



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 30 stp

Fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (KBM)

Utvikling av plantebaserte drikker (plantemelk) av erter og bygg

Development of plant-based beverages (plant milk)
from peas and barley

Marianne Rykkelid Dahle
Matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven avslutter en mastergrad innen matvitenskap i retningen produksjon og utvikling av næringsmidler, ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven ble skrevet ved Nofima og Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) våren 2021.

Nofima gjorde det mulig å formulere en oppgave etter min nysgjerrighet for plantemelk som produktkategori. Takk for råstoff og utstyr. Det har vært spennende å utvikle, utføre og skrive oppgaven med oppfølging fra min hovedveileder førsteamanuensis Bjørge Westereng og mine biveiledere seniorforsker Svein Halvor Knutsen og seniorforsker Stefan Sahlstrøm ved Nofima. Jeg ønsker å takke hver og en av dere for veiledning, hjelp og for kunnskapen dere har delt. Jeg har også satt stor pris på humoren og det gode humøret dere har.

Det har vært en usikker tid i forhold til den pågående pandemien. Derfor vil jeg rette en ekstra takk til mine veiledere som har gjort det mulig å gjennomføre laboratoriearbeid. På laboratoriet var jeg heldig å få hjelp av senioringeniør Hanne Kristine Zobel og Dr. Hanne K. Mæhre. Jeg setter veldig pris på all hjelpen jeg har fått av dere, takk skal dere ha.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for støtte underveis i arbeidet, det har betydd mye.

Ås, juni 2021

Marianne Rykkelid Dahle

Sammendrag

Bakgrunn: Plantebaserte drikker eller plantemelk er en raskt voksende produktkategori. Slike drikker sammenlignes med tradisjonelle melkebaserte drikker i smak og bruk. Derfor er det problematisk at de fleste slike produkter på markedet har en god del lavere innhold av protein enn kumelk. Bygg og erter er norske råvarer som kunne egne seg til produksjon av plantemelk. Dagens norskdyrkede bygg går i stor grad til fôr, og det er dessuten potensiale for å dyrke erter på et større areal i Norge.

Hensikt: Hensikten med oppgaven var å utvikle plantemelk av bygg, av erter og ertefraksjoner, med høyere proteininnhold enn eksisterende drikker. Kvalitetskravene var god utnyttelse av startmaterialet og høy sluttkvalitet målt i proteinutbytte, stivelsesnedbrytning og smak. Råstoff og metode var variablene som skulle undersøkes.

Metode: Startmaterialene var mel av Duga bygg, mel av Ingrid erter, grovfraksjon og proteinfraksjon etter luftklassifisering av Ingrid erter samt produktet Vestkorn. Plantemelk ble laget etter ulike metoder og analysert for protein ved modifisert Lowry og Dumas. Grad av stivelsesnedbrytning ble beregnet fra bestemmelse av total stivelse (Megazyme) og fri D-glukose (GOPOD, Megazyme). Rapid Visco Analyse (RVA) ble benyttet for å måle viskositet og undersøke enzymeffekt sammen med beregningen av nedbrutt stivelse. Smak og forbrukeraksept ble undersøkt med to enkle sensoriske tester (hedoniske) for metoden som ga plantemelk av høyest kvalitet, den siste smakstesten inkluderte tilsetninger for smak og stabilitet.

Resultater: Alle startmaterialene viste seg egnet til å lage plantemelk. Metoden med gelatinisering før enzymbehandling, inkubasjon ved 50 °C og ikke sentrifugering (OGCM) ga høyest sluttkvalitet. Med denne metoden var stivelsesnedbrytningen mellom fullstendig og 60 %, proteinutbyttet 89 til 99 % og proteinkonsentrasjonen 1,5 g til 2,9 g/100 mL. Ekstrakter av VK, IGF og DUB ble best likt i smakstestene. Proteinkonsentrasjonen var over gjennomsnittet for eksisterende produkter.

Konklusjon: Råstoffene og metodene viste seg egnet til produksjon av plantemelk med mer protein enn de fleste eksisterende varianter. Resultatene er med på å danne et grunnlag for videre produktinnovasjon og kan bidra til verdiskaping av erter og bygg. Prosessene kan forbedres ytterligere for eksempel med hensyn til smak, tekstur og stabilitet.

Abstract

Background: Plant-based beverages or plant milk is a fast-growing product category. Such beverages are often compared to dairy milk both in flavor and use. Therefore, it is problematic when the protein content of most plant milk available is lower than of dairy milk. Barley and peas are raw materials that could be suitable for plant milk. Most of the Norwegian barley is used for animal feed, and there is a potential for growing peas on a larger area in Norway.

Purpose: The purpose of this study was to develop plant milk from hull-less barley, peas and pea fractions giving a higher protein content than most existing beverages. The quality requirements were; high degree of utilization of the start material and a high final quality measured by protein yield, starch degradation and flavor. The variables to be investigated were raw material and methods/processing steps.

Method: Flour from barley (Duga), Ingrid peas, fine and coarse fractions according to air classification of Ingrid peas, and the product Vestkorn were chosen as starting materials. Plant milk was made by various methods and analyzed for protein by modified Lowry and Dumas. The degree of starch degradation was calculated from the determination of total starch (Megazyme) and free D-glucose (GOPOD, Megazyme). Rapid Visco Analysis (RVA) was used to measure viscosity and examine enzymatic effects together with the calculation of degraded starch. Taste and consumer acceptance were examined with two simple hedonic sensory evaluations, where the method giving plant milk of the highest quality was used. The last sensory evaluation included additives for flavor and stability.

Results: All starting materials proved suitable for development of plant milk. The method including gelatinization prior to enzymatic degradation, incubation at 50 °C and non-centrifugation (OGCM) resulted in the highest final quality. With this method, the starch degradation was between complete and 60 %, protein yield 89 to 2,9 g/100 mL and protein concentration 1,5 to 2,9 g/100 mL. Extracts with VK, IGF and DUB had the highest consumer acceptance. The protein concentration was above average for existing products.

Conclusion: The raw materials and methods proved suitable to produce plant milk with more protein than most existing varieties. The results help to form a basis for further product innovation and can contribute with value creation of peas and barley. The processes can be further improved, for example in terms of taste, texture and stability.

Forkortelser

N	Nitrogen
NSP	Non-Starch Polysaccharide
RVA	Rapid Visco Analyse
DUB	Duga bygg
INA	Avskallede Ingrid erter
IPF	Proteinfraksjon, avskallede Ingrid erter
IGF	Grovfraksjon, avskallede Ingrid erter
VK	Vestkorn, F55X
RHO	Rohalase: enzympreparat med xylanase og beta-glukanase aktivitet
GAF	Gammafungase: enzympreparat med alfa-amylase aktivitet
GDEX	Gammadex: enzympreparat med amyloglukosidase aktivitet (glucoamylase)
DMSO	Dimetyl sulfoksid
V	50°C, forforsøk
K	25°C, forforsøk
R	Med RHO, forforsøk
U	Uten RHO, forforsøk
CM	Crude Milk
O	Oppskalerte prøver
G	Gelatiniserte prøver
OG	Oppskalerte og gelatiniserte prøver
OCM	Oppskalerte prøver, Crude Milk
OGCM	Oppskalerte og gelatiniserte prøver, Crude Milk

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
1 Innledning	1
1.1 Plantemelk	1
1.2 Råvarer	6
1.2.1 Bygg	7
1.2.2 Erter	8
1.3 Antinæringsstoffer og allergier	9
1.4 Sentrale metodikker for råvarebehandling og analyse	10
1.4.1 Luftklassifisering	10
1.4.2 Dumas	10
1.4.3 Modifisert Lowry	11
1.4.4 Enzymer	12
1.4.5 Stabilisatorer	13
1.4.6 Viskositetsmåling	13
1.4.7 Sensorisk analyse	14
1.5 Hensikt	14
2. Materialer og metoder	15
2.1 Startmateriale og enzymer	15
2.2 Analyser	17
2.2.1 Tørrstoff	17
2.2.2 Total stivelse	17
2.2.3 Protein ved Dumas	19
2.2.4 Protein ved modifisert Lowry	20
2.2.5 Glukose ved GOPOD	21
2.3 Forforsøk: Ulik temperatur og enzymbehandling	22
2.4 Prøveproduksjon	23
2.4.1 Oppskalerte prøver (O)	24
2.4.2 Oppskalerte prøver uten sentrifugering (Crude Milk) (OCM)	25
2.4.3 Gelatinisering før enzymbehandling (OG, OGCM)	26
2.4.4 Sammenligning med eksisterende produkter	26
2.5 Rapid Visco Analyse (RVA)	26
2.6 Hedoniske smakstester	28

2.7 Databehandling.....	30
3. Resultater	31
3.1 Startmateriale	31
3.2 Forforsøk: Ulik temperatur og enzymbehandling	32
3.2.1 Fullstendig nedbrutt stivelse.....	32
3.2.2 Ekstrahert protein	33
3.3 Prøveproduksjon - Fullstendig nedbrutt stivelse	35
3.4. Prøveproduksjon - Protein.....	38
3.4.1 Proteinutbytte	38
3.4.2 Konsentrasjoner av protein i plantemelken	39
3.4.3 Protein sammenlignet med eksisterende produkter.....	40
3.5 Hedoniske smakstester	42
3.5.1 Smakstest 1 – uten tilsetning	42
3.5.2 Smakstest 2 – med tilsetning	44
3.6 Visuelle observasjoner av ekstraktene i dette studiet.....	47
4. Diskusjon.....	48
4.1 Startmateriale	49
4.2 Forforsøk: ulike temperaturer og enzymbehandling	50
4.2.1 Fullstendig nedbrutt stivelse ved ulike temperaturer og enzymbehandling	50
4.2.2 Ekstrahert protein etter ulike temperaturer og enzymbehandling	52
4.2.3 Sammenligning av Dumas og modifisert Lowry’s metode.....	52
4.3 Prøveproduksjon av plantemelk	55
4.3.1 Fullstendig nedbrutt stivelse.....	55
4.3.2 Protein	57
4.4 Sammenligning med kommersielle drikker	58
4.5 Hedoniske smakstester	59
4.6 Konklusjon	63
5. Referanser	64
7. Vedlegg	69

1 Innledning

1.1 Plantemelk

Det er vanlig å bruke ordet plantemelk eller plantebasert melk om ekstrakter av plantemateriale i vann som etterligner kumelk i utseende. Ekstraktene er kolloidale løsninger eller emulsjoner som kan være tilsatt sukker, olje, smak, stabilisatorer og beriket med vitaminer og mineraler (McClements et al., 2019; Mäkinen et al., 2015; Rincon et al., 2020; Silva et al., 2020). Plantematerialet kan være cerealer (havre, ris), pseudocerealer (quinoa), belgvekster (kikert, soya), nøtter og oljefrø (mandel, cashew, solsikke) (Gobbi et al., 2019; Sethi et al., 2016).



Figur 1. Eksempler på plantemelk tilgjengelig på det norske markedet. Soya, havre, ris og mandel er blant de vanligste variantene av plantemelk. Illustrasjonene er hentet fra matbutikken Oda: <https://oda.com/no/categories/48-melk-meieriprodukter-og-egg/487-plantebasert-drikke/>

Andre navn som benyttes om et slikt produkt er «plantebasert melkeerstatning», «*non-dairy alternative*», «plantebasert drikke» og «milk-analog». I oppgaven vil ordene plantemelk og plantebasert drikke bli brukt om ekstraktene av plantemateriale i vann da det meste av litteraturen omtaler produktet og kategorien slik (Haas et al., 2019; Rincon et al., 2020). Generelt kan plantematerialet bløtlegges og våtmølles eller tørt oppmalt materiale kan ekstraheres i vann. Det er også mulig å benytte proteinisolater eller konsentrater. Filtrering, sentrifugering eller dekantering er vanlig for å fjerne uønskede partikler før homogenisering og varmebehandling utføres (Mäkinen et al., 2015).

Stabiliteten av slike drikker er en funksjon av størrelsen på den dispergerte fasen (fettkuler, fast materiale, etc.) som kan føre til sandethet og tørr munnfølelse når den er opprisset og fasedeling ved lagring (Paul et al., 2019). For et bedre proteinutbytte kan enzymer som amylase og amyloglukosidase tilsettes (Mäkinen et al., 2015; Paul et al., 2019) selv om dette ikke er noe standard og vil avhenge av startmaterialet som benyttes. Slike stivelsesnedbrytende enzymer vil også kunne senke viskositeten forårsaket av svellet stivelse og bidra med søthet.

Felles for de plantebaserte drikkene er at de selges i kartong, drikkes som de er eller kan brukes i matlaging i større eller mindre grad, de er opake i forskjellige nyanser av hvit. Mange er kjent med kumelk og det vil ifølge McClements et al. (2019) være nødvendig å gjenskape de positive egenskapene til kumelk hos en plantemelk. Soyadrikk ligner mest på melk i forhold til proteininnhold og fett. Dette er en av variantene det selges mest av på verdensbasis (Paul et al., 2019). En trend blant forbrukere er å se etter andre alternativer enn soya. Til disse forbrukerne finnes det drikker basert på havre, ris, mandel og kokos. I tillegg til kombinasjoner med havre og hasselnøtt, og mandel og havre. En nykommer på det norske markedet er en drikk laget med erteprotein. I utlandet finnes enda flere alternativer med råstoff av ulike nøtter og frø. I Brasil selges en drikk med erteproteinisolat, og i USA lages det en drikk med bygg etter ølbrygging tilsatt risprotein og erteprotein. Farge og konsistens på drikkene avhenger av ingrediensene og prosessene som er brukt, det samme gjør næringsinnholdet (Silva et al., 2020).

Ernæring

Det er store variasjoner i energitetthet og næringsinnhold mellom ulike plantebaserte drikker avhengig av plantemateriale, bearbeidelse og tilsatte ingredienser. Ernæringsmessig er plantemelk underlegent kumelk (Chalupa-Krebzdak et al., 2018; Kopf-Bolanz & Sousa, 2017; Vanga & Raghavan, 2018). Fellestrekkene er lavere proteininnhold samt mangel eller lavere tilgjengelighet av mineraler som kalsium og jod (McClements et al., 2019). Det er derfor problematisk at plantemelk enkelte steder markedsføres som sunnere alternativ til kumelk (Singhal et al., 2016). Flere har konkludert med at det vil være viktig fremover å utvikle

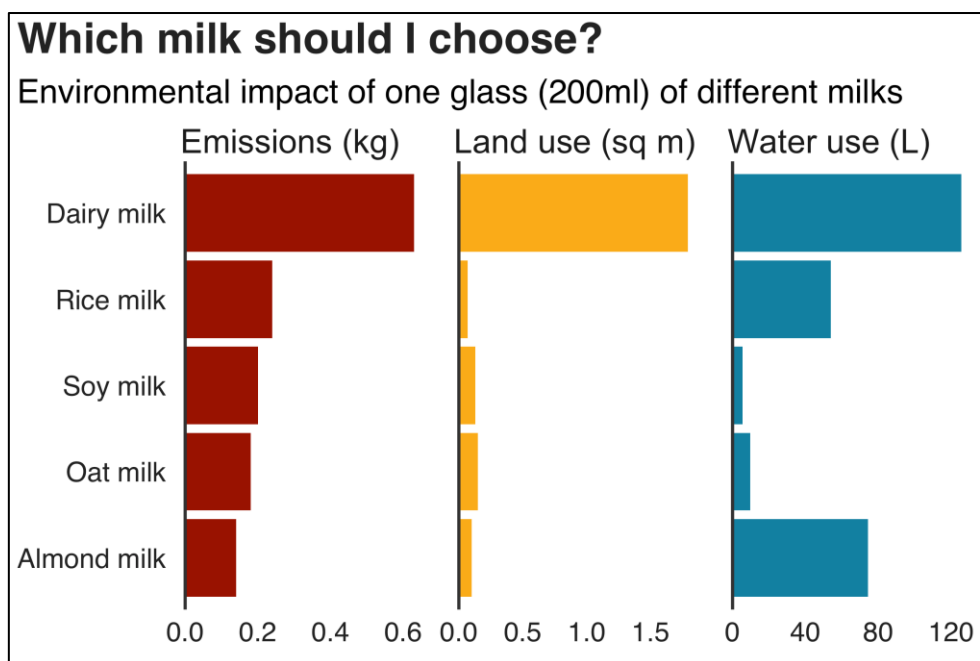
plantemelk med bedre tilgjengelighet av vitaminer og mineraler samt et høyere innhold av protein. I tillegg er det avgjørende at produktet er velsmakende og er produsert med lave miljøpåvirkninger (Mäkinen et al., 2015; Silva et al., 2020).

Forbrukere og motiver

Forbrukergruppene som kjøper plantebaserte drikker i USA er opptatt av miljø og bærekraft (McCarthy et al., 2017). Lignende observasjoner har blitt gjort i Europa. I tillegg er et vegansk, vegetarisk eller fleksitarisk kosthold begrunnet som drivere for økt interesse for plantebaserte alternativer til melk (Haas et al., 2019; Jeske et al., 2018). Forbrukere med melkeallergi eller laktoseintoleranse kan ha nytte av alternativer til kumelk, selv om det finnes alternativer for dem med laktoseintoleranse innen meieri. Paul et al. (2019) beskrev det Europeiske markedet som det raskest voksende markedet for plantemelk. I 2018 var salget av plantemelk i USA tilsvarende 13 % av melkemarkedet. Det er spådd fortsatt vekst og 14 % økning i salg av plantemelk på verdensbasis fra 2018–2024 ifølge Paul et al. (2019).

Nedgangen i salget av kumelk kobles ofte sammen med økningen i salget av plantemelk. Til og med i land som Østerrike hvor kumelk har en sterk posisjon og ansees som sunnere, mer naturlig og bedre for benhelsen enn plantemelk, har det blitt konkludert med at markedsandelen til plantemelk vil øke de kommende årene (Haas et al., 2019). Drivere ble beskrevet som endret livsstil til et fleksitarisk, vegetarisk eller vegansk kosthold, bevissthet rundt dyrevelferd, miljø og helse. I en studie av finske forbrukere ble motivene for å erstatte animalske proteiner med planteproteiner funnet å være hovedsakelig miljø/bærekraft, helse, vektkontroll og sosiale aspekter (Vainio et al., 2016).

Begrepet bærekraft er komplekst. Forhold som klimagassutslipp, landareal og vannforbruk trekkes ofte frem og varierer etter type plantemelk (figur 2). Forskjellene i klimagassutslipp (CO₂-ekv) er store mellom kumelk og plantemelk. Kumelk ble funnet å gi mer enn dobbelt så mye utslipp (kg CO₂-ekv) som ris-, soya-, havre-, og mandelmelk per 200 mL (figur 2). Det er viktig å poengtere at analyser av klimagassutslipp blir basert på ulike parametere, tallene er sammensatt og vil dessuten se annerledes ut om en ser på utslipp per kg protein enn utslipp per L ferdig drikke.

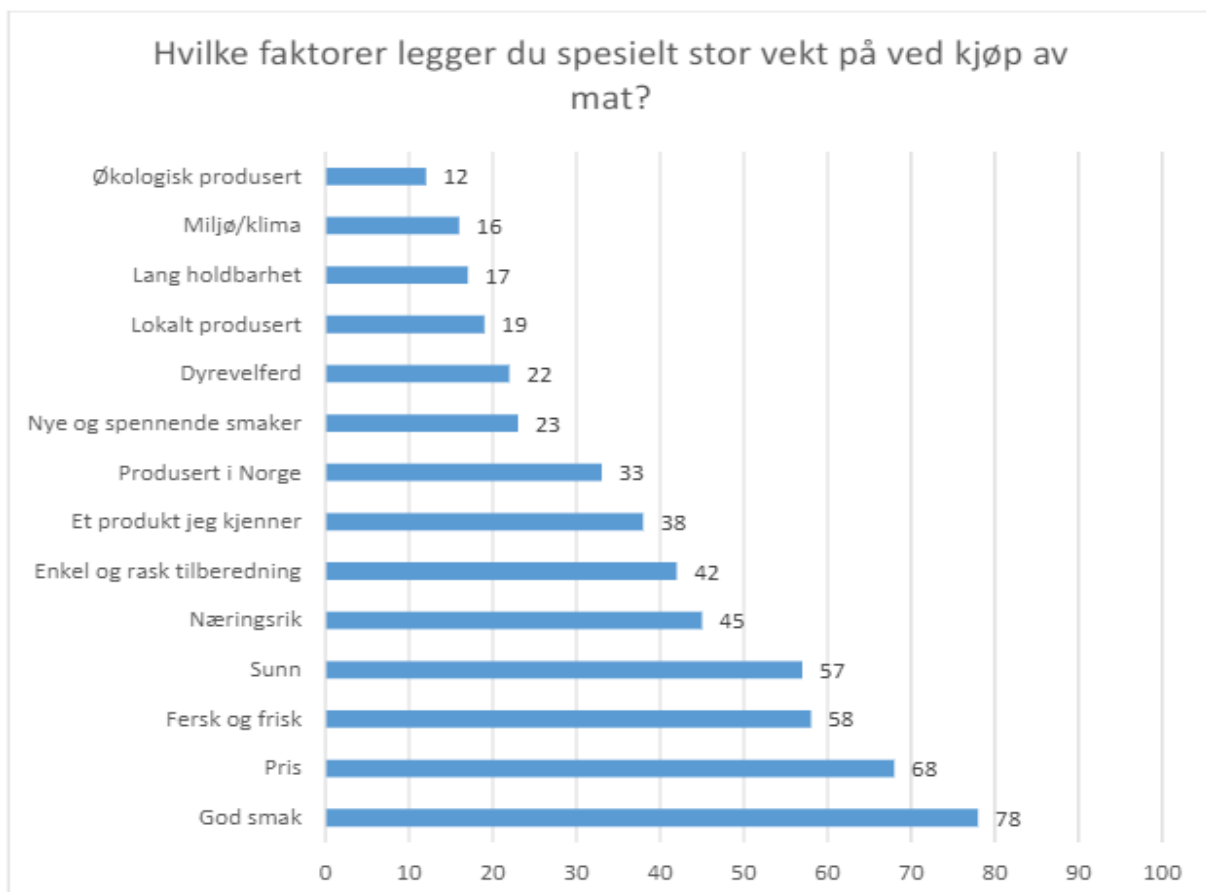


Figur 2. «Which milk should I choose?». Viser utslipp (kg CO₂-ekv), dyrkingsareal (m²) og vannforbruk (L) for kumelk, rismelk, soyamelk, havremelk og mandelmelk per 200 mL. Tilgjengelig fra <https://www.bbc.com/news/science-environment-46654042> med tall fra Poore, J., & Nemecek, T. (2018).

Gjennom fokusgrupper og undersøkelser identifiserte Schiano et al. (2020) fem hovedpunkter som ansees viktige for bærekraft: lavest mulig karbonavtrykk, lavest mulig utslipp av drivhusgasser, ingen konserveringsmidler, god dyrevelferd og enkle eller få ingredienser. Studiet gikk for seg i USA, men det er sannsynlig at flere av disse punktene kan overføres til de norske forbrukerne. I en livssyklusanalyse som sammenlignet kumelk og to plantebaserte alternativer, mandel og soya var konklusjonen at mandel og soya hadde miljømessige fordeler sammenlignet med kumelk (Grant & Hicks, 2018). Mandel kom derimot dårligst ut på alle punkter dersom en bedømte resultatene per kg protein. Noen av de viktigste påvirkningsfaktorene i denne livssyklusanalysen var transport og strømbruk under produksjon og lagring.

Trender viser at markedet vil bevege seg fra soya til mandel- og ris-basert plantemelk på grunn av mindre bærekraftig dyrking og ernæringsmessige oppfatninger av soya. Jeske et al. (2018) spår at særlig produkter med få allergener og uten gluten vil øke i omfang. Soyamelk har lange tradisjoner og et høyere proteininnhold enn de fleste andre drikker. Men en «bønneaktig» smak og antinæringsstoffer (beskrevet i avsnitt 1.3) gjør produktet mindre attraktivt (Vanga & Raghavan, 2018).

Bugge og Alfsnes (2018) undersøkte norske forbrukeres villighet til å bytte ut animalske produkter med plantebaserte produkter i 2018. Omtrent to av ti deltakere byttet ut animalske meieriprodukter eller kumelk med plantebaserte alternativer som soya, kokos eller mandel. De siste 2-3 årene hadde ¼ av respondentene endret kostholdet som følge av miljø eller klima. Av disse var det langt flere kvinner enn menn og i større grad personer under 30 år enn andre aldersgrupper. I den samme undersøkelsen svarte 53 % at de var helt eller delvis enige i at de er mer opptatt av å spise sunn mat enn miljø- og klimavennlig mat, mens 12 % av respondentene var svært eller ganske uenige i påstanden. Smak vil uansett alltid være svært viktig for at et produkt likes, og har vist seg viktig for hvilken grad melk og plantemelk konsumeres (Palacios et al., 2009; Palacios et al., 2010). I en forbrukerundersøkelse fra 2018 viste «god smak» seg å være den viktigste faktoren for norske forbrukere ved kjøp av mat (figur 3).



Figur 3. Hvilke faktorer legger du spesielt stor vekt på ved kjøp av mat? Hver enkelt stolpe er oppgitt i Prosent. Antall individer i undersøkelsen, N= 1785 (Bugge & Alfsnes, 2018). Tallmaterialet er hentet fra Norstat 2018.

Ingen av drikkene på markedet er i dag laget på norske råvarer, eller produsert i Norge. Plantemelk med havre har for lengst steget inn i butikkhyllene, mens andre kornsorter er mindre vanlige. Kun én variant med bygg har blitt funnet i forbindelse med oppgaven. Denne inneholdt erteprotein, risprotein i tillegg til maltet bygg. Bygg er en råvare som det tradisjonelt dyrkes mye av i Norge. Derfor er det interessant å undersøke om norskdyrket bygg egner seg som startmateriale i plantemelk. Det finnes per i dag ingen plantemelk av bygg uten andre tilsetninger av protein. Erter er en proteinvekst med flere fordeler for landbruket. Plantemelk med erteprotein er enda ikke utbredt. Det finnes én variant som nylig har blitt tilgjengelig i norsk dagligvare (Sproud). Andre varianter kan inneholde erteprotein eller erteproteinisolat som en ekstra ingrediens for å øke proteininnholdet.

1.2 Råvarer

Det ble dyrket 606 000 tonn bygg i Norge i 2020, som tilsvarte 49 % av totalt dyrket korn i Norge dette året (1 239 000 tonn). Dette er også gjennomsnittet for de siste fem årene (Statistisk sentralbyrå, 2020). Det meste av bygget går til dyrefôr, mindre enn 1 % brukes som mat til mennesker (Norske Felleskjøp, 2020). Behovet for selvforsyning er et evig tema. Det uttrykkes politisk og diskuteres hyppigere i tider med økt global usikkerhet. I tillegg er kortreist mat forbundet med bærekraft både i forhold til miljø og lokal sysselsetting. Selvforsyningsgraden av bygg er ~100 %. Strømmen kan i stor grad komme fra vannkraft som er en fornybar ressurs.

Norskdyrkede erter brukes i hovedsak til dyrefôr. Erter regnes som en billig kilde til protein, karbohydrater og vitaminer og mineraler (Dahl et al., 2012). Erteplantene har evnen til å binde nitrogen fra luften ved hjelp av arter av bakterieslekten *Rhizobium* som kan leve i knoller på røttene til planten. Bakteriene finnes normalt i tilstrekkelige mengder i norsk jord. Det gjør at ertene er selvforsynt med nitrogen og ikke behøver gjødsling med dette. Prosessen kalles biologisk nitrogenfiksering og gjør at nitrogen fra luften blir tilgjengelig for planter, dyr og mennesker. Dette er en viktig del av det globale nitrogenkretsløpet hvor omtrent 40 mill. tonn nitrogen bindes i jordbruket hvert år på verdensbasis (Serikstad et al., 2013). Fordelen med biologisk nitrogenfiksering i tillegg til at det er gunstig for erteplanten, er at det kan benyttes

til samdyrking eller vekstskifte med korn eller andre vekster. Høyere totalavling og mindre utarming av jorda er noen av fordelene samdyrking eller vekstskifte med erteplanter kan gi (Foyer et al., 2016). I følge Abrahamsen et al. (2019) har vi muligheter for å produsere en god del mer erter og åkerbønner dersom norske forbrukere vil etterspørre matprodukter basert på planteprotein.

1.2.1 Bygg

Bygg (*Hordeum vulgare L.*) ansees som en sunn råvare og Sullivan et al. (2013) uttalte at næringsmiddelindustrien står overfor utfordringen med å produsere sunne produkter basert på bygg, som også tilfredsstillende behovene til forbrukeren. Siden bygg inneholder gluten, bør ikke forbrukere med cøliaki konsumere kornet eller produkter med det. Skall-løst bygg, eller nakenbygg, er sorter som har et løstsittende skall som løsner under treskingen. Slike sorter har vist å ha høyere innhold av blant annet protein (Baidoo & Liu, 1998). Bygg inneholder 10–20 % proteiner, omtrent 70 % stivelse, 5–10 % beta-glukan, 2–3 % frie lipider og 2,5 % mineraler (Sullivan et al., 2013). Mye av proteinet er prolamin (hordeiner). Dette er lagringsproteiner som finnes i byggets endosperm. I endospermen er det også glutelin, som utgjør 23 % av det totale proteinet. I tillegg er det mindre mengder albumin og globulin i kornets aleuronlag og embryo (Houde et al., 2018). Bygg inneholder essensielle aminosyrer som treonin, valin og lysin. Essensielle aminosyrer må bli tilført gjennom kosten og er en viktig del av et fullstendig kosthold (Sullivan et al., 2013).

Stivelse utgjør hovedbestanddelen av karbohydratene i bygg, og er satt sammen av to polymerer av glukose: amylose og amylopektin. Den største andelen stivelse i bygg finnes i endospermen. Amylose og amylopektin utgjør tilnærmet 30 og 70 % (w/w) respektivt (Shewry & Ullrich, 2014). Amylose er hovedsakelig enheter av alfa-D-glucopyranosyl bundet i (1→4)-bindinger til en lineær kjede. Enkelte amylosemolekyler inneholder også et par forgreninger til hovedkjeden via alfa-(1→6)-bindinger. Disse er få, og ofte spredte slik at de fysiske egenskapene til amylose i grunn gis av de lineære molekylene (Damodaran & Parkin, 2017). Amylopektin er derimot store polymerer med flere forgreninger (Shewry & Ullrich, 2014). Stivelsesmolekylene foreligger delvis krystallisert som stivelseskorn. Selv om

stivelseskorn er uløselige i vann, kan de hydrere til en viss grad i romtemperert vann. I stivelseskornene foreligger amylose og amylopektin i semikrystallinske og amorfe områder. Disse områdene ligger lagvis, som en løk. Når stivelse varmes opp med vann øker viskositeten. Stivelseskornene mister sin form ved at hydrogenbindingene som stabiliserer stivelseskjedene brytes. Prosessen kalles gelatinisering og må gjøres for at amylose og amylopektin skal være tilgjengelige for enzymer (Huber & BeMiller, 2017).

En mindre andel av karbohydrater i bygg omfatter kostfibrene beta-glukan og arabinoxylan. Beta-glukan er et vannløselig polysakkarid bestående utelukkende av glukose. I følge Baidoo og Liu (1998) inneholder skall-løst bygg betydelig mer beta-glukan enn bygg med skall. Beta-glukan tilhører generelt kostfibergruppen NSP (Non-Starch Polysaccharide; e.g. et polysakkarid som ikke er stivelse). Arabinoxylan er et annet NSP i bygg og består av pentosene xylose og arabinose (Izydorczyk & Biliaderis, 2000).

1.2.2 Erter

Erter (*Pisum sativum*) er kjernebelgvekster som tilhører erteblomstfamilien. De store og næringsrike frøene blir brukt til mat og fôr. Hos villformene åpner belgen seg når frøene er modne, mens de dyrkede formene holder på frøene i overmoden tilstand (Frøseth, 2009). Dyrkingen skjer i mange deler av verden og erter er rangert som den femte mest dyrkede belgfrukten etter soya, peanøtt, hagebønner og kikerter. Verdens største produsent og eksportør av erter er Canada. Belgfrukten blir hovedsakelig brukt som en kilde til protein (Shen et al., 2016).

I Norge kan ertene dyrkes på Østlandet og i Trøndelag og veksttiden er omtrent som vårhvete. De aktuelle sortene for dyrking i Norge er Ingrid, Louise, Faust, Tinker og Pinocchio (Frøseth, 2017). I en rapport fra 2019 undersøkte Abrahamsen et al. mulighetene for å øke proteinproduksjonen på kornareal i Norge (Abrahamsen et al., 2019). Proteinvekstene som ble inkludert i dette studiet var erter (*Pisum sativum*) og åkerbønner (*Vicia faba* L). Det ble funnet et potensiale for å dyrke proteinvekstene på et vel 7 ganger større areal enn det gjøres i dag.

Men flere forhold kan gjøre at dette tallet i realiteten er mindre. Det indikerer derimot at det er muligheter for å møte en økt etterspørsel etter produkter av erter og åkerbønner.

Sammensetningen i erter avhenger ifølge Nikolopoulou et al. (2007) av sort og dyrkingsforhold. Ofte oppgis tørre hele erter å inneholde omtrent 33–47 % stivelse og 24–32 % protein (Nikolopoulou et al., 2007; Wu & Nichols, 2005). Ved avskalling øker innholdet av protein og stivelse (Wang et al., 2008). Ertene inneholder i tillegg vitaminer, mineraler og fiber. Men også antinæringsstoffer som fytinsyre, trypsin inhibitorer og oligosakkarider (som f.eks stackyose og raffinose) (Wang & Daun, 2004). Proteinene i erter er rike på den essensielle aminosyren lysin, men har et lavt innhold cystein og de essensielle aminosyrene metionin og tryptofan. Siden cerealer i større grad mangler lysin, men inneholder tilstrekkelig metionin og cystein, kan en kombinasjon av erter og cerealer sammen dekke behovet for essensielle aminosyrer og cystein i kosten (Wang & Daun, 2004).

Stivelse er karbohyratet det er mest av i erter. Ertestivelse består typisk av mer amylose i forhold til amylopektin sammenlignet med korn. Amylose-innholdet kan variere avhengig av sort og analysemetode (Hoover et al., 2010).

1.3 Antinæringsstoffer og allergier

Ved melkeallergi må alternativer til melk benyttes. En del med melkeallergi kan også være allergisk mot soyaprotein og er nødt til å finne andre alternativer (Zeiger et al., 1999). Også plantemelk basert på nøtter vil være uaktuelt for en del forbrukere på grunn av allergier. Plantemelk basert på korn kan inneholde gluten og vil ikke være egnet for dem med cøliaki. Selv om havre er en glutenfri kornsort, oppgis flere havrebaserte melkealternativer som mulig glutenholdige. Dette fordi andre kornsorter kan gro i samme avling. Rismelk er et produkt som tåles godt av mange, men denne drikken inneholder svært lite næringsstoffer sammenlignet med kumelk. Allergi mot erteprotein er mindre vanlig, men kan forekomme (Sanchez-Monge et al., 2004). Erter er som andre belgfrukter forbundet med antinæringsstoffer. Disse kan ha negativ effekt på fordøyelse eller biotilgjengelighet av næringsstoffer i kroppen. Imidlertid indikerer flere studier også positive effekter av

antinæringsstoffer, som for eksempel antioksidanter eller antikarsinogener (Dahl et al., 2012). Forekomsten av antinæringsstoffer påvirkes av sort og behandling som bløtlegging, koking og avskalling (Wang et al., 2008).

1.4 Sentrale metodikker for råvarebehandling og analyse

1.4.1 Luftklassifisering

For å skille en proteinrik finfraksjon fra en stivelsesrik grovfraksjon kan erter males opp og fraksjoneres mekanisk. Luftklassifisering er en metode for å fraksjonere partiklene i mel av et råstoff etter tetthet, størrelse og form (Schutyser & van der Goot, 2011). Siden proteinpartiklene (protein bodies) er mindre enn stivelseskornene, kan luftklassifisering benyttes for å oppnå en proteinrik fraksjon og en stivelsesrik fraksjon (Boye et al., 2010).

1.4.2 Dumas

En metode for å måle proteininnhold indirekte via å måle innholdet av nitrogen med elementanalyse blir benevnt som Dumas metoden. Opprinnelig, og i de enkleste instrumentene, ble bare nitrogen kvantifisert, men det finnes mer avanserte instrumenter som benyttes i denne oppgaven. Prøven forbrennes i en oksygen-beriket atmosfære ved høye temperaturer (800- 1 000 °C) for å sikre fullstendig forbrenning (Jung et al., 2003). I forbrenningen omgjøres alle former for nitrogen til nitrogenoksider som så reduseres til nitrogengass (N₂) av kobber (Serrano et al., 2013). I forbrenningen dannes også CO₂, H₂O og SO₂. Gassene separeres via tre kolonner med spesifikk absorpsjon mens N₂ går til detektoren og måles med en sensor for termisk konduktivitet. Etterfølgende blir CO₂ og SO₂ målt mens systemet absorberer H₂O (Elementar Vario EL cube manual). Siden uorganisk nitrogen også måles, er ikke alt nitrogen nødvendigvis fra protein. For ulike cerealer og soyaproteinkonsentrat har bestemmelsen med Dumas metode vist lignende resultater som den alternative metoden Kjeldahl for protein hvor prøven omvandles til ammonium og titreres (Jung et al., 2003).

Rent protein antas å inneholde 16 % nitrogen. Derfor brukes faktoren 6,25 ofte som en konverteringsfaktor fra nitrogen til protein (100/16) (Rhee, 2001). Faktoren brukes for de fleste næringsmidler når mengden nitrogen som ikke er fra protein er liten. Dersom en spesifikk konversjonsfaktor for matvaren er kjent, kan denne også benyttes. En nøyaktig N-faktor kan beregnes dersom aminosyresammensetningen er kjent (Saldanha do Carmo et al., 2020). Beregninger for proteininnhold for byggfraksjoner har med Dumas i ettertid vist seg å stemme med kvantifiseringer foretatt basert på totalhydrolyse av protein og summering av aminosyrer (Knutsen, 2021).

1.4.3 Modifisert Lowry

Modifisert Lowry i henhold til Hartree (1972) er en metode for å bestemme innholdet av protein i en løsning. Den originale Lowry metoden (Lowry et al., 1951) baserer seg på reduksjon av kobber med protein i basisk løsning og bruk av Folin-Ciocalteu phenol reagent som gir en kromofor som kan kvantifiseres spektrofotometrisk. Den modifiserte metoden i henhold til Hartree (1972) benytter høyere konsentrasjoner av den basiske kobberløsningen, har færre reagenser og gir en mer lineær kalibreringskurve (Hartree, 1972).

Prinsippet er at først danner divalente kobberioner et kompleks med proteinet under basiske forhold og reduseres til monovalente ioner. Reagenset i denne reaksjonen er en basisk løsning av kobberioner og kaliumnatriumtartrat (Lowry reagens). Videre tilsettes Folin-Ciocalteu reagens som reagerer med det monovalente kobberionet og den funksjonelle gruppen til tyrosin og tryptofan, og i mindre grad cystein og til dels histidin. Dette gir en blåfarge som kan måles spektrofotometrisk mellom 650 og 750 nm (Hartree, 1972; Lucarini & Kilikian, 1999).

Folin-Ciocalteu reagenset reduseres av de fleste fenoler og dermed aminosyren tyrosin. Men den måler også den aromatiske aminosyren tryptofan selv om den ikke er fenolisk (Folin & Ciocalteu, 1927). Reagenset kan også reagere på andre fenoler, tioler og noen ioner. Sukkere

rapporteres i varierende grad å være reaktive på reagensene. Fruktose, sorbose, xylose, rhamnose, mannose og glukose i rekkefølge etter synkende grad av effekt, ble rapportert å øke verdiene for protein ved bruk av Folin-Ciocalteu fenol reagenset (O'Sullivan & Mathison, 1970). Lucarini & Kilikian (1999) lister opp blant annet sukkere som glukose og sukrose, samt enkelte salter som forstyrrende faktorer, selv om ulike modifikasjoner av Lowry har blitt til for å løse problemer med slike faktorer. Hartree (1972) beskriver at den modifiserte metoden påvirkes av sukrose og Triton X-100. En nyere studie av Everette et al. (2010) undersøkte interaksjoner mellom Folin-Ciocalteu reagens og ulike klasser av komponenter. Fenoler, proteiner og tioler viste seg reaktive i likhet med andre studier, men flere sukkere ble ikke regnet som reaktive ved konsentrasjonene som ble benyttet. Av aminosyrer var det kun tyrosin, tryptofan og cystein som hadde signifikant reaktivitet (Everette et al., 2010). Undersøkelsen peker derfor på at cystein også kan gi bidrag til proteinkvantifiseringen med Lowry.

Proteininnholdet i prøven som analyseres baseres på en standardkurve med kjente konsentrasjoner av bovint serum albumin (BSA). Proteiner er ulikt sammensatt og siden standardkurven ikke er basert på samme proteiner som finnes i prøven, vil ikke metoden være absolutt. Likevel baserer ofte kolorimetriske metoder seg på standardkurver med BSA og kolorimetriske metoder regnes som mer sensitive enn for eksempel Kjeldahl og Dumas (Chang & Zhang, 2017).

1.4.4 Enzymer

Et av enzymene som blir benyttet til industriell hydrolyse av stivelse til D-glukose er alfa-amylase (Huber & BeMiller, 2017). Alfa-amylase bryter alfa-1,4 glukosidbindinger tilfeldig i stivelseskjeden (endogent) og opp til 1 enhet fra forgreningspunktet. Når stivelsen er brutt ned til mindre fragmenter vil det være flere ikke-reduserende ender tilgjengelig for exoaktive enzymer som glukoamylase (amyloglukosidase). Dette enzymet benyttes i kombinasjon med α -amylase og angriper stivelsen fra den ikke-reduserende enden (eksogent) slik at D-glukose frigis (Damodaran & Parkin, 2017a).

Enzymer med xylanase-aktivitet kan depolymerisere arabinoxylan som er uløselig i vann, til vannløselige oligosakkarider. Slike enzymer brukes blant annet ved brygging for å redusere viskositeten av vørteren. Et annet enzym som gjerne benyttes ved brygging er glukanasen. Enzymet bryter β -1,4 og -1,3 bindinger i glukaner (benevnes mixed linked beta-glucans) som særlig finnes i plantecelleveggen. I bryggeprosessen benyttes slike enzymer blant annet til å øke andelen fermenterbart sukker (Damodaran & Parkin, 2017a).

1.4.5 Stabilisatorer

Stabilisatorer kan blant annet bidra til å holde emulsjoner, forhindre sedimentering, stabilisere skum, binde vann og holde på fuktighet. En virkemåte til stabilisatorer er å øke viskositeten til den kontinuerlige fasen slik at løsningen bedre holder seg homogen dersom det er større partikler tilstede (Mäkinen et al., 2015). Ingredienser som danner gel og dermed øker viskositeten selv ved lave konsentrasjoner benyttes ofte som stabilisatorer (McClements et al., 2019). Gellan gum er et eksempel på et polysakkarid med evnen til å danne gel ved lave konsentrasjoner uten å påvirke smak (Sworn, 2009). I plantemelk er dette en mye brukt stabilisator (vedlegg 3). Andre relevante tilsetninger er guar gum, johannesbrødkjernemel (locust bean gum), solsikkelecitin og i mindre grad karragenan og xanthan (vedlegg 3). Reduksjon av partikkelstørrelse ved homogenisering kan også gi tilstrekkelig stabilitet for enkelte varianter av plantemelk (Mäkinen et al., 2015).

1.4.6 Viskositetsmåling

Rapid Visco Analyser (RVA) er et viskometer som måler motstand med en roterende plastspade samtidig som temperaturen kan kontrolleres. RVA gjør det derfor mulig å måle viskositeten i prøver med partikler under omrøring og oppvarming (Sahlstrøm, 2021).

1.4.7 Sensorisk analyse

Matens sensoriske egenskaper kan beskrives ved bruk av sensorisk analyse. I følge Lawless og Heymann (2010) er sensorisk analyse teknikker for å måle menneskelig respons på mat og minimere påvirkningen av andre faktorer. Hensikten er å kunne kartlegge produktets sensoriske egenskaper på en måte som er repeterbar. Det skilles mellom analytiske og hedoniske tester.

Analytiske tester inkluderer diskriminerende og deskriptive metoder slik som profilering av et produkt ved bruk av et trent panel. Her skal personlige preferanser ikke spille en rolle.

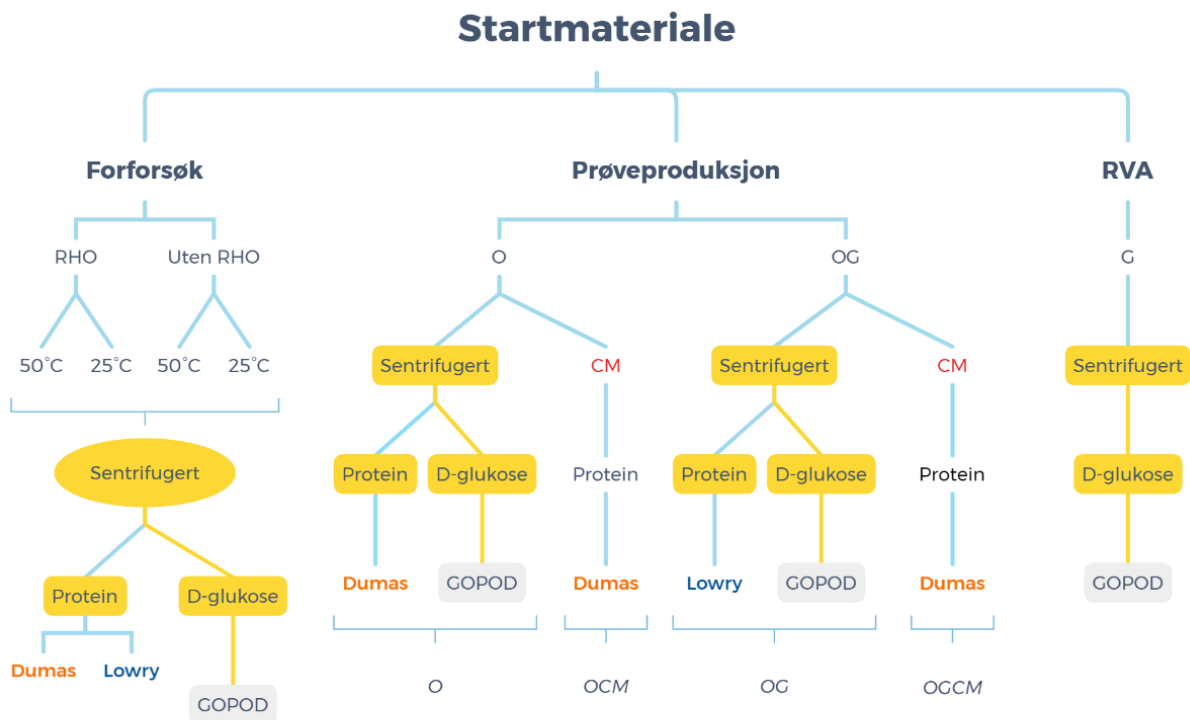
Hedoniske, også kalt affektive tester er det motsatte. I disse testene er preferansen viktig og deltakerne kan være utrente forbrukere innen målgruppen for produktet. Det er vanlig å bruke en 9- eller 7- punkts skala for å kartlegge hvor godt et produkt likes, også kalt forbrukeraksept. Preferansetesting hvor det brukes rangering eller best/verst skala er andre eksempler på hedonisk testing. Sensorisk bedømmelse utført av forbrukere finner ofte sted ved slutten av en produktutviklingsprosess (Harry & Hildegarde, 2010).

1.5 Hensikt

Hensikten med oppgaven er å utvikle plantemelk av bygg, av erter og ertefraksjoner med høyere proteininnhold enn eksisterende drikker. Målet er å undersøke om startmaterialene er egnet til plantemelk og hvilke metoder som gir høyest sluttkvalitet målt ved proteinutbytte, stivelsesnedbrytning og smak. Bakgrunnen for oppgaven er at det er et behov for utvikling av plantemelk med høyere proteininnhold enn eksisterende varianter. Videre er det ønskelig å utnytte planteprotein fra norske råstoff. Melken som produseres skal være i en slik form at den kan testes med enkel sensorisk bedømmelse.

2. Materialer og metoder

Det ble utført et forforsøk, en prøveproduksjon med to metoder og en Rapid Visco Analyse (RVA). En oversikt over metodene og analysene som ble utført følger under (figur 4).



Figur 4. Oversikt over forforsøket, prøveproduksjonen, Rapid Visco Analyse (RVA) og analyser. RHO = preparat med xylanase- og beta-glukanase aktivitet; O = oppskalert; OG = oppskalert og gelatinisert før enzymbehandling; G = gelatinisert; CM = Crude milk, ikke sentrifugering.

2.1 Startmateriale og enzymer

Startmaterialene i var mel av Duga bygg, mel av avskallede Ingrid, grovfraksjon og proteinfraksjon av Ingrid ertre, og Vestkorn. Vestkorn var et ferdig produkt med erteproteinfraksjon fremkommet ved tørrfraksjonering (vedlegg 4). Duga bygg (*Hordeum vulgare*, var. Rattan Duga, Rygge, Norge) var malt til mel ved Retsch, Mølle (ZM 200), med 0,5 mm sikt. Sorten er skall-løs (nakenbygg). Ertene var av typen Ingrid (*Pisum sativum* var. Ingrid) også malt til mel med 0,5 mm sikt. Ertene var dyrket ved Institutt for plantevitenskap ved NMBU. Fraksjonene fra Ingrid ertene var et resultat av tørrfraksjonering utført ved

Nofima (Hosokawa Alpine Pin mill and air classification). Tabell 1 viser råstoffene som ble brukt med forkortelser.

Tabell 1. Oversikt med forkortelse og beskrivelse av de ulike råstoffene som ble benyttet i oppgaven.

Forkortelse	Beskrivelse
DUB	Duga bygg
INA	Avskallede Ingrid erter
IPF	Proteinfraksjon, avskallede Ingrid erter
IGF	Grovfraksjon, avskallede Ingrid erter
VK	Vestkorn, F55X

Enzymene som ble benyttet var av godkjent matkvalitet og vises i tabell 2.

Tabell 2. Enzympreparater benyttet i oppgaven med forkortelse, beskrivelse av aktivitet, optimalt pH- og temperaturområde og produktnavn. Informasjonen er hentet fra produsent (AB Enzymes).

Forkortelse	Aktivitet	Units	pH	Temperatur	Produktnavn
RHO	Xylanase og beta-glukanase	< 225 000 BXU/g og < 255 000 BU/g	4,0–7,0	<65 °C	ROHALASE SEP (AB Enzymes GmbH Darmstadt, Tyskland)
GAF	Alfa-amylase	< 1300 AZ/g	4,0–6,5	30–55 °C	GAMMAFUNGASE A65L (AB Enzymes GmbH Darmstadt, Tyskland)
GDEX	Amyloglukosidase (glukoamylase)	< 500 GAU/g	3,5–6,5	45–75 °C	GAMMEDEX CAL (AB Enzymes GmbH Darmstadt, Tyskland)

2.2 Analyser

2.2.1 Tørrstoff

For å beregne tørrstoff i startmaterialene ble vanninnholdet målt med infrarød oppvarming (Sartorius Thermo Control YTC, GMBH Göttingen, Tyskland). Målingene ble utført i duplikater.

Tørrstoff ble beregnet ved bruk av formel 1 som regnes ut automatisk av programvaren i vekten.

Formel 1. Beregning av tørrstoff.

$$\text{Tørrstoff i prøven (g)} = \text{vekt av prøve (g)} * \frac{100 - \text{vanninnhold (\%)}}{100}$$

Der det var aktuelt ble resultatene korrigert for vanninnhold.

2.2.2 Total stivelse

Total stivelse i startmaterialene ble bestemt ved bruk av Total Starch Assay Kit fra Megazyme (Megazyme, Ireland) (modifisering av AOAC 996.11) etter medfølgende detaljerte metodebeskrivelse, som følger protokollen slik: prosedyre e), videre til steg 4 i prosedyre d), steg 4-5 i prosedyre b) og økt inkubasjonstid til 12 min. på grunn av bruk av polypropylen rør (Note, s. 10), videre fra steg 6 i prosedyre a).

Metoden går ut på hydrolysering av stivelse til D-glukose som blir tilsatt oksidase/peroksidase-reagent (GOPOD) og gir en rødfarge som kan måles spektrofotometrisk. Det ble brukt duplikater av alle prøver og medfølgende kontroll. Dette var maisstivelse med et kjent stivelsesinnhold.

For å fjerne lavmolekylært karbohydrat, ble det i 15 mL plastrør veid ut 100 µg tørr prøve (startmateriale eller kontroll) og tilsatt 5 mL etanol (80 % v/v). Inkubering ble foretatt ved 80-85 °C i 5 min, etterfulgt av omrøring med vortex og tilsetning av ytterligere 5 mL etanol (80

% v/v). Prøvene ble sentrifugert på 1800 x g i 10 min (Heraeus Multifuge 4 KR). Supernatanten ble kastet og pelleten ble resuspendert ved tilsetning av 5 mL etanol (80 % v/v), etterfulgt av omrøring med vortex og tilsetning av ytterligere 5 mL etanol (80 % v/v). Prøvene ble sentrifugert som tidligere og supernatanten kastet.

Før prøvene ble satt i kokende vannbad i 5 min, ble de tilsatt 2 mL dimetyl sulfoksid (DMSO) og ristet med vortex for å swelle stivelse. Thermostabil α -amylase ble blandet med 50 mM MOPS buffer (pH 7) i forholdet 1:30. Det ble tilsatt 3 mL av dette til hver prøve, som så fikk stå 12 min i kokende vannbad. Risting ble utført hvert 4. minutt. Deretter ble det tilsatt 4 mL natrium acetat buffer (pH 4,5) før 0,1 mL amyloglukosidase ble tilsatt og prøvene satt i vannbad ved 50 °C i 30 min.

Innholdet i prøvene ble overført til en 100 mL målekolbe og fortynnet til merket med destillert vann. Prøvene med proteinfraksjon (IPF og VK) ble kun fortynnet til 10 mL i tilsvarende målekolbe, og alle prøver ble ristet. Det ble tatt ut omtrent 1,5 mL av hver prøve som ble sentrifugert ved 17 000 x g i 10 min. Prøver av 0,1 mL supernatant og 3 mL GOPOD reagens ble inkubert i 20 min ved 50 °C. Det ble også laget til blanker med destillert vann og med GOPOD reagens. D-glukose i standardløsning på 1 mg/mL ble brukt som standard. Absorbansen ved 510 nm for prøvene og standarden ble lest mot blankene. Spektrofotometeret var Shimadzu UV Mini 1240 og det ble brukt plastkyvetter med 1 cm lysvei (volum 2,5 mL, Brand GMBH + Co KG, Germany).

For utregning ble følgende formel fra metodens protokoll (Total Starch HK, Assay procedure (AMG/ α -AMYLASE/HK METHOD, 2020) benyttet:

Formel 2. Total stivelse.

$$\text{Total stivelse, \%} = \Delta A * F / \text{vekt} * \text{endelig volum} * 0,9$$

Hvor F = 100 (μ g D-glukose)/ absorbans for 100 μ D-glukose.

Faktoren 0,9 er en omregningsfaktor fra D-glukose til anhydro D-glukose (som forekommer i stivelse).

2.2.3 Protein ved Dumas

Dumas Metode Elementar CHNS – DUMAS/total-nitrogen (Elementar. Model vario EL cube, Tyskland) ble brukt til å måle totalt nitrogeninnhold i startmaterialene. Målingene ble utført i duplikater. Omtrent 5 mg prøve ble veiet inn i tinnbåter (4 x 4 x 11 mm, Elementar Analysesystem GmbH, Tyskland) med vekten Mettler MT5 (Bergman, Greifensee, Sveits). Tinnbåtene ble brettet og presset sammen ved bruk av pinsetter og vekten ble notert.

Prøvene ble så analysert for totalt nitrogeninnhold som ble brukt til å beregne mengden protein ved generell omregningsfaktor 6,25. Innholdet av protein i mel av Duga bygg ble bestemt, mens de andre startmaterialene var blitt målt tidligere ved Nofima. Sulfanilamid ble brukt som standard. Prøvenes tørrstoffinnhold ble samtidig bestemt for å kunne korrigere proteininnhold i forhold til faktisk tørrstoff.

Sentrifugerte prøver

For de flytende prøvene måtte disse tørkes inn før analysen ved bruk av konvensjonelle tinnkapsler for bruk i instrumentet. Dette ble gjort ved at en liten tinnbåt (4 x 4 x 11 mm, tynn, Elementar Analysesystem GmbH, Tyskland) ble plassert i en noe større tinnbåt for å hindre lekkasje og at tinnbåten klistret seg til bunnen i brønnplaten hvor tørkingen skulle foregå. 100 µL prøve ble pipettert ut i den minste tinnbåten. Prøvene ble så tørket over natten ved henstand på benken før tinnbåtene ble presset og brettet godt sammen, plassert i karusellen og analysert. Gjenværende luft inneholder nitrogen og vil gi falske positive. Prøvens innhold av nitrogen (%) ble multiplisert med 6,25 for å beregne innholdet av protein (mg/100 µL). Det bemerkes at disse prøvene ikke veies, men har et kjent volum tilsatt.

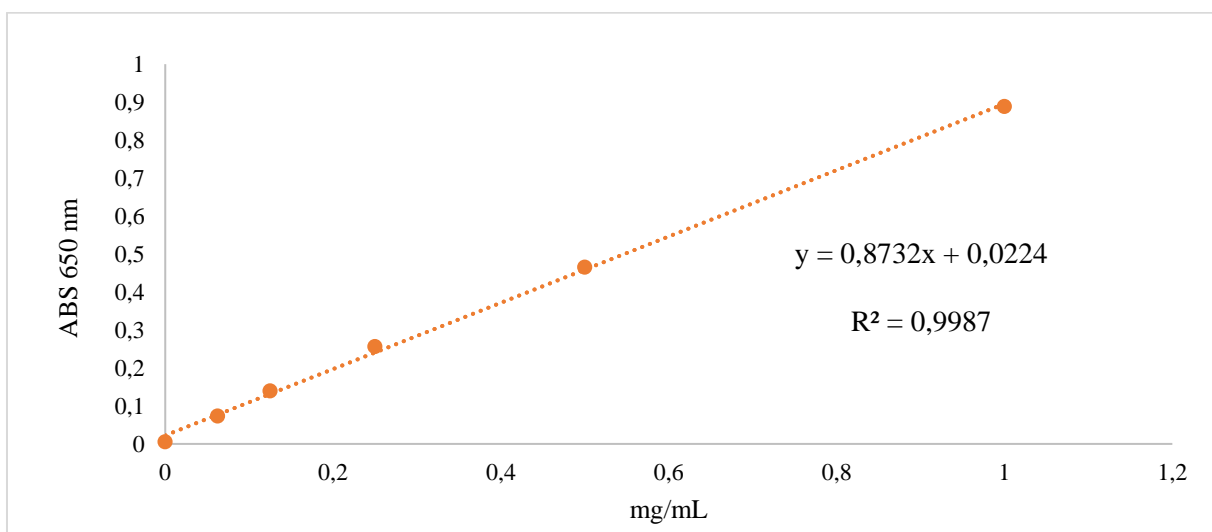
Crude milk - prøver

For prøvene betegnet som ikke sentrifugert (crude milk, CM) ble det pipettert ut 100 µL prøve i to omganger slik at totalen ble 200 µL. Det ble benyttet en spesialpipette med stempel, beregnet for væsker med høy tetthet, viskositet eller damptrykk (Engelsk; Positive displacement pipette). Prøvene ble tørket forsiktig i varmeskap ved 60 °C mellom pipetteringene. Resten ble utført som tidligere beskrevet.

2.2.4 Protein ved modifisert Lowry

Proteininnholdet i ekstraktene ble målt med modifisert Lowry i henhold til Hartree (1972). Det ble laget tre reagenser, løsning A, B og C. Løsning A ble laget ved å løse 2 g L⁻¹ KNaC₄H₄O₆*4H₂O og 100 g L⁻¹ Na₂CO₃ i 0,5 M NaOH. For å lage løsning B ble 0,2 g L⁻¹ KNaC₄H₄O₆*4H₂O og 0,1 g L⁻¹ CuSO₄*5H₂O løst i 0,1 M NaOH. Folin-Ciocalteu fenol reagent ble fortynnet 1:16 med destillert H₂O og utgjorde løsning C.

Til analysen ble det laget en standardkurve med bovint serumalbumin (BSA) i kjente konsentrasjoner. Standardkurven ble laget med følgende fortynninger av BSA med vann: 0, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 og 1 mg/mL BSA. Prøver til analyse med GOPOD ble sentrifugert ved 17 000 x g i 15 min (standardbetingelser ved bruk av eppendorf). Supernatanten ble fortynnet til gyldighetsområdet til standardkurven og duplikater ble benyttet. Til 1 mL prøve ble det tilsatt 0,9 mL løsning A etterfulgt av inkubering ved 50 °C i 10 min i vannbad. Det ble så tilsatt 0,1 mL løsning B før prøvene stod i 10 min i romtemperatur. Til sist ble det tilsatt 3 mL løsning C og prøvene ble inkubert i vannbad ved 50 °C i 10 min. Absorbansen ble målt i spektrofotometer (Shimadzu UV Mini 1240) ved 650 nm i plastkyvetter med 1 cm lysvei (2,5 mL, Brand GMBH + Co KG, Germany). Proteininnholdet ble regnet ut ved bruk av regresjonslinjen fra standardkurven. Blank og enzymer ble trukket fra. Standardkurven med regresjonslinjen $y = 0,8732x + 0,0224$, vises i figur 5.



Figur 5. Standardkurve med regresjonslinje og R-verdi for bovint serumalbumin (BSA) til bestemmelse av protein ved modifisert Lowry.

Beregning av proteinutbytte

For å sammenligne proteinutbyttet ved ulike tillagingsmetoder og ulike mengder av startmaterialet, gjøres utregningen beskrevet i formel 3. Proteinutbyttet ble definert som prosentandelen proteinet i prøven utgjør av proteinet som var i startmaterialet.

Formel 3. Beregning av proteinutbytte.

$$\text{Proteinutbytte (\%)} = \frac{\text{Bestemt proteininnhold i prøven (g/100 mL)}}{\text{Teoretisk proteininnhold (g/100 mL)}} \times 100$$

2.2.5 Glukose ved GOPOD

Innholdet av D-glukose ble bestemt ved bruk av Megazyme D-glucose (glucose oxidase/peroxidase; GOPOD) Assay Kit (GOPOD) etter AOAC Method 996.11 (Megazyme, Irland). Absorbansen ble lest ved 510 nm direkte etter tillaging. Alle prøver ble analysert i duplikater. Prøvene ble sentrifugert i eppendorfrør ved 17 000 x g i 15 min like før bruk.

Formel 4. Fri glukose (D-glukose) (Megazyme, Ireland).

$$\text{D-Glukose (\mu g/0.1 mL)} = \frac{\Delta A_{\text{Prøve}}}{\Delta A_{\text{D-glukose standard (100 \mu g)}}} \times 100$$

Fullstendig nedbrutt stivelse (%) ble definert som fri glukose i prosent av total stivelse i tørrstoff (formel 5).

Formel 5. Fullstendig nedbrutt stivelse.

$$\text{Fullstendig nedbrutt stivelse (\%)} = \frac{\text{fri glukose (g/100 mL)}}{\text{total stivelse (g/100 mL)}} \times 100$$

2.3 Forforsøk: Ulik temperatur og enzymbehandling

Prøvene ble laget ved å veie ut 6 g startmateriale i 50 mL rør og tilsette 37,5 mL kranvann. Rørene ble ristet for hånd til det ikke var synlige klumper. Alle prøvene ble så tilsatt 15 µL amylase (GAF, AB Enzymes) og 7,5 µL amyloglukosidase (GDEX, AB Enzymes).

Halvparten av prøvene ble tilsatt 7,5 µL preparat med xylanase- og beta-glukanase aktivitet (RHO, AB Enzymes). Halvparten av prøvene ble satt i vannbad ved 50 °C i 5 min før de ble plassert i risteinkubatoren (New Brunswick Scientific, Innova 40) ved 50 °C i 75 min på 75 rpm. Den andre halvparten ble plassert i risteinkubatoren ved 25 °C i 75 min på 75 rpm. Se tabell 3 for eksperimentelt oppsett.

Tabell 3. Oppsett av prøver med fire ulike startmaterialer, R = med RHO, U = uten RHO, V = 50 °C, K = 25 °C.

Råstoff	RHO R = med RHO U = uten RHO	Temperatur V = 50 °C K = 25 °C
DUB	R	V
DUB	U	V
DUB	R	K
DUB	U	K
INA	R	V
INA	U	V
INA	R	K
INA	U	K
IPF	R	V
IPF	U	V
IPF	R	K
IPF	U	K
IGF	R	V
IGF	U	V
IGF	R	K
IGF	U	K

Etter inkubasjon ble prøvene satt til oppbevaring ved 4 °C over natten. Rørene ble så sentrifugert ved standard betingelser.

En aliquot av hver supernatant ble overført til 1 mL eppendorfrør og sentrifugert ved 17 000 x g i 15 min. For bestemmelse av protein ved Lowry's modifiserte metode og Dumas, samt fri

glukose ved GOPOD ble klarnet supernatant benyttet. Det ble benyttet duplikater i alle bestemmelsene.

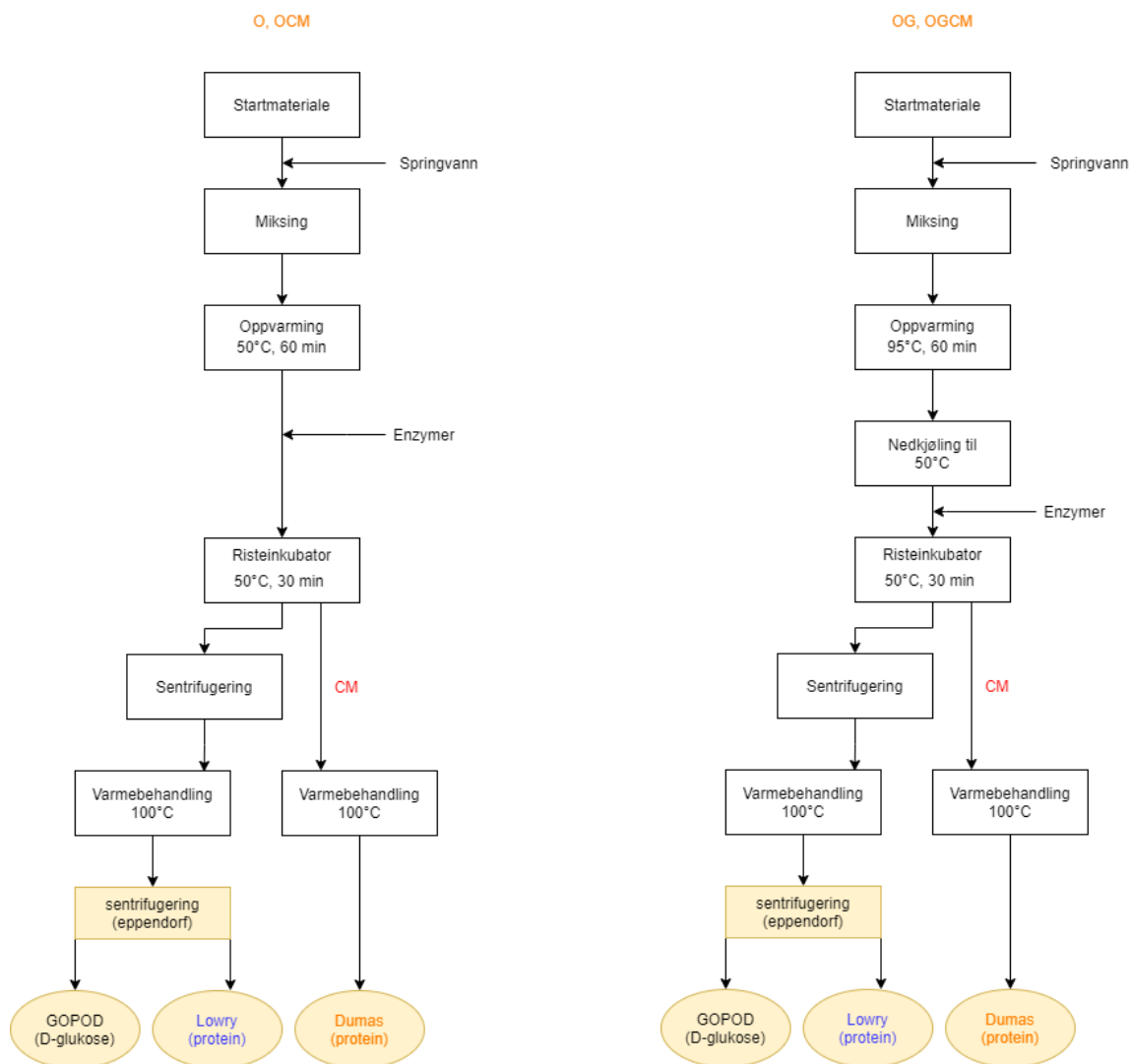
For noen utvalgte ekstrakter ble det etter bestemmelse av fri glukose ved GOPOD tilsatt ytterligere 10 μ L amyloglukosidase til hver prøve før innholdet av D-glukose ble bestemt på nytt. Dette var for å undersøke om enzym- doseringene som var tilsatt tidligere var tilstrekkelige i nedbrytningen.

2.4 Prøveproduksjon

Til prøveproduksjonen ble det laget:

- Oppskalerte prøver (O)
- Oppskalerte prøver, Crude Milk (OCM)
- Oppskalerte og gelatiniserte prøver (OG)
- Oppskalerte og gelatiniserte prøver, Crude Milk (OGCM)

Flytskjema for metodene i prøveproduksjonen vises i figur 6.



Figur 6. Flytskjema for prøveproduksjonen av plantemelk. O = oppskalert; OG = oppskalert og gelatinisert før enzymbehandling; CM = Crude milk, ikke sentrifugering.

2.4.1 Oppskalerte prøver (O)

I 1000 mL flasker (Duran) ble det veid inn 40 g startmateriale for VK og 120 g startmateriale for DUB, INA, IGF og IPF og tilsatt 750 mL springvann. Flaskene ble ristet kraftig for hånd og blandet med en liten propellmikser (IKA RW 16, GmbH & Co) til melet og vannet var blandet. IPF ble i tillegg mikset med en stående homogenisator, ofte benevnt som Ultra turrax (Polytron PT3100, Kinematica AG). Prøvene ble varmet til 50 °C i en risteinkubator i 1 time før 150 µL amylase (GAF) og 300 µL amyloglukosidase (GDEX) ble tilsatt. Prøven med byggmel ble også tilsatt 150 µL preparat med xylanase- og beta-glukanase aktivitet (RHO).

Etter kraftig risting for hånd ble prøvene satt i risteinkubatoren ved 50 °C i 30 min. Etter 15 min ble flaskene på nytt ristet for hånd.

Enzymreaksjonene ble stoppet ved at glassflaskene ble satt til varmebehandling i varmeskap ved 100 °C i 1 t. Prøvene ble avkjølt til romtemperatur og sentrifugert etter standard preparative betingelser (romtemperatur, 30 min, 4255 x g i en sentrifuge (Heraeus Multifuge 4 KR) med 4 x 1 L kapasitet). Dersom prøvene inneholdt klumper før sentrifugeringen, ble disse løst opp ved bruk av den stående homogenisatoren. Etter sentrifugeringen ble en aliquot av supernatanten klarnet ytterligere ved bruk av eppendorfrør før bestemmelse av D-glukose ved GOPOD og protein ved Lowry. Resten av supernatanten ble overført til mindre glassflasker og satt til varmebehandling i varmeskap ved 100 °C i 1 t.

2.4.2 Oppskalerte prøver uten sentrifugering (Crude Milk) (OCM)

Konsentrasjonene av startmaterialene ble justert etter første proteinbestemmelse av oppskalerte prøver. Mengden startmateriale av INA ble halvert, og en tredjedel av startmaterialet av IPF og VK ble benyttet. Fremgangsmåten fulgte oppskalerte prøver (avsnitt 2.4.1), men med følgende mengder: 120 g DUB, 60 g INA, 120 g IGF og 40 g VK.

Ekstraktene ble i motsetning til oppskalerte prøver ikke sentrifugert på Heraeus Multifuge 4 KR.

For proteinbestemmelse ved Dumas (avsnitt 2.2.3) ble det pipettert direkte fra usentrifugerte ekstrakt.

Glukose ble bestemt ved GOPOD (Megazyme) ved å ta ut en aliquot fra ekstraktet og sentrifugere ved 17 000 x g i 15 min og følge avsnitt 2.2.5.

2.4.3 Gelatinisering før enzymbehandling (OG, OGCM)

Prøver med 120 g (DUB, IGF), 60 g (INA) og 40 g (IPF, VK) startmateriale ble veiet inn i 1L flasker og tilsatt 750 mL vann før flaskene ble ristet kraftig for hånd. Prøven med VK ble i tillegg blandet med en stående homogenisator (Polytron PT3100, Kinematica AG). Flaskene ble plassert i varmeskap ved 95 °C i ca. 1 time eller til temperaturen ble målt til ~92 °C. De ble ristet for hånd hvert 10–15. min. Videre ble prøvene kjølt til 50 °C og tilsatt enzymer beskrevet under «oppskalerte prøver (O)». Videre behandling fulgte prosedyren til de oppskalerte prøvene uten gelatinisering før enzymbehandling (avsnitt 2.4.1). Det ble tatt ut aliquoter som ble sentrifugert og benyttet til bestemmelse av fri glukose ved GOPOD som beskrevet i 2.2.5 og proteinbestemt ved modifisert Lowry (avsnitt 2.2.4). For VK ble det utført et gjentak av bestemmelsen av fri glukose ved GOPOD i duplikater fra en ny aliquot av samme prøve.

Den samme fremgangsmåten som OG ble fulgt for prøver betegnet som OGCM, men sentrifugeringen ble utelatt. OGCM ble benyttet til smaking og proteinbestemmelse uten sentrifugering ved Dumas.

2.4.4 Sammenligning med eksisterende produkter

Proteininnholdet i kommersielle drikker som var tilgjengelige på markedet ble hentet fra næringsinnholdet oppgitt av produsent. Dette ble gjort for å sammenligne med proteininnholdet i eksperimentelle drikker produsert i denne studien.

2.5 Rapid Visco Analyse (RVA)

Rapid Visco Analyse (RVA-4, NEWPORT SCIENTIFIC, Australia) ble utført etter AACC metoden (AACC Method 76-21.02), med 4 g startmateriale og 25 mL vann. Analysene ble utført i duplikater. Prøven ble rørt om og varmet opp etter programmet beskrevet i tabell 4 samtidig som viskositet ble målt av instrumentet.

Tabell 4. RVA program for prøver med og uten enzym. Tabellen oppgir tid og temperatur/hastighet. Basert på tabellen til AACC 76-21.02.

Tid	Temperatur/hastighet
00:00:00	50 °C
00:00:00	960 rpm
00:00:10	160 rpm
00:01:00	50 °C
01:00:00	50 °C
01:03:00	95 °C
01:06:00	50 °C
00:10:00	slutt

Den samme prosedyren ble utført for prøver tilsatt 5 µL GAF og 10 µL GDEX. DUB ble i tillegg tilsatt 5 µL RHO.

For å teste effekten av gelatinisering før enzymbehandling på viskositet, ble 4 g startmateriale og 25 mL vann varmet opp etter programmet for gelatinisering (tabell 5.1) før enzymer ble tilsatt i samme mengde som i avsnittet over. Prøvene ble deretter rørt og varmet etter programmet beskrevet i tabell 5.2.

Tabell 5.1. RVA program for gelatinisering før tilsetning av enzymer.

Tid	Temperatur/hastighet
00:00	50 °C
00:00	960 rpm
00:10	160 rpm
01:00	50 °C
04:00	95 °C
07:00	95 °C
10:00	50 °C
10:00	Slutt
Enzymer tilsettes.	

Tabell 5.2. Etterfølgende RVA program for prøver tilsatt enzym etter gelatinisering.

Tid	Temperatur/hastighet
00:00	50 °C
00:00	960 rpm
00:10	160 rpm
30:00	50 °C
33:00	95 °C
36:00	50 °C
39:50	slutt

Etter gelatinisering og enzymbehandling ble det tatt ut aliquoter av hvert prøveduplikat som ble sentrifugert ved standard betingelser for eppendorf og analysert i duplikat for fri glukose ved GOPOD.

2.6 Hedoniske smakstester

Deltakerne til forbrukerundersøkelsene for smakstesting (sensorisk analyse, hedonisk) ble rekruttert fra studentpopulasjonen ved NMBU og andre tilknyttet denne. Valg av deltakere ble basert på tilgjengelighet. Fire av deltakerne ble selektert for å sikre en andel av deltakere som ofte, eller noen ganger drikker plantemelk. Oversikt over antall deltakere, kjønn, alder og vaner knyttet til konsum av plantemelk vises i tabell 6.

Tabell 6. Deltakere i smakstest av plantemelk uten tilsetning (smakstest 1) og med tilsetning (smakstest 2).

Deltakere	Smakstest 1	Smakstest 2
Antall	12	13
hvorav kvinner	9	8
hvorav menn	3	5
Konsumerer plantemelk		
Nei, aldri	3	3
Nei, eller svært sjeldent	3	3
Ja, noen ganger	2	4
Ja, ofte	4	3
Alder		
20-30 år	12	12
Over 30 år		1

Det ble i størst mulig grad forsøkt å benytte de samme deltakerne i smakstest 1 og 2. Antall deltakere var 12 i smakstest 1 og 13 i smakstest 2. Begge kjønn og alle drikkevaner var representert. Prøvene ble gitt navn som ikke kunne kobles til innholdet. Opplysningene deltakerne fikk i forkant var begrensede og forklarte ikke hva drikkene var laget av. Unntaket var nødvendige opplysninger om allergener.

Forbrukerundersøkelsene ble utført ved at deltakerne fikk utdelt hver sin pakke med prøver til smaking i eget hjem. I pakken var det en QR-kode med lenke til en digital spørreundersøkelse som skulle besvares samtidig med smakingen. Deltakerne stod frie til å smake når det passet dem. Smakstestene ble utdelt med én ukes mellomrom og deltakerne ble i smakstest 2 oppfordret til å gjennomføre smakingen til omtrent samme tidspunkt som smakstest 1. De ble bedt om å smake prøvene kaldt og drikke vann mellom smakingene. Hensikten var å undersøke hvordan drikkens smak og lukt ble oppfattet og hvordan de ble likt i forhold til hverandre. Første smakstest ble gjennomført med usentrifugerte prøver som var oppskalert og gelatinisert før enzymbehandling (OGCM). Nye flasker av hvert av startmaterialene DUB,

INA, IGF, IPF og VK ble produsert og varmebehandlet for konsum. Denne smakingen blir videre kalt smakstest 1.

Den neste smakingen var med de tre prøvene som ble best likt i første smaking og kalles videre smakstest 2. Disse ble tilsatt smak (vanilje/sjokolade), sukker og stabilisator (gellan gum) etter vedlegg 1 og ble sammenlignet med en kommersiell variant som referanse/benchmark i hver kategori (med vanilje/sjokolade). Deltakerne ble ikke fortalt at en referanse/benchmark var med, og ikke hvilken dette var. Alpro soyadrikk original ble brukt som benchmark for ekstrakter med vanilje, Alpro soyadrikk sjokolade ble brukt som benchmark for ekstrakter med sjokolade. Det ble tatt en beslutning om å inkludere DUB kun som sjokoladevariant på grunn av ekstraktets farge. Gellan gum ble tilsatt (0,03 %) for å hindre sedimentering av kakao og for å forhindre at prøvene skilte seg. Alle prøvene fikk tilfeldige bokstaver eller bokstaver og tall.



a. Smakstest 1

b. Innpakning

c. Smakstest 2: sukker/vanilje t.v. sjokolade t.h.

Figur 7. Plantemelk fra prøveproduksjonen benyttet til smakstesting.

Rekkefølgen på smakingen kunne deltakerne bestemme selv, men spørsmålene i undersøkelsene ble stilt i lik rekkefølge til alle. Deltakerne kunne smake på en prøve så mye de ønsket, og kunne smake på kryss og tvers så mye de ønsket. Det ble brukt en 7-punkts skala til hedonisk vurdering hvor 1 = «liker absolutt ikke» og 7 = «liker veldig godt». Denne vurderingen refereres til som liking. Andre vurderinger presenteres i tabell 7. Dersom deltakerne skulle svare ved bruk av en poengskala, ble 1–7 alltid brukt.

Tabell 7. Oversikt over skalaer og benchmark for smakstestene i undersøkelsen.

Vurdering	Test	Skala	
		1	7
Liking	Smakstest 1 & 2	Liker absolutt ikke	Liker veldig godt
Liking i forhold til andre plantebaserte drikker	Smakstest 1 & 2	Liker mye dårligere	Liker mye bedre
Søthet	Smakstest 1	Smaker ikke søtt i det hele tatt	Smaker veldig søtt
Smaksstyrke	Smakstest 1	Smaker veldig lite	Smaker veldig mye
<i>Benchmark</i>	Søtning/vanilje	Alpro soyadrikk original	
<i>Benchmark</i>	Sjokoladesmak	Alpro soyadrikk sjokolade	

Det ble i tillegg spurt om hvilken drikk deltakerne likte best, nest best og minst (preferanse). Det var også muligheter for å skrive kommentarer til hver enkelt drikk, og begrunnelse for hvorfor en drikk ble likt best eller minst. Opplysninger om deltakernes alder, kjønn og kjennskap til plantebaserte drikker ble også samlet inn. Spørreskjema for smakstest 1 og 2 er lagt ved i vedlegg 2.

Et sett med prøver tilsatt smak, sukker og gellan gum ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C og observert etter 7 dager.

2.7 Databehandling

Microsoft Office Excel ble benyttet til databehandling og framstilling av figurer. For box plot, gjennomsnitt og median for resultatene fra smakstestene ble XLSTAT versjon 2021.2.1 (Addinsoft, NY) benyttet.

3. Resultater

Med *Proteinutbytte* menes i den etterfølgende teksten og diskusjonen; hvor stor prosentandel protein fra startmaterialet, som finnes igjen i prøven. *Fullstendig nedbrutt stivelse* (%) defineres her som bestemt fri glukose i prosent av total stivelse i tørrstoff.

3.1 Startmateriale

Proteininnhold i INA, IGF, IPF og VK var oppgitt av Nofima. DUB hadde mest total stivelse i tørrvekt med 63,4 g/100 g, mens IPF og VK hadde minst med henholdsvis 2,3 og 4,4 g/100 g (tabell 8). Innholdet av protein i tørrvekt fulgte rekkefølgen: DUB < IGF < INA < VK < IPF.

Tabell 8. Prosent vanninnhold, total stivelse og protein i startmateriale med standardavvik. DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter; VK = Vestkorn.

	DUB	INA	IGF	IPF	VK
Vanninnhold (%)± sa	13,53 ± 0,28	9,21 ± 0,09	7,73 ± 0,13	8,94 ± 0,20	11,81 ± 0,05
Total stivelse tv (g/100g) [%]±sa	63,4 ± 1,0	45,4 ± 0,05	59,7 ± 3,9	2,3 ± 0,07	4,4 ± 0,002
Protein tv (g/100g) [%]± sa	11,5 ± 0,01	27,7 ± 0,2	15,8 ± 0,1	62,6 ± 0,2	57,0

sa = standardavvik

tv = tørrvekt

3.2 Forforsøk: Ulik temperatur og enzymbehandling

3.2.1 Fullstendig nedbrutt stivelse

Det var ønskelig å bryte ned stivelsen i ekstraktene for å senke viskositeten forårsaket av svelling, gi søthet og bedre proteinutbyttet. For å undersøke hvilken av de to inkubasjonstemperaturene 50 °C og 25 °C som var mest egnet til en prøveproduksjon, samt bruk av preparat med xylanase og beta-glukanase aktivitet (RHO) presenteres tabell 9.

Tabell 9. Fullstendig nedbrutt stivelse (glukose) (%) beregnet fra total stivelse. RHO = enzympreparat med xylanase og beta-glukanase aktivitet, temperatur er inkubasjonstemperaturen benyttet. DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter. Fargekodene representerer grad fullstendig nedbrutt stivelse fra minst (rød) til mest (grønn) innenfor serier av samme startmateriale.

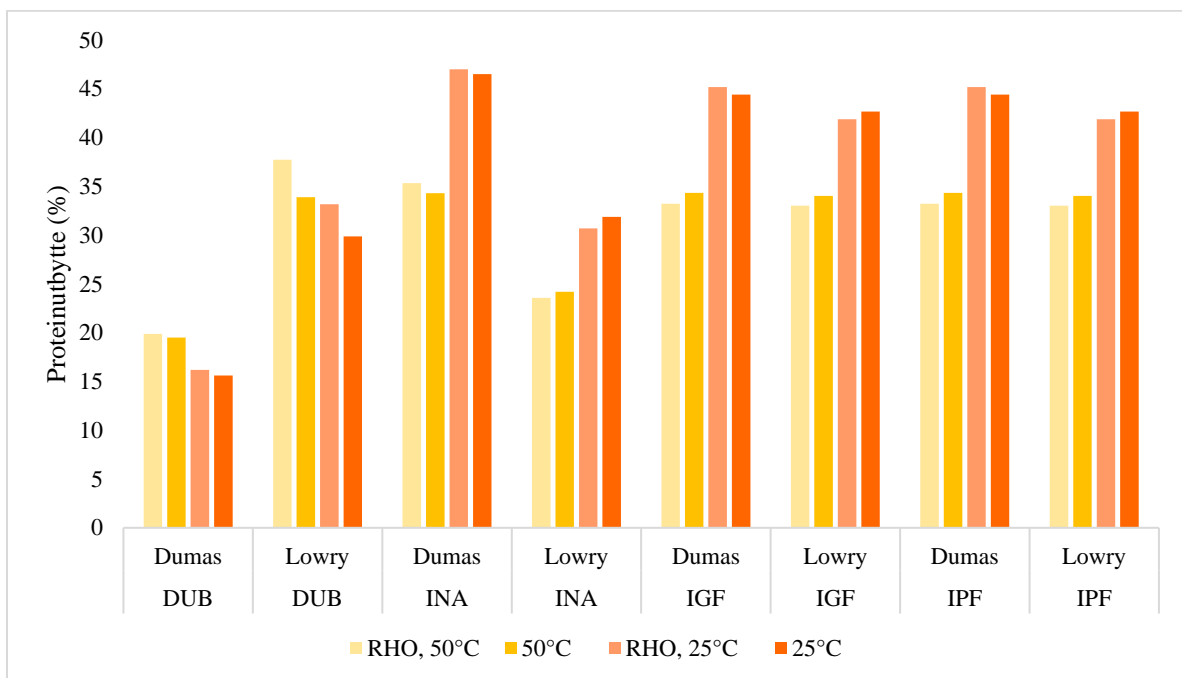
	DUB	INA	IGF	IPF
	%	%	%	%
RHO, 50 °C	24,23	5,57	5,94	48,89
50 °C	26,27	5,48	5,47	46,08
RHO, 25 °C	17,34	1,92	2,10	45,15
25 °C	14,48	2,23	3,06	44,48

Prøvene inkubert ved 50 °C hadde høyest andel nedbrutt stivelse. Det var liten forskjell i nedbrutt stivelse mellom prøvene med og uten preparat med xylanase og beta-glukanase aktivitet (RHO). Ved visuell observasjon fremstod DUB uten RHO som mer viskøs enn prøven med. Andelen stivelse som var fullstendig brutt ned var svært lav for INA og IGF. Mest stivelse var brutt ned hos IPF med opptil 48 %. Hos DUB var på det meste ¼ av stivelsen brutt ned.

Ny bestemmelse av fri glukose etter ytterligere tilsetning av amyloglukosidase ga ikke nevneverdig høyere resultater for fri glukose og fullstendig nedbrutt stivelse. Målinger av pH ga pH 5,8 for DUB og pH ~6,5 for prøver av øvrige startmaterialer. Endringen i pH før og etter tilsetning av enzymer var minimal. Alle prøvene var innenfor området for optimal pH for enzymene, selv om INA, IGF og IPF var i øvre grense for alfa-amylasen og amyloglukosidasen.

3.2.2 Ekstrahert protein

DUB hadde høyere utbytte av protein ved 50 °C enn ved 25 °C (figur 8). De andre prøvene hadde motsatt effekt av temperatur. Figuren viser at preparat med xylanase og beta-glukanase aktivitet hadde liten effekt på proteinutbytte. Utbyttet var på det meste omkring 45 %.



Figur 8. Utbytte av protein i supernatant av prøver. Proteinutbyttet er protein bestemt i prøven oppgitt i prosent av andelen protein av startmaterialet ved Dumas og modifisert Lowry. DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter. RHO = preparat med xylanase-og beta-glukanase aktivitet. Temperatur er inkubasjonstemperatur over 30 min.

DUB proteinbestemt ved Dumas hadde lavere proteinutbytte enn DUB proteinbestemt ved Lowry. INA proteinbestemt ved Dumas hadde høyere proteinutbytte enn INA proteinbestemt ved Lowry. IGF og IPF hadde mindre differanser i proteinutbytte bestemt ved de to ulike metodene.

For å se nærmere på den store forskjellen mellom de to metodene for DUB og INA presenteres differansen i g/100 mL i tabell 10.

Tabell 10. Differanse i proteininnhold (g/100 mL) målt ved Dumas og Lowry i supernatant av prøver inkubert i 30 min ved 50 °C eller 25 °C med og uten preparat med xylanase- og beta-glukanase aktivitet (RHO). Differansen i proteininnhold målt med de to metodene vises i tabellen. DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter.

	RHO, 50 °C	50 °C	RHO, 25 °C	25 °C
	g/100 mL	g/100 mL	g/100 mL	g/100 mL
DUB Dumas	0,32	0,31	0,26	0,25
DUB Lowry	0,60	0,54	0,53	0,48
Differanse	0,28	0,23	0,27	0,23
INA Dumas	1,42	1,38	1,89	1,87
INA Lowry	1,18	1,21	1,54	1,60
Differanse	0,24	0,16	0,35	0,27
IGF Dumas	0,77	0,80	1,05	1,04
IGF Lowry	0,77	0,79	0,98	0,99
Differanse	0,00	0,01	0,08	0,04
IPF Dumas	4,08	3,85	4,42	4,59
IPF Lowry	4,12	3,29	4,52	4,47
Differanse	0,05	0,56	0,10	0,12

DUB ved Lowry bestemte omtrent dobbelt så mye protein som DUB ved Dumas. For INA var det motsatt tendens hvor Dumas ga den høyeste bestemmelsen. For IGF og IPF stemte metodene godt overens utenom for IPF 50 °C. Denne hadde størst differanse av alle prøver i g/100 mL.

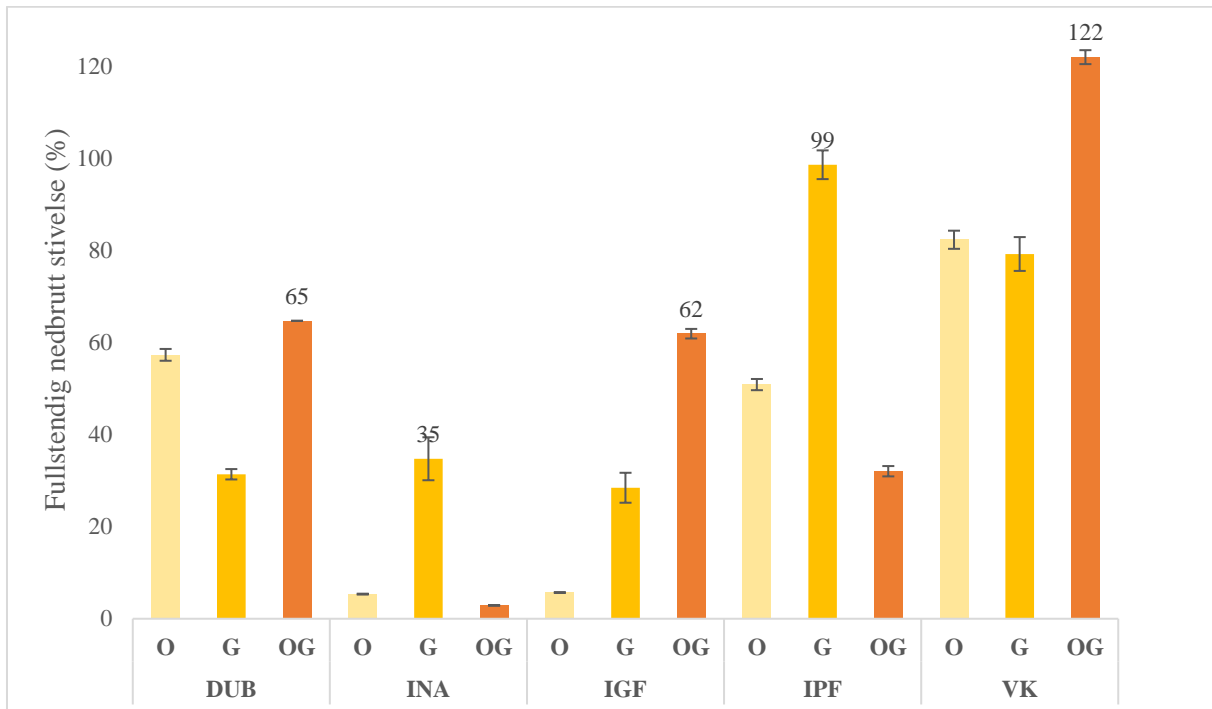
I tabell 11 vises differansen i proteinutbytte (% av teoretisk) mellom bestemmelse ved Dumas og bestemmelse ved Lowry. Ved denne fremstillingen var differansen mellom de to metodene størst for DUB med 14,3–17,9 % i forskjell.

Tabell 11. Differanse i proteinutbytte (% av teoretisk) bestemt ved Dumas og Lowry i supernatant av prøver inkubert i 30 min ved 50 °C eller 25 °C med og uten preparat med xylanase- og beta-glukanase aktivitet (RHO). Differansen i proteininnhold målt ved de to metodene vises i tabellen. DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter.

	RHO, 50 °C	50 °C	RHO, 25 °C	25 °C
	Utbytte (%)	Utbytte (%)	Utbytte (%)	Utbytte (%)
DUB Dumas	19,9	19,5	16,2	15,6
DUB Lowry	37,7	33,9	33,2	29,9
Differanse	17,9	14,4	17,0	14,3
INA Dumas	35,3	34,3	47,0	46,5
INA Lowry	23,6	24,2	30,7	31,9
Differanse	11,8	10,1	16,3	14,6
IGF Dumas	33,2	34,3	45,2	44,4
IGF Lowry	33,0	34,0	41,9	42,7
Differanse	0,2	0,3	3,3	1,7
IPF Dumas	44,7	42,2	48,5	50,3
IPF Lowry	45,2	36,1	49,6	49,0
Differanse	0,5	6,2	1,1	1,3

3.3 Prøveproduksjon - Fullstendig nedbrutt stivelse

Ved GOPOD ble innholdet av fri glukose bestemt i prøvene laget med metodene O, G og OG. Resultatene vises i figur 9 som andel fullstendig nedbrutt stivelse.



Figur 9. Fullstendig nedbrutt stivelse (%) i oppskalerte prøver (O), prøver som var gelatinisert før enzymtilsetning (G) og oppskalerte og gelatiniserte prøver (OG). DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter; VK = Vestkorn. Standardavvik for hver prøve er illustrert i feilfelt.

OG-metoden ga høyest andel totalt nedbrutt stivelse for DUB, IGF og VK. For INA og IPF ga G-metoden mest fullstendig nedbrutt stivelse. Prøven av VK med OG-metode skilte seg ut med et resultat >100 %. På grunn av det høye utbyttet ble det av VK-OG tatt ut en ny aliquot som ble analysert ved GOPOD med to paralleller. Resultatet tilsvarte det første for VK-OG (+0,003 g/100 mL avvik).

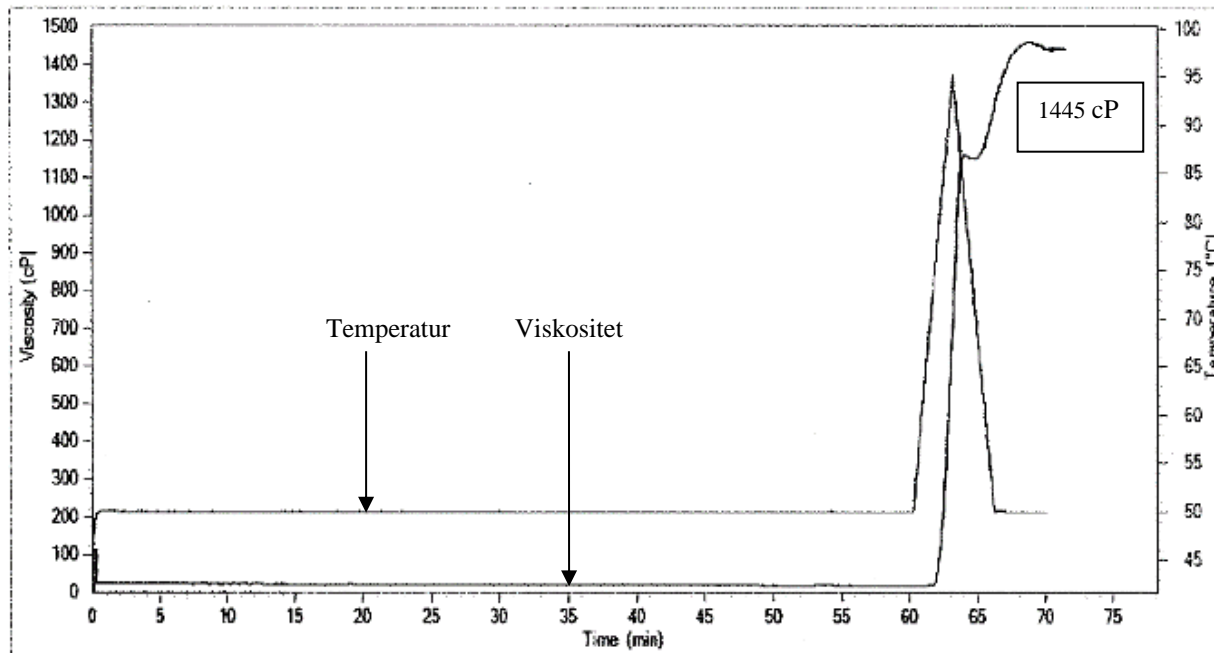
En annen måte å undersøke i hvor stor grad stivelsen brytes ned er ved hjelp av viskositetsmålinger (tabell 12).

Tabell 12. Final viscosity (cP) i prøver uten enzym, med enzym og med gelatinisering før enzymtilsetning. DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter; VK = Vestkorn. Tallene er gjennomsnittsverdier fra to paralleller.

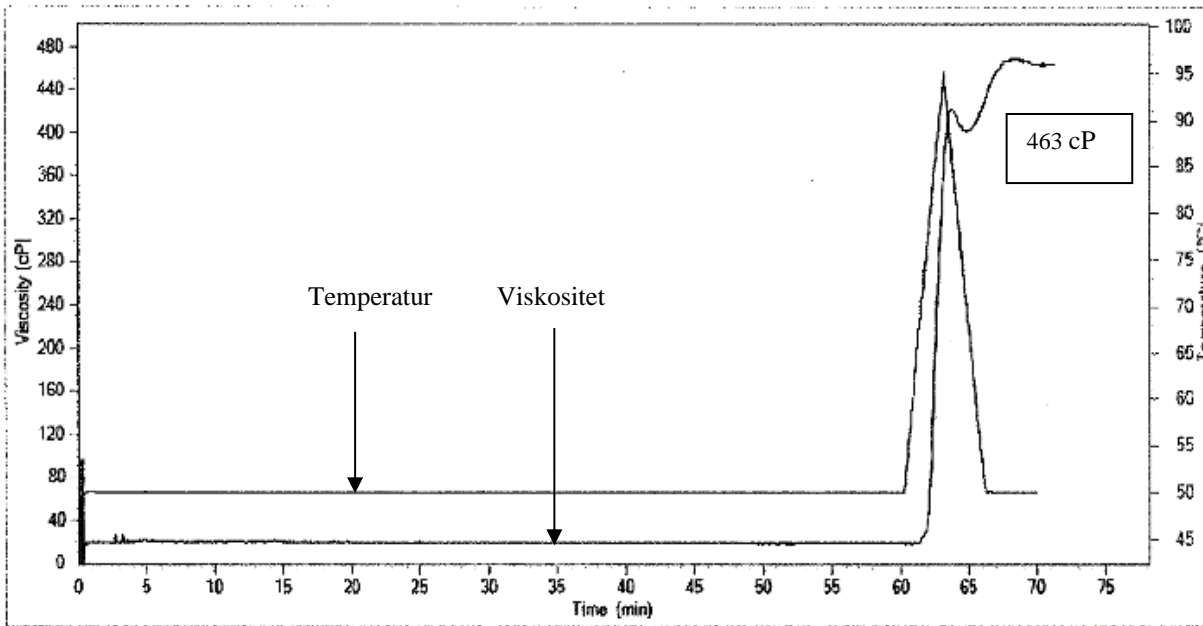
	Uten enzym (cP)	Med enzym (cP)	Gelatinisering og enzym (cP)
DUB	4202	36	-19,5
INA	1933	518	-8,5
IGF	6090	561	-47,5
IPF	261	259	-32,5
VK	226	222	-18

I tabellen kommer det frem at viskositeten gikk ned med enzym til stede, og gikk ned ytterligere ved gelatinisering før enzymtilsetning. Unntakene var de proteinrike prøvene IPF og VK, hvor viskositeten knapt gikk ned ved bruk av enzym. Med gelatinisering før enzymbehandling gikk viskositeten ned.

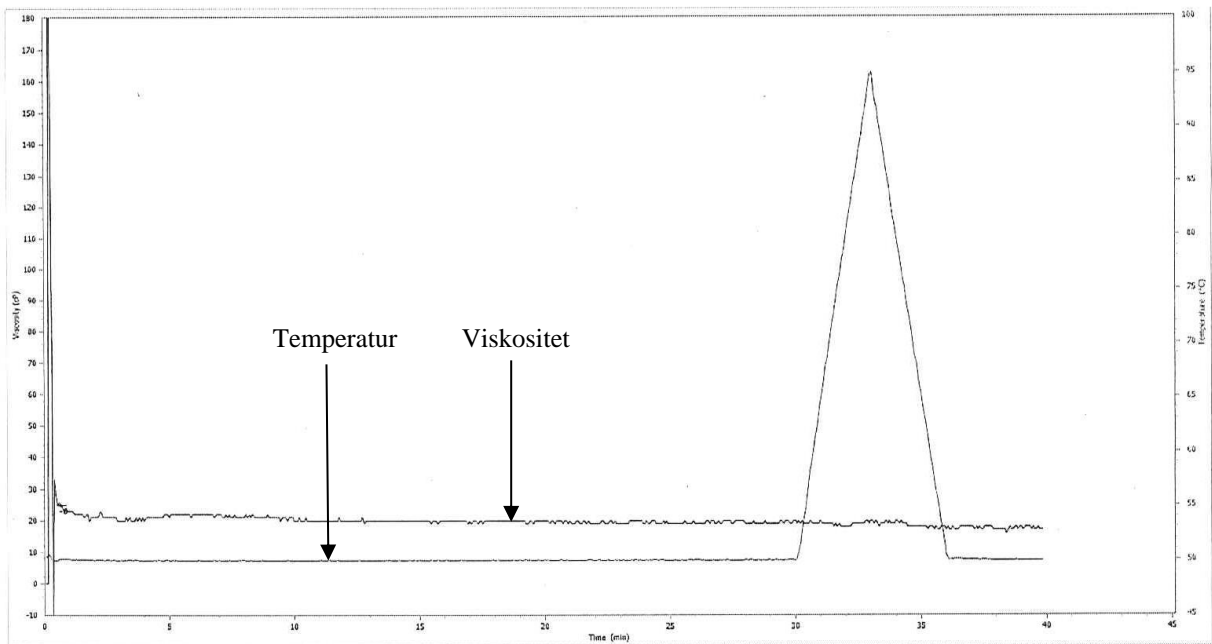
Et eksempel på RVA profil uten enzym, med enzym og med gelatinisering før enzymtilsetning vises i figur 10.



a. INA uten enzym



b. INA med enzym



c. INA gelatinisert før enzymtilsetning

Figur 10. RVA profiler av INA uten enzym (a); med enzym (b); gelatinisert før enzymtilsetning (c). INA = Ingrid erter, avskallede.

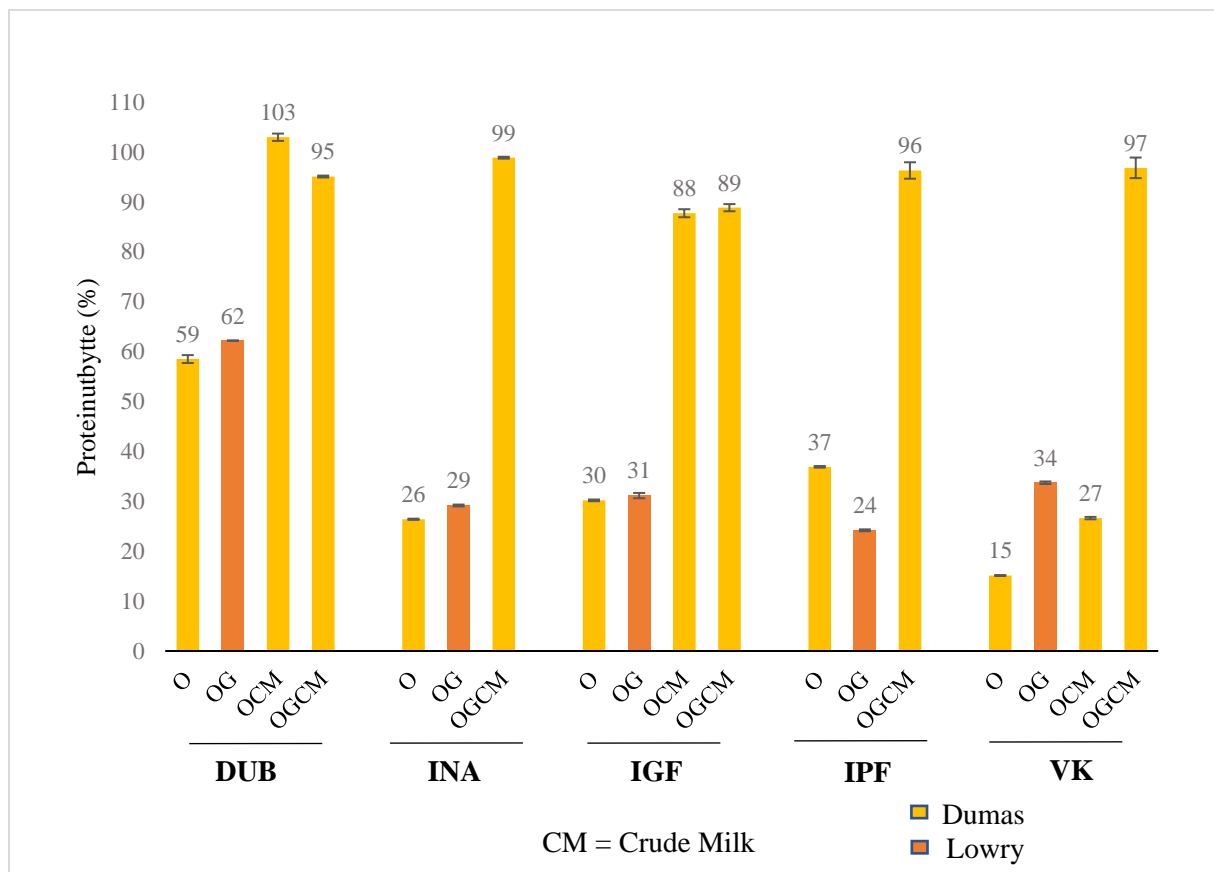
RVA profilene viser at viskositeten økte ved oppvarming uten enzym og etter enzymbehandling i 30 min ved 50 °C. Derimot var viskositeten stabilt lav for prøven gelatinisert før enzymbehandling også under oppvarmingen til 95 °C. Selv om prøver av ulike startmaterialer hadde forskjellige verdier for viskositet (cP), viser denne figuren et mønster

som var å se hos alle prøvene. Final viscosity i tabell 12 var angitt av softwaren. For prøvene med gelatinisering før enzymtilsetning ga softwaren systematisk et lavere tall enn det som leses av på figuren (figur 10 c). Det var de relative forskjellene som var viktig.

3.4. Prøveproduksjon - Protein

3.4.1 Proteinutbytte

Proteinutbyttet varierte mellom de ulike metodene for tillaging av plantemelk (figur 11).

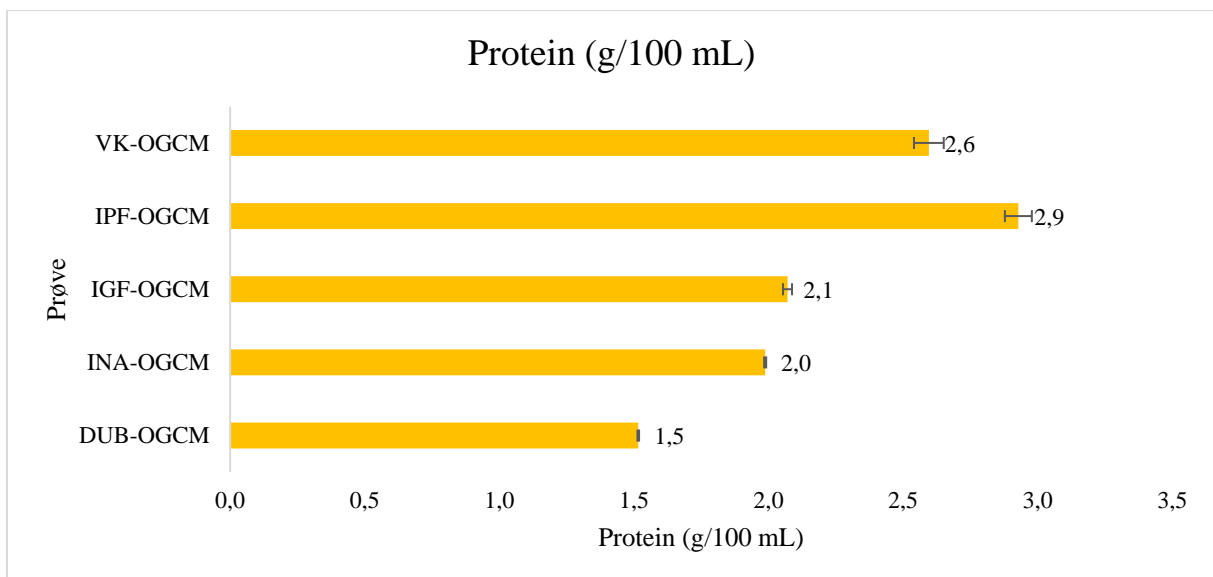


Figur 11. Utbytte av protein (%) i oppskalerte prøver (O), prøver som var oppskalerte og gelatinisert før enzymbehandling (OG). Bestemmelse ved Dumas (gule stolper) og modifisert Lowry (røde stolper). CM = ikke sentrifugerte ekstrakter; DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erte; INA = avskallede Ingrid erte; IPF = proteinfraksjon Ingrid erte; VK = Vestkorn. Standardavvik for paralleller i bestemmelsen vises på toppen av stolpene.

Figur 11 viser at prøvene hadde høyest utbytte med CM. Metoden OGCM ga høyest utbytte for alle prøver utenom DUB. For DUB ga OCM-metoden høyest utbytte med 103 %. For de fleste startmaterialene var det høyeste utbyttet opp mot 100 %. Utbyttet for IGF var noe lavere. Differansen i utbyttet mellom CM-prøver og sentrifugerte prøver var minst for DUB.

3.4.2 Konsentrasjoner av protein i plantemelken

Mengden startmateriale kan varieres. Med de mengdene som ble brukt for OGCM-metoden som eksempel gis konsentrasjoner av protein, vist i figur 12. Denne prøveserien ga generelt høyest proteinutbytte og ble brukt til videre produktutvikling og smakstesting.

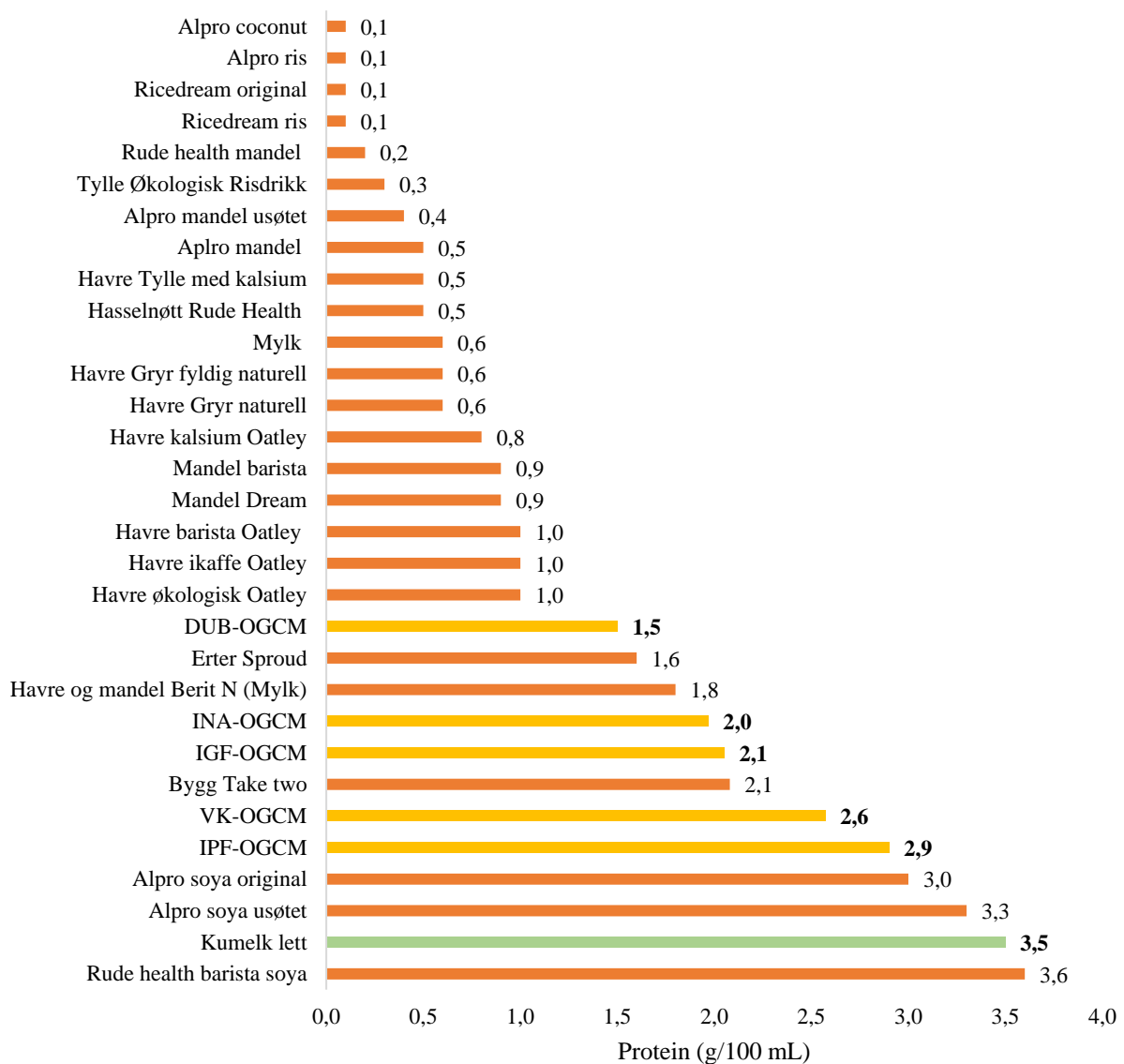


Figur 12. Konsentrasjon av protein (g/100 mL) med standardavvik av paralleller. DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter; VK = Vestkorn. OGCM = oppskalert, gelatinisert (før enzymbehandling) og Crude Milk.

Figuren viser at prøvene inneholdt mellom 1,5 og 2,9 g/100 mL protein. VK og IPF hadde mest protein med henholdsvis 2,60 g/100 mL og 2,9 g/100 mL. DUB hadde den laveste proteinkonsentrasjonen etterfulgt av IGF og INA.

3.4.3 Protein sammenlignet med eksisterende produkter

Proteininnholdet i kommersielle varianter varierte stort. De eksperimentelle drikkene ble sammenlignet med proteininnholdet (g/100 g) i lett kumelk (1 % fett) og 25 typer plantemelk, vist i figur 13. Prøveserien OGCM ble valgt ettersom disse prøvene generelt hadde høyest proteinkonsentrasjon og prosentandel nedbrutt stivelse. Innholdet av protein i de kommersielle drikkene ble notert fra innholdsfortegnelsen på pakken. Det fremkommer ikke hvordan proteinmålingene er gjort.



Figur 13. Proteininnhold (g/100 mL) i 25 kommersielle plantebaserte alternativer til melk (røde stolper), lett kumelt (grønn stolpe) og eksperimentelle drikker (gule stolper). Gjennomsnittet for kommersielle varianter = 1,02 g/100 mL. OGCM = Oppskalert, gelatinisert (før enzymbehandling), Crude Milk; DUB = Duga bygg; IGF = grovfraksjon Ingrid erter; INA = avskallede Ingrid, erter; IPF = proteinfraksjon Ingrid erter; VK = Vestkorn. Verdiene for kommersielle drikker er næringsinnholdet oppgitt av produsent (vedlegg 3). For de eksperimentelle drikkene ble Dumas (N x 6,25) benyttet til proteinbestemmelse siden vi antar at en tilsvarende metode Kjeldal eller DUMAS er benyttet på analysen av salgsproduktene.

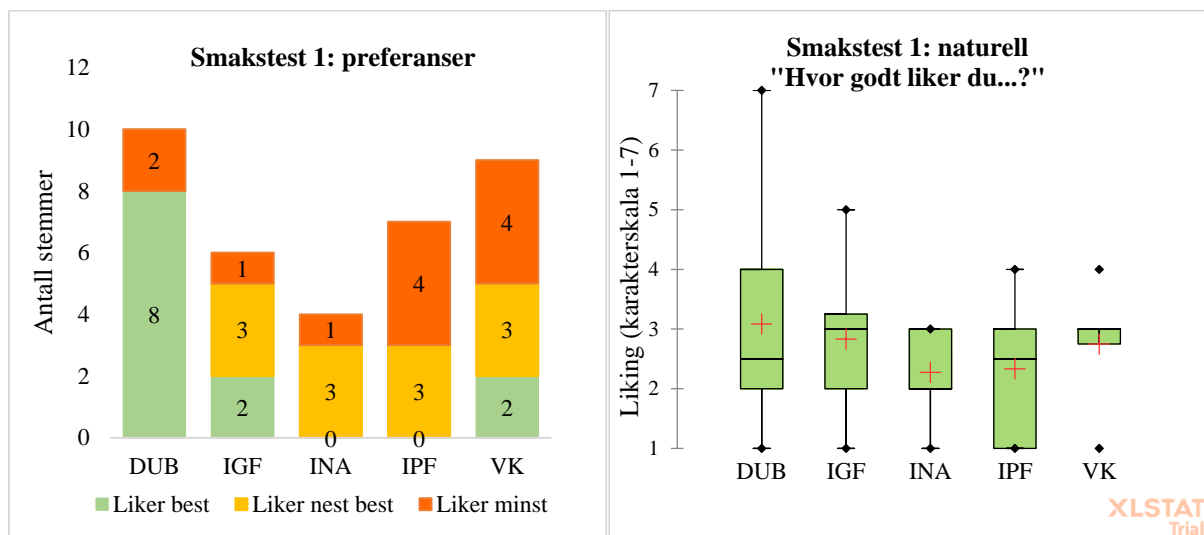
Kun én kommersiell variant hadde mer protein enn kumelk og de færreste drikkene var på høyde med proteininnholdet i kumelk lett (figur 13). De fleste kommersielle variantene hadde 1,0 g/100 mL protein eller mindre, som også var gjennomsnittet. Med de konsentrasjonene av startmateriale og vann som ble brukt var de eksperimentelle drikkene over gjennomsnittet i oversikten, men hadde mindre protein enn kumelk. Den eksperimentelle drikken med høyest proteininnhold var IPF-OGCM etterfulgt av VK-OGCM.

3.5 Hedoniske smakstester

Prøveserien OGCM hadde jevnt over høyest proteinutbytte og størst grad av fullstendig nedbrutt stivelse og ble valgt til smakstest 1. Til smakstest 2 ble de tre variantene som ble likt best i smakstest 1 benyttet. Dette var DUB, IGF og VK.

3.5.1 Smakstest 1 – uten tilsetning

Figur 14 viser at av OGCM-prøvene ble DUB valgt som best likt av flest deltakere, men ble også likt minst av to deltakere. INA og IPF ble ikke likt best av noen deltakere. Dette stemte overens med resultatene fra liking, hvor box plotet viser at gjennomsnittet for INA og IPF var lavest. Alle prøvene fikk generelt lav score for liking. Spredningen i svarene var størst for DUB.



a. Preferanser

b. Liking

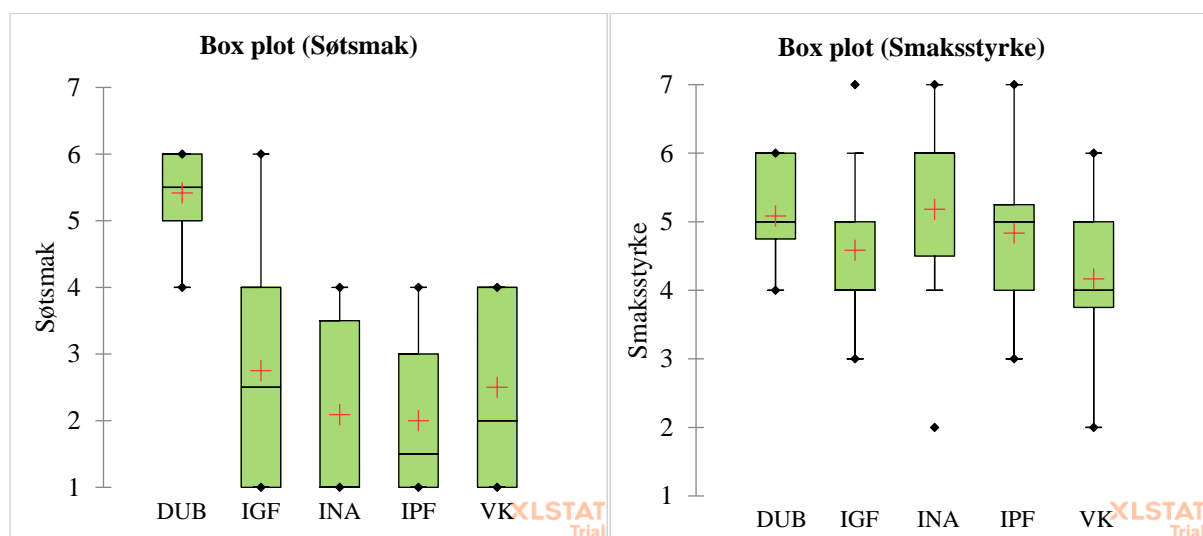
Figur 14. Preferanser (a) og box plot av liking (b) i smakstest 1. Karaktterskala 1-7 ble benyttet for vurdering av liking, 1= liker absolutt ikke, 7 = liker veldig godt. DUB = Duga bygg, IGF = grovfraksjon Ingrid erter, INA = avskallede Ingrid erter, IPF = proteinfraksjon Ingrid erter, VK = Vestkorn. For liking (b) vises gjennomsnitt som + og median som horisontal strek -. Ytre punkter er høyeste/laveste liking oppnådd.

Total score for liking viser summen av poeng gitt ved bedømmelse av liking på skala 1-7 (tabell 13). DUB fikk høyeste score for liking etterfulgt av IGF og VK. INA og IPF fikk lavest score.

Tabell 13. Total score for liking av prøvene i smakstest 1: uten tilsetning. Høyere score betyr høyere liking. DUB = Duga bygg, IGF = grovfraksjon Ingrid erter, INA = avskallede Ingrid erter, IPF = proteinfraksjon Ingrid erter, VK = Vestkorn.

	DUB	IGF	INA	IPF	VK
Total liking score	37	34	28	28	33

I tillegg til preferansetest og liking av prøvene, ble deltakernes vurdering av smak undersøkt. Box plot av deltakernes vurdering av prøvenes søttsmak (figur 15 a) viser at DUB ble oppfattet som søt i forhold til de andre prøvene.



a. Søttsmak

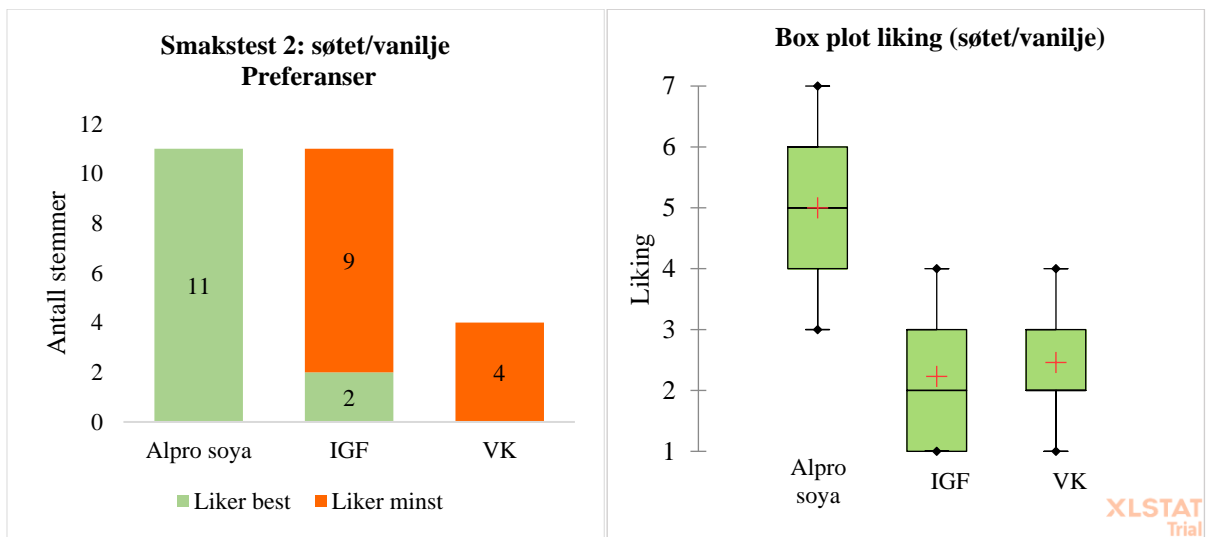
b. Smaksstyrke

Figur 15. Box plot fra smakstest 1 for søttsmak (a) og smaksstyrke (b). Karakterskala (1-7) ble benyttet for søttsmak hvor 1 = ikke søtt i det hele tatt, 7 = veldig søtt; for smaksstyrke hvor 1 = smaker veldig lite, 7= smaker veldig mye. DUB = Duga bygg, IGF = grovfraksjon Ingrid erter, INA = avskallede Ingrid erter, IPF = proteinfraksjon Ingrid erter, VK = Vestkorn. Gjennomsnitt vises som +, median vises som horisontal strek – og ytre punkter er høyeste/laveste score oppnådd.

Av dem som likte DUB godt ble søtheten kommentert som positivt. Prøvene scoret høyt på smaksstyrke (figur 15 b). VK og IGF smakte noe mindre enn de andre prøvene.

3.5.2 Smakstest 2 – med tilsetning

Prøvene i smakstest 2 var tilsatt sukker, vaniljesukker, vanilje-essens og gellan gum. Bolk A var smaksatt med noe vanilje og referansen fra markedet var Alpro soya, en søtet drikk. Alpro soya ble best likt (figur 16). IGF og VK hadde jevnt gjennomsnitt og lik median for liking. Ingen deltakere likte VK best av drikkene, mens IGF ble best likt av 2. IGF ble likt minst av flere deltakere enn VK.



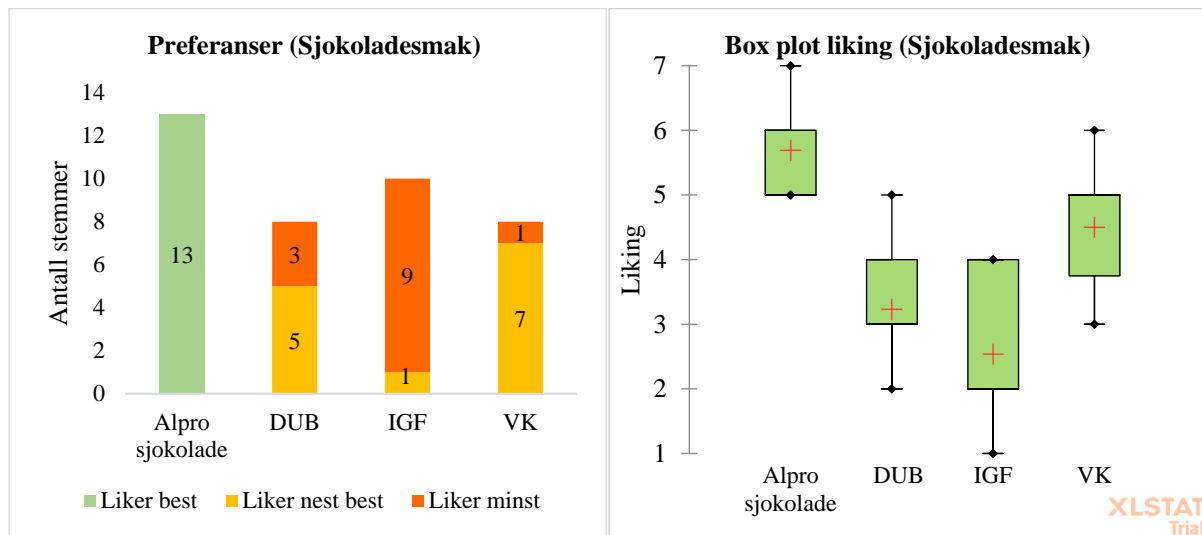
a. Preferanser

b. Liking

Figur 16. Preferanser (a) og liking (b) av drikker i smakstest 2 bolk A: søtet/vanilje. IGF = grovfraksjon av Ingrid erter, VK = Vestkorn. Karakterskala 1-7 ble benyttet for vurdering av liking, 1 = liker absolutt ikke, 7 = liker veldig godt. For liking (b) vises gjennomsnitt som + og median som horisontal strek -. Ytre punkter er høyeste/laveste liking.

Kommentarene fra deltakerne dreide seg i stor grad om at konsistensen til IGF opplevdes for viskøs. Flere beskrev en usmak for IGF. Av dem som likte IGF best ble sødme og viskositet positivt trukket frem.

Drikkene i bolck B var tilsatt kakao i tillegg til sukker, vanilje og gellan gum. Igjen kom det frem at den kommersielle varianten (Alpro sjokolade) ble best likt ved preferansetesting og ved bruk av karakterskala for liking (figur 17).



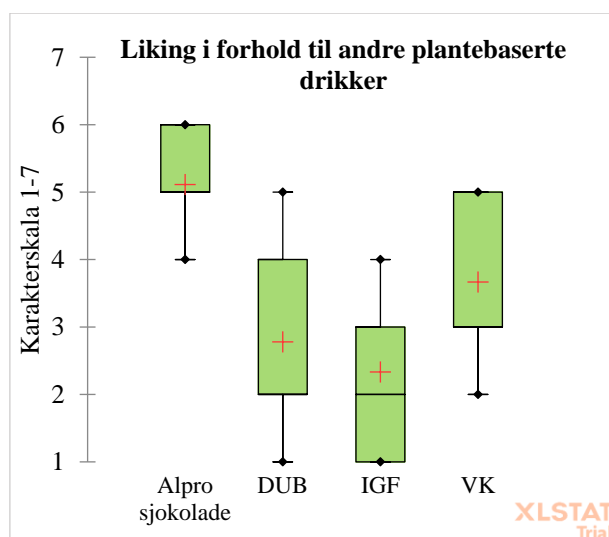
a. Preferanser

b. Liking

Figur 17. Preferanser (a) og liking (b) av drikkere i smakstest 2 bolck B: sjokoladesmak. DUB = Duga bygg, IGF = grovfraksjon av Ingrid erter, VK = Vestkorn. Karakterskala 1-7 ble benyttet for vurdering av liking, 1= liker absolutt ikke, 7 = liker veldig godt. For liking (b) vises gjennomsnitt som + og median som horisontal strek -. Ytre punkter er høyeste/laveste liking.

VK skiller seg ut som den best likte etter Alpro sjokolade både med tanke på preferanser og liking. Tilbakemeldingene for VK var noe varierende, men at sjokoladesmaken generelt ble oppfattet som kraftig var en gjenganger. De fleste var positive til kraftig sjokoladesmak, men for noen var det negativt. Konsistens var en egenskap som ble nevnt av flere. De fleste som rangerte IGF som den de likte minst begrunnet det med at den var for viskøs. Kommentarer til de andre drikkene gikk stort sett på smak.

Deltakerne ble bedt om å bedømme drikkene i forhold til andre plantebaserte drikker de hadde smakt. De 4 deltakerne som ikke hadde smakt andre plantebaserte drikker svarte ikke på spørsmålet. Resultatene er fremstilt som box plot i figur 18.



Figur 18. Liking i forhold til andre plantebaserte drikker med sjokoladesmak (Bolk B). DUB = Duga bygg, IGF = grovfraksjon av Ingrid ertre, VK = Vestkorn. En karakterskala fra 1-7 ble benyttet der 1 = liker mye dårligere, 4 = liker omtrent like godt, 7 = liker mye bedre. Gjennomsnitt vises som +, median vises som horisontal strek – og ytre punkter er høyeste/laveste liking.

VK ble likt best i forhold til sammenlignbare plantebaserte drikker med sjokoladesmak.

Gjennomsnittet for VK var 3,7 og nærmer seg derfor «liker omtrent like godt». Medianen var lavere. IGF hadde den laveste vurderingen mens DUB hadde mest variasjon i svarene.

3.6 Visuelle observasjoner av ekstraktene i dette studiet

Ekstrakter av Duga bygg hadde en brun/gråbrun farge. Prøver av INA, IGF, IPF og VK hadde ulike nyanser av hvitt (figur 19).



Figur 19. Nylaget plantemelk etter metoden med gelatinisering før enzymbehandling, ikke sentrifugert (OGCM). Fra venstre mot høyre: DUB = Duga bygg, INA = avskallede Ingrid ertes, IGF = grovfraksjon Ingrid ertes, IPF = proteinfraksjon Ingrid ertes, VK = Vestkorn.

Lagdelling i form av sedimentering forekom for alle prøver ved alle tillagingsmetoder etter lagring ved 4 °C over natten, men var tydeligst hos DUB. Lagdelingen var mindre hos prøvene som var gelatinisert før enzymbehandling. Prøver tilsatt gellan gum hadde ikke lagdeling i form av sedimentering etter kjølelagring over 7 dager. Prøvene av IGF med gellan gum var tydelig mer viskøs enn de andre.

For mer korrekt fargegjevning av ekstraktet vises figur 20, med plantemelk av IGF i noe sterkere lyssetting.



Figur 20. Ferdig eksperimentell plantemelk av Ingrid ertes, grovfraksjon.

4. Diskusjon

Oppgaven hadde som mål å utvikle en plantemelk med høyere innhold av protein enn de fleste variantene på markedet. Derfor diskuteres a) egnetheten til ekstrakter fra norske plantebaserte råvarer som alternativ plantemelk og b) metoder for å lage en plantemelk. Forhold som er nødvendige for et godt produkt i kategorien plantemelk ble undersøkt for fem ulike startmaterialer. Generelt ønskes et høyt innhold og utbytte av protein, stor grad av stivelsesnedbrytning, og en smak og et utseende sammenlignbart med andre plantebaserte alternativer. Grad av stivelsesnedbrytning og utbytte av protein ble undersøkt, samt to enkle smakstester og vurdering av utseende. Ekstrakter som ble laget i oppgaven kalles eksperimentelle drikker og ble sammenlignet med 25 kommersielle varianter i tillegg til kumelk. Smakstester ble utført med og uten tilsatt smak, søtning og stabilisator.

Startmaterialene som ble benyttet var mel av Duga bygg (DUB), mel av avskallede Ingrid erter (INA), grovfraksjon etter air classification av Ingrid erter (IGF), proteinfraksjonen etter air classification av Ingrid erter (IPF) og et kommersielt produkt: Vestkorn (VK) av norske erter. Innholdet av protein og karbohydrater, derunder fullstendig nedbrutt stivelse ble bestemt ved de benyttede konsentrasjonene av startmaterialet i oppgaven. Videre ble det beregnet grad av fullstendig nedbrutt stivelse og hvor mye av proteinet i startmaterialet som ble funnet igjen i drikkene (proteinutbytte). Enkle vurderinger av smak og utseende ble foretatt ved hjelp av smakstester med studenter som deltakere i testen.

Grad av fullstendig stivelsesnedbrytning ble undersøkt ved å bestemme innholdet av D-glukose ved GOPOD samt indirekte ved bestemmelse av sluttviskositet (cP) ved ulike behandlinger ved bruk av RVA. Intakt og svellet stivelse vil utgjøre det viktigste viskositetsbidraget i slike systemer. Total stivelse i startmaterialene ble bestemt med enzymassay for total stivelse. Proteininnholdet i startmaterialene var tidligere bestemt ved Nofima med unntak av Duga bygg som ble bestemt i oppgaven, med samme metodikk (Dumas). Proteinutbytte ble bestemt ved to metoder, Dumas og modifisert Lowry. Noe av hensikten med å benytte både modifisert Lowry og Dumas for proteinbestemmelse var å sammenligne disse to metodene og dermed lettere avdekke over- eller underestimeringer og undersøke hvilken av de to metodene som var best egnet.

4.1 Startmateriale

Vanninnholdet ble målt før andre kvantitative analyser ble satt i gang og dannet grunnlaget for korrigeringer av tørrstoff. Derfor var dette viktige resultater som kunne påvirke videre resultater som ble oppgitt i tørrvekt. Målingene ble utført i duplikater, og hadde relativt lave standardavvik (0,05–0,28 g/100 g). Derfor ble målingene antatt som gode nok. Vanninnholdet i 'tørre' prøver kan endre seg over tid og påvirkes av luftfuktigheten og temperaturen i rommet. Startmaterialene ble hentet fra lager hvor de hadde oppholdt seg over lengre tid, og små mengder ble tatt ut om gangen og benyttet etter kort tid. Det er derfor sannsynlig at det skjedde lite endring i vanninnhold i tiden mellom analysene. Vanninnholdet varierte mellom 7,73 og 13,53 % for de ulike oppmalte prøvene.

Innholdet av protein i startmaterialet av avskallet Duga bygg ble bestemt til 11,5 g/100 g i tørrvekt. Dette stemmer overens med Shewry & Ullrich (2014) som oppgir at bygg typisk har 10–16 % protein avhengig av sort og vekstforhold. Proteininnholdet til bygg var lavest blant alle startmaterialene. Total stivelse i melet av Duga bygg ble bestemt til 63,4 g/100 g i tørrvekt som er noe over beskrivelsene til Shewry & Ullrich (2014) med 50–60 % av tørrvekt. Det bemerkes at sorter uten skall har en tendens til å inneholde høyere andeler av komponentene i byggets kjerne, slik som stivelse (Sullivan et al., 2010). Dette kan forklare den noe høyere prosenten total stivelse i den skall-løse Duga bygg sorten.

Erter (*Pisum sativum*) rapporteres ofte å ha et proteininnhold mellom 24 % og 25 %, men med store variasjoner avhengig av sort og ytre faktorer (Nikolopoulou et al., 2007). For avskallede erter er proteininnholdet noe høyere. Resultatene for avskallede Ingrid erter var oppgitt til 27,7 g protein/100 g startmateriale i tørrvekt og var på linje med Owusu-Ansah & McCurdy (1991) med 27,9 g/100 g, hvor protein også var definert som N x 6,25. I likhet med proteininnhold kan stivelsesinnholdet i ertene variere. Wu og Nichols (2005) oppgir at tørre erter bestod av 48 % stivelse. I melet av avskallede Ingrid erter ble innholdet av total stivelse bestemt til 45,4 g/100 g som er noe lavere. Det var å forvente at grovfraksjonen av Ingrid erter (IGF) inneholdt mer stivelse og mindre protein enn proteinfraksjonen (IPF), slik tilfellet var her. Vestkorn (VK) hadde nesten like mye protein som IPF, hvor VK var oppgitt å inneholde 57 g/100 g og IPF var oppgitt til 62,6 g/100 g. Disse to startmaterialene inneholdt som forventet mest protein. Andelen stivelse i VK var derimot svært lav (4,4 %), ettersom

databladet til VK (vedlegg 4) oppga et karbohydratinnhold på 17 % hvorav 3,5 % sukkerarter. De oppgitte verdiene var beregnet, og ikke analysert. Analysen i oppgaven var kanskje ikke nøyaktig og kan ha underestimert totalstivelsen i VK (4,4 %). Totalstivelsen i IPF var også svært lav (2,3 %), og muligens har det skjedd en underestimering også her.

Alle proteinbestemmelsene av startmaterialet ble utført med Dumas ($N \times 6,25$) og det kan ikke utelukkes at nitrogen som ikke er fra protein kan ha ført til overestimering av proteininnholdet. Det kan også diskuteres om faktoren 6,25 er en egnet faktor for de spesifikke råstoffene som er benyttet. Aminosyresammensetningen for prøvene var ikke kjent, derfor kunne ikke N-faktoren beregnes nøyaktig. Videre drøfting av proteinbestemmelse følger (avsnitt 4.2.3).

4.2 Forforsøk: ulike temperaturer og enzymbehandling

Hensikten med forforsøket var å undersøke effekten av; a) beta-glukanase og xylanase aktivitet i Rohalase (RHO) og b) effekten av to ulike inkuberingstemperaturer på nedbryting av stivelse og innhold av protein i sentrifugert løsning med stivelsesnedbrytende enzymer (GAF & GDEX). Resultatet fra forforsøket ble benyttet til å avklare om RHO var nødvendig i tillegg til de stivelsesnedbrytende enzymene og hvilken inkubasjonstemperatur som var best egnet. Protein ble bestemt både med modifisert Lowry og Dumas. Forskjeller mellom metodene og resultatene blir diskutert i avsnittene nedenfor.

4.2.1 Fullstendig nedbrutt stivelse ved ulike temperaturer og enzymbehandling

Prøvene inkubert ved 50 °C hadde større andel nedbrutt stivelse enn prøvene inkubert ved 25 °C. Dette var å forvente da enzymenes oppgitte optimumstemperatur var 30–55 °C (GDEX) og 45–75 °C (GAF). I prøvene med proteinfraksjon fra avskallede Ingrid erter (IPF) var det lite total stivelse i utgangspunktet. Det er mulig at størrelsen og formen på stivelseskornene i proteinfraksjonen og stivelsesfraksjonen var ulike som følge av luftklassifiseringen. Størrelsen på stivelseskornene kan påvirke svellingen av stivelse (Huber & BeMiller, 2017).

Størrelsen og form på stivelseskorn i de ulike fraksjonene ble ikke undersøkt, men kunne i så fall vært påvirkende i stivelsesnedbrytningen. I forforsøket hadde IPF mest nedbrutt stivelse (48,89 %), og denne tendensen var tydelig videre i forsøket. Det samme gjaldt VK som også var en proteinfraksjon. Som nevnt kan totalstivelsen ha vært underestimert for disse (avsnitt 4.1).

For INA og IGF ble lite stivelse brutt fullstendig ned til glukose. En forklaring kan være at erter inneholder mer enzym-resistent stivelse sammenlignet med cerealer (Dahl et al., 2012), enten i råstoffet i seg selv eller som et resultat av fremstillingsprosessen med tørking. Det kan også være at enzymene ikke var helt egnet, at stivelsen var utilgjengelig for enzymene eller at stivelsesfragmentene dannet fra preparat med alfa-amylase (GAF) ikke ble brutt fullstendig ned til glukose av GDEX (amyloglukosidase). I erter kan det være enzymhemmere av alfa-amylase (Alonso et al., 1998). Forekomsten av hemmere avhenger av sort (Alonso et al., 1998), og selv om det er sannsynlig at slik aktivitet var tilstede kan det ikke sies sikkert. Målt pH i prøvene av erter var i øvre grensen for det aktive pH området (GDEX: pH 3,5–6,5 og GAF: 4,0–6,5) for enzym-preparatene med amylase og amyloglukosidase-aktivitet (se datablad i vedlegg 5 og 6 for detaljer). Reaksjonstiden for enzymene var dessuten ikke optimalisert, det er mulig at mer stivelse ville blitt brutt ned dersom enzymreaksjonen fikk fortsette lenger.

Ved visuell observasjon fremstod DUB uten RHO mer viskøs enn prøven med dette enzympreparatet. Bygg skiller seg fra de andre startmaterialene ved at det inneholder beta-glukan (Sullivan et al., 2010). Viskositeten øker når beta-glukan ekstraheres i vann. Derfor vil RHO med beta-glukanase aktivitet kunne senke viskositeten forårsaket av byggets beta-glukan. Det ville kunne resultere i høyere andel nedbrutt stivelse i DUB med RHO, slik som var tilfellet for DUB inkubert ved 25 °C, men ikke ved 50 °C. Forskjellene ved 50 °C for DUB med og uten RHO var liten, men det ble likevel besluttet å benytte RHO i forbindelse med DUB videre i prøveproduksjonen av plantemelk. At en ytterligere tilsetning av amyloglukosidase ikke førte til nevneverdig mer målt fri glukose tyder på at enzymdosering var tilstrekkelig.

Ulempen med å bruke de små rørene på 50 mL var at de var vanskelige å røre og riste skikkelig. Det ble kun laget én av hver prøve, som så ble analysert i duplikat. Derfor vil det være en usikkerhet knyttet til resultatene. Ved beregning av fullstendig nedbrutt stivelse og proteinutbytte ble volumet av tilsatt springvann benyttet til utregningen. Dette ble gjort for alle prøver/ekstrakt slik at sammenligningen mellom prøvene i oppgaven har det samme grunnlaget. Men det faktiske volumet kan ha variert i forhold til volumberegningen fordi startmaterialet sveller og tar opp vann.

4.2.2 Ekstrahert protein etter ulike temperaturer og enzymbehandling

Forskjellen i proteinutbytte med og uten RHO var liten for alle prøvene utenom DUB. Siden erter ikke er kjent for å inneholde beta-glukan og arabinoxylan, var det å forvente at enzympreparatet har hatt liten effekt på prøvene av erter som startmateriale. Det er ikke oppgitt at RHO har pektinaseaktivitet. Resultatet var sammenlignbart med Eriksen (1983) som fant at beta-glukanase hadde liten effekt på ekstraksjon av protein i soyamelk. DUB var den eneste med høyere proteinutbytte ved 50 °C enn 25 °C. Det kan være at stivelsesnedbrytningen spiller en større rolle for proteinutbyttet i DUB enn for øvrige prøver. For erte-prøvene var utbyttet lavest etter inkubasjon ved 50 °C, som tilsier at proteinene kan ha fått lavere løselighet som følge av høyere temperatur. For å hindre denaturering og dermed lavere løselighet av erteproteiner, rådes det å unngå temperaturer over 60 °C (Lam et al., 2018). Eventuelle endringer ved 50 °C var ikke forventet.

4.2.3 Sammenligning av Dumas og modifisert Lowry's metode

Det finnes mange metoder for å bestemme protein, og valg av metode påvirker resultatene (Mæhre et al., 2018). Proteinbestemmelse med totalhydrolyse av protein og summering av aminosyrer gir den mest korrekte proteinkvantifiseringen. En slik metode lå ikke innenfor rammene av denne oppgaven. Derfor måtte en annen metode benyttes. To tilgjengelige metoder var: modifisert Lowry i henhold til Hartree (1972) og Dumas metode. Dumas har vist seg å stemme med kvantifiseringer basert på aminosyresammensetning for bygg (Knutsen, 2021). En klar ulempe med Dumas er at den er tidkrevende. Derfor ble Lowry utført for å få

en indikasjon på om metodene ga resultater som stemmer overens, slik at Lowry kunne erstatte Dumas for raskere proteinbestemmelse. Lowry var raskere å utføre enn Dumas og krevde ikke inntørking av prøvene før kvantifisering. Siden metodene bestemte protein på ulikt grunnlag, kunne det å benytte begge metodene gi en bedre representasjon av det faktiske proteininnholdet og avdekke over- og underestimeringer. Mulige årsaker til feilestimeringer diskuteres i denne delen. Det bemerkes at en systematisk sammenligning ikke ble utført, men det ble gjort et forsøk på å få indikasjoner på om Dumas og Lowry gir tilsvarende proteininnhold.

Dumas måler både nitrogen fra aminosyrer, peptider, protein og ikke-protein. Slik var det en fare for overestimering av proteininnhold med Dumas metoden. Lowry er en kolorimetrisk metode som kjennetegnes av bruken av Lowry reagens og Folin-Ciocalteu reagens. I motsetning til Dumas var det ikke innholdet av totalt nitrogen som måles, men proteiner gitt i hovedsak ved aminosyrene tyrosin og tryptofan.

Proteiner i ulike matvarer har ulik aminosyre-sammensetning. Derfor kan bruk av proteinfaktoren 6,25 føre til over- eller underestimering av proteininnholdet. Det mest nøyaktige ville være å bestemme fullstendig aminosyresammensetning for å regne ut en korrekt faktor. Å regne ut faktoren for de ulike materialene er ikke en del av denne oppgaven. Dersom proteininnholdet skal brukes til å undersøke forhold som gir høyest utbytte fra samme råstoff, vil det være nok å bruke en standard faktor. Da vil eventuelt alle prøvene få samme «feil», men det gjør lite når de kun sammenlignes med hverandre.

Der de samme prøvene ble analysert for proteininnhold med både Lowry og Dumas ble det bestemt et høyere proteininnhold med Lowry enn Dumas for Duga bygg (DUB). Dette kan være på grunn av innholdet av fenoliske forbindelser i bygg (Holtekjølen et al., 2006). Slike forbindelser inneholder minst en aromatisk ring med minst en hydroksyl (-OH) gruppe. Bygg inneholder blant annet fenoliske forbindelser som frie fenoler, flavonoider og fenolsyrer (Shewry & Ullrich, 2014). Flere studier som har sett på innholdet av totale fenoler i bygg har blitt gjennomført. Deriblant Griffiths & Welch (1982) som fant at innholdet av totale fenoler utgjorde mellom 0,37 og 0,54 % av vekten «as is» i prøver med vanninnhold på omtrent 11

% . Hvor mye totale fenoler som er i Duga bygg kan variere fra disse tallene ettersom Duga er en skall-løs sort i tillegg til at vekstforhold kan ha noe å si. I Žilić et al. (2011) hadde skall-løs bygg det høyeste innholdet av frie fenoler og flavonoider sammenlignet med hvete, rug og havre. At innholdet av fenoler førte til overestimering av proteininnholdet i Duga bygg med Lowry i forhold til Dumas var derfor sannsynlig.

Det er mulig å forvente at aminosyresammensetningen spilte en rolle ved bestemmelse med Lowry. Råvarer har ulik aminosyresammensetning, og større eller mindre mengder av hovedsakelig tyrosin, tryptofan og cystein kan påvirke målingene (Everette et al., 2010). Innholdet av tyrosin i skall-løst bygg var 2,7 g/100 g protein i tørrvekt ved forsøk utført av Bahtty (1996), tryptofan ble ikke nevnt. Lignende resultater beskrives i Baidoo & Liu (1998). Altså var betydelige mengder av disse aminosyrene i bygg ikke forventet. Selv om det er mer cystein i bygg enn erter, er heller ikke dette nivået usedvanlig høyt (Baidoo & Liu, 1998). Derfor virker det mer sannsynlig at Dumas enten underestimerte proteininnholdet, eller at fenoler, sukkerer eller andre forbindelser påvirket målingene med Lowry og ga en overestimering for Duga bygg.

For INA ga Dumas et høyere proteinutbytte enn Lowry. I erter (*Pisum sativum*) kan andelen nitrogenforbindelser som ikke er fra protein ifølge Owusu-Ansah & McCurdy (1991) utgjøre 10-15 %. Dette kunne føre til en overestimering av protein med Dumas og beregning av protein med $N \times 6,25$, men ville ikke påvirket Lowry. Faktorer som påvirker bestemmelsen av INA burde også ha påvirket resultatene for grovfraksjonen av avskallede Ingrid erter og proteinfraksjonen for denne. Differansen var liten mellom fraksjonene utenom for en prøve av IPF. Det kan være at siden verdiene var nokså lave, var det en del usikkerhet knyttet til resultatene. Alle prøvene ble sentrifugert ved standard betingelser ved bruk av eppendorf. Dermed skulle ikke eventuelle partikler i prøvene påvirke proteinbestemmelsene. Erter inneholder også fenoler, selv om mengden kan variere (Oomah et al., 2011).

De store variasjonene mellom Dumas og Lowry for især DUB og INA viser at valg av analysemetode kan påvirke resultatene i betydelig grad. Det vil være bedre å sammenligne resultater fra samme analysemetode enn å sammenligne på tvers av metode. Etter at det ble

besluttet å tørke prøver til bestemmelse med Dumas i varmeskap heller enn på benken over natten, gikk totaltiden for Dumas betraktelige ned. Ulempen med Lowry var at prøveløsningen måtte sentrifugeres for at ikke andre partikler skulle forstyrre målingen av absorpsjon. En annen grunn til å bruke Dumas er at de kommersielle produktene som ekstraktene ble sammenlignet med, sannsynligvis er analysert med en metode som ligner på denne (Kjeldahl), dette diskuteres videre i avsnitt 4.4. I de videre proteinbestemmelsene ble det derfor brukt Dumas metode med unntak av prøveserien OG.

4.3 Prøveproduksjon av plantemelk

En god plantemelk eller forløper til plantemelk har stivelse som i størst grad er brutt ned for å forhindre høy viskositet, bidra til sødme og forbedre ekstraherbarheten av protein. Mest mulig av proteinet fra startmaterialet bør finnes igjen i produktet. Prøveproduksjonen ble lagt opp for å undersøke hvordan disse kriteriene ble tilfredsstillt for de ulike startmaterialene og metodene som ble valgt. Videre diskusjon drøfter hvorvidt metodene og startmaterialene tilfredsstiller kriteriene for plantemelk.

4.3.1 Fullstendig nedbrutt stivelse

Enzympreparatene som ble benyttet for å bryte ned stivelse (GAD & GDEX) danner maltose oligosakkarider og ideelt sett fri glukose som endepunkt. Stivelsen måtte gjøres tilgjengelig for enzymene for at nedbrytningen skulle finne sted. En metode er å svulle stivelseskornene i vann under oppvarming til stivelsen gelatiniserer og amylose lekker fra stivelseskornene. Forholdet mellom amylose og amylopektin i stivelseskornene, samt kornets størrelse har effekt på svelling. Mye amylose gir mindre svelling, mens større stivelseskorn gir mer svelling (Huber & BeMiller, 2017). Enzymene kan også finne angrepspunkt der stivelseskorn har blitt skadet på overflaten for eksempel etter oppmaling (Wrigley et al., 2015). Det vil være noe resistent stivelse tilstede som ikke brytes ned av enzymene (Huber & BeMiller, 2017).

Temperaturen hvor stivelseskornene mister den interne ordenen og krystallinske struktur varierer etter hvor stivelsen kommer fra. Yangcheng et al. (2016) fant at gelatiniseringen av seks skall-løse varianter av bygg startet mellom 54,1 og 56,1 °C (gelatinization onset). Mens for stivelse fra belgfrukter beskrives lite svelling og lekkasje av amylose under 60 °C (Hoover et al., 2010). Altså forventes det at enzymene lettere bryter ned stivelse i prøver hvor temperaturen har oversteget 60 °C. Dersom det var enzymhemmere til stede kan temperaturen ved gelatinisering medvirke til lavere hemmende aktivitet (Alonso et al., 1998). For alle startmaterialene var det en av metodene med gelatinisering som ga mest fri glukose. Resultatene varierte i forhold til om OG- eller G- prøvene hadde mest fri glukose. Det så ut til at INA og IPF med metoden OG ikke ble tilstrekkelig gelatinisert. Andelen fullstendig nedbrutt stivelse i disse prøvene var forventet høyere. Det kan hende at temperaturen ikke var høy nok og et gjentak burde vært utført ved en litt høyere temperatur. Dessverre ble det ikke tid på grunn av omstendighetene. For VK ble innholdet av fullstendig nedbrutt stivelse bestemt til 122 %. Denne overestimeringen kan komme av underestimering av total stivelsen i utgangspunktet (avsnitt 4.1).

Fri glukose gir ikke den samme viskositeten som gelatinisert stivelse. Derfor var en lavere final viscosity forventet for prøver med enzym enn prøver uten enzym. Dersom gelatinisering bedrer enzymatisk nedbrytning av stivelse forventes en ytterligere nedgang i viskositet for prøver gelatinisert før enzymbehandling. Disse forventningene ble møtt med unntak av prøver av de proteinrike startmaterialene IPF og VK. Viskositeten var relativt lik med og uten enzym, men gikk ned ved gelatinisering før enzymbehandling. Viskositeten var i utgangspunktet lavt i forhold til andre prøver, med eksempelvis 261 cp uten enzym for IPF sammenlignet med 6090 cp for IGF uten enzym. Økt mengde stivelse gir økt final viscosity. Derfor var en høyere viskositet forventet hos IGF, DUB og INA sammenlignet med IPF og VK. At viskositeten ved slutt punktet var lavest når en hadde foretatt gelatinisering før enzymbehandling, tyder på at gelatinisering ved >90 °C var avgjørende for tilgjengeliggjørelsen av stivelse også hos IPF og VK.

4.3.2 Protein

Prøvene med høyest proteinutbytte var ikke sentrifugert, og ble siden de inneholdt en del partikler kalt Crude Milk (CM). Resultatene tyder på at det ikke lønner seg å sentrifugere prøven for å oppnå et høyere proteinutbytte og at nokså mye protein blir igjen i pelleten dersom sentrifugering utføres. Når pH er nær det isoelektriske punktet (pI) forventes det generelt en lavere proteinløselighet. For byggprøvene var pH (5,8) nært pI (rundt pH 6) som kan forklare hvorfor proteinutbyttet i sentrifugert ekstrakt var en god del lavere enn i usentrifugert (Bilgi & Çelik, 2004; Wu et al., 1979). Det er sannsynlig at lavere løselighet ved pI har medvirket til lavere proteinutbytte for sentrifugert ekstrakt også for prøvene med erteprotein, men her var det større differanse mellom målt pH (~6,5) og pI (4 til 5) (Kiosseoglou & Paraskevopoulou, 2011; Lam et al., 2018).

Det var innledningsvis planlagt en eksperimentell uttesting av proteinekstraksjon ved pH vesentlig høyere enn pI for proteinene. Men siden laboratorietilgjengeligheten var sterkt nedsatt og veiledere ikke hadde tilgang til hjelp med spesialutstyr og innkjøring av disse typer eksperimenter, måtte denne delen utelates.

Lowry ble benyttet til å bestemme proteininnhold i prøvene som var oppskalert og gelatinisert (OG). Protein i startmaterialet ble beregnet med Dumas. Derfor ga ekstraktene bestemt med Dumas de mest korrekte beregningene av proteinutbytte. I tillegg vil ulike bestemmelsesmetoder forstyrre en sammenligning av ulike fremstillingsmetoder av prøvene og ulike startmaterialer. Forskjellen mellom OCM og OGCM var liten for DUB og IGF, men stor for VK. Det gjenstår å undersøke dette videre. DUB med OCM-metoden hadde over 100 % proteinutbytte. Også her kan det være en usikkerhet knyttet til volumberegninger av ekstrakt siden startmaterialet sveller og tar opp vann (avsnitt 4.1).

OGCM ga høyest proteinutbytte for alle prøvene utenom DUB. Proteinutbyttet med OGCM-metoden var mellom 89 og 99 % og ble regnet som tilfredsstillende. Det bør gjøres en grov filtrering, dekantering eller kraftig homogenisering for at munnfølelsen skal bedres og for å hindre sedimentering. Et videre forsøk kunne vært å utføre grov filtrering, dekantering eller kraftig homogenisering og måle protein i CM med Dumas for sammenligning.

Konsentrasjoner

Konsentrasjonene av protein for prøveserien OGCM (figur 12) tilsa at det trengs omtrent dobbelt så mye IGF som INA for å oppnå samme proteinkonsentrasjon med denne ekstraksjonsmetoden. DUB hadde den laveste proteinkonsentrasjonen med 1,52 g/100 mL, noe som gjenspeiler at dette startmaterialet hadde minst protein i tørrstoff i utgangspunktet. Proteinkonsentrasjonen til de andre drikkene var mellom 2 g/100 mL og 2,93 g/100 mL (figur 12). Med økt mengde tørrstoff kunne proteinkonsentrasjonen økt. Om det samme proteinutbyttet og den samme stivelsesnedbrytningen finner sted ved høyere konsentrasjoner ble ikke undersøkt. Rent praktisk ville en økning i tørt råstoff være mulig opp til en viss grad med tanke på viskositet og munnfølelse. Både INA, IPF og VK ble testet i høyere konsentrasjoner i utgangspunktet. Mulige utfordringer kan være forbundet med dispersjon av råstoffet. En kraftig homogenisering vil i så fall være tilrådelig.

4.4 Sammenligning med kommersielle drikker

Generelt lavt proteininnhold i plantemelk har blitt understreket i flere studier, deriblant Chalupa-Krebzdak et al. (2018). Drikkene som er tilgjengelige på det norske markedet var ingen unntak. Det er særlig viktig med et tilfredsstillende proteininnhold i plantemelk dersom disse skal fullstendig eller delvis erstatte kumelk. Selv om de eksperimentelle drikkene hadde mer protein enn gjennomsnittet for kommersielle drikker, var proteininnholdet lavere enn i kumelk. Plantemelken med den mest sammenlignbare proteinmengden som kumelk var basert på soya. På grunn av allergier mot soya og negativt produkt image (Wansink et al., 2000) er det et behov for alternativer til soya, som samtidig har godt næringsinnhold.

Sammenligningen av proteininnhold blir som nevnt mest korrekt dersom den samme metoden for proteinbestemmelse har blitt benyttet for alle produktene. Proteininnholdet i de kommersielle drikkene (figur 13) var hentet fra næringsinnholdet oppgitt av produsent. Hvilken metode som har blitt benyttet til proteinbestemmelse for disse var ukjent, men det er vanlig å benytte Kjeldahl. I så fall ville det være mer nærliggende å sammenligne proteininnholdet med resultater oppnådd med Dumas enn Lowry. Det er fordi både Kjeldahl og Dumas i motsetning til Lowry bestemmer innholdet av nitrogen og benytter standard faktor

6,25 til å beregne protein. Relativt like resultater har blitt gitt av Kjeldahl og Dumas (Bicsak & Collaborators, 1993).

For at de eksperimentelle drikkene skal være av samme ernæringsmessige verdi som kumelk, bør berikning av blant annet jod og kalsium vurderes. I tillegg bør fordøyelighet og næringsopptak fra drikken undersøkes. Til videre undersøkelser kan en øke mengden startmateriale slik at proteininnholdet blir omtrent som kumelk (3,5 g/100 mL) og undersøke sensoriske egenskaper og produktets stabilitet ved denne konsentrasjonen av protein og startmateriale. Det bør også undersøkes om det er mulig å ta utgangspunkt i andre fraksjoner som inneholder mer protein. Eller om en kan tilsette protein som er fremkommet med våtekstraksjon og felling av protein (metodikk som var planlagt i denne undersøkelsen, men ikke benyttet).

4.5 Hedoniske smakstester

Prøvene som var oppskalert, gelatinisert før enzymbehandling og ikke sentrifugert eller filtrert (OGCM) ble benyttet til smakingen. For å undersøke hvor godt eller dårlig de ulike råmaterialene ble likt med denne tillagingsmetoden, ble en prøve fra hvert startmateriale inkludert i smakstest 1. Til smakstest 2 var det kun variantene med høyeste resultat for liking i smakstest 1 som ble inkludert.

Deltakere

Testens deltakere var unge (20-30 år) og overrepresentert av kvinner. Dette gjenspeiler en gruppe hvor vi finner en stor andel forbrukere av slike produkter. En oppdragsrapport av Bugge og Alfsnes (2018) fant at aldersgruppen hvor størst andel erstatter kumelk eller meieriprodukter med plantebasert alternativer var under 30 år. I den samme rapporten ble det konkludert med at yngre og kvinner var mer tilbøyelige til å endre spisevaner på grunn av miljø, klima og dyrevelferd.

Omtrent halvparten av deltakerne i smakstestene i oppgaven svarte at de aldri eller svært sjeldent konsumerer plantemelk. For at utvalget bedre skulle representert målgruppen for plantemelk burde denne andelen vært lavere. Hedoniske tester slik som denne, benytter ifølge Harry og Hildegarde (2010) typisk 75-150 forbrukere. Deltakertallet i smakstest 1 og 2 var henholdsvis 12 og 13. Dette er for lavt til å representere en større befolkning og det ble derfor ikke utført statistiske analyser i forbindelse med smakstestene. Derimot gir resultatene en innsikt i hvordan en liten gruppe opplevde prøvene de ble presentert for.

Ytre forhold og bias

Prøverekkefølgen bør være randomisert for å unngå at rekkefølgen påvirker resultatene. Navnene på prøvene bør bestå av tre tilfeldig sammensatte tall for å unngå bias. Generelt bør en unngå alle former for ytre forhold som kan gi bias (Harry & Hildegarde, 2010). Navnene i smakstestene var ikke sammensatt av tre tilfeldige tall, og sannsynligvis enda viktigere; prøverekkefølgen var ikke randomisert. Derfor kan svarene ha blitt påvirket av hvilken prøve som for eksempel ble smakt først. Deltakerne kunne selv bestemme rekkefølgen på smakingen, men siden spørsmålene i undersøkelsene ble stilt i lik rekkefølge til alle var det naturlig å anta at denne rekkefølgen ble fulgt. Testen var dermed ikke randomisert. Deltakerne kunne fritt smake på prøver de allerede hadde smakt på for sammenligning. Forholdene rundt smakingen, eksempelvis tid på dagen ble ikke kontrollert da testene ble utført i deltakernes egne hjem til selvvalgt tid. Testing i eget hjem har fordelen at det ligner på en normal situasjon. Preferansetesting er relativt til de andre drikkene. Det betyr at deltakerne tvinges til å ta et valg slik at den mest likte nødvendigvis ikke er god, eller at den minst likte er dårlig. Resultatene fra smakstestene skal derfor ikke ilegges for stor kraft, men var ment som en indikasjon på hvordan produktet kan oppfattes av noen som selv ikke har deltatt i utviklingen. Smakstestene kunne også blitt brukt som for-tester til videre undersøkelse, der et større antall deltakere burde deltatt og ytre forhold bure vært kontrollert i større grad. Dette er kostbart og tidkrevende å gjennomføre og ligger utenfor rammene av denne oppgaven.

Resultatene

Resultatene for smakstestene ga nyttig informasjon om hvilke forhold som bør forbedres ved videre utvikling av et produkt. Prøven med Duga bygg ble likt best av flest i smakstest 1 uten

tilsetning, men var samtidig prøven med mest spredning i svarene for liking. Søtsmaken til Duga bygg ble vurdert som mye høyere enn de andre prøvene. Det er mulig at søtsmaken medvirket til at mange likte denne prøven best, selv om dette ikke kan sies med sikkerhet når det ikke ble testet for samspillseffekter. Derimot kom det frem i kommentarene at søtheten ble trukket frem positivt av dem som likte Duga bygg best, mens prøvens gråbrune farge ble oppfattet som negativ. At prøvene jevnt over fikk lav score for liking tyder på at det gjenstår en del arbeid for å forbedre drikkenes sensoriske kvaliteter. Selv om både INA og IPF ble nest best likt av 3 deltakere, kom disse dårligst ut for liking. Alle prøvene ble vurdert som nokså smaksrike, uten at det ble undersøkt om denne smaksstyrken var positiv eller negativ. Det ble ikke undersøkt om liking var koblet til smaksstyrke, og deltakernes oppfattelse av begrepet kan variere. Deltakernes forståelse av skalaene er heller ikke absolutt. Både liking, smaksstyrke og søthet kan forstås ulikt når det ikke blir brukt noe referanse. Som referanse kunne det vært inkludert en benchmark i prøveserien. Resultatene viste at DUB, IGF og VK ble best likt, mens INA og IPF ble likt dårligst. Derfor ble DUB, IGF og VK valgt til videre utprøving og smakstest med tilsetninger. Fargen til DUB skilte seg ut med at den var gråbrun. Smak av sjokolade ble derfor vurdert som mest passende for DUB. Mens IGF og VK var kremhvite i fargen og ble benyttet både til å lage en søtet variant med vanilje og til en sjokoladevariant.

I smakstest 2 med tilsatt smak, sukker og gellan gum ble den kommersielle varianten (benchmark) likt best både blant variantene med og uten sjokoladesmak. Av de resterende variantene viste preferansetesten uten sjokoladesmak at enkelte likte drikken med avskallede Ingrid erter (IGF) best. IGF ble likevel likt minst av flest. Vestkorn derimot ble ikke best likt av noen, men færre likte denne minst. De to som likte IGF best må ha gitt denne maksimalt «4» på skalaen for liking. Det er fortsatt under gjennomsnittet for referansen fra Alpro. Siden viskositeten til IGF ble kommentert som høy, bør lavere konsentrasjoner av gellan gum vurderes selv om enkelte også mente høy viskositet var positivt. Stivelsen bør også brytes ned i større grad for å unngå høy viskositet. Kommentarene på høy viskositet for IGF gjaldt både med og uten sjokoladesmak.

Av sjokoladevariantene ble VK best likt både etter preferanser og liking-skalaen. Sjokoladesmaken ble oppfattet som kraftig i VK og ble godt likt av mange. Det tyder på at en

kraftigere sjokoladesmak for de andre prøvene kan være et alternativ for en videreutvikling og oppfølging i en ny smakstest. Dette til tross for at DUB hadde mer kakao tilsatt. Det kan være at egensmaken til DUB likes mindre enn VK. For å si noe sikkert om dette hadde det vært mulig å gjennomføre for eksempel en deskriptiv analyse og «preference mapping». Med slike sensoriske metoder ville en kunne finne hvordan prøvene smaker og koble dette med hva forbrukerne liker (Harry & Hildegard, 2010).

At VK sjokolade ble vurdert like under «liker omtrent like godt» i sammenligningen med andre plantebaserte drikker kan tyde på et kommersielt potensial for denne drikken. Det kan også være at kun de som har smakt andre plantebaserte drikker svarte på spørsmålet, og at deltakere mer i målgruppen for slike produkter ga høyere score. IGF ble minst likt av sjokoladevariantene. Ved videre utvikling ville det være tilrådelig å redusere viskositeten for IGF med sjokoladesmak.

Ekstraktene av erter hadde en farge og opasitet som var sammenlignbar med drikker på markedet. I forhold til tilsetningene kan ulike nivåer av kakao, søtning og vaniljesmak testes. Siden den kraftige sjokoladesmaken til VK ble godt likt foreslås det å øke mengden kakao i IGF og DUB. For lavere viskositet for IGF bør det utføres tester med mindre eller ingen gellan gum, siden viskositeten allerede er såpass høy. Partikler bør fjernes med for eksempel filtrering. Videre smaksalternativer som kakao og kaffe, eller kakao og appelsin kunne også vurderes for å bedre kamuflere egensmaken til startmaterialene. I følge Haas et al. (2019) er det plass til ytterligere differensiering i plantemelk-markedet.

Gellan gum og stabilitet

At prøvene holdt seg homogene over 7 dager og det ikke ble observert sediment, tyder på at mengden tilsatt gellan gum (0,03 %) var tilstrekkelig (vedlegg 1). Det bør videre testes hvordan stabiliteten er over lengre tid og om mengden gellan gum muligens kan justeres ned.

4.6 Konklusjon

Det var mulig å lage vannbasert planteekstrakt av alle råmaterialene. Stivelse bør brytes ned for å gi en lav viskositet, bidra med sødme og forbedre ekstraherbarheten av protein. Proteinutbytte bør være høyest mulig for å utnytte råstoffet. Metoden som generelt ga mest nedbrutt stivelse og høyest proteinutbytte var OGCM. Denne metoden inkluderte gelatinisering før enzymbehandling med alfa-amylase (GAF) og amyloglukosidase (GDEX), inkubering ved 50 °C og ingen sentrifugering. DUB ble i tillegg tilsatt enzympreparat med xylanase- og beta-glukanase aktivitet som ga ekstraktet lavere viskositet. Preparatet var kun nødvendig for DUB. Proteinutbyttet varierte mellom 89 og 99 % med OGCM-metoden. Graden av stivelsesnedbrytning varierte fra fullstendig til ca. 60 %. Konsentrasjonen av startmaterialene ble tilpasset og ga protein konsentrasjoner i ekstraktene mellom 1,5 g/100 mL og 2,9 g/100 mL. Dette var mer enn gjennomsnittet hos eksisterende kommersielle produkter (1,0 g/100 mL), men mindre enn kumelk (3,5 g/100 mL). Bestemmelsene ga informasjon om sammensetningen av drikkene ved benyttede konsentrasjoner av startmateriale. Dette kan danne et grunnlag for videre beregning av innholdet ved lavere eller høyere konsentrasjoner av startmateriale. Til videre undersøkelser kan mengden startmateriale økes og sensoriske egenskaper og stabilitet ved denne konsentrasjonen undersøkes.

Plantemelken som ble best likt var VK, DUB og IGF og disse anbefales for videre utvikling. Det gjenstår utvikling som fjerner, maskerer eller forbedrer smak. For IGF kreves bedre stivelsesnedbrytning og mindre tilsatt gellan gum. Det bør utføres en grov filtrering, dekantering eller en kraftig homogenisering for en glatt munnfølelse. Proteinutbyttet bør i den sammenheng undersøkes på nytt. For bedre ekstraherbarhet av protein i ekstrakter som skal filtreres eller dekanteres kan det eksperimenteres med pH. Gellan gum var en passende stabilisator. Andre mengder av gellan gum, sukker, vanilje/aroma og kakaopulver bør undersøkes.

Målet om å utvikle plantebasert drikke av bygg, erter og ertefraksjoner med høyere proteininnhold enn eksisterende drikker ble møtt. I utviklingen ble det avdekket viktig informasjon som kan bidra til en videre produktinnovasjon. I det store bildet vil produktet kunne bidra til verdiskapning av erter og bygg.

5. Referanser

- Abrahamsen, U., Uhlen, A. K., Waalen, W. & Stabbetorp, H. (2019). *Muligheter for økt proteinproduksjon på kornarealene*. NIBIO Bok;5(1) 2019: NIBIO.
- Alonso, R., Orúe, E. & Marzo, F. (1998). Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chemistry*, 63 (4): 505-512. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00037-5).
- Baidoo, S. K. & Liu, Y. G. (1998). Hull-less barley for swine: ileal and faecal digestibility of proximate nutrients, amino acids and non-starch polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (3): 397-403.
- Bhatty, R. (1996). Production of food malt from hull-less barley. *Cereal Chemistry*, 73 (1): 75-80.
- Bicsak, R. C. & Collaborators. (1993). Comparison of Kjeldahl Method for Determination of Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds with Generic Combustion Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 76 (4): 780-786. doi: 10.1093/jaoac/76.4.780.
- Bilgi, B. & Çelik, S. (2004). Solubility and emulsifying properties of barley protein concentrate. *European Food Research and Technology*, 218 (5): 437-441. doi: 10.1007/s00217-004-0895-4.
- Boye, J., Zare, F. & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43 (2): 414-431. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>.
- Bugge, A. B. & Alfsnes, F. (2018). *Kjøttfrie spisevaner – hva tenker forbrukerne?* Oppdragsrapport fra Forbruksforskningsinstituttet SIFO 14/2018 (lest 11.05.2021).
- Chalupa-Krebszda, S., Long, C. J. & Bohrer, B. M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, 87: 84-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018>.
- Chang, S. K. C. & Zhang, Y. (2017). Protein Analysis. I: Nielsen, S. S. (red.) *Food Analysis*, s. 315-331. Cham: Springer International Publishing.
- Dahl, W. J., Foster, L. M. & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition*, 108 (S1): S3-S10. doi: 10.1017/S0007114512000852.
- Damodaran, S. & Parkin, K. L. (red.). (2017). *Fennema's Food Chemistry*. 5 utg. Boca Raton: CRC Press.
- Eriksen, S. (1983). Application of Enzymes in Soy Milk Production to Improve Yield. *Journal of Food Science*, 48 (2): 445-447. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10762.x>.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W. & Walker, R. B. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (14): 8139-8144. doi: 10.1021/jf1005935.
- Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane determinations in proteins *Journal of Biological Chemistry*, 73: 627-650.
- Foyer, C. H., Lam, H.-M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H. M., Varshney, R. K., Colmer, T. D., Cowling, W., Bramley, H., Mori, T. A., Hodgson, J. M., et al. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*, 2 (8): 16112. doi: 10.1038/nplants.2016.112.
- Frøseth, R. B. (2009). *Erter og åkerbønner*. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/erter-og-akerbonner>.

- Frøseth, R. B. (2017). *Belgvekster til modning*. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/belgvekster-til-modning>.
- Gobbi, L., Ciano, S., Rapa, M. & Ruggieri, R. (2019). Biogenic Amines Determination in “Plant Milks”. *Beverages*, 5 (2): 40.
- Grant, C. & Hicks, A. (2018). Comparative Life Cycle Assessment of Milk and Plant-Based Alternatives. *Environmental Engineering Science*, 35. doi: 10.1089/ees.2018.0233.
- Griffiths, D. W. & Welch, R. W. (1982). Genotypic and environmental variation in the total phenol and flavanol contents of barley grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33 (6): 521-527. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740330605>.
- Harry, T. L. & Hildegarde, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food : Principles and Practices*. Food Science Text Series, b. 2nd ed. New York: Springer.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48 (2): 422-427. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).
- Holtekjølen, A. K., Kinitz, C. & Knutsen, S. H. (2006). Flavanol and Bound Phenolic Acid Contents in Different Barley Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (6): 2253-2260. doi: 10.1021/jf052394p.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H. J. & Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food Research International*, 43 (2): 399-413. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.001>.
- Houde, M., Khodaei, N., Benkerroum, N. & Karboune, S. (2018). Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chemistry*, 254: 367-376. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.156>.
- Huber, K. C. & BeMiller, J. N. (2017). Carbohydrates. I: Damodaran, S. & Parkin, K. L. (red.) *Fennema's Food Chemistry*, s. 92-169. Boca Raton: CRC Press.
- Haas, R., Schnepps, A., Pichler, A. & Meixner, O. (2019). Cow Milk versus Plant-Based Milk Substitutes: A Comparison of Product Image and Motivational Structure of Consumption. *Sustainability*, 11 (18): 1-1.
- Izydorczyk, M. & Biliaderis, C. (2000). Structural and functional aspects of cereal arabinoxylans and b-glucans. I, s. 361-383.
- Jeske, S., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2018). Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Research International*, 110: 42-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.045>.
- Jung, S., Rickert, D. A., Deak, N. A., Aldin, E. D., Recknor, J., Johnson, L. A. & Murphy, P. A. (2003). Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80 (12): 1169. doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0837-3>.
- Kiosseoglou, V. & Paraskevopoulou, A. (2011). Functional and physiochemical properties of pulse proteins. I: Tiwari, B. K., Gowen, A. & McKenna, B. (red.) *Pulse Foods: processing, quality and nutraceutical applications*, s. 57-90. San Diego: Academic Press.
- Knutsen, S. H. (2021). *Upublisert, personlig meddelelse*. Ås (20.05.2021).
- Kopf-Bolanz, K. & Sousa, A. (2017). Nutritional Implications of an Increasing Consumption of Non-Dairy Plant-Based Beverages Instead of Cow's Milk in Switzerland. *J Adv Dairy Res*, 05. doi: 10.4172/2329-888X.1000197.
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T. & Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34 (2): 126-147. doi: 10.1080/87559129.2016.1242135.

- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-275. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Lucarini, A. C. & Kilikian, B. V. (1999). Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnology Techniques*, 13 (2): 149-154. doi: 10.1023/A:1008995609027.
- McCarthy, K. S., Parker, M., Ameerally, A., Drake, S. L. & Drake, M. A. (2017). Drivers of choice for fluid milk versus plant-based alternatives: What are consumer perceptions of fluid milk? *Journal of Dairy Science*, 100 (8): 6125-6138. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12519>.
- McClements, D. J., Newman, E. & McClements, I. F. (2019). Plant-based Milks: A Review of the Science Underpinning Their Design, Fabrication, and Performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18 (6): 2047-2067. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12505>.
- Megazyme. (2018). *D-GLucose Assay Procedure (GOPOD-FORMAT)*. Ireland: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-GLUC_DATA.pdf.
- Megazyme. (2020). *Total Starch HK, Assay procedure (AMG/ α -AMYLASE/HK METHOD)*. Ireland: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-TSHK_DATA.pdf.
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O. & Jensen, I.-J. (2018). Protein Determination—Method Matters. *Foods*, 7 (1): 5.
- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2015). Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (3): 339-349. doi: 10.1080/10408398.2012.761950.
- Nikolopoulou, D., Grigorakis, K., Stasini, M., Alexis, M. N. & Iliadis, K. (2007). Differences in chemical composition of field pea (*Pisum sativum*) cultivars: Effects of cultivation area and year. *Food Chemistry*, 103 (3): 847-852. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.035>.
- Norske Felleskjøp. (2020). *Statistikksamling Markedsordningen for korn Sluttrapport 2019 20* Tilgjengelig fra: <https://www.fk.no/nyheter/kornstatistikk> (lest 22.02.2020).
- O'Sullivan, J. & Mathison, G. E. (1970). Interference by monosaccharides with the estimation of tyrosine and proteins using the Folin-Ciocalteu phenol reagent. *Analytical Biochemistry*, 35: 540-542. doi: 10.1016/0003-2697(70)90221-6.
- Oomah, B. D., Patras, A., Rawson, A., Singh, N. & Compos-Vega, R. (2011). Chemistry of pulses. I: Tiwari, B. K., Gowen, A. & McKenna, B. (red.) *Pulse Foods: processing, quality and nutraceutical applications*, s. 9-55. San Diego: Academic Press.
- Owusu-Ansah, Y. J. & McCurdy, S. M. (1991). Pea proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. *Food Reviews International*, 7 (1): 103-134. doi: 10.1080/87559129109540903.
- Palacios, O. M., Badran, J., Drake, M. A., Reisner, M. & Moskowitz, H. R. (2009). Consumer acceptance of cow's milk versus soy beverages: Impact of ethnicity, lactose tolerance and sensory preference segmentation. *Journal of Sensory Studies*, 24 (5): 731-748. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2009.00236.x>.
- Palacios, O. M., Badran, J., Spence, L., Drake, M. A., Reisner, M. & Moskowitz, H. R. (2010). Measuring Acceptance of Milk and Milk Substitutes Among Younger and Older Children. *Journal of Food Science*, 75 (9): S522-S526. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01839.x>.

- Paul, A., Kumar, S., Kumar, V. & Sharma, R. (2019). Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60: 1-19. doi: 10.1080/10408398.2019.1674243.
- Poore, J. & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360 (6392): 987-992. doi: 10.1126/science.aag0216.
- Rhee, K. C. (2001). Determination of Total Nitrogen. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00 (1): B1.2.1-B1.2.9. doi: <https://doi.org/10.1002/0471142913.fab0102s00>.
- Rincon, L., Braz Assunção Botelho, R. & de Alencar, E. R. (2020). Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. *LWT*, 128: 109479. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109479>.
- Sahlstrøm, S. (2021). Svar på spørsmål om RVA og viskositet (e-post til Marianne R. Dahle 31.05.2021).
- Saldanha do Carmo, C., Silventoinen, P., Nordgård, C. T., Poudroux, C., Dessev, T., Zobel, H., Holtekjølen, A. K., Draget, K. I., Holopainen-Mantila, U., Knutsen, S. H., et al. (2020). Is dehulling of peas and faba beans necessary prior to dry fractionation for the production of protein- and starch-rich fractions? Impact on physical properties, chemical composition and techno-functional properties. *Journal of Food Engineering*, 278: 109937. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109937>.
- Sanchez-Monge, R. G., Lopez-Torrejón, G., Pascual, C., Varela, J., Martin-Esteban, M. & Salcedo, G. (2004). Vicilin and convicilin are potential major allergen from pea. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34: 1747-53. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02085.x.
- Schiano, A. N., Harwood, W. S., Gerard, P. D. & Drake, M. A. (2020). Consumer perception of the sustainability of dairy products and plant-based dairy alternatives. *Journal of Dairy Science*, 103 (12): 11228-11243. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18406>.
- Schutyser, M. A. I. & van der Goot, A. J. (2011). The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (4): 154-164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.006>.
- Serikstad, G. L., Hansen, S. & de Boer, A. (2013). Biologisk nitrogenbinding – belgvekster som kilde til nitrogen. *FOKUS, Bioforsk*, 8 (3).
- Serrano, S., Rincón, F. & García-Olmo, J. (2013). Cereal protein analysis via Dumas method: Standardization of a micro-method using the EuroVector Elemental Analyser. *Journal of Cereal Science*, 58 (1): 31-36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.04.006>.
- Sethi, S., Tyagi, S. K. & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (9): 3408-3423. doi: 10.1007/s13197-016-2328-3.
- Shen, S., Hou, H., Ding, C., Bing, D.-J. & Lu, Z.-X. (2016). Protein content correlates with starch morphology, composition and physicochemical properties in field peas. *Canadian Journal of Plant Science*, 96 (3): 404-412, 9.
- Shewry, P. R. & Ullrich, S. E. (2014). *Barley: chemistry and technology*. 2. utg. St Paul: American Association of Cereal Chemists, Inc (AACC).
- Silva, A. R. A., Silva, M. M. N. & Ribeiro, B. D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International*, 131: 108972. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>.
- Singhal, S., Baker, R. & Baker, S. (2016). A Comparison of the Nutritional Value of Cow's Milk and Non-dairy Beverages. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64: 1. doi: 10.1097/MPG.0000000000001380.
- Statistisk sentralbyrå. (2020). *Statistikkbanken; Korn og oljeverkster, areal og avlinger; 07479: Kornavling (1 000 tonn), etter statistikkvariabel og år (2016-2020)*.

- Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/statbank/table/07479/tableViewLayout1/> (lest 22.02.2020).
- Sullivan, P., O'Flaherty, J., Brunton, N., Gee, V. L., Arendt, E. & Gallagher, E. (2010). Chemical composition and microstructure of milled barley fractions. *European Food Research and Technology*, 230 (4): 579-595. doi: 10.1007/s00217-009-1196-8.
- Sullivan, P., Arendt, E. & Gallagher, E. (2013). The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods. *Trends in Food Science & Technology*, 29 (2): 124-134. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.10.005>.
- Sworn, G. (2009). Gellan gum. I: *Handbook of Hydrocolloids*, s. 204-227.
- Vainio, A., Niva, M., Jallinoja, P. & Latvala, T. (2016). From beef to beans: Eating motives and the replacement of animal proteins with plant proteins among Finnish consumers. *Appetite*, 106: 92-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.03.002>.
- Vanga, S. K. & Raghavan, V. (2018). How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *Journal of Food Science and Technology*, 55 (1): 10-20. doi: 10.1007/s13197-017-2915-y.
- Wang, N. & Daun, J. K. (2004). Effect of variety and crude protein content on nutrients and certain antinutrients in field peas (*Pisum sativum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (9): 1021-1029. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1742>.
- Wang, N., Hatcher, D. W. & Gawalko, E. J. (2008). Effect of variety and processing on nutrients and certain anti-nutrients in field peas (*Pisum sativum*). *Food Chemistry*, 111 (1): 132-138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.047>.
- Wansink, B., Park, S. B., Sonka, S. & Morganosky, M. (2000). How soy labeling influences preference and taste. *The International Food and Agribusiness Management Review*, 3 (1): 85-94. doi: [https://doi.org/10.1016/S1096-7508\(00\)00031-8](https://doi.org/10.1016/S1096-7508(00)00031-8).
- Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K. & Faubion, J. (2015). *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*.
- Wu, Y. V., Sexson, K. R. & Sanderson, J. E. (1979). Barley protein concentrate from high-protein, high-lysine varieties. *Journal of Food Science*, 44: 1580-1583.
- Wu, Y. V. & Nichols, N. N. (2005). Fine Grinding and Air Classification of Field Pea. *Cereal Chemistry*, 82 (3): 341-344. doi: <https://doi.org/10.1094/CC-82-0341>.
- Yangcheng, H., Gong, L., Zhang, Y. & Jane, J.-I. (2016). Physicochemical properties of Tibetan hull-less barley starch. *Carbohydrate Polymers*, 137: 525-531. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.061>.
- Zeiger, R. S., Sampson, H. A., Bock, S. A., Burks, A. W., Harden, K., Noone, S., Martin, D., Leung, S. & Wilson, G. (1999). Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. *The Journal of Pediatrics*, 134 (5): 614-622. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(99\)70249-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(99)70249-0).
- Žilić, S., Šukalović, V., Dodig, D., Maksimović, V., Maksimovic, M. & Basić, Z. (2011). Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 54: 417-424.

7. Vedlegg

Oversikt over vedlegg

Vedlegg 1: Sammensetning av ferdige drikker med smak

Vedlegg 2: Spørreskjema til hedonisk smakstest

Vedlegg 3: Innhold i eksisterende varianter av plantebasert drikke

Vedlegg 4: Vestkorn Pea Protein F55X

Vedlegg 5: AB Enzymes Gammadex CAL-TDS

Vedlegg 6: AB Enzymes Gammafungase A65L-TDS

Vedlegg 7: AB Enzymes Rohalase SEP-TDS

Vedlegg 1: Sammensetning av ferdige drikker med smak:

DUB sjokolade	% (vekt)
Plantemelk (Vannekstrakt)	92,07
Sukker	3,5
Vaniljesukker	0,7
Essens, vanilje	0,2
kakao	3,5
Gellan gum	0,03

VK	% (vekt)
Plantemelk (Vannekstrakt)	95,57
sukker	3,5
Vaniljesukker	0,7
Essens, vanilje	0,2
Gellan gum	0,03

VK sjokolade	% (vekt)
Plantemelk (Vannekstrakt)	92,07
Sukker	4
Vaniljesukker	0,7
Essens, vanilje	0,2
kakao	3
Gellan gum	0,03

IGF	% (vekt)
Plantemelk (Vannekstrakt)	96,07
Sukker	3
Vaniljesukker	0,7
Essens, vanilje	0,2
Gellan gum	0,03

IGF sjokolade	% (vekt)
Plantemelk (Vannekstrakt)	93,57
Sukker	3
Vaniljesukker	0,7
Essens, vanilje	0,2
kakao	2,5
Gellan gum	0,03

Ingrediensene:

Vaniljesukker: Freia vaniljesukker (sukker, maisstivelse, vanillin)

Essens, vanilje: Idun vaniljeessens (propylenglykol, aroma)

Kakao: Freia, presset kakaomasse (pulver)

Gellan gum: Kelcogel HA-B Gellan gum, Atlanta USA

Vedlegg 2: Spørreskjema til hedonisk smakstest

Spørsmål til smakstest 1 og 2:

Alder?

Kjønn ?

Hender det at du drikker plantebaserte drikker, også kjent som «plantemelk»?

- Ja, ofte
- Ja, noen ganger
- Nei, eller svært sjeldent
- Nei, aldri

«A» brukes som eksempel. Spørsmålene ble stilt for hver smaksprøve i testen, hvor «A» ble byttet ut med kodenavn til smaksprøven.

På en skala fra 1 til 7, hvordan vil du bedømme drikk A?

	1	2	3	4	5	6	7	
Liker absolutt ikke	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Liker veldig godt

Drikk A smaker

	1	2	3	4	5	6	7	
Ikke søtt i det hele tatt	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Veldig søtt

Drikk A smaker

	1	2	3	4	5	6	7	
Veldig lite	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Veldig mye

Hvor godt liker du drikk A i forhold til andre plantebaserte drikker du har smakt (ris, soya, mandel etc)? (Har du ikke smakt andre, går du videre til neste spørsmål)

1 2 3 4 5 6 7

Liker mye dårligere Liker mye bedre

Hvilken av drikkene likte du best? *Svaralternativer*

Hvilken av drikkene likte du nest best? *Svaralternativer*

Hvilken av drikkene likte du minst? *Svaralternativer*

(Frivillig) Hva synes du om denne smakingen? Har du noen kommentarer kan du skrive de her: *Plass til lang svartekst*

Ytterligere spørsmål til smakstest 2:

Har du noen kommentarer til drikk A? *Plass til lang svartekst*

Kan du si noe om hvorfor du likte denne drikken minst? *Plass til lang svartekst*

Kan du si noe om hvorfor du likte denne drikken mest? *Plass til lang svartekst*

Hva synes du om fargen til drikk A?

- OK farge
- ikke OK farge

For sjokoladevarianter:

Hvor godt liker du drikk B1 i forhold til andre plantebaserte drikker med kakao/sjokolade du har smakt (ris, soya, havre etc)? Skalaen går fra 1 til 7 hvor 1 = liker mye dårligere, 4 = liker omtrent like godt, 7= liker mye bedre.

1 2 3 4 5 6 7

Liker mye dårligere Liker mye bedre

Vedlegg 3: Innhold i eksisterende varianter av plantebasert drikke

Næringsinnhold per 100g eller ml	Kumelk lett	Alpro soya usøtet	Alpro soya original	Rude health barista soya	Alpro mandel usøtet	Mandel Dream	Havre og mandel Berit N (Mylk)	Alpro mandel	Mandel barista	Rude health mandel	Hasselnøtt Rude Health	Mylk
Energi (kJ)	173	134	163	241	52	152	244	102	152	237	62	250
Energi (Kcal)	41	32	39	58	13	36	58	24	36	56	262	60
Fett	1	1,8	1,8	1,7	1,1	1,1	2,4	1,1	1,1	1,5	2	3,9
-Hvorav mettede	0,6	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3	3,2
Karbohydrater	4,5	0,2	2,5	5	0,1	5,4	7	3	5,4	10,5	11	5,3
-Hvorav sukkerarter	4,5	0,1	2,5	3,4	0,1	2,9	5	3	2,9	4,7	4,4	4,9
Kostfiber		0,6	0,5	1	0,4	0,5	0,7	0,2	0,5	0,2	0,1	0,5
Protein	3,5	3,3	3	3,6	0,4	0,9	1,8	0,5	0,9	0,2	0,5	0,6
Salt	0,1	0,003	0,09	0,1	0,13	0,1	0,1	0,12	0,1	0,1	0,1	0,3
Stabilisatorer og emulgatorer		gellan gum	gellan gum	"sjøgress"	gellan gum, Johannesbrødkjerneremel, solsikkelecitin	gellan gum	gellan gum	gellan gum	gellan gum, guar gum	-	-	solsikkelecitin

Næringsinnhold per 100g eller ml	Alpro ris	Ricedream ris	Ricedream original	Tylle Økologisk Risdrikk	Alpro coconut	Havre kalsium Oatley	Havre økologisk Oatley	Havre ikaffe Oatley	Havre barista Oatley	Havre Tylle med kalsium	Havre Gryr fyldig naturell	Erter Sproud	Bygg Take two*
Energi (kJ)	200	209	211	229	85	193	157	247	247	193	168	243	105
Energi (Kcal)	47	50	50	54	20	46	37	59	59	46	40	58	25
Fett	1	1	0,1	1	0,9	1,5	0,5	3	3	1,2	1,5	3	2
-Hvorav mettede	0,1	0,1	0,1	0,1	0,9	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2
Karbohydrater	9,5	9,9	9,9	11	2,7	6,7	6,7	6,6	6,6	8	6,7	6,7	0,3
-Hvorav sukkerarter	3,3	7,1	7,1	7,5	1,9	4,1	4,1	4	4	6	3,5	3,5	0
Kostfiber				0,5	0	4,1	0,8	0,8	0,8	0,5			0,42
Protein	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,8	1	1	1	0,5	0,6	0,6	1,6
Salt	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Stabilisatorer og emulgatorer	gellan gum	gellan gum		-	karragenan, guar gum, xanthan	-	-	-	-	"alge" (0,4%)	gellan gum	-	gellan gum, locust bean gum

* tilgjengelig i USA

Vedlegg 4: Vestkorn Pea Protein F55X



Vestkorn A/S | F.L. Hansens vej 6 | DK-7500 Holstebro | Phone: + 47 51740300 | www.vestkorn.com | VAT 37336432

Vestkorn Pea Protein F55X

Version 2020-03-23

Description	100% Natural. Grain-free. Non-GMO. Pea Protein.
Format	Fine flour.
Application	Foodstuff. Suitable for kosher, halal, vegetarians and vegans.
Process	Concentrate obtained by milling and air classification. No additives. No processing aids.
Raw material	Pisum Sativum.
Colour	Creamy light yellow.
Odour	Smell of peas.
Packaging	Big Bag or bag.
Storage	Store in a dark, cool and dry place. Max 22°C.
Shelf life	24 months if stored under proper conditions.

Chemical specifications		Method
Moisture	<10,0 g/100g	§64 LFGB L 17.00-1 : 2002-12 (mod.)
Ash*	6,00 g/100g	§64 LFGB L 17.00-3 : 2002-12 (mod.)

Nutritional facts*		Method
Energy kJ	1545 g/100g	Calculated
Energy kcal	367 g/100g	Calculated
Protein (N*6,25)	55±1 g/100g	§64 LFGB L 17.00-15 : 2013-08 (mod.)
Carbohydrates	17,0 g/100g	Calculated
- Of which sugar	3,50 g/100g	Calculated
Total fat	5,00 g/100g	§64 LFGB L 17.00-4 : 1982-05 (mod.)
- Saturated fatty acids	0,90 g/100g	Calculated
- Mono unsaturated fatty acids	1,00 g/100g	Calculated
- Poly unsaturated fatty acids	2,50 g/100g	Calculated
- Trans fatty acids	0,00 g/100g	Calculated
Total dietary fibres	16,0 g/100g	§64 LFGB L 00.00-18 : 1997-01
Sodium (Na)	<0,01 g/100g	DIN EN ISO 11885 E22
Salt equivalent (calculated Na* factor 2,5)	<0,03 g/100g	Calculated

*Dry matter values. Average values, depending on variations in raw material.

Vedlegg 5: AB Enzymes Gammadex CAL-TDS del 1



GAMMADEX CAL

Glucoamylase enzyme for brewing, distilling & fruit juice production

PRODUCT DESCRIPTION

GAMMADEX CAL is a liquid formulated fungal glucoamylase (amyloglucosidase) enzyme for starch degradation. GAMMADEX CAL is an exo-amylase and hydrolyses alpha-1,4- as well as alpha-1,6-glycosidic linkages from the non-reducing end of liquefied starch and dextrans, thereby releasing glucose. GAMMADEX CAL is produced by controlled fermentation of a classical strain of *Aspergillus niger*.

PRODUCT CHARACTERISTICS

GAMMADEX CAL has the following characteristics & specifications:

- Liquid formulation.
- Composition: water, glucoamylase, glucose, potassium sorbate, sodium chloride, sodium benzoate
- Brown colour and characteristic odour.
- Density: ~1.14 g/ml.
- Activity: Minimum 500 GAU/g. A method of analysis is available on request.
- IUB: 3.2.1.3
- CAS: 9032-08-0

GAMMADEX CAL complies with the recommended specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) for food-grade enzyme preparations.

APPLICATION

In **brewing**, GAMMADEX CAL may be used both in the brew house and in the fermenter, in order to reach the desired attenuation, or to reduce the level of residual carbohydrate. If GAMMADEX CAL is used in the brew house, then a prolonged saccharification is recommended of 2-4 hours at temperatures of 60-65 °C. When using GAMMADEX CAL in the fermenter, no special measures need to be taken.

In **distilling**, GAMMADEX CAL is used to hydrolyse dextrans to fermentable sugars in cereal- and potato mashes, that have been liquefied. GAMMADEX CAL is added to the liquefied mash at a temperature of ca. 55 °C. A saccharification rest however is not required as saccharification will continue during fermentation, even at reduced reaction rate.

In **fruit juice** production, GAMMADEX CAL is used for the starch degradation in pome juices. Complete degradation of starch prevents hazes and is required for clear apple and pear juice concentrates. The addition of the enzyme takes place together with the depectinisation after heating, i.e. essence stripping. Complete starch degradation is measured with the iodine test.

DOSAGE

The dosage of the enzyme depends on raw materials used and reaction conditions such as pH, temperature and time. The optimal dose rate should be determined in trials.

pH range: 3.5-6.5
Temperature range: 45-75 °C

GAMMADEX CAL, Page 1 of 2



Vedlegg 5: AB Enzymes Gammadex CAL-TDS del 2



GAMMADEX CAL

Glucoamylase enzyme for brewing, distilling & fruit juice production

DOSAGE (continued)

For initial trials, typical dosages are:

- Brewing:** Brewhouse, 1.5-2.5 kg/ton grist.
Fermentation, 3-5 ml/hl beer (added while filling the fermenter)
- Distilling:** 650-700 ml/ton raw material at 50-55 °C for 2 days.
550-600 ml/ton raw material at 50-55 °C for 3 days.
550 ml/ton raw material at 50-55 °C for 4 days.
750-800 ml/ton raw material at 30 °C for 2 days.
600-650 ml/ton raw material at 30 °C for 3 days.
650 ml/ton raw material at 30 °C for 4 days.
- Fruit juice:** 15-30 g/1000 litre juice, depending on starch content in the fruit.

PACKAGING

GAMMADEX CAL is available in 25 kg PE canisters and 1000 kg IBC's.

STORAGE & HANDLING

When stored in original packaging, unopened, at dry conditions and at temperatures below 10°C, GAMMADEX CAL is best used within 24 months from the date of production. Avoid unnecessary contact with enzyme preparations during handling and avoid the formation of aerosol and dust of the product. Repeated inhalation of enzyme aerosol or dust may cause sensitisation and may cause allergic type reactions in sensitised individuals. For detailed information and instructions, please refer to the Safety Data Sheet (SDS).

DISCLAIMER

©AB Enzymes GmbH. Use and/or sale of these products may be covered by one or more patents as well as patent applications in EU, US and other countries. Product registration requirements apply in selected regions and countries; consult with AB Enzymes for latest updates on product registrations and product availability in your country.

We have used diligent efforts to ensure that all information and statements given in this brochure are correct at the time of publication. Despite thereof, neither AB Enzymes GmbH nor ROAL OY nor any of their affiliates can guarantee, represent or warrant that the information and statements are accurate, current and/or complete.

As the user controls the application or specific use of our products as well as the technical conditions therefor, we cannot make any representations or warranties with respect to this specific use or application including, but not limit to, any results obtained in the processing of our products. The customer or user is solely responsible for its specific use or application of our products and that such use or application will comply with applicable laws, regulations and all patent or other intellectual property rights of third parties.

All information and statements are intended for persons having the required skill and know-how and do not relieve the customer or user from verifying the suitability of information and statements given for a specific purpose prior to use of products.

We reserve the right to change content of this brochure, product specifications and not specified properties of the products without prior notice.

AB Enzymes GmbH
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt
Germany
Tel: +49 (0)6151 3680 100
Email: info@abenzymes.com
www.abenzymes.com

2017-02-13, RevNo. 11



GAMMADEX CAL, Page 2 of 2

Vedlegg 6: AB Enzymes Gammafungase A65L-TDS del 1



GAMMAFUNGASE A65L

Alpha-amylase enzyme for fruit juice production, brewing & distilling

PRODUCT DESCRIPTION

GAMMAFUNGASE A65L is a liquid formulated fungal saccharifying alpha-amylase enzyme for starch degradation. GAMMAFUNGASE A65L hydrolyses gelatinised starch and dextrans to soluble sugars, mainly to maltose. The product is used in fruit juice processing, brewing and distilling. GAMMAFUNGASE A65L is produced by controlled fermentation of a classical strain of *Aspergillus oryzae*.

PRODUCT CHARACTERISTICS

GAMMAFUNGASE A65L has the following characteristics & specifications:

- Liquid formulation.
- Composition: alpha amylase (active enzyme protein: 10-11%), glycerol (25-40%), potassium sorbate (0.5%), water (remainder).
- Brown colour and characteristic odour.
- Activity: Minimum 1300 AZ/g. A method of analysis is available on request.
- IUB: 3.2.1.1
- CAS: 9000-90-2

GAMMAFUNGASE A65L complies with the recommended specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) for food-grade enzyme preparations.

APPLICATION

In **fruit juice** production, GAMMAFUNGASE A65L is used for the cold clarification pome fruit juices for the starch degradation. For the control of the starch degradation, the iodine test is applied. Because of the molecular structure of the enzyme and its low dose rate, the formation of special haze („rod“ formation) is avoided.

In **brewing**, GAMMAFUNGASE A65L is used in the fermentation cellar, when the starch degradation in the brewhouse is insufficient. It hydrolyses starch and dextrans in beer to fermentable sugars, thus avoiding the appearance of starch haze. Due to the starch degradation also the fermentability of the wort is increased and the beer filtration is improved.

In **distilling**, GAMMAFUNGASE A65L decreases the viscosity of cereal mashes and forms dextrans, which are further saccharified by saccharification enzymes. In addition to its liquefying it has also saccharifying action. GAMMAFUNGASE A65L can also be used in addition to other liquefaction enzymes to achieve a fast primary fermentation and a faster fermentation course (2-day fermentation).

DOSAGE

The dosage of the enzyme depends on raw materials used and reaction conditions such as pH, temperature and time. The optimal dose rate should be determined in trials.

pH range: 4.0-6.5
Temperature range: 30-55 °C

GAMMAFUNGASE A65L, Page 1 of 2



Vedlegg 6: AB Enzymes Gammafungase A65L-TDS del 2



GAMMAFUNGASE A65L

Alpha-amylase enzyme for fruit juice production, brewing & distilling

DOSAGE (continued)

For initial trials, typical dosages are:

Fruit juice:	0.40-1.5 ml/hl juice, depending on starch content in the fruit.
Brewing:	0.5-1.5 ml/hl beer (added while filling the fermenter).
Distilling:	75-115 ml/ton starch.

PACKAGING

GAMMAFUNGASE A65L is available in 28 kg PE canisters.

STORAGE & HANDLING

When stored in original packaging, unopened, at dry conditions and at temperatures below 10°C, GAMMAFUNGASE A65L is best used within 36 months from the date of production. Avoid unnecessary contact with enzyme preparations during handling and avoid the formation of aerosol and dust of the product. Repeated inhalation of enzyme aerosol or dust may cause sensitisation and may cause allergic type reactions in sensitised individuals. For detailed information and instructions, please refer to the Safety Data Sheet (SDS).

DISCLAIMER

©AB Enzymes GmbH. Use and/or sale of these products may be covered by one or more patents as well as patent applications in EU, US and other countries. Product registration requirements apply in selected regions and countries; consult with AB Enzymes for latest updates on product registrations and product availability in your country.

We have used diligent efforts to ensure that all information and statements given in this brochure are correct at the time of publication. Despite thereof, neither AB Enzymes GmbH nor ROAL OY nor any of their affiliates can guarantee, represent or warrant that the information and statements are accurate, current and/or complete.

As the user controls the application or specific use of our products as well as the technical conditions therefor, we cannot make any representations or warranties with respect to this specific use or application including, but not limit to, any results obtained in the processing of our products. The customer or user is solely responsible for its specific use or application of our products and that such use or application will comply with applicable laws, regulations and all patent or other intellectual property rights of third parties.

All information and statements are intended for persons having the required skill and know-how and do not relieve the customer or user from verifying the suitability of information and statements given for a specific purpose prior to use of products.

We reserve the right to change content of this brochure, product specifications and not specified properties of the products without prior notice.

AB Enzymes GmbH
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt
Germany
Tel: +49 (0)6151 3680 100
Email: info@abenzymes.com
www.abenzymes.com

2017-07-27, RevNo. 06

GAMMAFUNGASE A65L, Page 2 of 2



Vedlegg 7: AB Enzymes Rohalase SEP-TDS del 1



ROHALASE® SEP

Xylanase and beta-glucanase enzyme for grain processing, brewing & distilling

PRODUCT DESCRIPTION

ROHALASE® SEP is a liquid formulated blend of concentrated fungal xylanase and beta-glucanase enzymes for hydrolysing non-starch polysaccharides. ROHALASE® SEP contains xylanase and beta-glucanase enzyme activities towards arabinoxylan and beta-glucan and is recommended for starch-gluten separation in grain processing. ROHALASE® SEP is also recommended for viscosity reduction in brewing and distilling, increasing brewhouse efficiency and optimizing throughput in the distilling mashing process respectively. ROHALASE® SEP is produced by controlled fermentation of a self-cloned strains of *Trichoderma reesei*.

PRODUCT CHARACTERISTICS

ROHALASE® SEP has the following characteristics & specifications:

- Liquid formulation.
- Composition: water, glycerol, beta-glucanase, xylanase, sodium benzoate.
- Light brown colour with characteristic odour.
- Density: 1.10 g/ml
- Activities: Minimum 225,000 BXU/g and minimum 255,000 BU/g. A method of analysis is available on request.
- IUB: 3.2.1.8 and 3.2.1.4
- CAS: 9025-57-4

ROHALASE® SEP complies with the recommended specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) for food-grade enzyme preparations.

APPLICATION

ROHALASE® SEP is suitable for the degradation of plant materials with higher contents of xylans, beta-glucans and other non-starch polysaccharides. These substrates are found in wheat, barley, malt, wort and in beer, and increase viscosity, can create haze and reduce beer filtration efficiency.

In **grain processing**, ROHALASE® SEP has been specially developed for wet-milled wheat- and corn starch processing. The enzyme hydrolyses predominantly soluble xylans in the starch slurry. Thus the viscosity is decreased and the separation of gluten is improved. The use of ROHALASE® SEP leads to higher yields and improved quality of gluten and A-starch. The enzyme preparation is added at the dough preparation together with the process water. ROHALASE® SEP is free of proteolytic activity.

In **brewing**, the enzyme is applied for optimizing brew house efficiency by providing: complete breakdown of beta-glucans and xylans, reduction of wort viscosity, increased wort separation rate, improved beer filtration efficiency and reduced beer haze. The use of ROHALASE® SEP can accelerate lautering and increase extract yield. ROHALASE® SEP is used to compensate disadvantageous malt quality and to ease the use of other raw materials such as wheat and barley.

In **distilling**, the enzyme is applied for optimizing the mashing process by providing: viscosity reduction in slurry and liquefaction, optimization of flow-rate (pumpability) and separation, reduced water & energy consumption, increased fermentable sugars and alcohol yield, and increased protein content in DDGS.

ROHALASE® SEP, Page 1 of 2



Vedlegg 7: AB Enzymes Rohalase SEP-TDS del 2



ROHALASE® SEP

Xylanase and beta-glucanase enzyme for grain processing, brewing & distilling

DOSAGE

The dosage of the enzyme preparation depends on raw materials used and reaction conditions such as pH, temperature and time. The optimal dose rate should be determined in trials.

pH range: 4.0-7.0
Temperature range: up to 65 °C

For initial trials, typical dosages are:

Grain processing: 50-100 g/ton wheat flour
Brewing & distilling: 25-100 g/ton raw material

PACKAGING

ROHALASE® SEP is available in 25 kg PE cans and 1000 kg IBC's.

STORAGE & HANDLING

When stored in original packaging, unopened, at dry conditions and at temperatures below 10 °C, ROHALASE® SEP is best used within 24 months from the date of production. Avoid unnecessary contact with enzyme preparations during handling and avoid the formation of aerosol and dust of the product. Repeated inhalation of enzyme aerosol or dust may cause sensitisation and may cause allergic type reactions in sensitised individuals. For detailed information and instructions, please refer to the Safety Data Sheet (SDS).

DISCLAIMER

©AB Enzymes GmbH. ROHAMENT® and ROHALASE® are registered trademarks of AB Enzymes GmbH. Use and/or sale of these products may be covered by one or more patents as well as patent applications in EU, US and other countries. Product registration requirements apply in selected regions and countries; consult with AB Enzymes for latest updates on product registrations and product availability in your country.

We have used diligent efforts to ensure that all information and statements given in this brochure are correct at the time of publication. Despite thereof, neither AB Enzymes GmbH nor ROAL OY nor any of their affiliates can guarantee, represent or warrant that the information and statements are accurate, current and/or complete.

As the user controls the application or specific use of our products as well as the technical conditions therefor, we cannot make any representations or warranties with respect to this specific use or application including, but not limit to, any results obtained in the processing of our products. The customer or user is solely responsible for its specific use or application of our products and that such use or application will comply with applicable laws, regulations and all patent or other intellectual property rights of third parties.

All information and statements are intended for persons having the required skill and know-how and do not relieve the customer or user from verifying the suitability of information and statements given for a specific purpose prior to use of products.

We reserve the right to change content of this brochure, product specifications and not specified properties of the products without prior notice.

AB Enzymes GmbH
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt
Germany
Tel: +49 (0)6151 3680 100
Email: info@abenzymes.com
www.abenzymes.com

2015-10-02, RevNo. 09

ROHALASE® SEP, Page 2 of 2





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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway