

Ferdige 12% akrylamidgeler (Bio-Rad Mini-PROTEAN® TGX™, Hemel Hempstead, Herts, UK) ble benyttet. Gelene ble vasket med dH<sub>2</sub>O, strips i underkant ble fjernet, gelen ble deretter plassert i gelkammeret. 1x runningbuffer (Laboratories 2010), ble tilsatt i midten av gelkammeret, resten av kammeret ble fylt opp 50 %. Figur 9 A og B viser anretningen

henholdsvis under og før elektroforesen. Det ble applisert 7  $\mu$ l molekylvektstandard (1:20 proteinstandard: prøvebuffer) i brønn 1, til venstre i figur B, deretter ble det applisert 7  $\mu$ l av henholdsvis; 0 prøve, G60, G60, D5, D5, D30, D30, D120 og D120. Lokk ble festet på og elektroforesen ble kjørt ved konstant spenning på 200 V i ca. 40 min ved hjelp av en Bio-Rad Power Basic 3 celle system (Bio Rad laboratories Ltd.).



Figur 9. Viser utstyr benyttet ved gel elektroforese. A) Biorad Gel elektroforesekar tilkoblet Biorad Power Basic ved konstant spenning (200V) i ca 40 min. B) Geler med 7 $\mu$ l påsatte prøver før gel-elektroforese.

Etter endt elektroforese ble gelene tatt ut fra glassplatene, renset med dH<sub>2</sub>O og lagt i en plastboks. Gelen ble tilsatt fikseringsløsning og ristet på 70/60 Hz ved hjelp av en ristemaskin (BioSan OS-10 orbital shaker, Montebello Diagnostics, Oslo) i 30 min. Gelen ble deretter farget med i 15 min, før den ble avfarget i 40 til 60 min. Gelene ble oppbevart i oppbevaringsløsning. Bilde av geler ble tatt ved hjelp av Biorad bildeprogram (Geldoc EZ imager, Biorad, UK). Alle løsninger benyttet ble laget etter Biorad og Lamkli protokollene (Laboratories, 2010, Laemmli 1970).

### 3.3.4 Identifisering av proteinbånd i SDS PAGE

Det ble ikke gjennomført en identifisering av de ulike proteinbåndene etter gel elektroforese. På bakgrunn av dette er identifiseringen basert seg på øvrig litteratur og kjent størrelse på proteinene. Molekylvekten til de ulike proteinene er beskrevet i Farrell Jr et al. (2004), hvor  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg,  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -kasein,  $\alpha_{s1}$  og  $\alpha_{s2}$  har en molekulstørrelse på henholdsvis 14,178 kDa, 18,363 kDa, 19,037 kDa, 24,023 kDa, 23,615 kDa og 25,226 kDa. Bovint serumalbumin (BSA)

er analysert til å ha en størrelse på 66,2 kDa (Madureira et al. 2007). Humane enzymer fra magesekk og tarm, er ikke identifisert i denne oppgaven. I Følge Lian (2012) og Devle et al. (2014) vil tarmenzymer bidra med proteiner av ulik størrelse, deriblant ved 30 kDa, 35 kDa og 40 kDa hvor det ble identifisert enzymer fra tarmsaft som inneholdt blant annet: Karboksypeptidase, kymotrypsin, kymotrypsin- lik elastase, karboksypeptidase, pankreatisk triacylglycerol, lipase, gastricin, pankreatisk  $\alpha$ - amylase og trypsin.

### **3.4 Analyse av frie aminosyrer ved RP-HPLC.**

Reversed phase- High- performance liquid chromatography (RP- HPLC) er en analysemetode som separerer aminosyrer. Metoden er basert på Bütikofer og Ardö (1999) og Moe et al. (2013) med modifikasjoner.

Prøver fra alle trinn i fordøyelsen (0-prøve, G60, D5, D30 og D120) ble tint i isvann. Som følge av lite prøvemateriale ble det benyttet 2,00 g i stedet for 5,00 g prøve, i tillegg ble mengden indre standardløsning justert, for å opprettholde samme konsentrasjon. Opparbeidelse av prøvene ble gjort ved å veie inn 2,00 g prøve i et 15 ml sterilt Nunc-rør. 2,00 ml indre standardløsning (0,4  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  L-norvalin (Sigma-Aldrich, Kina) ble tilsatt i 0,1 M HCl (Merck, Tyskland). Prøvene ble mikset i om lag 30 sek på MSI Minishaker Ika, Staufen, Tyskland) og satt i vendemaskin (Biosan Multi RS-60, Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 15 min. Prøvene ble deretter plassert i ultralydvannbad (Branson 2510E- MTH, Branson, USA) i 30 min før sentrifugering (Heraeus Multifuge X3R, Thermo scientific, Tyskland) i 40 min ved 2500xg (3400 rpm), 4 °C. 600 $\mu\text{L}$  4% trikloreddiksyre (TCA)(Merck, Tyskland) ble tilsatt til 600 $\mu\text{L}$  av supernatanten i et 1,5 ml eppendorfrør og blandingen ble mikset i en minishaker (Minishaker Ika, Staufen, Tyskland) før de ble avkjølt på is i 30 min.

Prøvene ble sentrifugert i en eppendorf 5415 D microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 15600xg i 5 minutter ved 4 °C. Prøvene ble overført til en 10 mL steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid) og deretter filtrert med 0,2 $\mu\text{m}$  cellulose acetat-filter (VWR, USA) med en engangskanyle på 0,8 x 40mm (Becton Dickinson S.A., Madrid) over i et nytt 1,5 mL eppendorfrør. 50  $\mu\text{L}$  ble overført til et HPLC rør og lagt på fryser (-20°C) før analysering. Resterende prøver ble oppbevart i fryser (-20 °C) som sikkerhetskopi.

Før separering ble prøvene tilsatt 350µl boratbuffer (0.4 M med pH 10,2; Agilent Technologies, Tyskland). Selve separeringen ble gjennomført av Kari Olsen (IKBM). Kalibrering ble gjennomført med standardløsninger opparbeidet på samme måte som prøvene. Komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsning. Kjente aminosyrer fra standarder var; GABA, L-alanin, L-arginin, L-aspargin, L-asparginsyre, L-citrullin, L-glutamin, L-glutaminsyre, L-glycin, L-histidin, L-isoleucin, L-leucin, L-lysin, L-metionin, L-norvalin, L-ornitin, L-serin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin løst i 0,1 M HCl (Merck).

### **3.5 Viskositetsmåling av produkt ved bruk av reometer.**

Viskositeten ble målt ved å benytte et reometer (Anton Paar, Physica MCR301, Østerrike). Det ble benyttet en 20 ml konsentrisk bob og cup (Standard measuring system CC27/T200/AL. Anton Paar GmbH, Anton-Paar-Str 20, A-8054 Graz, Østerrike). Reometeret ble koblet opp mot dataprogrammet, FLOW ORX. Rheoplus 3.0x.

Etter varmebehandling og påfølgende avkjøling av prøvene, ble 20 mL prøve tilsatt i koppen. Prøven ble varmet opp til 37 °C. Målinger ble gjennomført ved en fast skjærhastighet på 500 1/s. 10 punkter ble målt for hver parallell. Det ble målt 2 paralleller a 10 punkter av hvert gjentak, 3 gjentak av hvert produkt (totalt 60 punkter). Alle målinger ble gjennomført ved 37 °C for å simulere den viskositeten produktet vil ha i fordøyelsessystemet.

### **3.6 Statistiske analyser.**

Programmet R- commander ble benyttet for å kjøre statiske analyser på viskositet. Det ble ikke benyttet statiske analyser på FAA da disse kun hadde en parallell. Variansanalyser i form av toveis ANOVA (fra engelsk; analysis of variance), boksplokk og tukeys test ble benyttet. På bakgrunn av et ufullstendig design var det nødvendig å dele opp de statiske analysene for å innlemme så mange faktorer som mulig. Analysene ble delt inn i datasett A og datasett B. Datasett A er vist som grønn firkant i Figur 10 og inneholder alle produktene, men ubehandlet produkt er fjernet på bakgrunn av at det ikke finnes ubehandlet melk. I datasett B, blå firkant i Figur 10, viser kun nativ myse, WPC80 og ukjent X, men da med alle varmebehandlinger.



	Melk	Nativ Myse	WPC80	Ukjent X
Ubehandlet	0	60	60	60
Pasteurisert	60	60	60	60
UHT	60	60	60	60

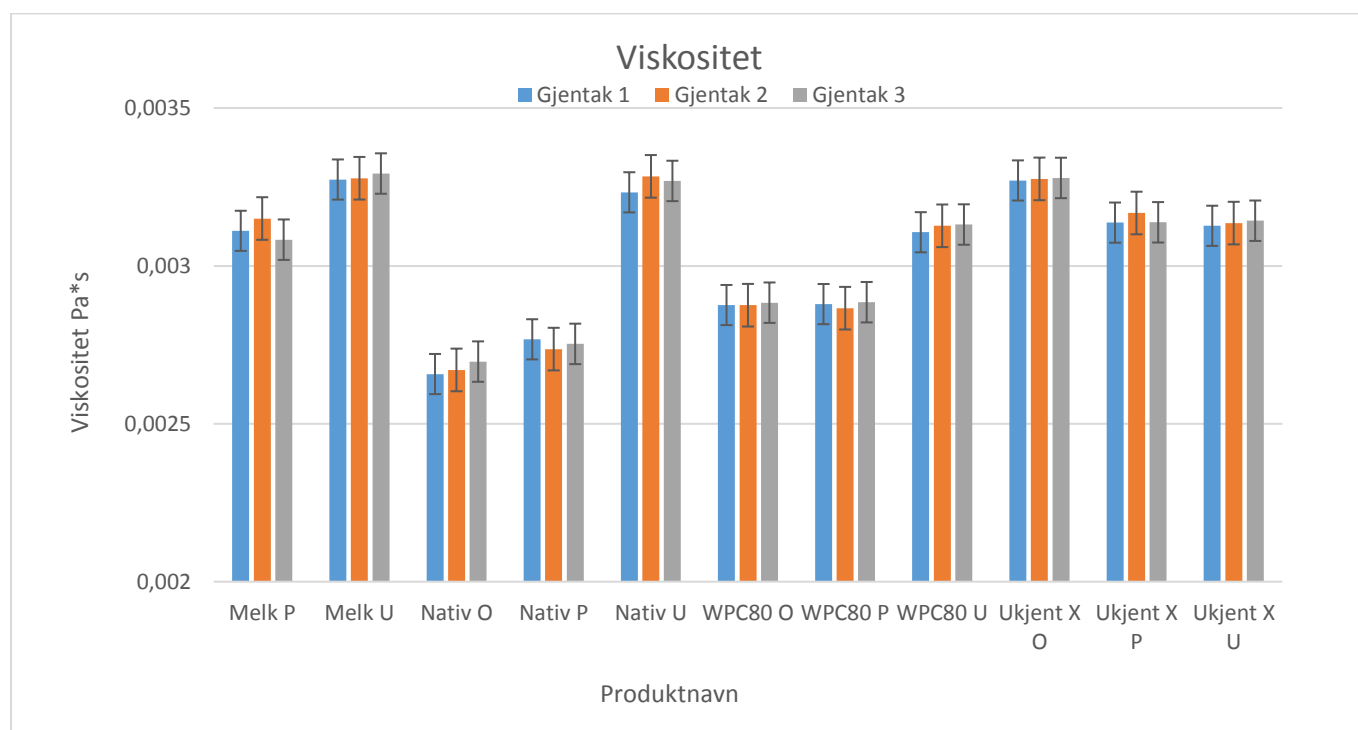
Figur 10. Viser inndelingen av datasett A, markert i grønt som innlemmer alle produkter, men kun pasteurisert og UHT-behandlet produkt. Datasett B markert i blått innlemmer alle varmebehandlinger, men ekskluderer melk i sin helhet.



## 4 Resultater

### 4.1 Viskositetsmåling av melk, nativ myse WPC80 og et ukjent proteinpreparat.

Viskositet (Pa\*s) ble undersøkt ved hjelp av reometer. Det ble ikke funnet store forskjeller mellom de ulike parallellene av henholdsvis melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X. Figur 11 viser en grafisk fremstilling av viskositeten til de ulike produktene med utgangspunkt i gjennomsnittet av de 3 parallellene, samt standardavvik. Det ble bestemt at alle 3 paralleller skulle innlemmes i de statistiske analysene på bakgrunn av dette. Tallmaterialet for gjennomsnitt er gitt i vedlegg 2.



Figur 11. Viskositetsmåling av de ulike produktene (melk, nativ myse, myseproteinkonsentrat (WPC80) og en ukjent ingrediens (ukjent X)) ble gjort ved tre ulike varmebehandlinger (ubehandlet (O), pasteurisert (P) og langtidsvarmebehandlet (U)) i reometer. Tallmaterialet bygger på tre paralleller av 20 punkter, totalt 60 punkter per produkt ved ulik varmebehandling.

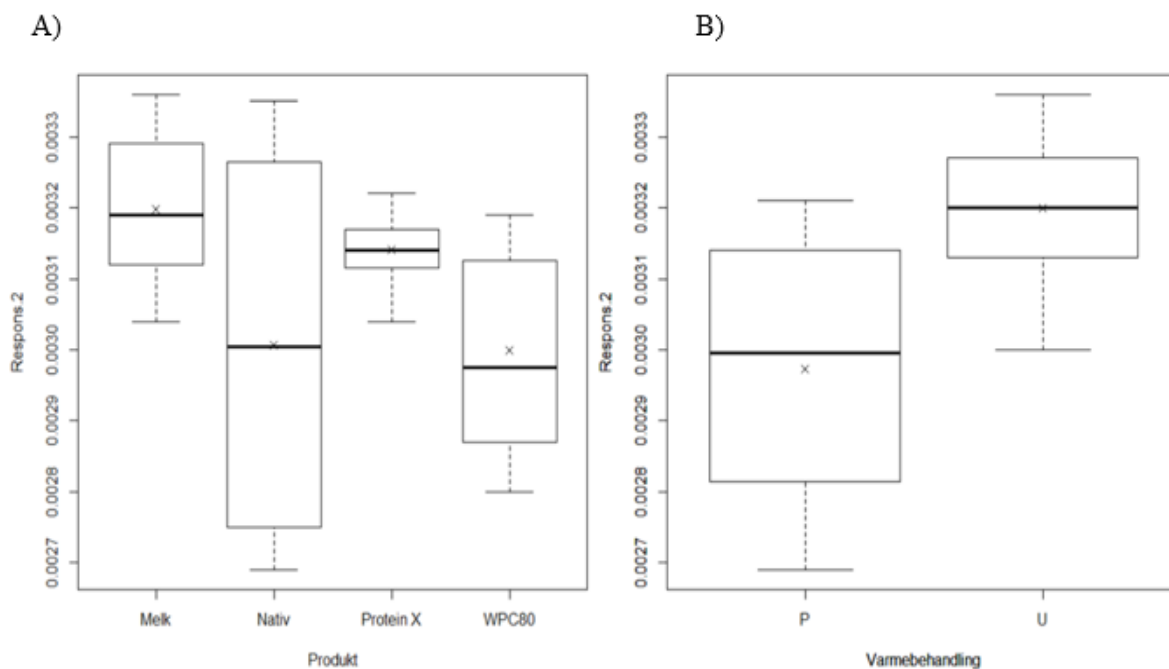
De statistiske analysene delt opp i to, da ubehandlet melk ikke inngikk i analysene. For å kunne dekke både samtlige fire produkter, i tillegg til varmebehandlingene, var denne inndelingen hensiktsmessig. I første datasett ble alle resultater fra originale produkter utelukket, heretter datasett A. I andre datasett ble melk tatt ut, heretter datasett B. Dette skyldes manglende tilgang

og dermed manglende forsøk på upasteurisert melk. Forskjeller mellom og innad i de ulike produktene vil bli beskrevet senere.

#### 4.1.1 Variasjon i data

Statistisk analyse ble gjennomført ved hjelp av statistikkprogrammet «R-commander».

Variasjonen i viskositet i datasettene er vist ved hjelp av to ulike boks plott, Figur 12. A viser forskjellen mellom gjennomsnittet av alle viskositetsmålinger i de ulike produktene. B viser hovedforskjellen i gjennomsnittet av viskositeten som følge av varmebehandlingene; pasteurisert (P) og langtidvarmebehandling (U).

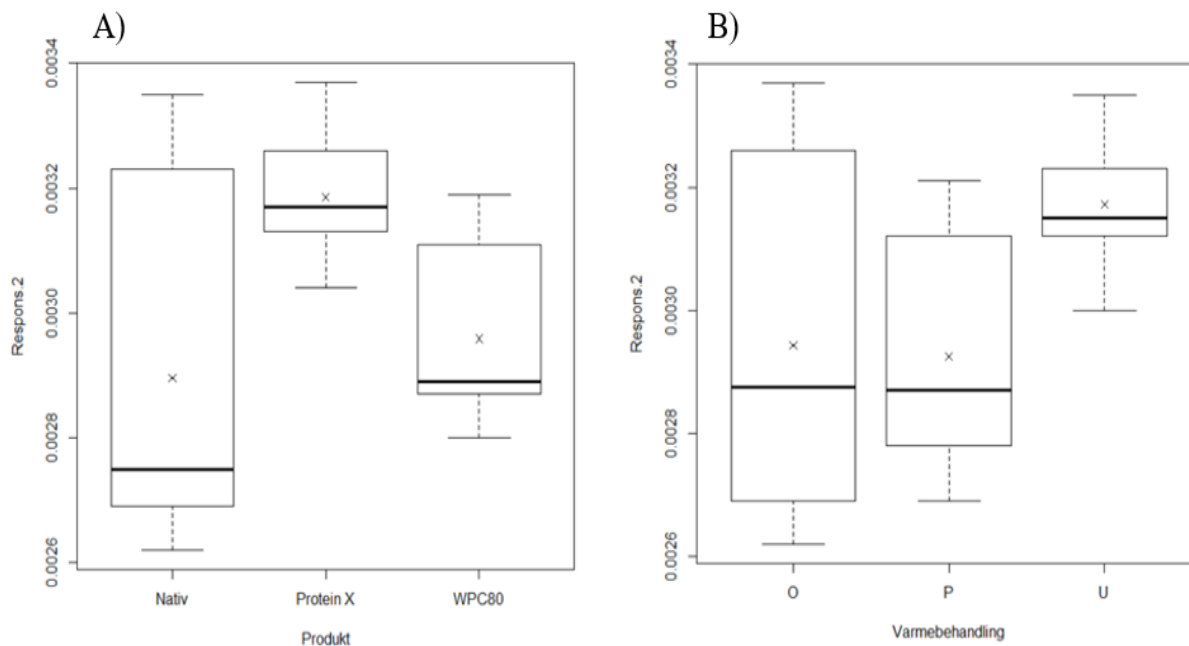


Figur 12. A) Illustrerer effekten av produkt på viskositet i produktet. Original er fjernet fra sammenligningen som følge av manglende datasett i «melk». B) viser effekten av varmebehandling Pasteurisert (P) og UHT- behandlet (U). Ubehandlet produkt (O) er fjernet fra datasettet som følge av manglende datasett i «melk».

Det ble sett en spredning over grad av variasjon i produktene, heltrukken svart linje illustrerer gjennomsnitt, mens boksen viser grad av variasjon innad i produktet eller varmebehandling. Det ble oppdaget en større variasjon i dataene til nativ myse, sammenlignet med de andre. Minst variasjon ble sett i ukjent X.

Datasett B inneholder ikke viskositetsmålinger fra melk, siden det ikke er gjort analyser på ubehandlet melk. Figur 13 viser en oversikt ved hjelp av to ulike boks-plott, som forklarer

variasjonen i henholdsvis A) forskjell i viskositet i produkt og B) forskjell i viskositet som følge av varmebehandling (ubehandlet (O), pasteurisert (P) og langtidsvarmebehandlet/UHT-behandlet (U)).



Figur 13. A) Viser forskjellen i produktene; Nativ myse, WPC80 og et ukjent proteinpreparat. B) Viser sammenligning av varmebehandling i nativ myse, myseproteinkonsentrat (WPC80) og en ukjent proteiningrediens (Protein X). Melk er utelatt fra datasettet i både A) og B) som følge av ufullstendig datasett.

Gjennomsnittet vises som heltrukken svart linje, mens variasjonen er illustrert med «boksen» rundt. Det ble sett størst variasjon i data i nativ myse, mens ukjent X hadde mindre variasjon. Variasjonen i ubehandlet produkt (O), viser større variasjon enn langtidsvarmebehandling (U).

#### 4.1.2 Statistiske analyser og interaksjonseffekter.

Toveis variansanalyse (ANOVA) og Tukeys metode ble benyttet for å undersøke variasjon i viskositet i og mellom produktene (melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X) og temperaturbehandling.

Tabell 5 viser resultater fra toveis variansanalyse samt Tukeys rangeringsmetode. Tabellen er delt opp i to som følge av to ulike datasett. Datasett A innlemmer data kun fra varmebehandlede produkter, ikke ubehandlet produkt. Datasett B inkluderer alle varmebehandlinger, men melk er ekskludert fra datasettet som følge av manglende tilgang og dermed analyse på rå melk. Det ble sett signifikante forskjeller i viskositet i samtlige produkter, signifikante målinger er illustrert ved hjelp av tre stjerner (\*\*\*)

Tabell 5. Resultater fra statistiske analyser av viskositet (Pa\*s) ved hjelp av toveis ANOVA og Tukeys metode. Tabellen er delt opp i to, da forsøkene måtte kjøres hver for seg, som følge av manglende datasett. «Datasett A» omhandler alle pasteuriserte og langtidsvarmede produkter (melk, nativ myse, myseproteinkonsentrat (WPC80) samt en ukjent ingrediens (Ukjent X)), mens «datasett B» ekskluderer melk, mens de tre andre produktene innlemmet i sin helhet. Små bokstaver indikerer utfall fra Tukeys metode hvor produktene og varmebehandlingen er gruppert, bokstavene kan kun sammenlignes kolonnevis. P-verdi <0,05 ble satt som signifikansnivå, tre stjerner (\*\*\*) indikerer signifikansnivå <0,001.

	<i>Datasett A (Uten original)</i>			<i>Datasett B (Uten Melk)</i>		
	<b>Viskositet Gjennomsnitt (mPa*s)</b>	<b>Standard avvik (mPa*s)</b>	<b>Pr(&gt;t)</b>	<b>Gjennomsnitt (mPa*s)</b>	<b>Standardavvik (mPa*s)</b>	<b>Pr(&gt;t)</b>
<i>Melk</i>	3,20 <sup>A</sup>	± 2,849e <sup>-03</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***			
<i>Nativ</i>	3,14 <sup>B</sup>	±2,849e <sup>-03</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***	2,90 <sup>A</sup>	± 1.962510e <sup>-02</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***
<i>Ukjent x</i>	3,01 <sup>C</sup>	±2,849e <sup>-03</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***	3,19 <sup>B</sup>	± 5.394939e <sup>-03</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***
<i>WPC80</i>	3,00 <sup>B</sup>	±1.157789e <sup>-02</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***	2,96 <sup>C</sup>	± 8.862098e <sup>-03</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***
<i>Original</i>				2,94 <sup>X</sup>	± 1,873644e <sup>-02</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***
<i>Pasteurisert</i>	2,97 <sup>X</sup>	±1.088006e <sup>-02</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***	2,93 <sup>X</sup>	± 1,256671e <sup>-02</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***
<i>UHT behandling</i>	3,20 <sup>Y</sup>	±5.247033e <sup>-03</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***	3,17 <sup>Y</sup>	± 5,473981e <sup>-03</sup>	<2e <sup>-16</sup> ***

Tabell 6 viser interaksjonseffekter mellom de ulike produktene og som følge av varmebehandling. To datasett er presentert i samme tabell, «uten original» og «uten melk». Det ble sett signifikante forskjeller (p<0,001) i viskositet i samtlige produkter med unntak av mellom nativ myse og WPC80. Det ble sett signifikant forskjell mellom original og UHT behandling, samt pasteurisert og UHT behandlet produkt. Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell i viskositet mellom original- og pasteurisert produkt.

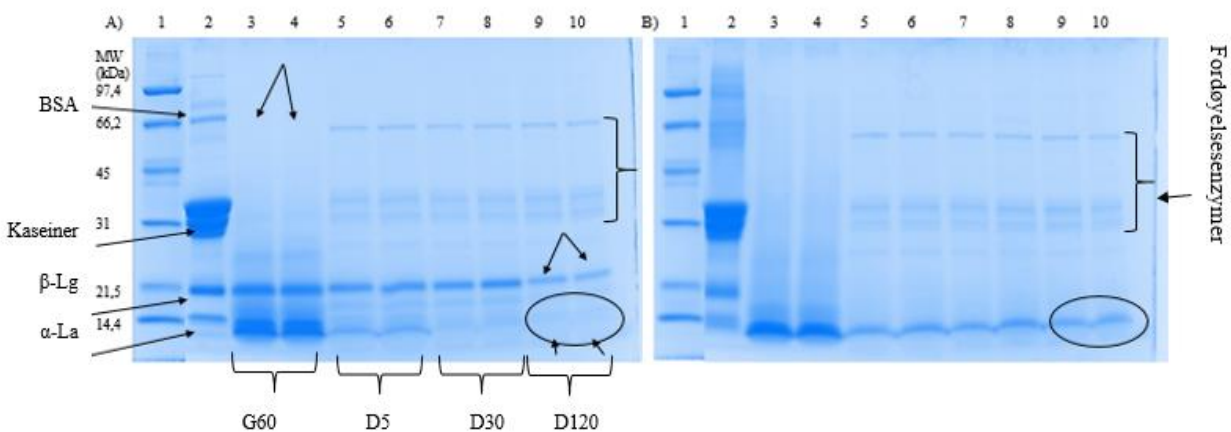
Tabell 6. Interaksjonseffekt mellom produkt og ulike varmebehandlinger på viskositet (Pa\*s). Tomme felter indikerer manglende datasett og analysene er derfor analysert ved hjelp av to ulike datasett. «Uten original» innlemmer samtlige produkter (melk, nativ myse, myseproteinkonsentrat (WPC80) samt en ukjent ingrediens (Ukjent X), men kun ved to ulike varmebehandlinger (pasteurisering og langtids varmebehandling). «Uten melk» innlemmer samtlige varmebehandlinger, men kun Nativ myse, WPC80 og ukjent X. Signifikansnivået er satt til p<0,05 (\*). Tre stjerner (\*\*\*) indikerer et signifikansnivå på 0,001.

<i>Produkt/ Varmebehandling</i>	<i>Uten original</i>	<i>Uten Melk</i>
	<b>Pr(&gt;t)</b>	<b>Pr(&gt;t)</b>
<i>Melk – Nativ</i>	2.81e <sup>-11</sup> ***	
<i>Melk-protein X</i>	2.81e <sup>-11</sup> ***	
<i>Melk WPC80</i>	2.81e <sup>-11</sup> ***	
<i>Nativ – Protein X</i>	2.81e <sup>-11</sup> ***	3,31e <sup>-10</sup> ***
<i>Nativ -WPC80</i>	0,315	1,85e <sup>-05</sup> ***
<i>Protein X- WPC80</i>	2.81e <sup>-11</sup> ***	3,31e <sup>-10</sup> ***
<i>Original- Pasteurisert</i>		0,419
<i>Original- UHT</i>		3,31e <sup>-10</sup> ***
<i>Pasteurisert – UHT</i>	2.81e <sup>-11</sup> ***	3,31e <sup>-10</sup> ***

## 4.2 Proteindegradering av melk, nativ myse, WPC80 og en ukjent proteiningrediens med mage og tarmsaft.

Nedbrytningen av proteinene i de ulike produktene (nativ myse, myseproteinkonsentrat (WPC80), en ukjent ingrediens (ukjent X) og melk) ble undersøkt ved SDS-PAGE. Prøver av de ulike produktene ble tatt ut før fordøyelse, etter fordøyelse i magesekk i 60 min. (G60), og i tarm etter 5 min. (D5), 30 min. (D30) og 120 min. (D120).

Figur 14 viser proteindegradering i A) pasteurisert melk samt B) langtidsvarmebehandlet melk.

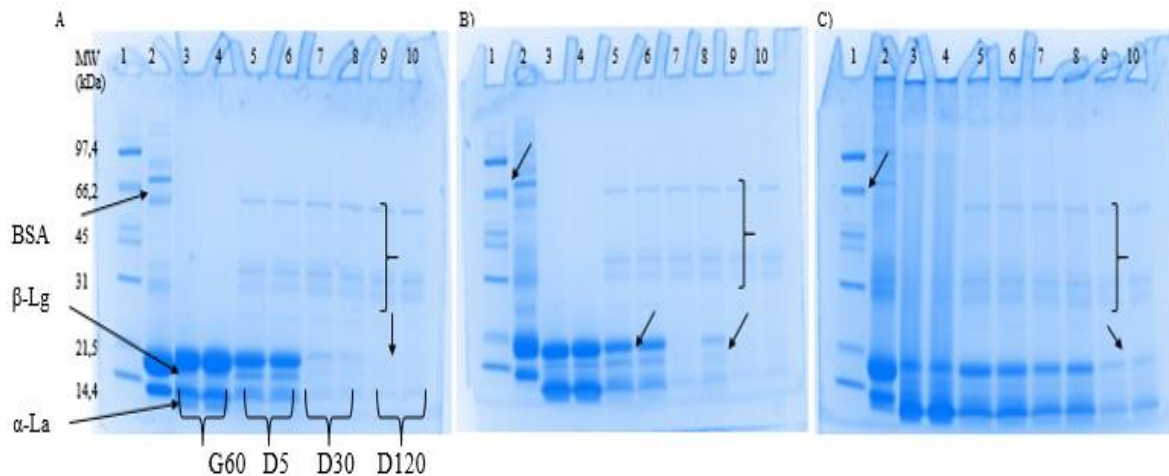


Figur 14. SDS-PAGE geler fra Melk. A) viser pasteurisert lettmelk, B) viser langtidsvarmebehandlet lettmelk ved 90°C i 120 min. Det er applisert 7µl prøve i samtlige brønner i følgende rekkefølge; 1) Proteinstandard, 2) nullprøve, 3) gastrisk fase etter 60 min (G60), 4) G60 parallell 2, 5) duodenal prøve etter 5 min (D5), 6) D5 2. parallell, 7) duodenal prøve etter 30 min (D30), 8) D30 2. parallell, 9) Duodenal prøve etter 120 min (D120), 10) D120 2. parallell.

Resultatene viser en større degradering av  $\alpha$ -La ved molekylvekt (MW) 14,4, som følge av lenger tid i fordøyelsen i pasteurisert lettmelk (A), sammenlignet med langtidsvarmebehandlet melk (B). Piler viser proteinbånd i brønn 9 og 10 (D120), som er degradert i større grad enn bånd 3 til 8.  $\beta$ -Lg ved MW på ca 18 kDa, syntes å være degradert allerede i magesekk (G60) i langtidsvarmebehandlet melk (B), men ikke i pasteurisert melk (A). Brønn 3 og 4 indikerer prøver fra magesekk, det ble ikke sett proteiner i størrelsesorden MW 25 til 40 i G60, mens det i 0-prøve og duodenale prøver er funnet spor. Dette tyder på at kaseiner blir fullstendig degradert i magesekk.

Figur 15 viser degraderingen av proteinene i A) ubehandlet nativ myse, B) pasteurisert nativ myse ved 63 °C i 30 min., C) langtidsvarmebehandlet nativ myse ved 90 °C i 120 min.

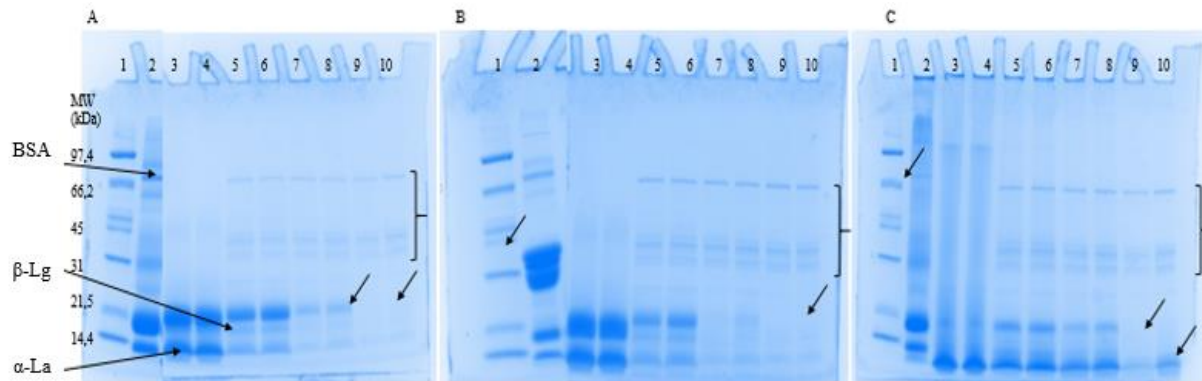




Figur 15. SDS-PAGE geler fra nativ myse. A) viser ubehandlet nativ myse, B) viser pasteurisert nativ myse ved 63°C i 30 min, C) viser langtidsvarmebehandlet nativ myse ved 90°C i 120 min. Det er applisert 7µl prøve i samtlige brønner i følgende rekkefølge; 1) Proteinstandard, 2) nullprøve, 3) gastrisk fase etter 60 min (G60), 4) G60 parallell 2, 5) duodenal prøve etter 5 min (D5), 6) D5 2. parallell, 7) duodenal prøve etter 30 min (D30), 8) D30 2. parallell, 9) Duodenal prøve etter 120 min (D120), 10) D120 2. parallell.

Det ble sett variasjon i degradingen i de native myseproteinene. Det ble sett en større degrading av  $\beta$ -Lg og  $\alpha$ -La ved ubehandlet myse (A), enn ved langtidsvarmebehandlet nativ myse (C), hvor brønn 9 og 10 (D120) viser tydelig tilstedeværelse av både  $\beta$ -Lg og  $\alpha$ -La. Parallellene fra D30 i brønn 7 og 8 stemmer ikke overens. Sannsynligvis kan det være pipetteringsfeil som forårsaker denne ulikheten. Det er observert enkelte forskjeller i peptidbånd ved MW ca. 18, dette er trolig  $\beta$ -Lg. I figur A er bredden på båndene stor, det er derfor vanskelig å skille proteinene fra hverandre. Det er enklere å se trenden i figur B og C, hvor båndene er svakere ved 18 kDa i figur C, sammenlignet med figur B. Ingen tilstedeværelse av BSA ved 66,2 kDa, i G60 viser fullstendig degrading i magesekk. I D5 til D120 vises fordøyelsesenzymmer mellom 30kDa og 45 kDa.

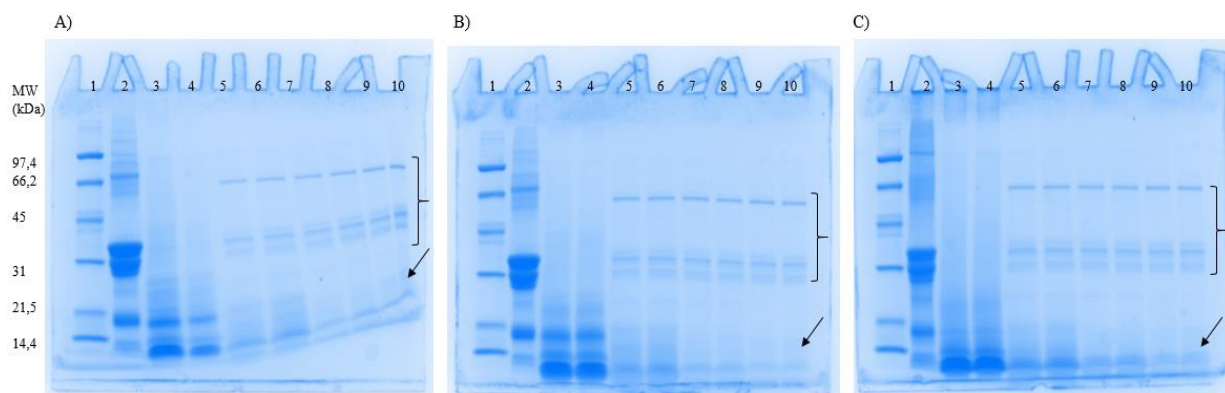
Degradering av WPC80 ble undersøkt og illustreres som geler i Figur 16. Ubehandlet produkt vises i gel A, mens B og C viser pasteurisert og langtidsvarmebehandlet WPC80. Nullprøven i brønn 2 figur B skiller seg ut fra øvrige nullprøver av WPC80. Tydelig tilstedeværelse av kaseiner med størrelse mellom 25 kDa og 40 kDa, kan tyde på feil applisering av prøvemateriale i gel. Degradering av BSA ved ca. 66,2 kDa er fullstendig etter G60. Degraderingen av  $\alpha$ -La i WPC80 er større i ubehandlet og pasteurisert WPC80, sammenlignet med langtidsvarmebehandlet WPC80. Tydelige bånd ved 14,4 kDa og nedover indikerer tilstedeværelse av  $\alpha$ -LA, eller mindre peptidfragmenter i UHT-behandlet produkt.



Figur 16. SDS-PAGE geler fra myseproteinkonsentrat (WPC80) A) viser ubehandlet WPC80, B) viser pasteurisert WPC80 ved 63°C i 30 min, C) viser langtidsvarmebehandlet WPC80 ved 90°C i 120 min. Det er applisert 7µl prøve i samtlige brønner i følgende rekkefølge: 1) Proteinstandard, 2) nullprøve, 3) gastrisk fase etter 60 min (G60), 4) G60 parallell 2, 5) duodenal prøve etter 5 min (D5), 6) D5 2. parallell, 7) duodenal prøve etter 30 min (D30), 8) D30 2. parallell, 9) Duodenal prøve etter 120 min (D120), 10) D120 2. parallell.

Degradering av  $\beta$ -Lg går raskere i pasteurisert WPC80 enn ubehandlet. Ubehandlet WPC80 viser fullstendig degradering av  $\beta$ -Lg etter 120 min, mens pasteurisert WPC80 viser omtrent fullstendig degradering etter 30 min. UHT- behandling av WPC80 fører til at  $\beta$ -Lg degraderes saktere enn ved pasteurisert produkt, fullstendig degradering av  $\beta$ -Lg i UHT-behandlet produkt syntes ved D120.

Degradering av ukjent X illustreres som geler i Figur 17. Ubehandlet produkt vises i gel A, mens B og C viser henholdsvis pasteurisert- og UHT-behandlet ukjent X.



Figur 17. SDS-PAGE geler fra en ukjent ingrediens (ukjent X). A) viser ubehandlet ukjent X, B) viser pasteurisert ukjent X ved 63°C i 30 min, C) viser langtidsvarmebehandlet ukjent X ved 90°C i 120 min. Det er applisert 7µl prøve i samtlige brønner i følgende rekkefølge: 1) Proteinstandard, 2) nullprøve, 3) gastrisk fase etter 60 min (G60), 4) G60 parallell 2, 5) duodenal prøve etter 5 min (D5), 6) D5 2. parallell, 7) duodenal prøve etter 30 min (D30), 8) D30 2. parallell, 9) Duodenal prøve etter 120 min (D120), 10) D120 2. parallell.

Resultatene viser mindre variasjon i proteindegradering i ukjent X sammenlignet med de andre produktene (melk, nativ myse og WPC80) på bakgrunn av varmebehandlingene. Det er tydelig

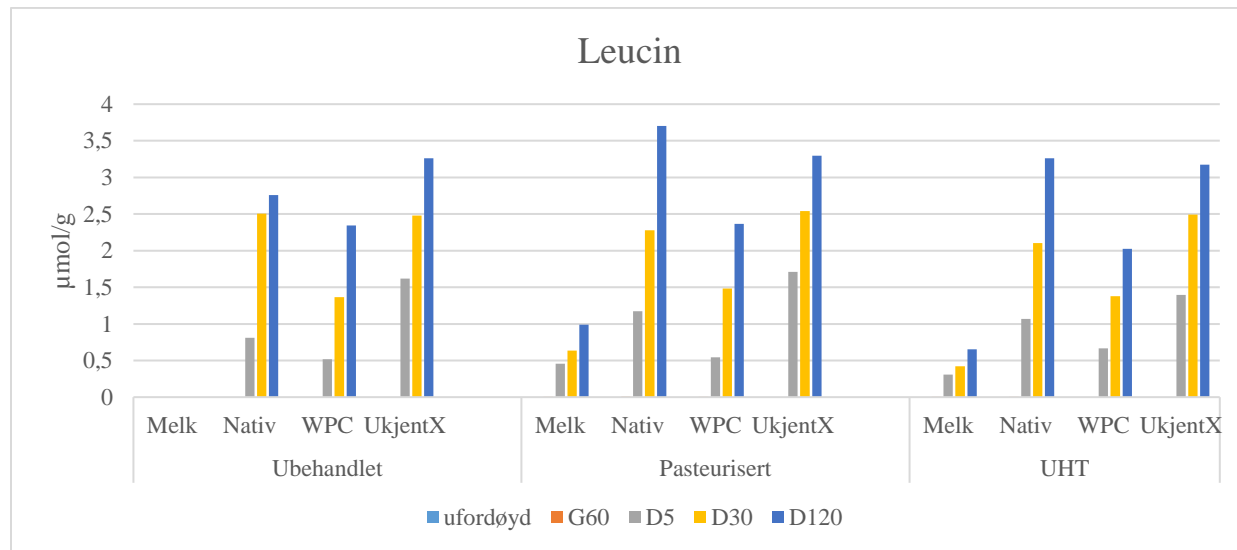
forskjell mellom 0-prøver og D120 i henholdsvis brønn 2 og 9 og 10, men forskjellen mellom ubehandlet (A) og langtidsvarmebehandlet (B) er ikke like stor som i øvrige produkter. Kaseiner i spekteret 25kDa til 40 kDa ble observert i samtlige nullprøver, men ikke etter fordøyelse i magesekk (G60). Dette tyder på at kaseiner degraderes fullstendig i magesekk uavhengig av varmebehandling. BSA ved 66,2 kDa degraderes fullstendig i magesekk i samtlige varmebehandlinger. Proteiner i spekteret 31-40, er tydelig i alle prøver fra tynntarm (brønn 5-10) etter samtlige varmebehandlinger, dette skyldes de humane tarmentzymene som ble benyttet i forsøket. Degradering av  $\beta$ -Lg er fullstendig i samtlige varmebehandlinger, mens  $\alpha$ -La virker ufullstendig degradert med rester i samtlige varmebehandlinger.

### **4.3 Frigjøring av frie aminosyrer før og etter *ex vivo* fordøyelse (HPLC)**

Tilstedeværelse av frie aminosyrer og eventuelle mengder, ble undersøkt fra samtlige produkter, varmebehandlinger og på ulike steg i fordøyelsesprosessen ved hjelp av HPLC. Prøver med ulik startkonsentrasjon ble regnet om, og vises i vedlegg 2. Alle verdiene er oppgitt i  $\mu\text{mol/g}$ . Resultatene er presentert grafisk i Figur 18 til Figur 25 og viser endring i aminosyreinnhold på bakgrunn av produkt, varmebehandling og hvilket steg i fordøyelsesprosessen prøven er tatt ut. Ikke alle aminosyrer som ble undersøkt er presentert i sin helhet, resterende tallmateriale er lagt ved i vedlegg 3. Denne resultatdelen legger vekt på essensielle aminosyrer, med hovedfokus på de tre forgrenede aminosyrene (BCAA) Leucin (Leu), Isoleucin (Ile) og Valin (Val). Det gjøres oppmerksom på at konsentrasjoner av ulike aminosyrer ble funnet svært forskjellige. På bakgrunn av dette er y-aksen tilpasset hver enkelt frie aminosyre.

### 4.3.1 Frigjøring av forgrenede aminosyrer (BCAA) før og etter *ex vivo* fordøyelse

Det ble sett varierende innhold av Leu som følge av varmebehandling, produkt og steg i fordøyelsen, Figur 18.

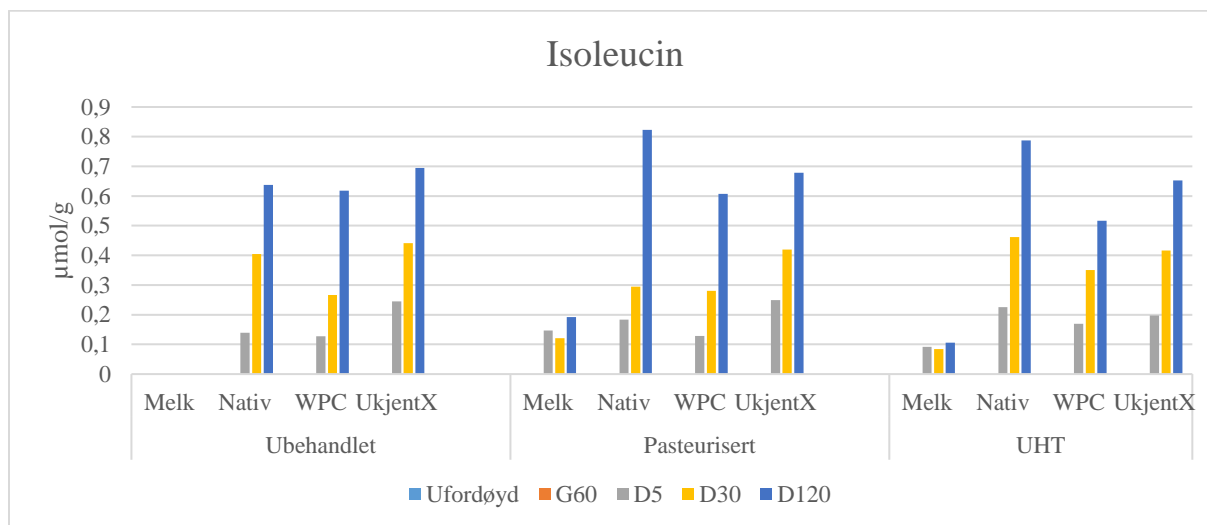


Figur 18. Innhold av Leucin (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og et ukjent produkt (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30 og D120).

Det ble ikke funnet spor av Leu i ufordøyd prøver, eller etter 60 min fordøyelse i magesekk (G60). Deretter ble det observert økende mengder Leu som følge av lengre oppholdstid i «tynntarmen». Etter 120 min i duodenal fordøyelse (D120) ble det sett høyest konsentrasjon av Leu i samtlige ubehandlede produkter med en variasjon fra 2,343  $\mu\text{mol/g}$  i WPC80 til 3,261  $\mu\text{mol/g}$  i ukjent X. Det ble sett en økning i leucinkonsentrasjon som følge av pasteurisering i samtlige produkter, med en variasjon fra 0,989  $\mu\text{mol/g}$  i melk til 3,704  $\mu\text{mol/g}$  i nativ myse. Langvarig varmebehandling gav varierende resultat på bakgrunn av individuelle forskjeller i produkt. Det ble sett en reduksjon i Leu fra pasteurisert produkt til UHT-behandling i samtlige produkter. Lavest innhold av Leu etter UHT-behandling hadde melk med 0,651  $\mu\text{mol/g}$ . Nativ myse hadde høyest innhold av Leu etter UHT-behandling med 3,26  $\mu\text{mol/g}$ , mens ukjent X og WPC80 hadde henholdsvis 3,175  $\mu\text{mol/g}$  og 2,023  $\mu\text{mol/g}$ .

Innhold av Ile varierte i de ulike produktene, Figur 19. Det ble sett lavere konsentrasjon av Ile i melk, sammenlignet med de andre produktene. Det ble ikke observert Ile i 0-prøver eller etter 60 min i magesekk i noen av produktene. I ubehandlede produkter etter fordøyelse (D120) ble det

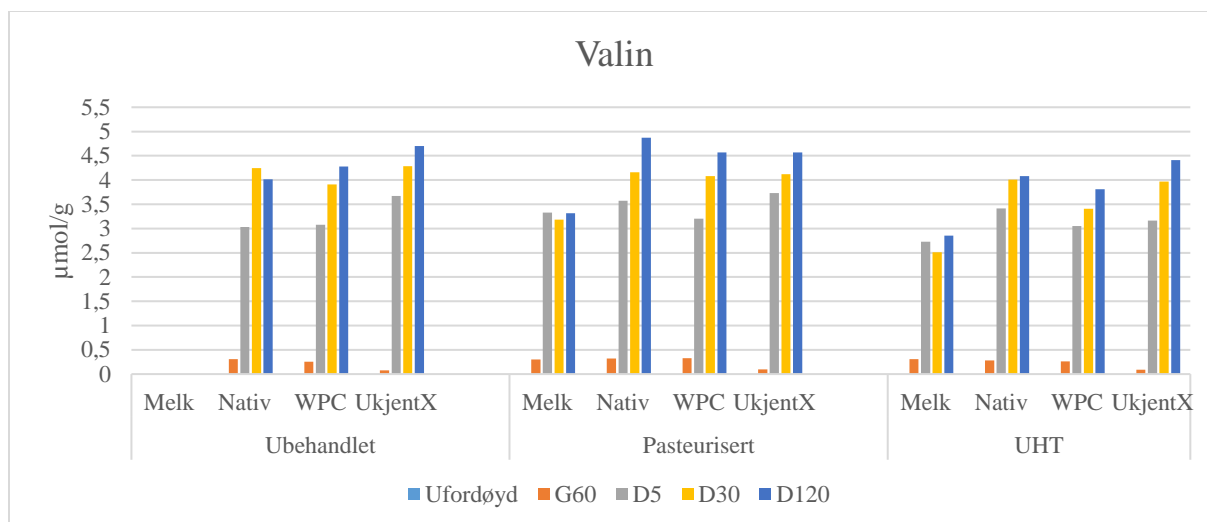
sett en variasjon i konsentrasjonen av Ile fra 0,618  $\mu\text{mol/g}$  i WPC80, til 0,637  $\mu\text{mol/g}$  og 0,695  $\mu\text{mol/g}$  i henholdsvis nativ myse og ukjent X.



Figur 19. Innhold av Isoleucin (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og et ukjent produkt (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30 og D120).

Etter pasteurisering ble det sett en økning i Ile konsentrasjon i nativ myse til 0,823  $\mu\text{mol/g}$ , mens WPC80 og ukjent X reduserte konsentrasjonen av Ile til henholdsvis 0,607  $\mu\text{mol/g}$  og 0,678  $\mu\text{mol/g}$ . I pasteurisert lettmeik ble innholdet av Ile målt til 0,192  $\mu\text{mol/g}$ . UHT- behandling reduserer konsentrasjonen av Ile i samtlige produkter, sammenlignet med pasteurisert produkt, hvor melk hadde laveste konsentrasjon med 0,106  $\mu\text{mol/g}$ . Nativ myse hadde høyest innhold av Ile etter UHT-behandling med 0,787  $\mu\text{mol/g}$ , sammenlignet med de andre produktene. WPC80 og ukjent X hadde henholdsvis 0,517  $\mu\text{mol/g}$  og 0,653  $\mu\text{mol/g}$  etter UHT-behandling av produktene.

Innholdet av Val varierte som følge av produkt, varmebehandling og steg i fordøyelsesprosessen Figur 20. Det ble ikke sett Val i nullprøvene, men etter 60 min i magesekk ble det observert lave konsentrasjoner av Val i samtlige produkter og varmebehandlinger.

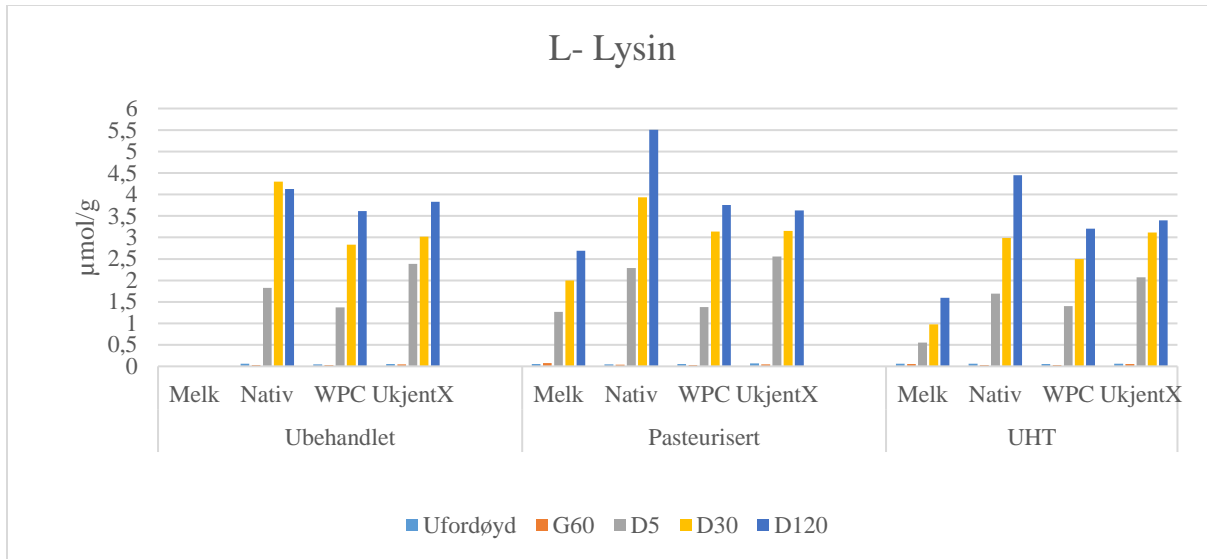


Figur 20. Innhold av Valin (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og et ukjent produkt (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30 og D120).

I ubehandlede produkter ble det sett høyest konsentrasjon av Val i ukjent X med en konsentrasjon på  $4,7 \mu\text{mol/g}$ , hvor nativ myse og WPC80 hadde en konsentrasjon av Val på henholdsvis  $4,015 \mu\text{mol/g}$  og  $4,279 \mu\text{mol/g}$ . Etter pasteurisering ble det sett høyest konsentrasjon av Val i nativ myse med  $4,87 \mu\text{mol/g}$ . Melk WPC80 og ukjent X hadde en konsentrasjon av Val på henholdsvis  $3,314 \mu\text{mol/g}$ ,  $4,571 \mu\text{mol/g}$  og  $4,57 \mu\text{mol/g}$ . Alle produkter med unntak av ukjent X hadde redusert konsentrasjon som følge av langtidsvarmebehandling, men forskjellen varierte som følge av produkt.

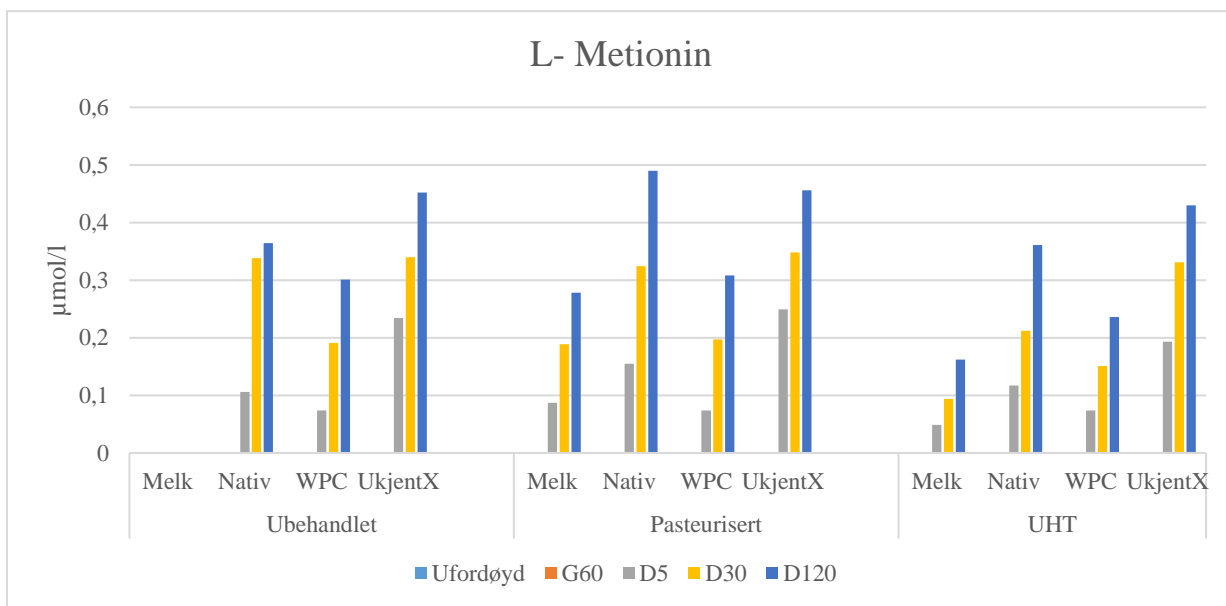
#### 4.3.2 Frigjøring av andre essensielle aminosyrer etter *ex vivo* fordøyelse

Innholdet av Lysin (Lys) varierte i de ulike produktene, som følge av varmebehandling og som følge av ulike steg i fordøyelsesprosessen, Figur 21. Det ble funnet ingen eller små mengder Lys i nullprøver og etter 60 min i magesekk. Innholdet av Lys var lavest i melk etter samtlige varmebehandlinger. Høyest innhold av Lys ble funnet i nativ myse, uavhengig av varmebehandling. I ubehandlede produkter ble det sett høyest innhold av Lys i nativ myse etter D120 med en konsentrasjon på  $4,129 \mu\text{mol/g}$ . WPC80 og ukjent X hadde en lysinkonsentrasjon på henholdsvis  $3,612 \mu\text{mol/g}$  og  $3,831 \mu\text{mol/g}$ . Etter pasteurisering og UHT-behandling ble høyest innhold av Lys funnet i nativ myse med henholdsvis  $5,507 \mu\text{mol/g}$  og  $4,45 \mu\text{mol/g}$ . Det ble sett en reduksjon i Lys fra pasteurisert til UHT-behandlet produkt i samtlige produkter.



Figur 21. Innhold av Lysin (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og et ukjent produkt (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30 og D120).

Innholdet av Metionin (Met) varierte som følge av temperaturbehandling produkt og steg i fordøyelsen. Det ble sett en økning i innhold av Met ved pasteurisering i nativ myse og WPC80,

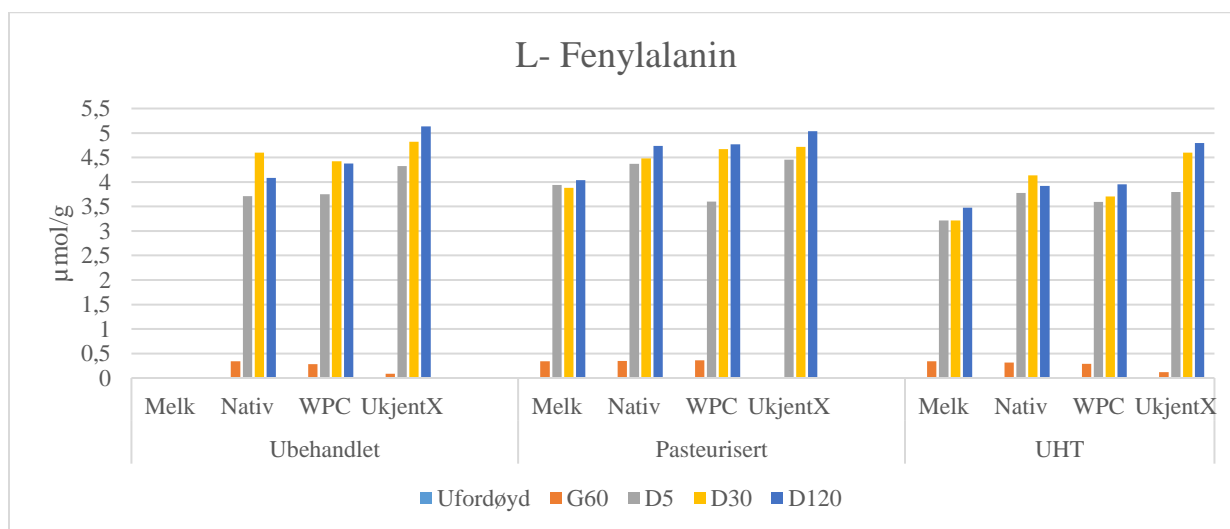


mens en lengre varmebehandling gav en reduksjon sammenlignet med pasteurisering. Ukjent X hadde en mindre reduksjon som følge av lengre varmebehandling, og syntes mer varmestabil.

Figur 22. Innhold av Metionin (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og en ukjent ingrediens (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30, D120).

Høyest innhold av Met ble sett i nativmyse etter pasteurisering med en konsentrasjon på 0,4  $\mu\text{mol/g}$ .

Innholdet av Fenylalanin (Phe) varierte som følge av produkt, varmebehandling og som følge av steg i fordøyelsesprosessen, Figur 23. Det ble ikke sett spor av Phe i nullprøvene, men etter 60 min i magesekk ble det sett spor i samtlige produkter. Innholdet av Phe var høyest i ukjent X etter samtlige varmebehandlinger, med henholdsvis 5,132  $\mu\text{mol/g}$  i ubehandlet produkt, 5,037  $\mu\text{mol/g}$  i pasteurisert produkt og 4,797  $\mu\text{mol/g}$  i UHT-behandlet produkt. Det ble sett en reduksjon i Phe som følge av UHT-behandling i samtlige produkter.

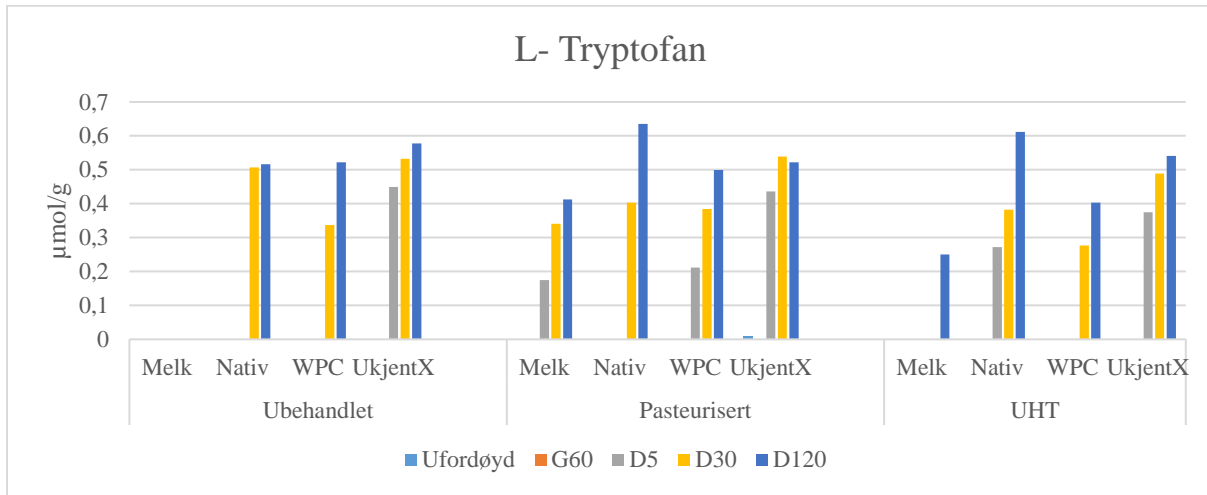


Figur 23. Innhold av Fenylalanin (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og et ukjent produkt (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30 og D120).

Innholdet av Tryptofan (Trp) varierer som følge av produkt, temperaturbehandling og steg i fordøyelsesprosessen, Figur 24. Høyest innhold av Trp i ubehandlet produkt ble funnet i ukjent X med en konsentrasjon på 0,578  $\mu\text{mol/g}$ , mens det i pasteurisert og UHT-behandlet produkt ble

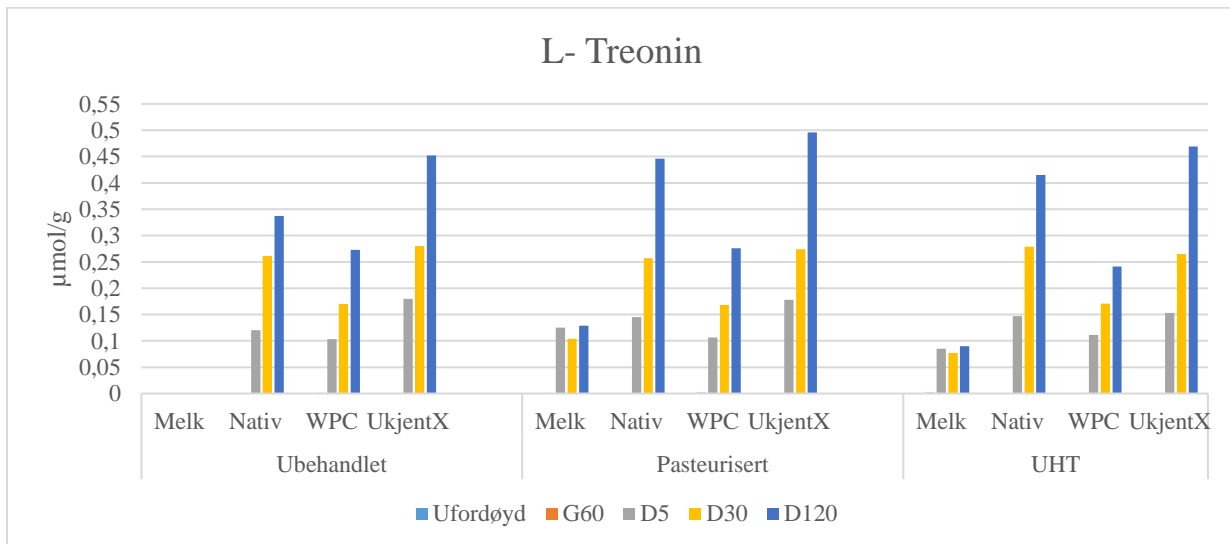


sett høyere konsentrasjon av Trp iativ myse. Trp kan komme som en «hale» på Phe ved høye konsentrasjoner av Trp, og kan dermed ikke sammenlignes på lik linje med de andre.



Figur 24. Innhold av Tryptofan (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og et ukjent produkt (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30 og D120).

Innholdet av Treonin (Thr) varierte som følge av produkt, temperaturbehandling og steg i fordøyelsesprosessen. Figur 25 illustrerer innholdet av Thr i de ulike produktene.



Figur 25. Innhold av Treonin (målt i  $\mu\text{mol/g}$ ) i melk, nativ myse (nativ), myseproteinkonsentrat (WPC) og et ukjent produkt (ukjent X) henholdsvis i ubehandlet, pasteurisert og langtidsvarmebehandlet (UHT) produkt. Innholdet ble målt i fem ulike steg i fordøyelsen; ufordøyd, etter 60 min i magesekk (G60), etter 5, 30 og 120 min i duodenal fase (D5, D30 og D120).

I D120 ble det sett høyest konsentrasjon av Thr i ukjent X i samtlige varmebehandlinger, med henholdsvis  $0,452 \mu\text{mol/g}$ ,  $0,496 \mu\text{mol/g}$  og  $0,469 \mu\text{mol/g}$  i ubehandlet, pasteurisert og UHT-

behandlet produkt. Det ble sett en økning i Thr som følge av pasteurisering i ukjent X, men en reduksjon som følge av UHT-behandling sammenlignet med pasteurisert produkt. Etter pasteurisering ble det sett en stor økning i Thr i nativ myse; fra 0,337  $\mu\text{mol/g}$  i ubehandlet produkt til 0,446  $\mu\text{mol/g}$  i pasteurisert produkt. Det ble ikke sett lignende økning i WPC80. Etter UHT- behandling ble det sett en reduksjon i Thr i samtlige produkter.

## 5 Diskusjon

Målet for denne oppgaven var å sammenligne om forskjellig varmebehandling hadde innvirkning på viskositet, proteinnedbrytning og dannelse av essensielle frie aminosyrer før og etter fordøyelse i ulike produkter. *Ex vivo* fordøyelse med humane mage- og tarmenzymer ble gjennomført på melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X, etter to ulike varmebehandlinger; pasteurisering og UHT- behandling i tillegg til ubehandlet produkt.

### 5.1 Effekt av varmebehandling

#### 5.1.1 Effekt av varmebehandling på viskositet i nullprøver.

Vi så en signifikant økning i viskositet fra pasteurisert melk til UHT-behandlet melk. Ubehandlet melk ble ikke undersøkt, som følge av manglende tilgang til upasteurisert melk. Jeurnink og De Kruif (1993), Lucey et al. (1997) og Lucey et al. (1999) viste tilsvarende økning i viskositet ved oppvarming av melk til  $>80^{\circ}\text{C}$ . Økning i viskositet som følge av oppvarming kan ikke alene bli forklart av en økning i volumfraksjonen, men også en svak økning av interaksjon mellom miceller (Jeurnink & De Kruif 1993). Når melk varmes opp til høye temperaturer  $>80^{\circ}\text{C}$  i 30 min, vil myseproteiner denatureres, og samspillet med kaseinmicellen vil påvirkes. Denaturerte myseproteiner vil skape interaksjon med  $\kappa$ -kasein fra kasein micellen via tiol-disulfid utveksling med  $\beta$ -Lg (Anema & Li 2003; Donato & Guyomarc'h 2009; Jeurnink & De Kruif 1993). Det stilles spørsmål om i hvilken grad aggregater av myseprotein finner vei gjennom det hårete  $\kappa$ -kaseinlaget for å danne disulfidbroer (Singh 2004). En antagelse kan være forandringer i  $\kappa$ -kasein, som følge av varmebehandling, kan føre til enten endring i selve laget med  $\kappa$ -kasein, eller micellestruktur. Interaksjon mellom  $\beta$ -Lg og kaseinmicellens  $\kappa$ -kasein fører til en økning i størrelsen på selve kaseinmicellen (Rowland 1937). Interaksjon mellom  $\beta$ -Lg og fettkulemembranen ved varmebehandling bidrar ifølge Lee og Sherbon (2002) til en inkorporering av myseproteiner i fettkulemembranen. Interaksjonen mellom  $\beta$ -Lg og kaseinmicellens  $\kappa$ -kasein kan derfor være med å forklare økning i viskositet i melk.

Det ble antatt at ukjent X burde kunne sammenlignes med melk som følge av svært lik komposisjon, og fordeling mellom kaseiner og myseproteiner. Det ble derimot sett en signifikant reduksjon i viskositet i ukjent X, som følge av varmebehandling, hvor ubehandlet produkt hadde høyest viskositet. Dette er oppsiktsvekkende, da dette strider mot produktets natur, hvor

proteinene danner et svakt gel nettverk ved oppvarming (Lucey et al. 1999). Det kan derfor ikke konkluderes med at det er selve varmebehandlingen som påvirker viskositeten til den ukjente proteiningrediensen. Det er derimot verdt å nevne at produksjonsprosessen for dette produktet er ukjent, og det er derfor ikke stadfestet hvilket type produkt det er snakk om, annet enn at det inneholder 83% protein i råmaterialet. Dermed kan vår antagelse om at dette produktet burde ha lignende egenskaper som WPC80, og nativ myse falle i fisk. Det er vist metoder som kan bidra til å redusere økning i viskositet, og/eller redusere viskositeten, ved bruk av ultralydbehandling etter varmebehandling av WPC (Ashokkumar et al. 2009; Chandrapala et al. 2011). Det er viktig å påpeke at dette kun er vist ved ultralydbehandling etter varmebehandling, og kan ikke overføres til ubehandlede produkter. Det kan derfor være mulig at ukjent X har vært gjennom en slik behandling, uten at dette fremgår hos leverandør. Det er oppgitt svært lite informasjon angående produksjonsmetoden og innholdet i den ukjente proteiningrediensen, så dette kan derfor ikke føre til en konklusjon om årsak til reduksjonen i viskositet. Studier viser at ved å danne et mikropartikulært myseprotein ved hjelp av mikrofluidisering kan være med og endre fysiske egenskaper til WPC, da ved å øke varmestabiliteten til produktet (Dissanayake & Vasiljevic 2009).

Resultatene viste at ubehandlet nativ myse og WPC80 hadde signifikant økning i viskositet etter langtidsvarmebehandling, sammenlignet med pasteurisering og ubehandlet produkt. Det er vist forskjell i størrelse ved aggregering av  $\alpha$ -La og  $\beta$ -Lg fra ulike WPC. Oppvarming til over 75°C viser at WPC fra ostemyse (WPC80) danner større aggregater enn «sur» WPC under samme forhold (Havea et al. 2002). Dette tyder på at mineralinnhold i de ulike WPC har innvirkning på aggregeringen av  $\alpha$ -La og  $\beta$ -Lg. Tilstedeværelse av kalsiumioner øker overgangstemperaturen og stabiliserer  $\alpha$ -La (Relkin & Mulvihill 1996). HTST behandling påvirker nitrogen og mineralinnhold i MF fraksjoner ifølge Svanborg et al. (2014). Permeat fra upasteurisert skummetmelk hadde lavere innhold av kasein, kalsium, magnesium, fosfor og natrium sammenlignet med pasteurisert nativ myse. Det ble sett en trend, men ikke signifikans, mot at nativ myse hadde høyere viskositet etter varmebehandling ved 90°C i 120 min, sammenlignet med WPC80 i dette forsøket. Dette tyder på at mineralinnholdet i den native mysen som er benyttet i dette forsøket, kan være lavere enn den spraytørkede WPC80 fra pasteurisert ostemyse. Dette kan skyldes pasteuriseringssteget (HTST) som er gjennomført før spraytørking av WPC80, men kan også stamme fra individuelle forskjeller i råmateriale. Mineralinnhold i produktene i

dette forsøket ble ikke analysert, det vil derfor være naturlig å tro, men vanskelig og konkludere med at dette kan ha hatt innvirkning på ferdig produkt.

### **5.1.2 Effekt av varmebehandling på proteindegradering ved fordøyelse med HGJ og HDJ.**

Proteindegradering ble visualisert ved SDS- PAGE. Kaseinene i melk og ukjent X var fullstendig degradert etter 60 min med HGJ. Dette stemmer godt overens med andre studier (Devle et al. 2014; Gallier et al. 2012; Kopf-Bolanz et al. 2012), som beskriver fullstendig degradering av kasein helt ned i 40 min med HGJ. Almaas et al. (2006) hevder at typen, mengden og aktiviteten til enzymene er avgjørende for degradering av kasein i magesekk. Det ble i dette forsøket benyttet samme enzymaktivitet ved alle forsøkene, og dette har dermed trolig liten effekt innad i forsøkene. Det er derimot av interesse om forsøket skal sammenlignes med lignende typer studier. Det er benyttet to ulike batcher med enzymer av HGJ, men justert til samme enzymaktivitet. Dette kan bidra til forskjell i degradering, men da det ikke tyder på noen påvirkning på kaseindegradering i de ulike produktene er dette trolig ikke en påvirkende faktor. Det ble ikke sett noen effekt av ulik varmebehandling på kaseindegradering i dette forsøket. Det ble i dette forsøket kun testet et tidspunkt under gastrisk fase. Dette fordi degraderingen av myseproteiner som er i større grad påvirket av varmebehandling hovedsakelig finner sted i tynntarmen (El-Zahar et al. 2005; Mandalari et al. 2009).

Degradering av  $\beta$ -Lg skjer gradvis i tynntarmen, dette kommer av at  $\beta$ -Lg er resistent mot gastrisk fordøyelse med pepsin (El-Zahar et al. 2005; Mandalari et al. 2009). Etter 120 min i duodenal fordøyelse var  $\beta$ -Lg fullstendig degradert i alle produkter bortsett fra pasteurisert melk og UHT behandlet nativ myse. I pasteurisert melk var det riktignok en gradert forskjell fra gastrisk fordøyelse til etter 120 min i duodenal fordøyelse, hvor proteinene var degradert i større grad, men ikke fullstendig, sammenlignet med UHT-behandlet melk. Melken i dette forsøket var utsatt for en HTST pasteurisering, 72°C i 15 sek, som benyttes i industrien. Øvrige produkter ble utsatt for en «in vat» lavpasteurisering i vannbad i 30 min. Tiden melken har vært utsatt for varme kan være årsaken til at dette produktet har en større andel  $\beta$ -Lg igjen etter 120 min fordøyelse, sammenlignet med de andre ingrediensene. Pelegrine og Gasparetto (2005) viser at temperaturbehandling over 60°C påvirker utfoldingen av proteinet, og dermed løseligheten.

Optimalt burde det vært benyttet rå melk, slik at samme varmebehandling kunne vært gjennomført på samtlige produkter, dette ble ikke gjort som følge om ønske av bruk av standardisert kommersiell butikkmelk i parallellgående prosjekt.

Det ble ikke sett noen nevneverdig forskjell i degradering av  $\beta$ -Lg som følge av temperaturbehandling fra ubehandlet til pasteurisert nativ myse etter 120 min fordøyelse. Dette tyder på at varmebehandlingen som gjennomføres for å fjerne potensielt skadelige mikroorganismer ikke påvirker produktet negativt. Det ble derimot sett en effekt av varmebehandling på degradering av  $\beta$ -Lg tidlig i fordøyelsen. Etter 5 min i duodenal fordøyelse, ble det sett en større grad av degradering i pasteurisert nativ myse, sammenlignet med ubehandlet myse. Dette skyldes trolig delvis utfolding av  $\beta$ -Lg sin struktur, slik at tarmenzymene lettere kan fordøye  $\beta$ -Lg. Resultatene viste at langtidsvarmebehandling av nativ myse førte til en mindre grad av proteindegradering, sammenlignet med ubehandlet og pasteurisert nativ myse. Tilstedeværelse av  $\beta$ -Lg i nativ myse etter UHT behandling kan tyde på aggregering av proteinene under varmebehandling. Under varmebehandling vil dimere fra  $\beta$ -Lg dissosiere til monomere, og føre til mulighet for interaksjon med andre proteiner via disulfidbånd og/eller hydrofob interaksjon (Havea et al. 2004). Irreversibel denaturering av  $\beta$ -Lg, starter ved 60% utfolding av proteinet (De Wit 1990), og fører til at  $\beta$ -Lg aggregerer med andre proteiner, deriblant  $\kappa$ -kaseiner (Donato & Guyomarc'h 2009),  $\alpha$ -La og BSA (Dalglish et al. 1997). Ye et al. (2004) viste at interaksjon mellom  $\beta$ -Lg med proteiner fra fettkulemembranen i helmelk kan medføre aggregering. Løselighet av myseproteiner er studert i ulike studier (Pelegrine & Gasparetto 2005), hvor løseligheten til myseprotein påvirkes av pH og var høyest ved isoelektrisk punkt pH 4,5. Studien viser også at temperatur påvirker løseligheten til myseproteinene. Hvor det ved pH 6,8 ble sett redusert løselighet ved økning i temperatur, dette indikerer proteindenaturering som følge av varmebehandling, da pH i tynntarmen er ca 7. Ved pH 5,65 økte løseligheten ved økt temperatur, noe som ikke indikerer koagulering eller aggregering av molekylene (Pelegrine & Gasparetto 2005). Dette tyder på at samspillet mellom pH og temperatur har mye å si, ikke nødvendigvis bare temperaturen. I tarmkanalen vil pH være 5-7 (Guerra et al. 2012), og det er derfor naturlig og tro at redusert løselighet av myseprotein ved pH 6,8 kan overføres til humant tarmsystem. På tross av resistens mot synlig pepsindegradering, kan  $\beta$ -Lg ha vært påvirket i noen grad som følge av gastrisk fordøyelse ved pH 3. Dette kan ha ført til strukturelle endringer, som igjen kan påvirke løseligheten i duodenal fordøyelse. Det kan

dermed ikke med sikkerhet fastslås om den lave pH i magesekk, har påvirket proteindegraderingen av  $\beta$ -Lg.

Resultater fra proteindegradering viser tilstedeværelse av  $\alpha$ -La er 14,1 kDa, i både nullprøve og etter fordøyelse i magesekk (G60) i samtlige produkter, etter samtlige varmebehandlinger. Fordøyelse av  $\alpha$ -La finner sted ved hjelp av duodenale enzymer i tarmen (Mandalari et al. 2009). I dette forsøket er  $\alpha$ -La fullstendig nedbrutt etter ca. 30 min i duodenal fase i pasteurisert lettmeik. Fullstendig degradering av  $\alpha$ -La er tydelig i ubehandlet og pasteurisert WPC80, mens det er tydelig tilstedeværelse av  $\alpha$ -La i UHT-behandlet WPC80. Det ble sett minimale mengder  $\alpha$ -La etter D120 i ubehandlet og pasteurisert nativ myse. Det ble derimot sett tydelig tilstedeværelse av  $\alpha$ -La i UHT-behandlet nativ myse etter D120. Langtidsvarmebehandling ved 90°C i 120 min kan forårsake en aggregering av  $\alpha$ -La, som følge av høy varmebehandling over tid (Dalglish et al. 1997). Både varmebehandling og pH påvirker aggregeringen av  $\alpha$ -La, og ifølge Lam og Nickerson (2015), vil pH 7 føre til større stabilitet, enn ved pH 5 i emulsjoner. Dette tyder på at nøytral pH vil kunne påvirke aggregeringen av  $\alpha$ -La i produkt, noe som er nyttig for industrien å ta i betraktning. I Ifølge Gezimati et al. (1996) vil ikke varmebehandling på isolert  $\alpha$ -La føre til aggregering, tilstedeværelse av  $\beta$ -Lg vil derimot påvirke aggregering av  $\alpha$ -La ved oppvarming. Siden det sjelden benyttes isolert  $\alpha$ -La, da både  $\alpha$ -La og  $\beta$ -Lg er tilstede i melk og produkter av melk, vil det være hensiktsmessig å se på de funksjonelle egenskapene ved tilstedeværelse av både  $\alpha$ -La og  $\beta$ -Lg. I ukjent X ble det detektert  $\alpha$ -La, etter samtlige varmebehandlinger, det ble sett svakere bånd i pasteurisert ukjent X sammenlignet med ubehandlet og UHT-behandlet ukjent X. Manglende degradering skyldes sannsynligvis ikke varmebehandling, men snarere typen produkt, og hvilke egenskaper produktet innehar.

Denaturering av myseproteiner som følge av varmebehandling kan medføre store problemer i industrien. Det frigjøres små sulfatholdige komponenter, som kan bidra til uønsket kokt smak i produktet (Al-Attabi et al. 2008). I tillegg vil hydrofobisitet og løselighet av  $\alpha$ -La og  $\beta$ -Lg påvirkes av oppvarmingen, noe som kan føre til bruning av produktet (Thomas et al. 2004). Under prosessering av melk vil komplekser av myseprotein dannes og føre til påbrenning i varmeveksleren, dette kan redusere varmevekslingen og øke trykkfallet (Delplace et al. 1996; Visser & Jeurnink 1997).

Det ble ikke sett noen effekt av varmebehandling på degradering av BSA. BSA ble identifisert i nullprøve og har en størrelse på 66,2 kDa (Madureira et al. 2007), og ble påvist i både nullprøve og i samtlige prøver fra fordøyelse i tarmen. Prøvene fra fordøyelse i magesekk inneholder ikke BSA, dette tyder på at BSA er fullstendig degradert i magesekk etter 60 min. Dette støttes av annen litteratur som beskriver fullstendig gastrisk fordøyelse av BSA etter 40 min (Islam et al. 2015b; Islam et al. 2016).

SDS-PAGE er ikke en analyse som viser eksakte mengder, det er derfor vanskelig å fastslå mengden proteiner og proteinfragmenter i hver gel. Estimeringen over hvor stor grad varmebehandlingen påvirker degraderingen av de ulike proteinene etter *ex vivo* fordøyelse blir derfor vanskelig. Styrken på gel båndene gir en indikasjon, men for å kunne gitt ytterligere informasjon burde gel båndene ha vært nærmere analysert.

### **5.1.3 Effekt av varmebehandling på frigjøring av essensielle frie aminosyrer etter fordøyelse med HGJ og HDJ.**

Innholdet av frie aminosyrer (FAA) ble bestemt ved hjelp av HPLC i ufordøyde og fordøyde prøver. Resultatene viser en generell økning i frigjøring av FAA i alle produkter etter *ex vivo* fordøyelse, sammenlignet med ufordøyde prøver. Det ble detektert små mengder FAA allerede i utgangspunktet fra melk, men i liten eller ingen grad i de andre proteiningrediensene. Det er ifølge Walstra et al. (2005b) helt normalt å detektere spormengder av både FAA og små peptider, i melk. Frigjøringen av FAA i melken skyldes trolig bakteriell proteolyse. Det ble liten grad sett FAA i øvrige nullprøver.

Opptak av næringsstoffer, inkludert FAA finner sted i tynntarmen (Saladin 2012). Avhengig av hvordan type føde som inntas, fast eller flytende, oppholder maten seg i tynntarmen i ulik, ofte opptil 5 timer (Guerra et al. 2012). På bakgrunn av varierende degradering etter 30 min i fordøyelse i tynntarm, vil hovedvekten legges på 120 min i tynntarm, da de fleste prøvene var fullstendig fordøyd. Variasjon mellom ulike individer er naturlig, da humane tarmenzymer har ulik enzymaktivitet.

Resultatene viste varierende frigjøring av BCAA som følge av varmebehandling og fordøyelse. Det ble ikke sett noen effekt av varmebehandling på frigjøring av frie aminosyrer i



utgangsproduktene. Det ble derimot sett en økning av Leu etter pasteurisering i D120 i nativ myse. Dette tyder på at pasteurisering av nativ myse bidrar til økt frigjøring av Leucin i human fordøyelse. Dette stemmer overens med studier som beskriver at inntak av eksogent protein, som inneholder BCAA fører til en frigjøring av ulike BCAA i tarmen i inntil 4 timer etter inntak (Adibi & Mercer 1973). Det ble i tillegg sett en økning i Leu både fra WPC80 og Ukjent X etter pasteurisering, men forskjellen var av mindre grad. Det er ikke sammenligningsgrunnlag for melk, da det ikke ble undersøkt ubehandlet melk. UHT- behandling bidro til en liten økning i frigjøring av Leu i nativ myse, men ikke i WPC80 og Ukjent X, sammenlignet med ubehandlet produkt. Det ble funnet lavere innhold i leucin fra UHT-behandlet melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X sammenlignet med pasteurisert produkt. Dette tyder på at en UHT-behandling vil påvirke frigjøringen av Leu i negativ grad sammenlignet med pasteurisert produkt. Trolig som følge av aggregering av myseproteinene i produktet ved høy varmebehandling.

Frigjøring av Ile etter *ex vivo* human fordøyelse varierte som følge av varmebehandling. Det ble ikke sett noen forandring som følge av varmebehandling i utgangsproduktene. Høyest frigjøring av Ile ble sett i nativ myse etter pasteurisering. Sammenlignet med ubehandlet og UHT behandlet nativ myse, er det fordelaktig med en varmebehandling av produktet før fordøyelse. Det er derimot smart å unngå en for høy temperatur, som følge av fallet i frigjøring etter varmebehandling ved 90°C i 120 min. Dette kan skyldes aggregering av proteiner som følge av den høye varmebehandlingen. Dette samsvarer med resultater fra SDS-PAGE, hvor proteindegraderingen var mindre i UHT-behandlet nativ myse. Det ble funnet proteiner med størrelse på ca 14 kDa og 18 kDa. Dette er trolig en kombinasjon av  $\alpha$ -LA og  $\beta$ -Lg. Det ble sett en reduksjon av frigjøring av Ile fra melk ved UHT-behandling sammenlignet med pasteurisering. WPC80 og ukjent X viste en reduksjon i frigjøring av Ile som følge av pasteurisering, sammenlignet med ubehandlet produkt, en ytterligere reduksjon ble sett ved UHT- behandling av WPC80 og Ukjent X. Dette tyder på at frigjøring av Ile fra WPC80 og ukjent X er størst i ubehandlet produkt. Dette viser en indikasjon på at ved ønske om høy grad av frigjøring av Ile, vil nativ myse være fordelaktig uavhengig av varmebehandlingstype.

Etter fordøyelse ble det sett høyest innhold av Val i den ukjent X i ubehandlet produkt. Etter pasteurisering ble det observert en økning av Val i nativ myse og WPC80. Det ble derimot sett en reduksjon i Val i den ukjente ingrediensen etter pasteurisering. Etter UHT behandling ved 90

°C i 120 min ble det observert en reduksjon i Val-konsentrasjonen i samtlige produkter, sammenlignet med pasteurisert produkt. Dette tyder på at det er variasjon i påvirkning av varmebehandling av produktene med hensyn til frigjøring av Val. Ved ønske om høyt innhold av Val i pasteurisert produkt er nativ myse og foretrekke. Det er derimot viktig å være innforstått med at dette er nativ myse i sin ferske tilstand, som ikke har vært spraytørket. Det vil være spennende å undersøke om spraytørket nativ myse vil ha samme effekt. Ved bruk i forskjellige typer varmebehandling vil det ukjente proteinet være fordelaktig, da frigjøringen av Val er svært stabil uavhengig av varmebehandling.

## **5.2 Effekt av variasjon i råmateriale**

### **5.2.1 Effekt av variasjon av råmateriale på viskositetsendring i nullprøver**

Melk og ingredienser av melk benyttes til en rekke ulike produkter på grunn av deres funksjonelle egenskaper og fordelaktige ernæringsmessige kvalitet (De Wit 1990; Hau & Bovetto 2001; Madureira et al. 2007). Deres sammensetning og temperaturbehandling vil påvirke både fysiske, kjemiske og biokjemiske egenskaper både i produktet, men også ved opptak i human tarm. Viskositetsøkning i industrien kan medføre store industrielle utfordringer. Derfor er det viktig at det blir tilegnet kunnskap, ikke bare om reologiske egenskaper, men også hvordan produksjonsprosessen påvirker opptaket av ulike næringsstoffer i human tarm.

Det ble sett signifikante forskjeller i viskositet mellom produktene. Tukey's metode rangerte melk, ukjent X og nativ myse forskjellige fra hverandre. Dette viser en tydelig forskjell i viskositet i disse tre produktene. WPC80 var signifikant forskjellig fra melk og ukjent X, men ikke nativ myse, noe som viser at WPC80 og nativ myse har svært lik viskositet. WPC80 og nativ myse produseres av samme råstoff, men med forskjellig metode. Forskjellen i viskositet ved samme proteinkonsentrasjon vil derfor ikke endres i større grad, selv om det er en trend mot at nativ myse har større viskositetsøkning ved varmebehandling. Det vil være stor forskjell mellom kvaliteten på melken som benyttes som følge av sesong, art, og gener, i tillegg vil prosessen som benyttes gi ulikheter med hensyn til konsentrasjon av løpe, kutting, drenering, pH og filtreringstemperatur (Hurt et al. 2015; Morr & Ha 1993). I følge Brans et al. (2004) finnes det nå metoder hvor skummetmelk fraksjonerer ved hjelp av spesialtilpassede mikrofiltreringsteknikker for å produsere en kaseinrik fraksjon i tillegg til nativ myse.

Tradisjonell WPC80 utvinnes ved hjelp av mikrofiltrering av myse fra produksjon av ost. Forskjellen på disse to er hovedsakelig innhold av kasein makropeptid, i tillegg til somatiske celler, melkesyre bakterier, bakteriofager og rester fra løpe (Maubois 2002). Hvilken effekt dette har på de reologiske egenskapene er fortsatt ikke fullstendig kartlagt. Selv om det ikke er sett noen signifikant forskjell i viskositet mellom nativ myse og WPC80 vil mineralinnholdet i fraksjonene påvirkes av varmebehandlingssteg under produksjon. HTST behandling påvirker nitrogen og mineralinnhold i MF fraksjoner ifølge Svanborg et al. (2014). Permeat fra upasteurisert skummetmelk hadde lavere innhold av kasein, kalsium, magnesium, fosfor og natrium sammenlignet med pasteurisert nativ myse. WPC80 inneholder glykomakropeptid (GMP) fra osteproduksjon (Madureira et al. 2007). Hvordan GMP påvirker funksjonelle egenskaper er ikke fullstendig kartlagt. Innholdet av mineraler i ulike WPC er viktig for å kunne kontrollere aggregering av  $\alpha$ -La og  $\beta$ -Lg ved varmebehandling (Havea et al. 2002).

Da den native mysen som er benyttet i dette forsøket er av upasteurisert opprinnelse, kan mineralinnholdet være lavere enn den spraytørkede WPC80 fra pasteurisert ostemyse. Dette kan skyldes pasteuriseringssteget (HTST) som er gjennomført før spraytørring av WPC80, men kan også stamme fra individuelle forskjeller i råmateriale. Mineralinnhold i produktene i dette forsøket ble ikke analysert, det vil derfor være naturlig å tro, men vanskelig og konkludere med at dette kan ha hatt innvirkning på ferdig produkt. Det tyder derimot på at nativ myse har fordel med hensyn til frigjøring av essensielle frie aminosyrer etter *ex vivo* fordøyelse. Hvordan dette påvirker

### **5.2.2 Effekt av produkt på proteindegradering.**

Det ble ikke sett noen forskjell som følge av produkt på degradering av kaseiner. Kaseiner ble detektert i melk og ukjent X før fordøyelse, men var etter 60 min i gastrisk fordøyelse fullstendig fordøyd. Dette stemmer overens med annen litteratur som viser fullstendig degradering av kaseiner etter 20 min (Islam et al. 2015a), 30 min (med ikke-humane enzymer) (Kopf-Bolanz et al. 2012), 40 min (Devle et al. 2014) og 45 min (Gallier et al. 2012). Nullprøven i pasteurisert WPC ser ut til å inneholde kaseiner, som følge av proteinbånd med størrelse på 25 kDa til 40 kDa, dette kan ikke stemme da innholdet av kaseiner i ubehandlet produkt, eller varedeklarasjonen, ikke fremgår. Det er naturlig å tro at det kan ha blitt forvekslet med enten

melk eller det ukjente proteinpreparatet ved en feiltakelse, og vil derfor ikke bli nærmere diskutert i denne oppgaven.

Degradering av myseproteiner viste at  $\beta$ -Lg i større grad ble degradert i nativ myse, WPC80 og protein X sammenlignet med melk i pasteurisert produkt. Det ble sett tydelig tilstedeværelse av  $\beta$ -Lg i pasteurisert melk etter 120 min fordøyelse. Dette kan skyldes produktet i seg selv, og/eller en kombinasjon med varmebehandling. Det er benyttet HTST-pasteurisert melk, mens de øvrige produktene er pasteurisert ved hjelp av lavpasteurisering. Derfor knyttes det usikkerhet til om det er selve produktet eller om det er varmebehandlingen som medfører denne ulikheten. Devle et al. (2014) viste fullstendig degradering av  $\beta$ -Lg etter 60 min i duodenal fase i skummet melk.  $\beta$ -Lg var derimot intakt etter 120 min i duodenal fase i fullfet melk. Dette kan tyde på at innholdet av fett i melk påvirker degraderingen av  $\beta$ -Lg. Studier som har benyttet kommersielle enzymer viser at fullfet melk er resistent mot nedbrytning av  $\beta$ -Lg (Gallier et al. 2012). Det ble i dette forsøket benyttet lettmelk, fettinnholdet på 1,2% kan derfor ha påvirkning på degraderingen av  $\beta$ -Lg, men trolig ikke i like stor grad som vist i Devle et al. (2014) og Gallier et al. (2012) som benyttet helmelk i sine forsøk. Om maten benytter lenger tid på å bli fullstendig fordøyd er ikke det ensbetydende med ufullstendig fordøyelse. I hvilken grad forskjell i råstoff påvirker proteindegraderingen er enda ikke fullstendig forklart. Ulik produksjonsmetode skaper ulikt innhold av mineraler i WPC80 og nativ myse. Dette tyder på at ulikt mineralinnhold i de ulike WPC har en innvirkning på aggregeringen av  $\alpha$ -La og  $\beta$ -Lg, ved at kalsiumioner øker overgangstemperaturen og stabiliserer  $\alpha$ -La (Relkin & Mulvihill 1996). HTST behandling påvirker nitrogen og mineralinnhold i MF fraksjoner ifølge Svanborg et al. (2014). Permeat fra upasteurisert skummetmelk hadde i Svanborg et al. (2014) lavere innhold av kasein, kalsium, magnesium, fosfor og natrium sammenlignet med pasteurisert nativ myse. I dette forsøket er det benyttet upasteurisert nativ myse, det ville derfor vært hensiktsmessig å se på om pasteurisert nativ myse vil føre til samme resultater, eller om mineralinnholdet påvirker degraderingen av proteinene etter *ex vivo* fordøyelse.

Det ble ikke sett noen effekt som følge av produkt på degradering av  $\alpha$ -La mellom melk, nativ myse og WPC80. I ubehandlet ukjent X ble det derimot funnet rester av  $\alpha$ -La etter 120 min. Dette kan skyldes hvordan strukturen til det ukjente proteinet er bygd opp, mulig som følge av produksjonsprosessen det har vært gjennom.

### **5.2.3 Effekt av produkt på frigjøring av essensielle aminosyrer**

Det ble ikke sett noen effekt av produkt på frigjøring av essensielle aminosyrer i ufordøyd produkt, da disse foreligger som større peptider og proteiner. Det ble derimot sett høyere grad av frigjøring av Leu og Ile i ukjent X i ubehandlede produkter, mens frigjøringen av Leu og Ile var høyest i nativ myse etter pasteurisering og UHT- behandling. Det ble sett høyere grad av frigjøring i Leu og Ile fra nativ myse i alle varmebehandlinger sammenlignet med WPC80. Dette støttes av forskning hvor innhold av BCAA er sammenlignet i blodplasma etter inntak av nativ myse og WPC80 (Laahne 2013). Samtlige BCAA er i Laahne (2013) høyere i nativ myse sammenlignet med WPC80. Resultatene viser at frigjøring av Val varierte som følge av produkt. Innhold av Val var høyest i ukjent X i ubehandlet og UHT-behandlet produkt, mens det i pasteurisert produkt var høyest i nativ myse. Dette tyder på at nativ myse har fordeler med hensyn til frigjøring av BCAA sammenlignet med WPC80.

## 6 Konklusjon

Varmebehandling av viste signifikant økning i viskositet etter UHT behandling i melk, nativ myse og WPC80. Det ble sett en signifikant reduksjon i ukjent X som følge av varmebehandling. Det ble observert en signifikant forskjell i produkt på viskositet, hvor nativ myse var signifikant forskjellig fra melk og ukjent X, men ikke WPC80. Det ble sett signifikant forskjell mellom WPC80, melk og ukjent X.

*Ex vivo* fordøyelse av melk, nativ myse, WPC80 og et ukjent X førte til forskjell i proteindegradering og frigjøring av BCAA som følge av varmebehandling. Degradering av kaseiner og BSA var fullstendig etter 60 min. fordøyelse i magesekk. Det ble sett fullstendig degradering av  $\beta$ -Lg D120 i samtlige produkter med unntak av pasteurisert melk og UHT-behandlet nativ myse. Degradering av  $\alpha$ -La varierte som følge av varmebehandling da UHT-behandling av melk, nativ myse, WPC80 og i mindre grad ukjent X viste aggregering av  $\alpha$ -La i D120. Samme trend ble ikke sett etter pasteurisering, hvor  $\alpha$ -La var fullstendig degradert i D120 i samtlige produkter med unntak av pasteurisert melk. Pasteurisering viste høyest grad av frigjøring av Leu, Ile og Val, sammenlignet med ubehandlet og UHT-behandlet produkt. Det ble sett forskjeller i frigjøring av BCAA som følge av produkt. Nativ myse hadde større frigjøring av Leu, Ile sammenlignet med WPC80, ukjent X og melk i pasteurisert og UHT-behandlet produkt. Nativ myse hadde større frigjøring av Val enn WPC80 og melk i pasteurisert og UHT-behandlet produkt.

## **7 Til ettertanke og videre forsøk**

### **7.1 Svakheter ved forsøksoppsett.**

I denne oppgaven ble det undersøkt i hvilken grad varmebehandling påvirker proteindegradering og frigjøring av FAA i human tarm. Ved lignende forsøk vil det være spennende å gjøre en del endringer. Det vil være hensiktsmessig og benytte industrielle varmebehandlingsmetoder for melkeprodukter, da henholdsvis pasteurisering ved 72°C i 15 sek og UHT behandling ved 135-145°C i et par sekunder. Dette for å se på om aggregering av proteinene vil opptre på samme måte, eller om det faktisk er tiden varmebehandlingen tar som påvirker aggregeringen.

For sikrere resultater ville det vært hensiktsmessig og undersøkt de samme produktene ved flere gjentak. Kun en parallell av FAA ble undersøkt etter fordøyelse. Det kan derfor være hensiktsmessig og undersøke dette ved flere forsøk for å få større tyngde i resultatene.

I dette forsøket ble det benyttet to ulike batcher med HGJ, for å være sikker på at individuell forskjell i enzybatch, burde det med fordel vært benyttet samme til samtlige undersøkelser. Enzymaktiviten ble målt lang 6 mnd før bruk, dette kan ha medført reduksjon i enzymaktivitet (Ulleberg et al. 2011).

### **7.2 Videre forskning**

Det vil være spennende å se på nativ myse som har blitt spraytørket. Dette er den mest naturlige måten å forlenge holdbarheten til produktet på. Det vil da være av interesse om spraytørkingen påvirker den ernæringsmessige sammensetningen av produktet. Spørsmålet er da om de høye verdiene av forgrenede aminosyrer vil holde samme nivå, eller om den native mysen da vil ligge på samme nivå som spraytørket WPC80. Dette vil gi oss ytterligere svar på hvordan varmebehandlingshistorien til et produkt påvirker den ernæringsmessige kvaliteten til produktet. For å få et mer helhetlig bilde vil det være fordelaktig og undersøke bioaktive peptider i de samme prøvene. Det ville i tillegg vært spennende å se på produkter hvor aminosyrekonsentrasjonen var standardisert i nullprøvene, ikke bare total proteinkonsentrasjon som ble gjort i dette forsøket. Dette for å sikre et utgangspunkt som har samme innhold av FAA for å kunne se tydeligere på om varmebehandling av produktene har noen innvirkning på frigjøringen av aminosyrene.

Parallelt med denne oppgaven undersøkes det opptak av aminosyrer i en intervensjonsstudie ved Norges Idrettshøgskole. Det er benyttet samme batch med nativ myse, WPC80 og melk fra samme leverandør. Det vil derfor være spennende å sammenligne resultater fra BCAA i blodparametre opp mot hva som er vist fra fordøyelsen i denne oppgaven. Da Silva et al. (2016) viser at myseproteiner og BCAA har en anti-inflammatorisk effekt på endotelceller. Dette sees i sammenheng med at inntak av myseproteiner og BCAA gir en reduksjon i kardiovaskulære sykdommer. Det er fortsatt mange spørsmål som gjenstår. Er det noen reell sammenheng med hva som fordøyes og hva som tas opp av enterocytene? Eller er human fordøyelse og aminosyremetabolisme mer komplisert enn som så. Det er fortsatt mange ubesvarte spørsmål, som er interessante å få et endelig fullstendig svar på i kommende studier.



## Litteraturliste

- Aarak, K. E., Kirkhus, B., Holm, H., Vogt, G., Jacobsen, M. & Vegarud, G. E. (2013). Release of EPA and DHA from salmon oil - a comparison of in vitro digestion with human and porcine gastrointestinal enzymes. *Br J Nutr*, 110 (8): 1402-10.
- Adibi, S. A. & Mercer, D. W. (1973). Protein Digestion in Human Intestine as Reflected in Luminal, Mucosal, and Plasma Amino Acid Concentrations after Meals. *Journal of Clinical Investigation*, 52 (7): 1586-1594.
- Al-Attabi, Z., D'arcy, B. & Deeth, H. (2008). Volatile sulphur compounds in UHT milk. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49 (1): 28-47.
- Albert Ibarz, G. V. B.-C. (2002). Rheology of Food Products. I: *Unit Operations in Food Engineering*, s. 89- 142: CRC Press.
- Almaas, H., Cases, A.-L., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., Aadnoey, T. & Vegarud, G. E. (2006). In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, 16 (9): 961-968.
- Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C. & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56: 49-73.
- Anema, S. G. & Li, Y. (2003). Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (6): 1640-1646.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M. & Kentish, S. (2009). Hot topic: Sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92 (11): 5353-5356.
- Boirie, Y., Danguin, M., Gachon, P., Vasson, M.-P., Maubois, J.-L. & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (26): 14930-14935.
- Bourne, M. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*: Academic press.
- Brans, G., Schroën, C. G. P. H., van der Sman, R. G. M. & Boom, R. M. (2004). Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*, 243 (1-2): 263-272.
- Bylund, G. & Systems, T. P. P. (2015a). Building Blocks of Dairy Processing. I: *Dairy Processing Handbook*: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Bylund, G. & Systems, T. P. P. (2015b). The Chemistry of Milk. I: *Dairy Processing Handbook*: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Bylund, G. & Systems, T. P. P. (2015c). Rheology. I: *Dairy Processing Handbook*: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Bylund, G. & Systems, T. P. P. (2015d). Whey Processing. I: *Dairy Processing Handbook*: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Bütikofer, U. & Ardö, Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *Bulletin-FIL-IDF (Belgium)*.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S. & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (5): 951-957.
- Da Silva, M. S., Bigo, C., Barbier, O. & Rudkowska, I. (2016). Milk Proteins and Amino Acids Modulate Inflammatory Gene Expression in Vascular Endothelial Cells. *The FASEB Journal*, 30 (1 Supplement): 1169.10-1169.10.

- Dalgleish, D. G., van Mourik, L. & Corredig, M. (1997). Heat-induced interactions of whey proteins and casein micelles with different concentrations of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (12): 4806-4813.
- De Wit, J. N. (1990). Thermal Stability and Functionality of Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*, 73 (12): 3602-3612.
- Delplace, F., Leuliet, J. & Tissier, J. (1996). Fouling experiments of a plate heat exchanger by whey proteins solutions. *EUR*: 1-8.
- Devle, H., Ulleberg, E. K., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vegarud, G. & Ekeberg, D. (2014). Reciprocal interacting effects of proteins and lipids during ex vivo digestion of bovine milk. *International Dairy Journal*, 36 (1): 6-13.
- Dissanayake, M. & Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 92 (4): 1387-1397.
- Donato, L. & Guyomarc'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in heated skim milk—A review. *Dairy Science and Technology*, 89 (1): 3-29.
- Ekmekcioglu, C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, 76 (2): 225-230.
- El-Zahar, K., Sitohy, M., Choiset, Y., Métro, F., Haertlé, T. & Chobert, J.-M. (2005). Peptic hydrolysis of ovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin Exceptional susceptibility of native ovine  $\beta$ -lactoglobulin to pepsinolysis. *International Dairy Journal*, 15 (1): 17-27.
- Elwell, M. W. & Barbano, D. M. (2006). Use of Microfiltration to Improve Fluid Milk Quality<sup>1,2</sup>. *Journal of Dairy Science*, 89, Supplement: E20-E30.
- Eriksen, E. K., Holm, H., Jensen, E., Aaboe, R., Devold, T. G., Jacobsen, M. & Vegarud, G. E. (2010). Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *Br J Nutr*, 104 (3): 374-81.
- Farrell Jr, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87 (6): 1641-1674.
- Ferrua, M. J. & Singh, R. P. (2010). Modeling the Fluid Dynamics in a Human Stomach to Gain Insight of Food Digestion. *Journal of Food Science*, 75 (7): R151-R162.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015a). Milk Proteins. I: b. 2 *Dairy Chemistry and Biochemistry*, s. 145-240. Switzerland: Springer International Publishing.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015b). Production and Utilization of Milk. I: Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (red.) b. 2 *Dairy Chemistry and Biochemistry*, s. 1-20. Switzerland: Springer International Publishing.
- Gallier, S., Ye, A. & Singh, H. (2012). Structural changes of bovine milk fat globules during in vitro digestion. *Journal of Dairy Science*, 95 (7): 3579-3592.
- Gezimati, J., Singh, H. & Creamer, L. K. (1996). Aggregation and gelation of bovine beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, and serum albumin. *Macromolecular interactions in food technology*.
- Gray, J., Armstrong, G. & Farley, H. (2003). Opportunities and constraints in the functional food market. *Nutrition & Food Science*, 33 (5): 213-218.

- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30 (11): 591-600.
- Hau, J. & Bovetto, L. (2001). Characterisation of modified whey protein in milk ingredients by liquid chromatography coupled to electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 926 (1): 105-112.
- Havea, P., Singh, H. & Creamer, L. K. (2002). Heat-induced aggregation of whey proteins: comparison of cheese WPC with acid WPC and relevance of mineral composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (16): 4674-4681.
- Havea, P., Carr, A. J. & Creamer, L. K. (2004). The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. *J Dairy Res*, 71 (3): 330-9.
- Holm, H., Hanssen, L. E., Krogdahl, A. & Florholmen, J. (1988). High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J Nutr*, 118 (4): 515-20.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A. & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125 (1): 1-12.
- Hurt, E. E., Adams, M. C. & Barbano, D. M. (2015). Microfiltration of skim milk and modified skim milk using a 0.1-microm ceramic uniform transmembrane pressure system at temperatures of 50, 55, 60, and 65 degrees C. *J Dairy Sci*, 98 (2): 765-80.
- Islam, M. A., Ekeberg, D., Rukke, E.-O. & Vegarud, G. E. (2015a). Ex vivo Digestion of Milk from Red Chittagong Cattle Focusing Proteolysis and Lipolysis. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28 (4): 559-567.
- Islam, M. A., Ekeberg, D., Rukke, E.-O. & Vegarud, G. E. (2015b). Ex vivo digestion of omega-3 enriched buffalo skimmed milk. *Journal of Functional Foods*, 19: 842-851.
- Islam, M. A., Ekeberg, D., Rukke, E.-O. & Vegarud, G. E. (2016). Ex vivo digestion of proteins and fat in buffalo milk. *International Dairy Journal*, 52: 82-91.
- Jeurnink, T. J. M. & De Kruif, K. G. (1993). Changes in milk on heating: viscosity measurements. *Journal of Dairy Research*, 60 (02): 139-150.
- Kopf-Bolanz, K. A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R. & Egger, L. (2012). Validation of an In Vitro Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in Humans. *The Journal of Nutrition*, 142 (2): 245-250.
- Koros, W. J., Ma, Y. H. & Shimidzu, T. (1996). *Terminology for membranes and membrane processes (IUPAC Recommendations 1996)*. Pure and Applied Chemistry, 68, 7. 1479 s.
- Laahne, J. A. L. (2013). Nativt myseprotein gir større og raskere økning av aminosyrer i blod enn behandlede mysefraksjoner og lettmeik, men ikke raskere restitusjon av muskelfunksjon.
- Laboratories, B.-R. (2010). *Mini-PROTEAN®Precast Gels Instruction Manual and Application Guide*. Tilgjengelig fra: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_1658100.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1658100.pdf).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lagrange, V., Whitsett, D. & Burris, C. (2015). Global market for dairy proteins. *Journal of food science*, 80 (S1): A16-A22.

- Lam, R. S. H. & Nickerson, M. T. (2015). The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. *Food Chemistry*, 173: 163-170.
- Lee, S. J. & Sherbon, J. W. (2002). Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *Journal of Dairy Research*, 69 (04): 555-567.
- Lian, I. A. (2012). in vitro fordøyelse av ulike osteslag (ku og geit): proteinnedbrytning og peptiddannelse gjennom fordøyelsen.
- Lucey, J. A., Teo, C. T., Munro, P. A. & Singh, H. (1997). Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, 64 (04): 591-600.
- Lucey, J. A., Munro, P. A. & Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9 (3-6): 275-279.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40 (10): 1197-1211.
- Mahe, S., Roos, N., Benamouzig, R., Davin, L., Luengo, C., Gagnon, L., Gausserges, N., Rautureau, J. & Tome, D. (1996). Gastrojejunal kinetics and the digestion of [15N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *Am J Clin Nutr*, 63 (4): 546-52.
- Mandalari, G., Adel-Patient, K., Barkholt, V., Baro, C., Bennett, L., Bublin, M., Gaier, S., Graser, G., Ladics, G. S., Mierzejewska, D., et al. (2009). In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi-laboratory evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 55 (3): 372-81.
- Mather, I. H. (2000). A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane<sup>1,2</sup>. *Journal of Dairy Science*, 83 (2): 203-247.
- Maubois, J. (2002). Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2): 92.
- McConnell, E. L., Fadda, H. M. & Basit, A. W. (2008). Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm*, 364 (2): 213-26.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*, 5 (6): 1113-24.
- Moe, K., Porcellato, D. & Skeie, S. (2013). Metabolism of milk fat globule membrane components by nonstarter lactic acid bacteria isolated from cheese. *Journal of dairy science*, 96 (2): 727-739.
- Montgomery, D. C. (2008). Analysis of Variance. I: *Design and analysis of experiments*, s. 65 - 138: John Wiley & Sons.
- Morr, C. & Ha, E. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33 (6): 431-476.
- Norton, I., Fryer, P. & Moore, S. (2006). Product/process integration in food manufacture: engineering sustained health. *AIChE Journal*, 52 (5): 1632-1640.
- O'Donnell, R., Holland, J. W., Deeth, H. C. & Alewood, P. (2004). Milk proteomics. *International Dairy Journal*, 14 (12): 1013-1023.

- Pelegriane, D. H. G. & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38 (1): 77-80.
- Redington, J. M., Breydo, L., Almehdar, H. A., Redwan, E. M. & Uversky, V. N. (2016).  $\alpha$ -Lactalbumin: Of camels and cows. *Protein and peptide letters*.
- Relkin, P. & Mulvihill, D. (1996). Thermal unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36 (6): 565-601.
- Roman, M. J., Burri, B. J. & Singh, R. P. (2012). Release and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene from fortified almond butter during in vitro digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (38): 9659-9666.
- Rowland, S. J. (1937). 147. The soluble protein fraction of milk. *Journal of Dairy Research*, 8 (01): 6-14.
- Saladin, K. (2012). *Anatomy and Physiology: The Unity of Form and Function*: McGraw-Hill Education.
- Sarwar, G., Botting, H. G., Davis, T. A., Darling, P. & Pencharz, P. B. (1998). Free amino acids in milks of human subjects, other primates and non-primates. *British Journal of Nutrition*, 79 (02): 129-131.
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M. & Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (1-2): 1-22.
- Schmidt, R. H., Packard, V. S. & Morris, H. A. (1984). Effect of Processing on Whey Protein Functionality. *Journal of Dairy Science*, 67 (11): 2723-2733.
- Singh, H. (2004). Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2-3): 111-119.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*: Freeman press.
- Svanborg, S., Johansen, A.-G., Abrahamsen, R. K. & Skeie, S. B. (2014). Initial pasteurisation effects on the protein fractionation of skimmed milk by microfiltration. *International Dairy Journal*, 37 (1): 26-30.
- Svanborg, S., Johansen, A.-G., Abrahamsen, R. K., Schüller, R. B. & Skeie, S. B. (2016). Caseinomacropptide influences the functional properties of a whey protein concentrate. *International Dairy Journal*.
- Swaigood, H. E. (1993). Review and Update of Casein Chemistry 1, 2. *Journal of dairy science*, 76 (10): 3054-3061.
- Swaigood, H. E. (1995). F - Protein and Amino Acid Composition of Bovine Milk A2 - Jensen, Robert G. I: *Handbook of Milk Composition*, s. 464-468. San Diego: Academic Press.
- Switzar, L., Giera, M. & Niessen, W. M. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research*, 12 (3): 1067-1077.
- Thomas, M. E., Scher, J., Desobry-Banon, S. & Desobry, S. (2004). Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (5): 297-322.
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*: 99-114.
- Ulleberg, E. K., Comi, I., Holm, H., Herud, E. B., Jacobsen, M. & Vegarud, G. E. (2011). Human Gastrointestinal Juices Intended for Use in In Vitro Digestion Models. *Food Dig*, 2 (1-3): 52-61.

- Visser, J. & Jeurnink, T. J. (1997). Fouling of heat exchangers in the dairy industry. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14 (4): 407-424.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2005a). Membrane Processes. I: *Dairy Science and Technology, Second Edition*, s. 341-356: CRC Press.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2005b). Milk Components. I: *Dairy Science and Technology, Second Edition*, s. 17-108: CRC Press.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2005c). Milk: Main Characteristics. I: *Dairy Science and Technology, Second Edition*, s. 3-16: CRC Press.
- Ye, A., Singh, H., Taylor, M. W. & Anema, S. (2004). Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Le Lait*, 84 (3): 269-283.

# **Vedlegg**

## **Oversikt over vedlegg**

Vedlegg 1: Oppskrift på elektrolyttløsninger

Vedlegg 2: Gjennomsnitt av målinger av viskositet.

Vedlegg 3: Tallmateriale fra HPLC, frigjøring av frie aminosyrer.

.

## Vedlegg 1. Oppskrifter på elektrolyttløsninger

Tabell 3: Illustrerer anbefalte konsentrasjoner av elektrolytter i elektrolyttløsninger for henholdsvis magesekk (fra engelsk; simulated gastric fluid (SGF)) og fra tynntarm (fra engelsk; simulated intestinal fluid (SIF)), basert på in vivo data. (Minekus et al. 2014)

	SGF		SIF	
	Mmol L <sup>-1</sup>	Ref	Mmol L <sup>-1</sup>	Ref
<b>K<sup>+</sup></b>	7.8	27,28	7.6	27, 28
<b>Na<sup>+</sup></b>	72.2	27-29	123.4	27, 28
<b>Cl<sup>-</sup></b>	70.2	27,28	55.5	27
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	0.9	27	0.8	27
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	25.5	27	85	27
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	0.1	27	0.33	27
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1.0	27	-	
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0.15	27,28	0.6	27, 28



### Vedlegg 3. Gjennomsnitt gjentak på målinger av viskositet.

Produkt	Gjentak 1	Gjentak 2	Gjentak 3	Viskositet Gjennomsnitt
Melk P	0.003111	0.00315	0.003083	0.00311467
Melk U	0.0032735	0.0032775	0.0032925	0.00328117
Nativ myse O	0.0026575	0.0026705	0.002697	0.002675
Nativ myse P	0.0027675	0.0027365	0.002753	0.00275233
Nativ myse U	0.003233	0.0032835	0.003269	0.00326183
WPC80 O	0.002876	0.0028755	0.0028835	0.00287833
WPC80 P	0.002879	0.002866	0.002885	0.00287667
WPC80 U	0.0031065	0.003127	0.003131	0.0031215
ProteinX O	0.0032705	0.0032755	0.0032785	0.00327483
ProteinX P	0.003137	0.0031675	0.003138	0.0031475
ProteinX U	0.003127	0.0031355	0.003143	0.00313517

Figur 26. Gjennomsnitt av tallmateriale over viskositet i melk, nativ myse, WPC80 og ukjent X, etter ulik varmebehandling, ubehandlet (O), pasteurisert (P) og UHT- behandlet (U).

## Vedlegg 2. Resultater fra HPLC

Navn	Prøve	L-aspartic	L-glutamic	L-asparagine	L-serine	L-glutamine	L-histidin	Glycin	L-threonin	L-citrulline	L-arginine	L-alanin	GABA	L-tyrosin	L-valin	L-methionin	L-norvalin	L-isoleucine	L-phenylalanin	L-tryptophan	L-leucine	L-ornithine	L-lysin
Melk P0	110	n.d.	0.071	n.d.	0.021	n.d.	n.d.	0.053	n.d.	n.d.	0.001	0.013	0.053	n.d.	n.d.	0.416	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.042	0.053	
Melk P G60	111	n.d.	0.081	n.d.	0.01	0.001	n.d.	0.036	0.001	n.d.	0.008	0.0155	0.0385	0.002	0.3025	n.d.	0.413	n.d.	0.34	n.d.	0.0035	0.0335	0.079
Melk P D5	114	0.036	0.162	0.064	0.192	0.163	0.043	0.22	0.125	n.d.	0.84	0.274	0.075	0.659	3.327	0.087	0.407	0.147	3.941	0.175	0.457	0.085	1.27
Melk P D30	116	0.006	0.132	0.05	0.168	0.167	0.043	0.184	0.104	n.d.	1.058	0.233	0.071	0.842	3.184	0.189	0.392	0.121	3.88	0.341	0.635	0.076	1.997
Melk P D120	118	0.025	0.16	0.064	0.174	0.232	0.054	0.181	0.129	0.001	1.297	0.286	0.072	1.052	3.314	0.278	0.399	0.192	4.04	0.413	0.989	0.103	2.69
Melk U 0	120	n.d.	0.073	n.d.	0.019	n.d.	n.d.	0.063	n.d.	n.d.	0.002	0.013	0.054	n.d.	n.d.	0.401	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.039	0.059	
Melk U G60	122	n.d.	0.066	n.d.	0.0135	n.d.	n.d.	0.0455	0.002	n.d.	0.0105	0.018	0.037	0.003	0.3085	n.d.	0.401	n.d.	344	n.d.	0.004	0.0225	0.056
Melk U D5	124	0.003	0.094	0.041	0.144	0.12	0.032	0.156	0.085	n.d.	0.489	0.182	0.063	0.421	2.731	0.049	0.328	0.092	3.216	n.d.	0.308	0.058	0.551
Melk U D30	126	0.002	0.091	0.034	0.131	0.116	0.026	0.146	0.077	n.d.	0.68	0.175	0.063	0.557	2.512	0.094	0.332	0.084	3.215	n.d.	0.422	0.069	0.977
Melk U D120	128	0.006	0.109	0.037	0.154	0.152	0.039	0.164	0.09	n.d.	0.933	0.207	0.065	0.756	2.852	0.162	0.358	0.106	3.478	0.25	0.651	0.082	1.599
Nativ O 0	200	n.d.	0.003	n.d.	0.032	n.d.	n.d.	0.048	n.d.	n.d.	0.014	0.044	n.d.	n.d.	0.395	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.061
Nativ O G60	202	n.d.	0.015	n.d.	0.0045	n.d.	n.d.	0.0305	n.d.	n.d.	0.0065	0.0105	0.0295	0.001	0.31	n.d.	0.401	n.d.	0.341	n.d.	n.d.	0.031	0.031
Nativ O D5	204	0.001	0.067	0.043	0.15	0.166	0.118	0.175	0.12	n.d.	0.717	0.251	0.058	0.586	3.032	0.106	0.361	0.139	3.713	n.d.	0.81	n.d.	1.824
Nativ O D30	206	0.032	0.143	0.065	0.179	0.505	0.185	0.18	0.261	0.006	1.33	0.5	0.06	1.337	4.247	0.338	0.42	0.405	4.6	0.507	2.507	n.d.	4.302
Nativ O D120	208	0.066	0.269	0.06	0.208	0.652	0.174	0.202	0.337	0.001	1.129	0.579	0.064	1.309	4.015	0.364	0.331	0.637	4.082	0.516	2.758	n.d.	4.129
Nativ P 0	210	n.d.	n.d.	n.d.	0.018	n.d.	n.d.	0.048	n.d.	n.d.	n.d.	0.008	0.043	n.d.	n.d.	n.d.	0.381	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.049
Nativ P G60	212	n.d.	0.0135	n.d.	0.013	n.d.	n.d.	0.0385	n.d.	n.d.	0.0065	0.0135	0.0285	0.0045	0.318	0.0005	0.386	n.d.	0.3495	n.d.	0.0065	0.037	0.0365
Nativ P D5	214	0.007	0.078	0.054	0.175	0.21	0.124	0.194	0.145	n.d.	0.828	0.299	0.059	0.657	3.575	0.155	0.381	0.183	4.373	n.d.	1.171	n.d.	2.289
Nativ P D30	216	0.033	0.157	0.063	0.191	0.441	0.167	0.198	0.257	0.001	1.186	0.469	0.063	1.112	4.16	0.324	0.384	0.294	4.481	0.403	2.28	n.d.	3.933
Nativ P D120	218	0.079	0.312	0.077	0.26	0.916	0.232	0.229	0.446	0.003	1.38	0.778	0.063	1.531	4.871	0.49	0.391	0.823	4.733	0.635	3.704	n.d.	5.507
Nativ U 0	220	n.d.	0.004	n.d.	0.005	n.d.	n.d.	0.031	n.d.	n.d.	n.d.	0.007	0.044	n.d.	n.d.	0.396	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.061
Nativ U G60	222	n.d.	0.011	n.d.	0.013	n.d.	n.d.	0.0345	n.d.	n.d.	0.006	0.0135	0.027	0.003	0.2835	n.d.	0.361	n.d.	0.3155	n.d.	0.0025	0.032	0.0345
Nativ U D5	224	0.011	0.079	0.055	0.165	0.239	0.093	0.197	0.147	n.d.	0.671	0.275	0.06	0.519	3.417	0.117	0.393	0.225	3.776	0.272	1.069	n.d.	1.69
Nativ U D30	226	0.036	0.129	0.069	0.209	0.562	0.166	0.202	0.279	0.001	0.955	0.478	0.062	0.868	4.005	0.212	0.381	0.462	4.135	0.382	2.103	n.d.	2.985
Nativ U D120	228	0.064	0.235	0.071	0.239	0.948	0.223	0.206	0.415	0.001	1.169	0.756	0.061	1.274	4.08	0.361	0.382	0.787	3.918	0.612	3.26	n.d.	4.45
WPC O 0	300	n.d.	n.d.	n.d.	0.02	n.d.	n.d.	0.034	n.d.	n.d.	n.d.	0.006	n.d.	n.d.	n.d.	0.366	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.044	0.05
WPC O G60	302	n.d.	n.d.	n.d.	0.015	n.d.	n.d.	0.0235	0.001	n.d.	0.005	0.0095	0.0235	0.001	0.254	n.d.	0.338	n.d.	0.2805	n.d.	n.d.	0.036	0.034
WPC O D5	304	0.001	0.05	0.041	0.151	0.138	0.084	0.156	0.103	n.d.	0.721	0.217	0.056	0.494	3.075	0.074	0.385	0.127	3.751	n.d.	0.518	n.d.	1.375
WPC O D30	306	0.013	0.082	0.061	0.185	0.251	0.127	0.182	0.17	0.001	1.074	0.334	0.059	0.893	3.907	0.191	0.397	0.267	4.421	0.337	1.364	n.d.	2.833
WPC O D120	308	0.031	0.135	0.067	0.23	0.477	0.166	0.192	0.273	0.007	1.2	0.494	0.063	1.175	4.279	0.301	0.388	0.618	4.376	0.522	2.343	n.d.	3.612
WPC P 0	310	n.d.	n.d.	n.d.	0.02	n.d.	n.d.	0.034	n.d.	n.d.	n.d.	0.006	n.d.	n.d.	n.d.	0.377	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.054
WPC P G60	312	n.d.	n.d.	n.d.	0.012	n.d.	n.d.	0.0245	0.002	n.d.	0.006	0.011	0.0245	0.0035	0.3255	n.d.	0.408	n.d.	0.359	n.d.	0.001	0.042	0.035
WPC P D5	314	0.002	0.048	0.043	0.15	0.141	0.084	0.157	0.106	n.d.	0.678	0.221	0.056	0.457	3.201	0.074	0.325	0.129	3.601	0.212	0.543	n.d.	1.381
WPC P D30	316	0.013	0.081	0.056	0.19	0.26	0.127	0.188	0.168	0.002	1.102	0.349	0.062	0.916	4.078	0.197	0.399	0.281	4.668	0.384	1.481	n.d.	3.137
WPC P D120	318	0.03	0.135	0.068	0.241	0.469	0.167	0.203	0.276	0.006	1.206	0.517	0.063	1.173	4.571	0.308	0.401	0.607	4.768	0.499	2.367	n.d.	3.755
WPC U 0	320	n.d.	n.d.	n.d.	0.02	n.d.	n.d.	0.036	n.d.	n.d.	n.d.	0.005	n.d.	n.d.	n.d.	0.391	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.054
WPC U G60	322	n.d.	n.d.	n.d.	0.0125	n.d.	n.d.	0.022	0.001	n.d.	0.0045	0.01	0.024	0.001	0.264	n.d.	0.35	n.d.	0.286	n.d.	n.d.	n.d.	0.031
WPC U D5	324	0.004	0.048	0.043	0.143	0.154	0.066	0.15	0.111	n.d.	0.614	0.217	0.054	0.407	3.054	0.074	0.387	0.169	3.596	n.d.	0.664	n.d.	1.401
WPC U D30	326	0.013	0.072	0.043	0.162	0.286	0.097	0.16	0.171	n.d.	0.872	0.308	0.055	0.654	3.409	0.151	0.398	0.351	3.702	0.277	1.377	n.d.	2.496
WPC U D120	328	0.035	0.13	0.054	0.205	0.428	0.126	0.174	0.241	n.d.	1.066	0.428	0.059	0.94	3.808	0.236	0.386	0.517	3.953	0.403	2.023	n.d.	3.206
ProteinX O0	400	n.d.	n.d.	n.d.	0.019	n.d.	n.d.	0.037	n.d.	n.d.	0.008	0.005	n.d.	n.d.	n.d.	0.405	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.055
ProteinX O G60	402	n.d.	n.d.	n.d.	0.0035	n.d.	n.d.	0.012	n.d.	n.d.	0.0035	0.004	0.255	n.d.	0.075	n.d.	0.363	n.d.	0.0885	n.d.	n.d.	n.d.	0.045
ProteinX O D5	404	0.012	0.063	0.064	0.186	0.328	0.077	0.187	0.18	0.004	1.212	0.288	0.061	1.038	3.669	0.234	0.378	0.245	4.324	0.449	1.617	0.102	2.382
ProteinX O D30	406	0.02	0.09	0.08	0.223	0.777	0.121	0.209	0.28	0.007	1.514	0.429	0.068	1.305	4.286	0.34	0.391	0.441	4.823	0.532	2.479	0.093	3.017
ProteinX O D120	408	0.046	0.161	0.105	0.311	1.409	0.194	0.261	0.452	0.009	1.717	0.611	0.07	1.574	4.7	0.452	0.402	0.695	5.132	0.578	3.261	n.d.	3.831
ProteinX P0	410	n.d.	n.d.	n.d.	0.004	n.d.	n.d.	0.015	n.d.	n.d.	0.011	0.001	n.d.	n.d.	n.d.	0.378	n.d.	n.d.	0.009	n.d.	n.d.	n.d.	0.067
ProteinX P G60	412	n.d.	n.d.	n.d.	0.0135	n.d.	n.d.	0.0225	n.d.	n.d.	0.0045	0.009	0.026	0.002	0.0965	n.d.	0.393	n.d.	0.0121	n.d.	n.d.	0.0275	0.047
ProteinX P D5	414	0.007	0.06	0.064	0.185	0.339	0.07	0.182	0.178	0.002	1.253	0.301	0.062	1.099	3.73	0.249	0.383	0.249	4.456	0.436	1.709	0.081	2.559
ProteinX P D30	416	0.012	0.08	0.079	0.216	0.772	0.117	0.193	0.274	0.006	1.518	0.424	0.064	1.339	4.118	0.348	0.374	0.42	4.717	0.539	2.542	0.102	3.155
ProteinX P D120	418	0.038	0.149	0.12	0.314	1.426	0.213	0.236	0.496	0.01	1.696	0.631	0.07	1.603	4.57	0.456	0.372	0.678	5.037	0.522	3.297	0.09	3.631
ProteinX U 0	420	n.d.	n.d.	n.d.	0.019	n.d.	n.d.	0.036	n.d.	n.d.	0.032	0.005	n.d.	n.d.	n.d.	0.397	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	0.06
ProteinX U G60	422	n.d.	n.d.	n.d.	0.0125	n.d.	n.d.	0.0225	n.d.	n.d.	0.005	0.009	0.026	0.0015	0.093	n.d.	0.403	n.d.	0.118	n.d.	n.d.	0.0245	0.052
ProteinX U D5	424	0.003	0.051	0.054	0.159	0.263	0.054	0.153	0.153	n.d.	1.067	0.248	0.059	0.897	3.161	0.193	0.365	0.198	3.797	0.375	1.394	0.081	2.073
ProteinX U D30	426	0.017	0.083	0.075	0.207	0.772	0.116	0.19	0.265	0.006	1.521	0.41	0.064	1.318	3.967	0.331	0.398	0.416	4.6	0.489	2.491	0.08	3.111
ProteinX U D120	428	0.039	0.154	0.112	0.301	1.409	0.206	0.229	0.469	0.01	1.662	0.607	0.075	1.528	4.409	0.43	0.387	0.653	4.797</				





Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway