Enzymatisk hydrolys av glutenprotein

LUNDS UNIVERSITET
Lunds Tekniska Högskola

Institutionen för livsmedelsteknik
Livsmedelsteknisk högskoleutbildning vid Campus Helsingborg

Ida Persson
Examensarbete 2009

© Copyright Ida Persson

Institutionen för livsmedelsteknik
Lunds universitet
Box 882
251 08 Helsingborg

Department of Technology, Engineering and Nutrition
Lund University
Box 882
SE-251 08 Helsingborg
Sweden

Sammanfattning

Enzymatisk hydrolys av glutenproteiner

Lantmännen Reppe utvinner huvudsakligen stärkelse ur vete och får då även gluten som en produkt. I nuläget säljs glutenet främst som degförstärkare till bagerimjöler men ett intresse finns att utforska nya användningsområden för produkten. Att kunna extrudera glutenet är önskvärt och för att det ska vara möjligt måste glutenets nätverk brytas ner. Detta kan göras med en enzymatisk hydrolys.

För att ta reda på hur hydrolyserat glutenet blir vill man veta hydrolysgraden (DH %). I samtliga försök har jag använt mig av pH-stat metoden. Detta är en metod som direkt speglar bildningen av fria aminoändar som ett resultat av hydrolysen och ger på så vis ett direkt mått på hydrolysgraden. Detta sker genom att bas tillsätts under reaktionens gång för att hålla pH konstant på sitt ursprungsvärde

Genom att enzymatiskt hydrolysera glutenet med ett aggressivt enzym speciellt lämpat för spälkning av veteproteiner, Neutrase®, har glutennätverken blivit mer lösliga. Eftersom den önskvärda hydrolysgraden på glutenet inte var känd på förhand har försöken gjorts på lite olika sätt.

Försök 1a, b och c har gått ut på att låta enzym med en koncentration på 0,25 % av proteinmängden verka i bestämda tider dvs. 10, 30 resp. 60 minuter i optimala pH och temperaturer för just det specifika enzymet. Därefter har en inaktivering av enzymerna skett med syrachock och glutenhydrolysaten har slutligen spraytorkats för att vara bättre lämpade för förvaring. Resultaten blev hydrolysgrader mellan 0,22 och 0,46 %.

Försök 2 innebar att glutenet hydrolyserades på samma sätt, fast med dubbel dos Neutrase® med koncentrationen 0,5 % av proteinmängden till en hydrolysgrad (DH) på 2 %. Detta kunde på förhand räknas ut 2 % DH motsvarade 25 ml bas. Försöket tog 85 minuter. Hydrolysen avslutandes med en syrachock för inaktivering av enzymerna, därefter spraytorkades hydrolysatet.

Då en lämplig extruder inte har funnits att tillgå för utvärdering av glutenhydrolysatens lämplighet för extrudering, har jag jämfört hydrolysatens konsistens med vetemjöl. Vetemjöl går nämligen utmärkt att extrudera. Genom att blanda de olika preparaten med vatten och jämföra i en Bostwick – konsistometer kom jag fram till att glutenhydrolysatet med 2 % DH var i princip direkt jämförbart med vetemjölets konsistens och bör således fungera att extrudera.

Nyckelord: Gluten, gliadin, glutenin, enzymatisk hydrolys, hydrolysgrad.

Abstract

Enzymatic hydrolysis of wheat gluten proteins

Reppe, a starch factory within the concern of Lantmännen is mainly producing starch from wheat but also gets gluten as a product in the process. Currently, the wheat gluten is primarily used to improve the properties of flour for bread-making and as an additive in the baking industry. But there is an interest to explore new uses of the product. To make this possible, the solubility of gluten has to be improved. This can be done by an enzymatic hydrolysis.

To find out the hydrolytic efficiency of the protease the degree of hydrolysis (DH%) is essential to know. I've been using the pH-stat method throughout the experiment. This is a method that directly reflects the formation of free amino terminals as a result of hydrolysis and is thus a direct measure of hydrolysis. This is done by constant adding base during the reaction time to keep the pH constant at its original value.

By enzymatically hydrolyzing the gluten with an aggressive protease that is especially suitable for breaking down wheat proteins, called Neutrase®, I have managed to get the gluten network more soluble. Since we did not know which DH % of gluten that was desirable, different types of tests has been made.

The experiment 1a, b and c was made in order to let the enzyme (concentration = 0.25 % of the protein) work for 10, 30 respectively 60 minutes, in optimal pH and temperature for the specific enzyme. The results were hydrolysis between 0.22 and 0.46 %.

During the second experiment the gluten was hydrolyzed in the same way as in the first experiment, but with double dose Neutrase ® with a concentration 0.5 % of the amount of protein to a DH of 2%. A DH of 2 % was pre-calculated to correspond to 25 ml of base. The experiment took 85 minutes. A following inactivation of the enzymes was made with acid shock. Finally the gluten hydrolysates were spraydried.

Since a suitable extruder hasn't been available for evaluation of the gluten hydrolysates suitability for extrusion, I have compared the texture of the hydrolysates with wheat flour. Wheat flour is suitable for extrusion. By mixing the different samples with water and using a Bostwick – konsistometer I discovered that gluten with 2 % DH was directly comparable to the texture of wheat flour and should therefore suit well for extrusion.

Keywords: Wheat gluten, gliadin, glutenin, enzymatic hydrolysis, enzym, degree of hydrolysis.

Förord

Jag studerar på Livsmedelsteknisk högskoleutbildning som tillhör LTH och är förlagd till Campus Helsingborg, Lunds universitet. Utbildningen omfattar två års heltidsstudier, dvs. 120 högskolepoäng.

I utbildningen ingår ett examensarbete som omfattar 15 högskolepoäng. Mina 10 veckor av examensarbete är nu till ända och tiden har gått fort. Under denna period har jag hunnit vara stationerad både på stärkelsefabriken i Reppe och på kontoret i Malmö och fått ett enormt fint bemötande av alla jag träffat. Jag vill dock rikta speciella tack till vissa personer som hjälpt mig lite extra.

Tack till Susanne Österberg för utmärkt handledning, Agne Bergqvist för sin expertis och Göran Wikström för sin hjälp i labbet på Lantmännen Food R&D.
Tack till handledare, Bo Furugren, för att tålmodigt läst och bistått med förnuftiga åsikter genom arbetets framskridande.

Vidare vill jag tacka Mattias Gustafsson, Linda Philipsson och Inga-Maj Johansson för fint bemötande och för all hjälp jag fått under min vistelse i Reppe. Inte att förglömma Inge Hultkvist som varit en stor hjälp i flera situationer, men framför allt varit en räddare i nöden när spraytorken och jag inte talat samma språk. Jag vill även tacka alla grabbarna i fabriken som fått hjälpa mig med rörskruvningar, elektriska fel på maskinerna och andra manliga saker som jag saknat handlag att utföra. Tack!

Jag är tacksam och glad att Lantmännen har gett mig tillfället att avsluta min utbildning med att få göra ett väldigt intressant examensarbete och hoppas att arbetet ger dem en liten hjälp i framtiden med deras förestående extruderingsprojekt.

Helsingborg maj 2009
Ida Persson

Innehållsförteckning

1 Inledning 1

2 Syfte 2

3 Teori 2
3.1 Protein 2
3.2 Vad är gluten? 2
3.3 pH-effekter på protein 3
3.3.1 Isoelektriska punkten 3
3.3.2 Isoelektriska punkten för gluten ..... Error! Bookmark not defined.
3.4 Vad innebär hydrolys? 4
3.5 Enzymer 4
3.6 Hydrolysgrad 5
3.7 Spraytorkning 5

4 Material 7

5 Metod 8
5.1 Beskrivning 8
5.2 Förberedande uträkningar 8
5.3 Försök 1. 9
5.3.1 Uträkning av DH % ..... Error! Bookmark not defined.
5.3.2 Spraytorkning 9
5.4 Försök 2. 10
5.4.1 Uträkning av DH % 10
5.4.2 Spraytorkning 10
5.5 Flyttals - analys ..... Error! Bookmark not defined.

6 Resultat 11
6.1 Försök 2. 11
6.1.1 1A) Hydrolys i 10 minuter 11
6.1.2 1B) Hydrolys i 30 minuter 12
6.1.3 1C) Hydrolys i 60 minuter 12
6.2 Försök 2. 13
6.3 Sammanställning av resultat 14
6.4 Flyttals - analys ..... Error! Bookmark not defined.

7 Resultatdiskussion.....15
7.1 Förberedandet ..... Error! Bookmark not defined.
7.2 Konsistensförändringen på de olika hydrolysaten 15
7.3 Tillgänglighet för enzymerna 15
7.4 Inaktivering av enzymer 16
7.5 pH-stat metoden 16
7.6 Spraytorkningen 16
7.7 Utvärderingen 17
7.8 Fler fördelar med nedbrutet protein - celiakivänligt..... 17

8 Slutsats 17

9 Källförteckning.....19
9.1 Litteratur 19
9.2 Internet..... 20
*9.2.1.1 <underkapitel rubrik 4> .....**Error! Bookmark not defined.***

1 Inledning

Reppe AB är en stärkelsefabrik inom Lantmännenkoncernen som bildades 1876. Bolaget utvinner och förädlar vete till basprodukter främst inom livsmedelsindustrin. Produkter som tillverkas är t.ex. glukossirap för tillverkning av godis och glass, men också glutenmjöl för att stärka bagerimjöl. Företaget driver dessutom ett av Nordens största destillerier för framställning av finsprit. Företaget har idag två produktionsanläggningar, en i Nyköping och en i Växjö.

När man utvinner stärkelse ur vete får man även gluten som produkt. I ett expansivt skede för företagets fabrik i Nyköping utforskar man därför fler användningsområden för att bättre kunna nyttja även denna produkt. Företaget tittar bland annat på möjligheterna att kunna använda glutenet som proteintillskott i olika sammanhang och behöver därför kunna göra materialet extruderbart. Slutprodukten är tänkt att helt eller delvis kunna fungera som ett substitut för kött till vegetarianer eller för människor som söker fettsnålare alternativ till kött i matlagningen [7], [8].

Gluten bildas av proteinfraktionerna glutenin och gliadin. Dessa proteiner i vete har förmågan att bilda ett elastiskt nätverk, något som är fördelaktigt vid brödbak då det är den starkt bidragande orsaken till att luft kan arbetas in och att brödet kan få volym. Gluten i sitt nativa tillstånd är dock omöjligt att extrudera i Lantmännens befintliga extruder, eftersom det skulle fastna likt ett tuggummi på insidan. Av den anledningen är det av intresse att glutenets nätverksbildande egenskaper försämras och detta kan man göra genom att hydrolysera proteinerna som glutenet består av med olika typer av enzymer till en önskad nedbrytningsgrad har uppnåtts. En hydrolys har många olika parametrar man kan variera, beroende på enzymet man använder och resultatet man vill komma fram till. Temperatur, pH, tid och inaktivering är några av sakerna man ska optimera för att få ett så lyckat resultat som möjligt. Dels för att förhindra att proteinerna i glutenet förstörs, men även för att hitta de optimala intervallerna där enzymerna har som störst och effektivast verkan i sitt jobb att bryta ner proteinkedjorna.

Arbetet kommer inte att inrikta sig närmre på smaken på slutprodukten annat än att vi vet att en bitter smak kan uppstå vid förekomst av för många små peptidkedjor och fria aminosyror i slutprodukten [10], [11]. Av den anledningen kommer hydrolyserna uteslutande att utföras med endopeptidaser, alltså enzymer som enbart bryter av proteinet på bestämda platser inne i dess kedjor. Resultatet blir då många halvlånga peptidkedjor istället för flera små peptider och fria aminosyror. Hydrolysförsöken kommer att utföras med enzymet Neutrase®, i två olika styrkor 0,8 L samt 1,5 mg. Detta är ett enzym som är speciellt utvecklat för att försvaga nativa veteproteiner såsom gluten.

Att testköra de slutliga glutenhydrolysaten i extruder kommer inte att ingå i mina arbetsuppgifter då en lämplig extruder inte finns att tillgå. I en flyttalsanalys kommer glutenhydrolysaten att jämföras med konsistensen av en vetemjölssuspension. Vetemjöl är nämligen extruderbart.

2 Syfte

Syftet med uppgiften är att enzymatiskt hydrolysera våtgluten till den grad där glutenet är så pass nedbrutet att det kan likna konsistensen av en vetemjölssuspension. Målet är att få fram ett glutenhydrolysat som ska kunna bedömas lämpligt för extrudering.

3 Teori

3.1 Protein

Proteiner består av många sammanlänkade aminosyror. Aminosyror är karboxylsyror innehållande minst en aminogrupp samt en R-grupp som ger aminosyran dess identitet. Aminosyror kopplas samman och bildar polypeptider. Ändarna på peptider kallas N-terminal (amin) och C-terminal (karboxylatgrupp). Ett protein består av en eller flera sådana polypeptidkedjor. För varje protein är sammansättningen av aminosyror och ordningsföljden av dessa unik.

Proteiner delas in i fiberproteiner och globulära proteiner. Fiberproteinerna har en trådig form och de globulära proteinerna är enkelt sagt lika långa som de är tjocka. Glutenproteiner är vetets förrådsproteiner och är av globulär struktur [2].

3.2 Vad är gluten?

Alla våra sädeslag innehåller olika sammansättningar av proteiner. Redan 1907 delade T.B. Osborne in proteinerna efter deras olika löslighet [1]. Vattenlösliga proteiner kallas albuminer och saltlösliga proteiner kallas globuliner, tillsammans utgör dessa den hydrofila proteindelen i cerealier. Prolaminer är lösliga i etanol och gluteliner är endast lösliga i syra eller alkali. Dessa två grupper utgör tillsammans den hydrofoba delen av sädeslagens proteiner. Prolaminerna och glutelinerna utgör sädesslagets kväveförråd under tiden som grodden växer och fotosyntesen ännu inte är fullt utvecklad [2], [8].

Vetekornets proteinsammansättning skiljer sig från de övriga sädeslagen då den har förmågan att bilda gluten. Det är förrådsproteinerna, alltså prolaminerna som hos vete heter gliadiner och glutelinerna som i vetet kallas gluteniner som på olika sätt har förmågan att bilda nätverk med varandra i kontakt med vätska och bearbetning. Vad som sker är att det uppstår svavelbryggor mellan de två proteindelarna när degen bearbetas och ett elastiskt nätverk – gluten, bildas.

Gliadinet bidrar med viskositeten och gluteninet bidrar med elasticiteten och vardera utgör 50 % av glutenproteinerna. Molekylvikten för gliadiner är ca 30.000 – 100.000 u, och för gluteniner från ca 100.000 – 3 miljoner u.

En gemensam likhet mellan de två proteinerna är att de har stort innehåll av aminosyran glutamin. Den avgörande skillnaden mellan gliadiner och gluteniner är deras positioner för aminosyran cysteins SH-grupper. Genom att gliadinerna bildar intramolekylära disulfidbryggor samtidigt som disulfidbryggorna bildas intermolekylärt i gluteninerna

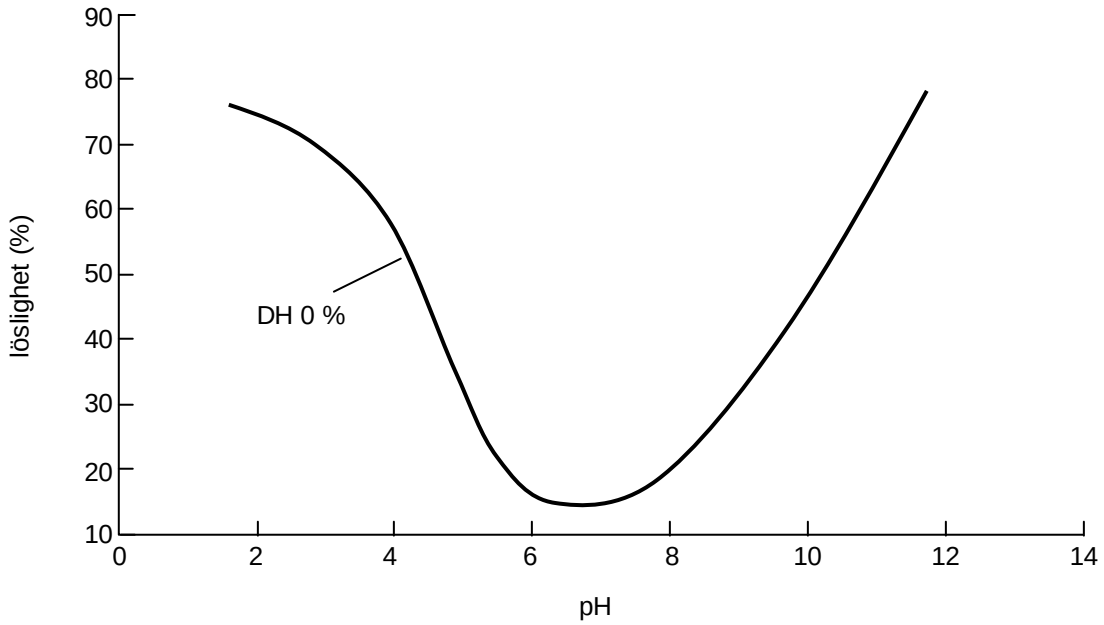
kan ett glutennätverk uppstå med förmågan att hålla kvar koldioxid som jästen bildar vid brödbakning. På så vis kan man skapa volym i ett bröd. Förutom disulfidbryggor och vätebindningar verkar även hydrofob växelverkan mellan peptidkedjorna spela stor roll för att en förening mellan de två proteinkedjorna ska vara möjlig [1], [3].

3.3 pH-effekter på protein

3.3.1 Isoelektriska punkten

Beroende på hur ett protein är uppbyggt innehåller det olika antal positivt och negativt laddade R-grupper. Summan av dessa ger proteinets nettoladdning. Vid lågt pH är proteinets nettoladdning positiv eftersom de sura grupperna tagit upp protoner och blivit oladdade och de basiska grupperna är positivt laddade. Omvänt är proteinets nettoladdning negativ i höga pH-värden. Då har de sura R-grupperna avgivit sin proton och blivit negativt laddade, samtidigt som de basiska R-grupperna även de avgivit sin proton och blivit oladdade. Mellan de höga och låga pH-värdena finns en punkt där proteinets nettoladdning är noll. Det intervallet kallas den isoelektriska punkten och innebär att proteinets antal negativa och positiva laddningar är lika. Vid sin isoelektriska punkt har proteinet som sämst möjlighet att lösa sig [2].

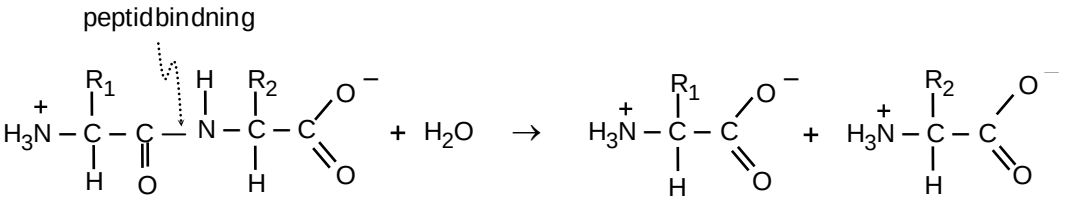
Den isoelektriska punkten för gluteniner är 6,5 – 8,1 och för gliadiner mellan 4,2 – 6,5. Gluten består av ungefär lika delar gluteniner och gliadiner [2]. Men då gluteninerna är väsentligt mycket större i molekylstorleken kan man anta att dessa påverkar den isoelektriska punkten mer än gliadinerna. Som man kan se i figuren nedan befinner sig den isoelektriska punkten för gluten någonstans i pH-intervallet 5,5 – 8 [5].



Figur 1.
Effekt av pH på lösligheten hos icke-hydrolyserat gluten [9].

3.4 Vad innebär hydrolys?

En kemisk reaktion som innebär att man spjälkar en molekyl med hjälp av vatten. Det kan schematiskt se ut enligt nedan [2]:



Som man kan se på reaktionen ovan bildas en ny karboxylat- resp. aminogrupp vid varje peptidbindningshydrolys. Reaktionen kan katalyseras av syra eller enzym.

3.5 Enzymer

Enzymer är proteiner med katalyserande effekt. Detta innebär att de kan påskynda kemiska reaktioner utan att själva förbrukas. Detta sker genom att proteinerna har ett aktiv centrum där olika substrat passar perfekt i och binds till. När reaktionen har skett mellan substratet och enzymet lossnar reaktionsprodukterna från det aktiva centrumet och enzymet är fritt att reagera med ett nytt substrat. Enzymer som katalyserar hydrolys av protein och peptider kallas proteaser eller peptidaser [2].

Vid användning av enzymer vid pH och temperatur lämpligt för det utvalda preparatet, kommer en eller flera peptidbindningar som binder aminosyrorna samman att brytas. Beroende på var man vill att proteinet ska brytas använder man sig av antingen exoproteaser eller endoproteaser. Exoproteaser hydrolyserar aminosyror från ändarna av kedjan och resultatet blir många små enskilda aminosyror. Endoproteaser bryter peptidbindningar inne i kedjorna och bildar flera större peptider med något högre molekylvikt. Inga eller få fria aminosyror släpps fria. Ju längre reaktionen får ske med enzymerna desto fler och mindre fragment av proteinet bildas.

Att hydrolysera protein i livsmedel med enzym istället för med kemiska metoder innebär fördelar för livsmedlets egenskaper gällande funktion och näring. Enzymatisk behandling innebär en högre specificitet var i proteinet det bryter och vilka peptider man får fram. Så specifikt kan man inte hydrolysera med syror. Reaktionerna sker snabbt och under milda omständigheter [2].

För att avstanna enzymernas verkan kan man göra på olika sätt beroende på vilken typ av enzym man använder och beroende på hur känsligt substrat man arbetar med. Upphettning till temperaturer över den optimala verkningstemperaturen, syrachock eller genom tillsättning av salt denaturerar enzymerna så att de slutar fungera [15].

3.6 Hydrolysgrad

För att ta reda på hur nedbrutet ett protein är vill man veta hydrolysgraden (DH %). Innan man påbörjar en enzymatisk hydrolys av proteiner består en polypeptidkedja av endast en N-terminal aminosyra och en C-terminal aminosyra. Då säger man att hydrolysgraden är 0 %. Om proteinets samtliga peptidbindningar bryts upp och hela kedjan är uppdelad i enskilda aminosyror säger man att hydrolysgraden är 100 %. Det finns ett flertal olika metoder för att ta reda på hydrolysgraden, beroende på om man vill veta före, efter eller under en hydrolysreaktion. pH-stat är en av metoderna som står i direkt relation till peptiddelningen under hydrolysen och kan på så vis ge ett exakt mått på hydrolysgraden under hela reaktionens gång [6].

3.6.1 pH-stat metoden

Eftersom det finns ett intresse av att veta hur hydrolysgraden fortskrider under hydrolysens gång har jag valt att använda mig av pH-stat metoden för att ta reda på DH %. pH-stat metoden innebär att man håller pH konstant under reaktionen genom titrering med en bas (NaOH). För varje peptidbindning som bryts av enzymerna blir lösningen surare. Genom att kontrollera åtgången av basen kan man ha kontroll på hur hydrolyserad lösningen är fortlöpande under reaktionen.

Hydrolysgraden definieras som kvoten mellan antal hydrolyserade bindningar (h) och totala antalet bindningar (h_{tot}) multiplicerat med 100. Denna kan räknas ut med hjälp av följande formel [9]:

$$\text{DH (\%)} = \frac{h \times 100}{h_{tot}} = \frac{B \times N_b \times 100}{\alpha \times M_p \times h_{tot}}$$

där B är baåtgången i ml och N_b är basens molaritet; α är den genomsnittliga dissociationsgraden av α-NH_2 (i detta fall = 1); M_p är proteinets massa i gram; h är uttryckt i meqv/g protein och h_{tot} är det totala antalet peptidbindningar i det tillsatta proteinsubstratet (8,38 meqv/g glutenprotein) [9].

3.7 Spraytorkning

Ett skonsamt sätt att torka känsliga produkter som proteiner är spraytorkning. Spraytorken består av ett högt cylindriskt torn där vätskan matas in i toppen. Vätskan finfördelas till mycket små droppar med hjälp av en centrifugalspridare så att kontaktytan med den heta luften bli stor, ca 20 – 100 m^2/liter vätska. De finfördelade dropparna befinner sig i varmluften en kort tid, mellan 5- 15 sekunder [12]. Eftersom hålen i spridaren är riktade uppåt får vätskan en maximal transportsträcka genom torkkammaren på sin väg vertikalt neråt. Proteinpartiklarna landar i torkad form i cylinderns nedre koniska del och transporteras med hjälp av luften i kammaren till separatorcyklonen. I denna sker det andra torkningsperioden. Pulvret skiljs från den varma luften och landar i en behållare medan den varma luften lämnar systemet genom ett rör i separatorns topp.

Temperaturen på luften varierar beroende på vad som ska torkas. Den ingående temperaturen brukar ligga mellan 150 och 500 grader. Under denna första torkningsperiod kan luften vara mycket varm utan att det skadar produkten. Vattenavdunstningen från en fuktig produkt blir densamma som avdunstningen från en fri vätskeyta. Detta innebär att dess temperatur aldrig kommer att överstiga luftens våta temperatur, oavsett hur varm luften är. När vattenhalten minskar i produkten ökar motståndet mot en fortsatt fukttransport. För att inte proteinet ska förstöras eller att en maillardeffekt ska ske bör den andra delen av torkningsperioden ske under lägre temperaturer, vanligtvis mellan 75 och 150 grader [13].

Figur 2. Spraytorken som använts i försöken.

3.8 Flyttalsanalys enligt Bostwickmetoden

Figur 3. Bostwick – konsistometer [17].

För att ta reda på viskositeten hos glutenhydrolysaten har jag använt mig av Bostwickmetoden. Den går ut på att man använder ett instrument som i figur 3 som gör det möjligt att mäta hur långt en flytande, viskös smet hinner rinna ut i en graderad ränna under en viss tid. Först ser man till att maskinen inte lutar genom justering av två avvägningsfötter så att vattenpasset till höger om provrännan ligger precis i mitten. Man fyller provkammaren med smet (max 75ml) och släpper sedan upp den fjäderspända klaffen som skapar ett jämt flöde av smeten [18].

4 Material

Gluten
Färskt våtgluten erhölls dagligen från Lantmännen Reppes fabrik i Lidköping.
pH varierade mellan 4,8 och 5,7 på leveranserna.

Enzymer
Neutrase® 0,8 L. 0,8 AU-NH/g. Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danmark.
Neutrase® 1,5 mg. 1,5 AU-NH/g. Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danmark.

Kemikalier
1 M och 4 M NaOH samt 1 M HCl

Värmebad
Julabo, SW-20C/2; kW 1,7; No 512 8926163; Julabo Labortechnik, GmbH.

pH-meter
PHM82 Standard pH-meter, Radiometer, Köpenhamn, Danmark.

Titreringsmaskin
T80/20, Schott Geräte, Hofheim, Tyskland.

Spraytork
LAB.S1; w.o. 74198; Anhydro, Köpenhamn, Danmark.

Konsistometer
Bostwick Konsistometer, CSC. Scientific. 1 - 800 - 458 – 2558, Gerber Instruments, Effretikon, Schweiz.

5 Metod

5.1 Beskrivning

Försöken kommer att gå ut på att hitta en lagom hydrolysgrad av våtgluten genom användning av enzym i olika koncentrationer, verkningstider och pH. Enzymet som kommer användas är Neutrase® 0,8 L och Neutrase® 1,5 mg – ett aggressivt endoproteas, speciellt framtaget för att försvaga egenskaper hos gluten i vete. Det har en optimumtemperatur mellan 45 och 50 grader och optimum pH 5 – 9, enligt leverantören. Det enda som skiljer de två preparaten åt är deras koncentration och att den svagare varianten kommer i form av vätska och den starkare levereras som pulver. Första försöket kommer att visa oss hur hydrolyserat glutenet hinner bli under 10, 30 resp. 60 minuters reaktionstid med enzymkoncentrationen 0,25 % av proteinets vikt i pH 5,6. Andra försöket kommer att visa oss hur lång tid det tar att hydrolysera gluten till 2 % DH i pH 7,1. Under detta försök kommer dubbel mängd enzym med en enzymkoncentration på 0,5 % av proteinets vikt att användas. Hydrolysaten kommer slutligen att spraytorkas för att kunna förvaras.

Som utvärdering kommer en flyttalsmätning att göras på hydrolysaten för att mäta konsistensen på de olika glutenmjölerna. Dessa kommer att jämföras med flyttalet för en vetemjölssuspension som fungerar som en referens då vetemjöl går bra att extrudera.

5.2 Förberedande uträkningar

Torrsubstansen (ts) i våtglutenet är ca 28 % [9]. Detta har dubbelkollats genom att torka våtgluten i ugn över natten. Resultatet blev mellan 27 och 31 % ts i våtglutenet. Ts har bestämts till 28 % för beredning av försöken. Av ts i våtgluten är 85 % protein och 10 % lipider. Resten är stärkelse och fiber som blivit kvar efter separationen av glutenet från stärkelsen [5].

Vi bestämmer oss för att arbeta med en proteinmängd på ca 150 g.
150 g protein motsvarar 150/(0,85 × 0,28) = 630 g våtgluten.

Vi valde att tillsätta 146,2 g vatten av två anledningar.

1. Vi fick möjlighet att blanda ut enzymerna i vatten innan tillsättning, detta gjorde det möjligt att få en större fördelning av dessa i lösningen för en snabbare verkan.
2. Vi fick en spädning av glutenproteinerna till 20 % w/w. Detta var också en åtgärd för att göra det mer lättåtkomligt för enzymerna.

Vatten I våtgluten: 630 g × 0,72 = 453,6 g
Totalvikt: 150 g + 453,6 g + 146,2 g = 750 g
Proteinhalt i blandningen: 150 g / 750 g = 0,2 = 20 %

Enzymkoncentrationen ska enligt leverantörens rekommendationer vara 0,25 % av proteinvikten. 150 × 0,0025 = 0,375 g.

5.3 Försök 1.

Enzymatisk hydrolys av gluten med Neutrase® 0,8 L

A. = 10 minuters reaktionstid
B. = 30 minuters reaktionstid
C. = 60 minuters reaktionstid

630 g våtgluten mäts upp i 2000 ml bägare. Detta värms till 50 grader i 60 gradigt vattenbad, som jag sänker till 52 grader när glutenet börjar närma sig rätt temperatur.

146,2 g vatten blandas med 0,375 g enzym (150 g protein × 0,0025 = 0,375 g). Detta värms till 50 grader innan det tillsätts glutenet för att inte kyla blandningen. Vattnet tillsätts för att få en proteinkoncentration på 20 % i lösningen. Enzymkoncentrationen är 0,25 % av proteinvikten.

Vid stabila 50 grader justeras pH från 4,7 till 5,6 med 1 M NaOH.

Reaktion får ske i 10, 30 resp. 60 minuter under manuell titrering av 1 M NaOH för att behålla pH konstant på 5,6. Under de första 5 minuterna klipps glutenet med sax för att underlätta för enzymerna att komma åt glutenets nätverk. En konstant omrörning sker under reaktionstiden med plastslev.

Enzymerna inaktiveras genom att 1 M HCl tillsätts för att sänka pH till 3,5. Omrörning sker under 25 minuter.

pH höjs till 4,2 med 1 M NaOH. Att pH inte höjs högre är för att glutenet då börjar koagulera och omöjliggör en efterföljande spraytorkning. Lösningen späds med dubbel mängd vatten för att underlätta spraytorkningen.

1A. Åtgång 1 M NaOH under reaktionen = 2,72 ml

1B. Åtgång 1 M NaOH under reaktionen = 4,90 ml

1C. Åtgång 1 M NaOH under reaktionen = 5,78 ml

5.3.1 Spraytorkning

Spraytorkning utfördes i 72 – 75 grader utgående temperatur, och i 200 – 210 grader ingående temperatur. Spridaren var inställd på 220 varv.

5.4 Försök 2.

Enzymatisk hydrolys med Neutrase® 1,5 mg till 2 % DH i pH 7,1.

630 g våtgluten vägs upp i 2000 ml bägare. Detta värms till 50 grader i 60 gradigt vattenbad, som jag sänker till 52 grader när glutenet börjar närma sig rätt temperatur.

146,2 g vatten + 0,75 g enzym mäts upp och blandas. (150 g protein × 0,005 = 0,75 g). Vattnet tillsätts för att få en proteinkoncentration på 20 % i lösningen. Enzymkoncentrationen är 0,5 % av proteinvikten.

När temperaturen i glutenet är 50 grader höjs pH från 4,4 till 7,1 genom tillsättning av 12,26 ml 4 M NaOH.

pH får stabilisera sig på 7,1 i hela glutenet innan enzym och vatten tillsätts. Enzym och vatten tillsätts under konstant omrörning. De första 5 minuterna klipps glutenet med sax för att enzymerna lättare ska kunna komma till.

pH hålls konstant 7,1 genom titrering av 1 M NaOH. Vart 5:e minut noteras åtgången för att senare kunna göra en kurva.

Titrering sker manuellt tills 25 ml 1M NaOH har åtgått. (Då är hydrolysgraden den önskade enligt uträkningen nedan.) Detta tog 85 minuter.

118 ml 1 M HCl tillsätts för att sänka pH till 3,5. (Inaktivering av enzym). Detta fick verka i 25 minuter under omrörning.

pH höjs från 3,5 till 4,2 med 36,47 ml 1 M NaOH.

Blandningen kyls genom att dubbel mängd vatten hälls i för spädning till spraytork. (Detta moment behövs egentligen inte då lösningen blivit så lättflytande).

5.4.1 Uträkning av DH %

För att få en slutlig hydrolysgrad på 2 % i glutenet räknades mängden bas (1 M NaOH) som skulle behöva tillsättas ut genom uträkningen nedan:

$$B = \frac{\text{DH (\%)} \times \alpha \times M_p \times h_{tot}}{N_b \times 100}$$

$$B = \frac{2 \times 1 \times 149{,}9 \times 8{,}38}{1 \times 100} = 25$$

2 % DH på 149,9 g protein motsvarar 25 ml 1 M NaOH.

5.4.2 Spraytorkning

Spraytorkning utfördes i ingående temperatur 190 – 210 grader och utgående temperatur 72 – 80 grader. Spridaren var inställd på 220 varv.

5.5 Flyttalsanalys

Flyttalsanalyser gjordes på proverna 1a, 1b, 1c, 2 samt en vetemjölssuspension. På varje mjöl gjordes 3 försök. Mjölerna lämnas in för vattenhaltsbestämning i Lantmännens laboratorium.

32 g pulver och 48 g vatten mäts upp var för sig. Det ger en smet med ts på ca 40 %.

Samtidigt som vattnet tillsätts mjölet sätts en klocka inställd på 5 minuter igång. Smeten rörs först om med sked. Därefter vispas smeten med elvisp på full effekt i 20 sekunder.

50 g smet vägs upp i konsistometern.

När 4 minuter har gått släpps spärren upp och smeten får flyta ut i 10 sekunder.

Efter 10 sekunder läser jag av på skalan hur långt smeten har hunnit. Ju längre smeten har hunnit rinna i konsistometern desto mer lättflytande och mindre viskös är den.

6 Resultat

6.1 Försök 1.

Enzymatisk hydrolys av gluten med Neutrase® 0,8 L

6.1.1 1A) Hydrolys i 10 minuter

Hydrolysen gjorde att glutenet gick från väldigt elastisk konsistens till upplöst, inte fullständigt men absolut märkbart. Glutenet blev lite geligt, halvt sammanhängande men mycket löst. Det tog för lång tid att komma ner i pH (11 minuter). Under denna extra tid hinner enzymerna hydrolysera vidare. Dock under sämre och sämre förhållande.

En relativt stor mängd HCl fick tillsättas för att lyckas sänka pH. Under tiden glutenblandningen hade pH 3,5 hade den konsistensen av välling, lite tjockare men lättflytande.

När pH höjdes aggregerade glutenblandningen och vit vätska trängde fram. pH i blandningen skulle egentligen höjts till 4,5 men stoppades på 4,3 för att kunna lyckas med senare spädning av vatten. Blandningen gick bra att spraytorka. Pulvret blev inte elektrostatiskt.

<u>Uträkning av DH %</u>

$$\frac{2{,}72 \times 1 \times 100}{1 \times 149{,}9 \times 8{,}38} = \mathbf{0{,}22\ \%}$$

Vattenhalt i pulvret efter spraytorkningen: 5 %

6.1.2 1B) Hydrolys i 30 minuter

Glutenblandningen höll en aning för hög temperatur under reaktionen, ca 55 – 57 grader.

Blandningen går från seg konsistens till att efter 30 minuter se ganska grynig ut, ungefär som denaturering till mindre partiklar. Blandningen blev mer upplöst än hydrolysen med reaktionstiden 10 minuter.

Vid sänkning till pH 3,5 ser blandningen helt löst ut och fick konsistens av jämn välling. Inga partiklar syns. Vid uppgång till pH 4,2 blir blandningen något grynig igen. Blandningen späds med vatten och skiktar sig när den får stå utan omrörning.

Uträkning av DH %

$$\frac{4{,}90 \times 1 \times 100}{1 \times 149{,}9 \times 8{,}38} = \mathbf{0{,}39\ \%}$$

Vattenhalt i pulvret efter spraytorkningen: 4,5 %

6.1.3 1C) Hydrolys i 60 minuter

Man kan se en tydlig hydrolys de första 30 minuterna. Dock sker inte mycket på pH skalan. Glutenblandningen går från konsistens av tuggummi till välling med öar i, till finfördelade mindre partiklar och slutligen till väldigt små partiklar.

När pH sänks till 3,5 blir blandningen till synes helt homogen, man kan inte urskilja några små partiklar. Vid höjningen av pH börjar blandningen precis runt 4,2 att flocka sig men i mindre aggregat än hydrolysen i 30 minuter.

Det går bra att blanda upp med dubbel mängd vatten för spraytorkning men skiktar sig om den får stå utan omrörning. Partiklarna faller till botten och vätska samlas ovanpå.

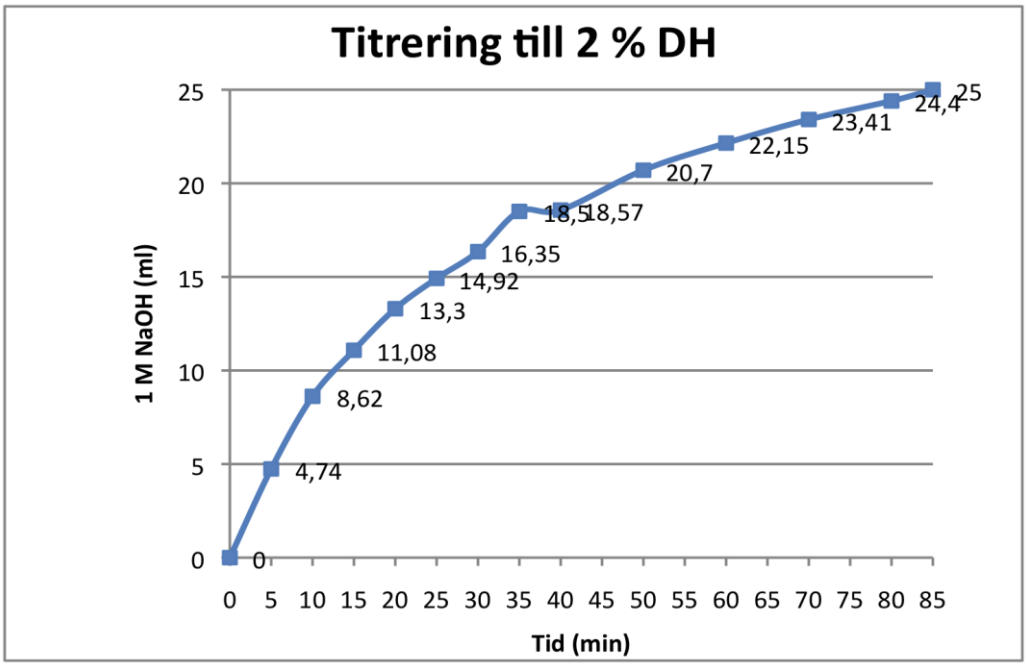
Uträkning av DH %

$$\frac{5{,}78 \times 1 \times 100}{1 \times 149{,}9 \times 8{,}38} = \mathbf{0{,}46\ \%}$$

Vattenhalt i pulvret efter spraytorkningen: 4,2 %

6.2 Försök 2.

Enzymatisk hydrolys av gluten med Neutrase® 1,5 mg till 2 % DH.



Figur 4.
Kurvan visar åtgång bas under tiden glutenet hydrolyseras av enzymer för att hålla pH konstant. Detta görs tills 25 ml har åtgått. Kurvan visar att den enzymatiska aktiviteten är något högre under hydrolysens första del.

När reaktionen får ske vid pH 7 sker en tydligare vandring av pH de första 15 minuterna, något som man kan se i figuren ovan. Kanske beror detta även på den ökade mängden enzym (0,5 % av proteinvikten). Glutenet går snabbt från halvfast och elastisk konsistens mot lösare form och efter 25 minuter är konsistensen som välling – man kan ej se några partiklar i lösningen och då har 14,92 ml 1 M NaOH tillsatts.

25 ml 1 M NaOH tog 85 minuter att titrera för att få 2 % DH. Det slutliga resultatet blev en mycket upplöst vätska som inte gick tillbaka till en flockig konsistens vid pH uppgången till 4,2 efter inaktiveringen. Blandningen späds lätt med dubbel mängd vatten men skiktar sig efter en stund om man inte rör om.

DH % = 2 %

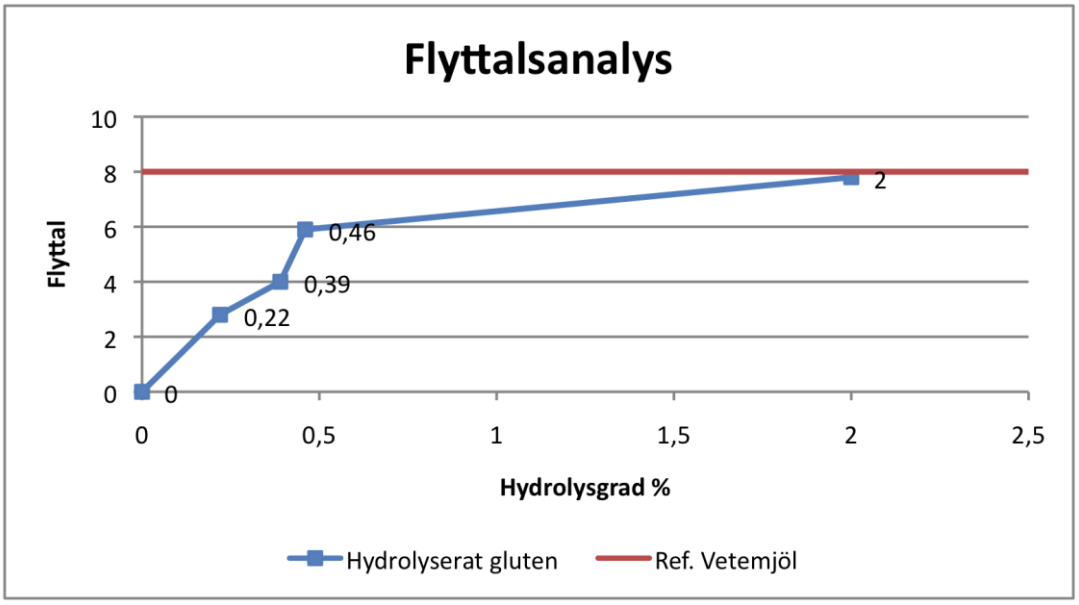
Vattenhalt på pulvret efter spraytorkningen: 3 %

6.3 Sammanställning av resultat

Prov	Enzym	Konc. (%)	Tid (min)	DH (%)	pH i lösning	Vatten-halt (%)	Utseende
1a.	Neutrase 0,8 L	0,03	10	0,22	5,6	5,0	Grynig
1b.	Neutrase 0,8 L	0,03	30	0,39	5,6	4,5	Mindre grynig
1c.	Neutrase 0,8 L	0,03	60	0,46	5,6	4,2	Små partiklar
2.	Neutrase 1,5 mg	0,05	85	2,0	7,1	3,0	Slät välling

6.4 Flyttalsanalys

	Test	Sträcka	Medel
Försök 1a.	1	2,8	2,8
	2	2,8	
	3	2,8	
Försök 1b.	1	4,2	4,0
	2	4,0	
	3	4,0	
Försök 1c.	1	5,9	5,9
	2	5,9	
	3	5,9	
Försök 2.	1	7,6	7,8
	2	7,8	
	3	7,8	
Vetemjöl.	1	8	8
	2	8	
	3	8	



Figur 5.
Man kan se att ju mer hydrolyserat glutenet är desto högre flyttal får det. Gluten som har hydrolyserats till 2 % DH har nästan samma flyttal som vetemjölet.

Ett försök att flyttalsanalysera intakt gluten gjordes. Torrgluten blandades till 40 % ts och resultatet blev en elastisk gummiboll med obefintlig flytningsförmåga. Ohydrolyserat gluten fick alltså ett flyttal = 0.

7 Resultatdiskussion

7.1 Konsistensförändringen på de olika hydrolysaten

En tydlig skillnad i nedbrutenhet av glutenet har kunnat påvisas beroende på de olika tiderna enzymerna har fått vara verksamma. Hydrolysaten går från gryning konsistens till mycket små partiklar beroende på om de hydrolyserats i 10 eller 60 minuter. En tydlig nedbrutenhet och det faktum att pH vandrar kraftigt under de första 30 minuterna tyder på att enzymet har varit som mest aktivt och att hydrolyseringen av peptidbindningarna har varit som intensivast under denna period. Hur nedbrutet ett protein blir av proteolysen beror på proteinets uppbyggnad. En hydrolys i sitt isoelektriska pH ger veteproteiner en löslighet som överstiger 90 % vid DH > 10 % [6], [9]. Detta innebär att glutenet till stor del bör brytas ner under den första perioden av hydrolysen, vilket det också gör. Trots våra låga DH % värden kan vi därför anta att glutenet har gjorts betydligt mer lösligt i vatten än det var i ursprungsformen.

7.2 Tillgänglighet för enzymerna

Innan hydrolysförsöken påbörjades funderade vi på hur man skulle kunna underlätta för enzymerna att komma åt att reagera med glutenet på effektivast sätt. Glutenets konsistens i sitt isoelektriska pH kan liknas vid ett tuggummi och för att enzymerna ska komma åt att verka i hela substratet på effektivt sätt blir någon form av finfördelning av

materialet nödvändig. Jag provade att klippa i glutenet med en sax under de första 5 minuterna av reaktionstiden. Detta visade sig vara lyckat och underlättade för enzymerna att komma åt och klippa peptidbindningarna i glutenet. Efter 5 minuter var glutenet så pass nedbrutet att jag kunde fortsätta med enbart omrörning.

7.3 Inaktivering av enzymer

Under de första provförsöken inaktiverades enzymerna genom upphettning till 85 grader i 15 minuter. Glutenproteinerna aggregerade och verkade bilda koagel. Eftersom det inte gav en önskvärd slutprodukt konsulterades leverantören av enzymet som kom med rådet att prova inaktivering av enzymerna med syrachock till pH 3,5. Detta utfördes genom snabb tillsättning av 1 M HCl följt av 25 minuter omrörning. Denna form av inaktiviering fungerade bättre då enzymaktiviteten avstannade utan att glutenproteinerna denaturerades. Försök visade på att enzymaktiviteten inte heller återkom efter att pH justerats till gynnsammare intervaller igen.

7.4 pH-stat metoden

Lite försent upptäcktes det att pH-stat metoden som använts för att räkna ut hydrolysgraden inte var optimal att använda i pH 5 – 6 [6]. Det var i just det intervallet som de flesta hydrolyserna (försök 1a, b, c) hade körts i. Den sista hydrolyseringen (försök 2.) gjordes dock i ett högre pH = 7. Att detta gav mer svängningar i pH under reaktionstiden beror dels på en högre koncentration av enzym, och en högre dosering men förmodligen även för att lösningen inte längre buffrar undan H^+ på samma sätt. Detta ger därför endast det sist utförda försöket ett tillförlitligt resultat av hydrolysgrad. Vill man kontrollera vilken DH % som är den riktiga på testerna genomförda i pH 5,6 finns det metoder som är lämpliga för utvärdering av DH % efter genomförd hydrolysprocess.

7.5 Spraytorkningen

Efter att ha provkört spraytorken på högre temperaturer och glutenblandningen bränt fast på insidan av torkkammaren samt att pulvret blivit i det närmsta statiskt, bestämde vi oss för att köra på något lägre temperaturer. Vattenhalten på pulverna varierade mellan 3 och 5 %, vilket var något högre än de tidigare misslyckade provförsöken. En annan fördel att köra i lägre temperaturer var att en större mängd pulver kunde erhållas. Pulverna blev något mindre statiska och var fortfarande svåra att blanda upp med vatten, förmodligen för att partikelstorleken var för liten vilket gav en för lite yta att återfukta. En vattenhalt på mer än 5 % är snarare att föredra. Detta kan göras genom justering av temperaturen på spraytorken till ytterligare något lägre, antingen på ingående eller utgående temperatur eller möjligen på båda.

Dock tror jag att pulverna är något hygroskopiska vid en så låg vattenhalt och att de kommer absorbera vatten från omgivande luft för att utjämna skillnaden. Vattenhalten kommer på så vis att rätta till sig själv efter ett tag.

7.6 Utvärderingen

Genom att blanda de torkade hydrolysaten med vatten och jämföra dessa i konsistometern kunde det konstateras att det fanns ett tydligt samband mellan hydrolysgraden och flyttal. Ju mer hydrolyserat glutenet var desto mer lättflytande var smeten. Detta innebar att smeten hann flyta längre på 10 sekunder i konsistometern, vilket gav högre flyttal. Som man kan se i Figur 5 sker den största förändringen i början av hydrolyseringen och smeten får snabbt högre flyttal. Kurvans lutning avtar ju mer hydrolyserat glutenet blir. Detta stämmer även överens med hydrolyseringsförloppet då enzymerna hade störst verkan i början av reaktionen för att sedan avta och plana ut. Eftersom vetemjöl går bra att extrudera jämfördes hydrolysatens viskositet med en vetemjölssuspension, uppblandat till samma ts = 40 %.

Enligt figur 5 motsvarar en hydrolysgrad av 2 % på glutenet nästan samma flyttal som vetemjölet, nämligen 8. Ett försök att extrudera gluten hydrolyserat till 2 % skulle därför rimligtvis kunna lyckas.

7.7 Fler fördelar med nedbrutet protein - celiakivänligt

En elektrofores innebär alltså att man kan se hur pass nedbrutete proteinerna är. Genom att enzymerna har fått verka kan det finnas en möjlighet att de hjälpt till att bryta ned glutenproteinerna till den grad att även människor med celiaki har möjlighet att förtära produkterna utan att få problem.

Det är nämligen gliadinet i glutenet som är problemet. Normalt sett bryts det ner av enzymer som förekommer naturligt i magsäck och tunntarm till mindre peptider. Kvar blir även en peptid bestående av 33 aminosyror som modifieras av enzymet transglutaminas i tarmslemhinnan. Hos männikor med celiaki aktiverar den modifierade peptiden T-lymfocyter som leder till att tarmen blir inflammerad.

Om man kan bryta ner peptiden bestående av 33 aminosyror i förväg med specifika enzymer till mindre bitar kan man förhindra att tarminflammationen uppstår [19], och celiakipatienter har möjlighet att äta produkterna tillverkade av glutenhydrolysaten.

8 Slutsats

Med denna studie har jag kommit fram till att en enzymatisk hydrolys av våtgluten har effektivast verkan under hydrolysens första 30 minuter för att sedan avta och plana ut.

En hydrolysering av våtgluten till ca 2 % DH är jämförbart med konsistensen hos vetemjöl. Det innebär att en hydrolysering av gluten till 2 % bör vara tillräcklig för att en extrudering av materialet ska vara möjligt.

För att få ett pålitlig och korrekt resultat bör en enzymatisk hydrolys ske i pH 7 – 9 om man ska använda sig av pH-stat metoden. Inaktiveringen av enzymerna sker lämpligast med syrachock till pH 3,5. Om en spraytorkning av materialet är önskvärt bör pulvret hålla en vattenhalt på > 5 %.

Förslag till fortsatt arbete

- Fortsätta hydrolysering av gluten till högre DH % och jämföra även dessa resultat i konsistometern för att tydligt se förändringen.

- Det skulle vara intressant att utvärdera molekylstorlekarna i de olika hydrolysaten. Genom att göra en elektrofores av något slag skulle man få redan på partiklarnas molekylstorlek och därmed också få ett exakt mått på hur hydrolyserat glutenet blivit. Bilderna och talen man får fram skulle kunna jämföras med likvärdiga produkter på marknaden för att få en bild av hydrolysatens lämplighet för extrudering.

  Elektrofores är en teknik som utnyttjar molekylers laddning och fungerar därför utmärkt på proteiner. Lösningen man vill analysera placeras i ett elektriskt fält och beroende på partiklarnas storlek, form och laddning kommer de att röra sig med olika hastighet och separeras. Metoden kan sedan utvecklas och man kan tillsätta gel till lösningen för att undvika att de separerade molekylerna återblandas. Detta kallas gelelektrofores eller PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophores) [14], [16]. Just metoden PAGE skulle vara intressant att tillämpa på glutenhydrolysaten.

- Provköra glutenhydrolysaten i extruder.

- Undersöka smakegenskaperna hos hydrolysaten. Behövs det möjligen andra enzymer?

9 Källförteckning

9.1 Litteratur

1. Furugren, B. (2008) *Vegetabilier*. Lund: KFSAB.

2. Furugren, B. (2007) *Matens molekyler*. Lund: KFSAB.

3. Salomonsson, A-C. och Åman P. (1993) Spannmål. I *Våra livsmedelsråvaror*. Stockholm: Utbildningsradion.

4. Belitz, H-D; Grosch, W. (1999) *World Food Chemistry, Second edition*. Heidelberg: Springer-Verlag.

5. Pomeranz, Y. (1988) *Wheat: Chemistry and Technology, third edition*. USA: American Association of Cereal Chemistry.

6. Munk-Nielsen, P. (1997) Functionality of protein hydrolysates. In *Food Proteins and Their Applications*. New York: Marcel Dekker.

7. Maningat, C.C.; DeMerritt, G.K.; Chinnaswamy, R. and Bassi, S.D. (1999) Properties and applications of texturized wheat gluten. *Cereal Foods World* 44, nr 9, 650-655.

8. Day, L.; Augustin, M.A.; Batey, I.L. and Wrigley, C.W. (2006) Wheat-gluten uses and industry needs. *Food Science and Technology*. 17, 82-90.

9. Kong, X.; Zhou, H. and Qian, H. (2007), Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101, 615-620.

10. Schlichtherle-Cerny, H.; Amado, R. (2002), Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate od deamidated wheat gluten. *J. Agric. Food Chem*, 50, 1515-1522.

11. Adler-Nissen, J. (1976) Enzymic Hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24 (6), 1090-1093.

12. Skjöldebrand, C. (1993) Uppvärmning och nedkylning av livsmedel. I *Livsmedelsförädling*. Stockholm: Utbildningsradion.

13. Fogler, B.B.; Kleinschmidt, V.R. (1938) Spraydrying. *Ind. Eng. Chem.*, 30 (12), 1372-1384.

14. Concepción, M.; López, G. and Alegre, M.L.M. (2009) Detection of Adulterations: Addition of Foreign Proteins. In *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis.* Taylor and Francis group, LLC.

9.2 Internet

15. Dansk kurslitteratur i matkunskap:
file:///Users/magnusahlbeck/Documents/IDA%20YTH/Examensarbete/beskrivn%20proteiner%20DK.pdf (2009-05-06)

16. Nationalencyklopedin
Sökord: Elektrofores
http://ne.se.ludwig.lub.lu.se/lang/elektrofores (2009-05-18)

17. Bostwick – konsistometer
http://gerber.wiessoft.de/info793.htm?Lang=DE (2009-05-21)

18. Bostwick – Konsistometer
http://www.esska-teknik.se/esska_se_s/viskositetsmaetning.html?gclid=CJbr69jrzZoCFcME3godAyVQ4A, (2009-05-21)

9.3 Elektroniska källor

19. Ingrid Malmheden Yman (Förste kemist på Livsmedelsverket). Mail. (2009-02-18)