

Civilingenjör i Bioteknik, Examensarbete

# Enzymatisk nedbrytning av arabinoxylan och fytinsyra som metod för att öka utbytet och biotillgängligheten av näringsämnen i flytande havrebas

Anna Aronsson  
Sara Strandberg

Handledare:

Professor Eva Nordberg Karlsson  
Lunds Universitet

Linda Eriksson  
Oatly AB

Examinator:

Professor Olle Holst  
Lunds Universitet

Avdelningen för bioteknik

Lunds Universitet, Sverige

2013



## Förord

Det här examensarbetet har genomförts som ett avslutande moment i utbildningen till civilingenjör inom bioteknik vid Lunds Tekniska Högskola. Projektupplägget utformades av oss studenter men baserades på företagets problemställning och tillgången av utrustning på Bioteknikavdelningen i Lund. Att arbeta tillsammans inom tidsramen på 20 veckor har gett utrymme för ett flertal försök och analyser samt bra diskussioner och reflektioner. Därtill har samarbetsförmågan utvecklats hos oss båda.

## Vårt bidrag i arbetet

I upplägget av det laborativa upplägget har Anna haft ansvar för arbetet med xylanaserna och Sara för arbetet med fytaserna. Det har inkluderat planerande och utvärdering av experimenten. Det laborativa arbetet har gjorts mestadels gemensamt. Den kombinerade delen planerades och utfördes däremot tillsammans.

Rapporten har tagits fram på liknande sätt, Anna har skrivit om havre och xylanas och Sara har skrivit om fytinsyra och fytas. Anna har haft ansvar för att ta fram resultaten genom beräkningar och Sara har skrivit metod och materialdelen. Resultaten diskuterades och utvärderades tillsammans och därför har diskussion och slutsats skrivits gemensamt.

## Tack!

Vi vill slutligen passa på att tacka alla de personer som varit delaktiga i projektet. Ett stort tack till:

**Eva Nordberg Karlsson** – för att hon alltid lika glad och positiv kommit med värdefull och konstruktiv kritik under arbetets gång.

**Linda Eriksson** – för att hon delat med sig av sina tankar och idéer inför det framskridande arbetet och för en trevlig rundvandring på Oatly.

**Peter Falck** – för att han delat med sig av sina erfarenheter och kommit med viktiga råd under tiden i laboratoriet och under rapportskrivandet.

**Christina Wennerberg** – för att hon hjälpt oss med preparat till BCA -analysen men också för en trevlig tid tillsammans i laboratoriet.

**Zubaida Gulshan Kazi** – för att hon delat med sig av erfarenhet, utrustning och preparat till vårt laborativa arbete.

**Frans Peder Nilsson** – för att han med entusiasm hjälpt oss med utrustning och datorproblem.

Trevlig läsning!

Anna Aronsson & Sara Strandberg

2013-06-14, Lund

## Abstract

This project (*Enzymatic degradation of arabinoxylan and phytic acid as a method to increase yield and bioavailability of nutrients in liquid oat base*) evaluates the degradation of phytic acid, of the insoluble fraction from Oatly's existing production process, with the aim of increasing available nutrients such as minerals and proteins. Previous studies have shown that phytic acid from this fraction is hard to disassemble and one possible theory is that the phytic acid is tightly bound to the fibers and hence hard to access.

A fiber degrading enzyme, a xylanase, was studied for degradation of the fibers with 6 % dry weight. Three phytases were studied separately and in combination with the xylanase. The xylanase was expected to break up part of the fibers that the phytic acid is believed to be attached to, and the anticipation was that the degradation of the phytic acid would be more effective in the presence of xylanase.

The optimal concentration of the xylanase Pentopan<sup>®</sup> Mono Conc. BG (16,1 µg/ml), which degrades the oat cell wall fiber arabinoxylan to oligosaccharides, was determined and combined with the determined optimal concentrations for the phytases Phytase<sup>®</sup> 5000 L (1,39 µg/ml) and Quantum<sup>™</sup> TR 5000 L (1,60 µg/ml). The third phytase, Sternzym PHY 21097, was not further investigated since it did not show reasonable activity within the applicable time and temperature intervals.

No apparent synergistic effect between the xylanase and the phytases could be determined with the optimized amounts of xylanase. However, a free phosphorous analysis showed a higher amount of free phosphorous with 100 times the optimized amount of the xylanase added. This indicates that more phytic acid had been degraded but which also resulted in xylose release. This result supports the hypothesis that the phytic acid is more easily degraded when the insoluble fibers have been detached and other treatments for the degradation of the fiber structure are recommended to further evaluate.

The results showed that Phytase<sup>®</sup> 5000 L was a better alternative in terms of increasing available nutrients. 20 % of the iron content and 19 % of the proteins in the fiber material, after 120 minutes enzyme treatment in 60°C, were found in the fraction to be returned to Oatly's process. On the other hand, the results from the free phosphorus analysis showed that more free phosphorus, which was used to evaluate the degradation of phytic acid, was obtained with Quantum<sup>™</sup> TR 5000 L than with Phytase<sup>®</sup> 5000 L. A potential theory was that the Phytase<sup>®</sup> 5000 L only partially degrades phytic acid while Quantum<sup>™</sup> TR 5000 L fully degrades phytic acid into inositol. A degradation of IP<sub>6</sub> to IP<sub>4</sub> is enough to decrease the binding strength of ions. A hydrolysis profile, an IP<sub>6</sub> - IP<sub>1</sub> analysis, could have confirmed this theory but was not performed within the project.

An alternative treatment for the degradation of phytic acid that used germinated oat grains was studied in parallel in this project. The germination was expected to cause a lower amount of phytic acid and increase the amount of soluble minerals and proteins. However the opposite was shown since the amount of solvent minerals and proteins decreased with an increase in time of the germination.

## Sammanfattning

Projektet utvärderar nedbrytning av fytinsyra från den olösliga fraktionen i Oatlys befintliga produktionsprocess med syfte att utnyttja mer av havrens egna näringsämnen. Fytinsyran har sedan tidigare visat sig vara svår att bryta ned i denna fraktion och en teori är att fytinsyran sitter hårt bunden till fibrerna och därför är svåråtkomlig.

Ett fibernedbrytande enzym, xylanas, studerades för att degradera och lösliggöra fibrerna med 6 % torrsbstans och tre fytaser studerades enskilt och i kombination med xylanaset. Xylanaset förväntades bryta ned en del av de fibrer som fytinsyran tros vara bunden till och förhoppningen var att fytinsyranedbrytningen skulle bli mer effektiv vid närvaro av xylanas.

Optimal koncentration av enzymet Pentopan<sup>®</sup> Mono Conc. BG (16,1 µg/ml) som bryter ned arabinoxylan, som finns i havrens cellväggar, till oligosackarider bestämdes och kombinerades med de bestämda optimala koncentrationerna av fytaserna Phytase 5000 L (1,39 µg/ml) och Quantum 5000 L (1,60 µg/ml). Det tredje fytaset, Sternzym PHY 21097, undersöktes inte vidare då det inte visat sig vara aktivt vid lämpliga tids- och temperaturintervall.

Ingen tydlig synergieffekt kunde urskiljas mellan xylanaset och fytaserna med den optimerade mängden xylanas. Däremot visade en fri fosforanalys på större mängd fri fosfor vid en tillsats av 100 gånger högre mängder xylanas vilket tyder på att mer fytinsyra brutits ned men även att mer xylos frisatts. Resultatet med högre mängder xylanas stödjer hypotesen om att fytinsyran är lättare att bryta ner när de olösliga fibrerna luckrats upp och alternativa behandlingar för att bryta ned fiberstrukturen rekommenderas att titta vidare på i samband med en fytasbehandling.

Resultaten visade på att en behandling med enbart Phytase<sup>®</sup> 5000 L, vid 60°C i 120 minuter, frisatte mest näringsämnen i den fraktion som skulle återföras till Oatlys process. 20 % av järnet och 19 % av proteinerna i det olösliga fibermaterialet återfanns i den fraktion som skulle återföras till Oatlys process. Däremot gav en fri fosforanalys större koncentration fri fosfor efter behandling med Quantum<sup>™</sup> TR 5000 L än med en behandling med Phytase<sup>®</sup> 5000 L. En möjlig teori är att Quantum<sup>™</sup> TR 5000 L bryter ned fytinsyran fullständigt och Phytase<sup>®</sup> 5000 L endast delvis. Nedbrytningen av fytinsyra från IP<sub>6</sub> till IP<sub>4</sub> är tillräcklig för att försämra inbindningen till positiva joner. En hydrolys profil, en IP<sub>6</sub> - IP<sub>1</sub> analys, skulle kunnat bekräfta denna teori men utfördes inte inom projektets tidsram.

En alternativ behandling för nedbrytning av fytinsyra som inbegrep utnyttjandet av groddade havrekärnor studerades parallellt i projektet. Förhoppningen var att groddningen skulle leda till lägre mängd fytinsyra och följaktligen ökad mängd lösliga mineraler och proteiner. Däremot uppnåddes det motsatta, den lösliga mängden mineral och protein minskade med längre groddningstid. Denna alternativa behandling med groddning av havre ansågs därför inte vara en lämplig metod för att bryta ned fytinsyra och erhålla mer lösliga mineraler och proteiner.

## Ordlista

Nedan följer en lista med förklaring av ord och begrepp, inklusive förkortningar, som förekommer i rapporten.

### **Arabinoxylan, AX**

En typ av [xylan](#) som finns i havrens cellväggar och består av sockerarterna xylos och arabinos.

### **AX**

Se [Arabinoxylan](#)

### **β-glukan**

En typ av [fiber](#) som finns i hela havrekornet och som har visat sig ge positiva hälsoeffekter i form av sänkning av kolesterolhalten och stabilisering av blodsockernivån.

### **Cellulosa**

En typ av olöslig [fiber](#) som utgör huvuddelen av havrens cellväggar.

### **Fiber**

Innefattar kolhydrater och lignin som inte kan spjälkas eller absorberas i tunntarmen utan när tjocktarmen utan att ge energi.

### **Fytin**

Komplex mellan [fytinsyra](#) och någon av jonerna kalcium eller magnesium.

### **Fytinsyra, IP<sub>6</sub>**

Ett ämne som förekommer i havre och som hämmar upptaget av mineralämnena såsom järn, zink och kalcium samt vissa proteiner.

### **Fytas**

Enzym som katalyserar hydrolysen av [fytinsyra](#) till lägre [inositolfosfater](#)/ [inositol](#) och frisätter oorganiskt fosfat.

### **Fytat**

Komplex mellan [fytinsyra](#) och joner.

### **Glukomannan**

En typ av [hemicellulosa](#) som finns i havrens cellväggar och består av sockerarterna glukos, mannos och i vissa fall galaktos.

### **Glukosidaser**

En grupp av enzymer som katalyserar hydrolysning av kolhydrater.

### **Hemicellulosa**

En grupp av [fibrer](#) som finns i havrens cellvägar och består av grenade polysackarider uppbyggda av varierande sockerarter.

### **Inositol**

Produkt efter fullständig nedbrytning av [fytinsyra](#).

### **Inositolfosfater, IP<sub>1-6</sub>**

IP<sub>1-5</sub> är produkter efter en icke fullständig nedbrytning av IP<sub>6</sub>, [fytinsyra](#).

### **IP<sub>1-6</sub>**

Se [Inositolfosfater](#)

### **IP<sub>6</sub>**

Se [Fytinsyra](#)

### **Oligosackarider**

I denna rapport: Kolhydrater bestående av en till fem monosackaridenheter.

### **Prebiotisk effekt**

Effekten av icke-nedbrytbara livsmedelsingredienser som stimulerar tillväxten och/eller aktiviteten av bakterier i matspjälkningssystemet på sätt som påstås vara positivt för hälsan.

### **Stärkelse**

En typ av, för människan nedbrytbar, kolhydrat som finns till stor del i havre och som består av sockerarten glukos.

### **Xylan**

En typ av [hemicellulosa](#) bestående till stor del av sockerarten xylos.

### **Xylanas**

Enzymer som katalyserar hydrolysen av den linjära polysackariden  $\beta$ -1-4-[xylan](#) till xylos.

### **Xylooligosackarider**

[Oligosackarider](#) bestående endast av sockerarten xylos.

## Innehåll

1	Introduktion.....	9
1.1	Problemställning.....	9
1.2	Projektbeskrivning.....	10
2	Bakgrund .....	11
2.1	Havre .....	11
2.2	Fytinsyra .....	18
2.3	Enzymer .....	20
3	Försöksplan.....	23
3.1	Översikt .....	23
3.2	Steg 1 - Karaktärisering och förbehandling.....	23
3.3	Steg 2 - Xylanasbehandling .....	24
3.4	Steg 3 - Fytasbehandling .....	24
3.5	Steg 4 - Kombinerad enzymbehandling .....	24
3.6	Steg 5 - Alternativ behandling.....	25
3.7	Avgränsningar.....	25
4	Material och metod.....	27
4.1	Material .....	27
4.2	Utrustning och analysmetoder.....	29
5	Resultat och diskussion .....	34
5.1	Karaktärisering och förbehandling.....	34
5.2	Xylanasbehandling.....	43
5.3	Fytasbehandling .....	49
5.4	Kombinerad enzymbehandling .....	54
5.5	Alternativ behandling.....	61
5.6	Reflektioner kring Megazyme kitet för fytinsyra/ total fosforanalys.....	63
6	Slutsats .....	65
7	Förslag till fortsatt arbete.....	66
8	Referenslista.....	67
	Appendix 1 – Populärvetenskaplig artikel.....	72



# 1 Introduktion

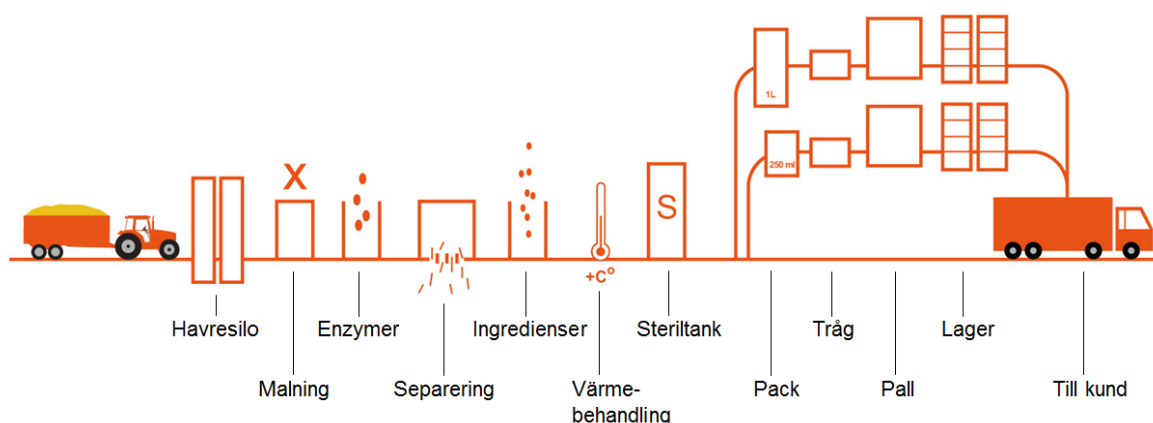
Det här examensarbetet har kommit till genom ett samarbete mellan livsmedelsföretaget Oatly och bioteknikavdelningen vid Lunds Tekniska Högskola. Bakgrunden till projektet var ett intresse i att uppnå bättre näringsinnehåll och utbyte för den flytande havrebas som företaget använder i sina produkter.

## 1.1 Problemställning

På Oatly har man uppmärksammat att höga halter fytinsyra, som finns i havre, är kopplat till försämrade biotillgänglighet av mineraler och proteiner (Eriksson, 2013). Fytinsyra har en hög affinitet för positivt laddade joner och bildar lätt komplex med dessa (Coulibaly, et al., 2011). Mineraler och proteiner som befinner sig i fytinsyrakomplex, så kallade fytater, kan inte absorberas i människans matspjälkningsystem. Därmed kan en hög halt fytinsyra leda till en försämrade biotillgänglighet av dessa näringsämnen och följaktligen ett minskat näringsupptag. (Greiner & Konietzny, 2006)

På Oatly har man tidigare utfört försök med enzymet fytas för att bryta ned fytinsyran i sin flytande havrebas. Dessa har utförts i industriell skala på den *lösliga* fraktionen av havrebasen, men det har däremot visats sig vara problematiskt att bryta ned fytinsyran i den *olösliga* fraktionen. En möjlig orsak kan vara att fytinsyran sitter hårt bunden till fibrerna och är därför svåråtkomlig. En bearbetning som bryter ned fibrerna i den olösliga fiberfraktionen i kombination med en fytasbehandling kan vara en väg att gå för att öka utbytet och frisätta mer proteiner och mineraler. Detta var vad som låg till grund för projektet. (Eriksson, 2013)

Tillverkningen av den flytande havrebasen (Figur 1) börjar med att havren blandas med vatten och mals. Därpå behandlas blandningen med stärkelsenedbrytande enzymer varefter de olösliga fibrerna separeras bort. Separeringen görs för att erhålla en mer mjölkliknande konsistens. Slutligen tillsätts eventuella ingredienser och produkten värmebehandlas och paketeras. (Eriksson, 2012)

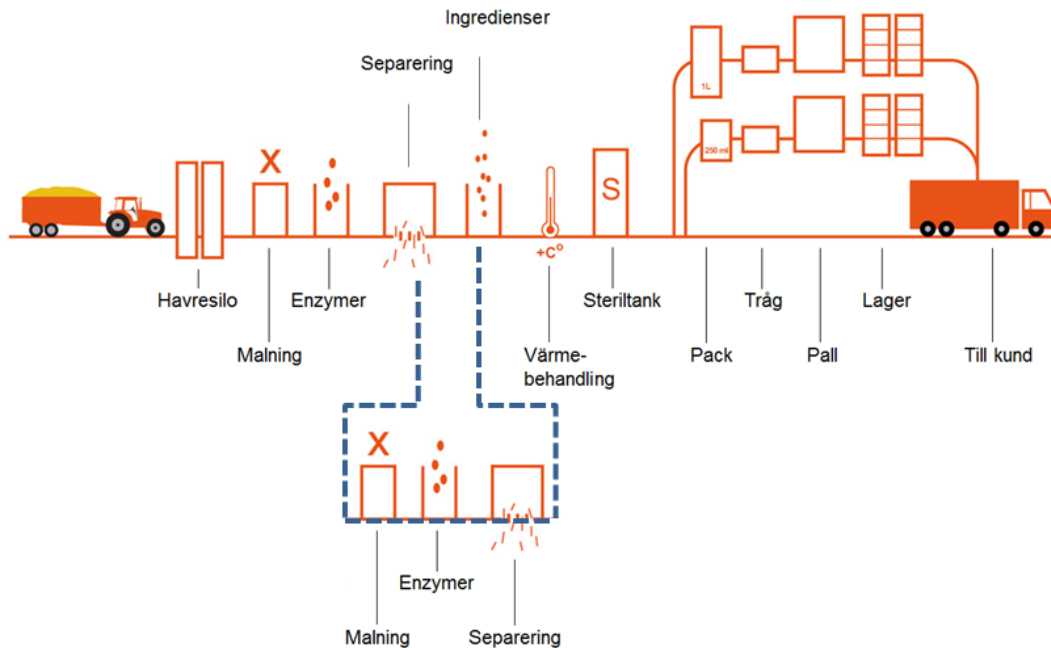


Figur 1. Oatlys tillverkningsprocess.

Till fibrerna i den olösliga fraktionen sitter näringsämnen såsom proteiner och mineraler bundna vilka förloras efter separeringen. Fraktionen som separeras skickas i dagsläget iväg och används som grisfoder. Av både miljömässiga och ekonomiska skäl är det värdefullt att ta till vara på den bortseparerade fraktionen samt havrens ursprungliga näringsämnen och på så sätt också öka utbytet. (Eriksson, 2013)

## 1.2 Projektbeskrivning

Den olösliga fraktionen utgjorde projektets råmaterial. Visionen var att skapa ett parallellt spår i Oatlys nuvarande process (Figur 2) för att ta tillvara på denna bortseparerade fraktion. I Oatlys nuvarande processlinje sker en malning i början av processen. I den föreslagna sidolinjen ingår ytterligare ett malningssteg på den bortseparerade fraktionen, vilket antas frigöra mer löslig substans från havrefibrerna. Tanken var att den olösliga fraktionen skulle malas, enzymbehandlas och därefter genomgå ett separeringssteg för att erhålla en löslig fraktion som skulle kunna återföras till huvudlinjen.



Figur 2. Oatlys tillverkningsprocess med föreslagen med sidolinje.

Malning av den olösliga fiberfraktionen i kombination med addering av enzymet xylanas, ett fibernedbrytande enzym, genomfördes och studeras för att degradera och lösliggöra fibrerna. Därpå behandlades materialet med fytas, fytinsyranedbrytande enzym. Eftersom xylanaset förväntades bryta ned en del av de fibrer som fytinsyran tros vara bunden till var förhoppningen att fytasbehandlingen skulle bli mer effektiv vid en kombination med xylanasbehandling.

*Målet med projektet var att studera enzymbehandlingarna i kombination med malning samt erhålla en löslig fraktion med lösliga mineraler och proteiner som skulle kunna återföras till den befintliga processlinjen.*

Parallellt med ovanstående arbete utvärderades ett alternativt sätt att bryta ned fytinsyra i havre, genom groddning av havrekärnor. Analyser utfördes på groddade och icke groddade havrekärnor erhållna från en potentiell leverantör till Oatly.

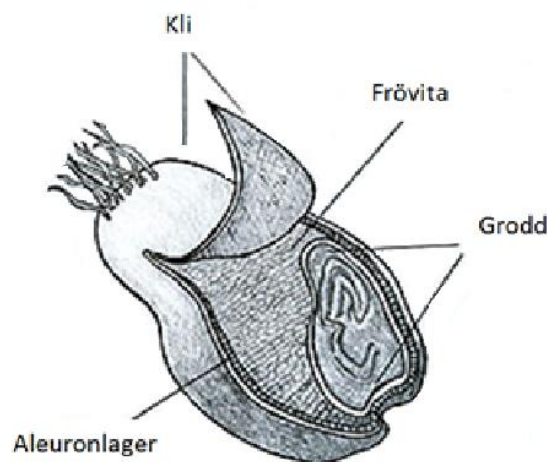
## 2 Bakgrund

### 2.1 Havre

Havre är basen i alla Oatlys produkter och dess olösliga fiber är projektets startmaterial. Avsnittet beskriver havrekornets uppbyggnad och dess näringsinnehåll. Då fibrerna har en essentiell del i projektet beskrivs de i mer detalj. Till sist presenteras de hälsoeffekter som kopplats samman med havre och hur dessa kan påverkas på vägen från havrefälten till konsumenten.

#### 2.1.1 Havrekornet

Ett havrekorn består av en kärna som är täckt av ett hölje. Endast kornet är av intresse för vidare behandling i en tillverkning av havredryck då höljet inte tillför något näringsinnehåll för människan och tas bort innan behandling. Kärnan består av tre lager som skiljer sig åt morfologiskt och kemiskt; kliet, frövitån och grodden (Figur 3). (Zhang, et al., 2007)



Figur 3. Havrekärnans delar (Hammermeister, 2008).

Kliet utgör omslutningen av kärnan och innehåller en bulk av vitaminer, mineraler, fytat och antioxidanta ämnen. Av dessa är det mesta lokaliserat i aleuronlagret som är ett encelligt skikt intill frövitån (Figur 3). Aleuronlagret består till största del av lipid- och proteinkroppar. I varje proteinkropp finns två regioner som inte innehåller proteiner, dessa består av samlingar av niacin (vitamin B<sub>3</sub>) respektive fytin. Lipidkropparna innehåller tokoferoler (vitamin E). Aleuronlagret är en stor källa för hydrolytiska enzym som kan bryta ned reservmaterial från frövitån och därmed möjliggöra transport av mindre, lösliga subenheter under groddning. De övriga lagren av kliet består till största delen av olösliga polysackarider med en stor mängd fenoler. (Miller & Fulcher, 2011)

Frövitån, som består 70 % av havrekornet, fungerar som det huvudsakliga förrådet av stärkelse, proteiner och  $\beta$ -glukaner. Upp till 90 % av havrens lipider hittas i detta lager och domineras av fettsyran linsyra följt av oljesyra och palmitinsyra. Cellväggen hos frövitans celler är rik på  $\beta$ -glukaner men även arabinoxylan, cellulosa och glukomannan. Undersökningar har föreslagit en lagervis uppdelning av cellväggarna i frövitån; ett tunt yttre lager med ett olösligt polysackaridskelett bestående av cellulosa, glukomannan och arabinoxylan, en polysackaridmatris av  $\beta$ -glukan och arabinoxylan samt ett tjockt inre lager som mestadels består av  $\beta$ -glukaner men även arabinoxylan. (Miller & Fulcher, 2011)

Grodden innehåller stora mängder av protein och lipider men små mängder stärkelse. Proteinkropparna i grodden innehåller liksom proteinkropparna i kliet en sektion av ackumulerat fytin men däremot inget niacin. Även här är proteinkropparna omslutna av lipidkroppar.  $\beta$ -glukaner kan hittas i groddens cellväggar. Grodden är en metaboliskt aktiv struktur från vilken den mogna plantan utvecklas. (Miller & Fulcher, 2011)

### 2.1.2 Näringsinnehåll

Näringsinnehållet beskriver vilka komponenter som finns i en råvara eller produkt som är av energi- eller näringsintresse för konsumenten. Näringsinnehållet kan delas upp i huvudkomponenter, mikrokomponenter och andra mindre komponenter. Dessa är för havre beskrivna nedan.

#### 2.1.2.1 Huvudkomponenter

Huvudkomponenterna i havre presenteras nedan (Tabell 1).

Tabell 1. Huvudkomponenter i havre (Welch, 2011).

Komponent	Koncentration i havre (g/100 g)
Vatten	8,5
Kolhydrater	58,7
Protein	14,0
Fett	8,0
Fiber	9,0
Aska	1,8

Den största komponenten i havre är kolhydrater som till största del består av stärkelse. Protein har en signifikant andel i havre. Havre har den största andelen fetter av alla sädeslag, de flesta är omättade och vid rumstemperatur oljor. Fiberandelen är relativt hög i havre jämfört med andra sädeslag och diskuteras separat (2.1.3 Fiber). (Welch, 2011)

#### 2.1.2.2 Mikronäringsämnen

Vitaminer

Mängden av de vanligaste vitaminerna i havre presenteras nedan (Tabell 2).

Tabell 2. Vitamininnehållet i havre (Welch, 2011). Andel av RDI är beräknat på kvinnor ålder 31-60 (Livsmedelsverket, 2012).

Vitamin	Mängd i havre (mg/100 g)	Andel av RDI (%)
Vitamin E	1,2	-
Niacin, Vitamin B <sub>3</sub>	0,88	-
Niacin-ekvivalent	3,93	26,2
Pantotensyra, Vitamin B <sub>5</sub>	1,23	-
Tiamin	0,73	66,4
Vitamin B <sub>6</sub>	0,22	18,3
Riboflavin	0,13	10
Folsyra	49·10 <sup>-3</sup>	-
Biotin	21·10 <sup>-3</sup>	-
Kolin	40	-

Av de fettlösliga vitaminerna, dvs. A, D, E och K, har endast vitamin E påträffats i havre. Alla vattenlösliga vitaminer förutom vitamin C och vitamin B<sub>12</sub>, har hittats i havre. Havre innehåller höga halter av tiamin, biotin och kolin, och jämfört med andra sädeslag höga halter av vitamin E, pantotensyra, riboflavin och folsyra. Havre innehåller jämförelsevis låga halter av niacin, niacin-ekvivalenter och vitamin B<sub>6</sub>. (Welch, 2011)

## Mineraler

Mängden av de vanligaste mineralerna i havre presenteras nedan (Tabell 3).

Tabell 3. Mineralinnehållet i havre (Welch, 2011). Andel av RDI är beräknat på kvinnor ålder 31-60 (Livsmedelsverket, 2012).

Näringsämne	Mängd i havre (mg/100 g)	Andel av RDI (%)
Kalium	389	12,5
Fosfor	459	76,5
Magnesium	145	51,8
Kalcium	54	6,75
Natrium	9	-
Järn	4,3	28,7
Zink	3,4	48,6
Mangan	4,1	-
Koppar	0,44	48,9

Mineraler kan delas upp i två grupper beroende på näringsbehovet, huvudmineraler och spårmineraler. Huvudmineralerna är kalium, fosfor, magnesium, kalcium och natrium. Av dessa har havre en stor mängd av fosfor och kalium och mindre av magnesium och kalcium. Halten av dessa huvudmineraler är hög i havre jämfört med andra sädeslag. Halten av natrium är liten. Spårmineralerna utgörs av järn, zink, mangan och koppar. Havre har höga halter av järn, zink och mangan jämfört med andra sädeslag. Halterna av spårmineraler är starkt influerat av jorden havren odlats på. (Welch, 2011)

### 2.1.2.3 Andra mindre komponenter

Havre innehåller utöver de nämnda huvudkomponenterna och mikronäringsämnena även andra mindre utforskade ämnen som har potentiella hälsoeffekter. Dessa komponenter inkluderar steroler, lignaner, saponiner och en rad fenoler, där avenantramider är unika för havre och ur hälsosynpunkt av intresse (2.1.4 Hälsoeffekter). (Welch, 2011)

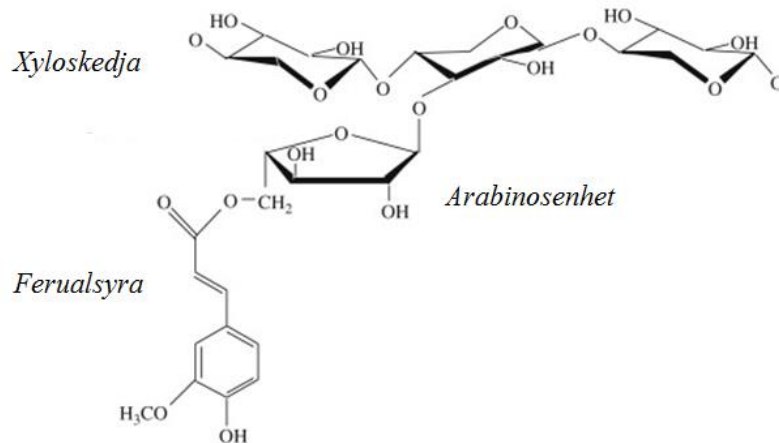
### 2.1.3 Fiber

Fiber består av icke-nedbrytbara kolhydrater samt mindre mängder av lignin och andra komponenter. Fiber delas upp i två klasser beroende på dess förmåga att lösa sig i vatten, man pratar om olösliga och lösliga fiber. Olösliga fibrer utgörs av cellulosa och vissa typer av hemicellulosa medan de lösliga fibrerna utgörs av övriga typer av hemicellulosa samt en del andra lösliga polysackarider. Havrens fiber är till största del lokaliserad i det yttersta klilagret. Den största delen, 58 %, av fibrerna i havre är lösliga. De olösliga fibrerna i havre består av cellulosa och olösliga icke-cellulosa icke-stärkelse polysackarider.  $\beta$ -glukan och arabinoxylan är de två typer av fiber som är rikligast förekommande och även av intresse för projektet, dessa är beskrivna i efterföljande avsnitt. (Welch, 2011)

### 2.1.3.1 Arabinoxylan

Efter glukos, som bygger upp  $\beta$ -glukan, cellulosa och stärkelse, är xylos och arabinos de två mest rikligt förekommande monosackariderna i havre. Dessa är grundstenarna i polysackariden arabinoxylan, som tillhör gruppen hemicellulosa och är en av komponenterna i havrens cellväggar. (Welch, 2011)

Arabinoxylan (Figur 4) består av en linjär kedja av  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) bundna D-xylopyranosyl enheter till vilken  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl enheter har bundit via O-3 och/eller O-2 positionen på xylosenheten. En del arabinosenheter har via en esterbindning på O-5 positionen länkats till ferualsyra. (Holguin-Acuña, et al., 2011)



Figur 4. Kemisk struktur av arabinoxylan (Holguin-Acuña, et al., 2011).

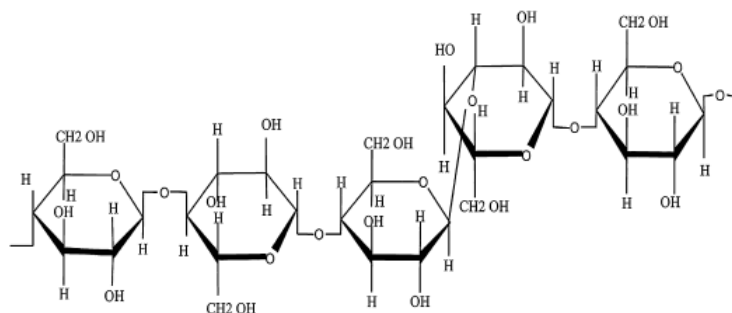
I en och samma växt kan flera olika typer av arabinoxylan förekomma. De strukturella skillnader som uppkommer beroende på substituering av arabinosenheter påverkar arabinoxylans funktionalitet. Både lösliga och olösliga varianter existerar i havre. De olösliga varianterna har ett relativt lågt innehåll av arabinosenheter och dessa är huvudsakligen positionerade på monosubstituerade xylosenheter. (Ebringerová & Heinze, 2000)

Arabinoxylan betecknas härefter AX.

### 2.1.3.2 $\beta$ -glukan

$\beta$ -glukan utgör den största andelen av havrens lösliga fiber och halten kan variera mellan 2 och 8 g/100 g havre. (Welch, 2011)

$\beta$ -glukan,  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  4)-D-glukan, är den mest rikligt förekommande polysackariden i frövitans och aleuronlagrets cellväggar (Faure, et al., 2012). Polysackariden är uppbyggd av D-glukosenheter som är bundna genom antingen  $\beta$ -1,3 eller  $\beta$ -1,4 bindningar.  $\beta$ -1,3 bindningarna avbryter den raka kedjan som  $\beta$ -1,4 bindningarna ger vilket gör att  $\beta$ -glukan är en löslig och flexibel makromolekyl (Figur 5). (Xu, 2012)



Figur 5. Kemisk struktur av  $\beta$ -glukan (Othman, et al., 2011).

Även om  $\beta$ -glukan räknas som den största komponenten av lösliga fibrer i havre kan lösligheten variera beroende på vilka metoder och förutsättningar som tillämpats i mätmetoden. Enligt Welch (2011) är 88 % av  $\beta$ -glukanerna i havre lösliga. En vattenlösning av  $\beta$ -glukaner är mycket viskös. (Welch, 2011)

#### 2.1.4 Hälsoeffekter

Humanstudier har tydligt visat att havrefiber, där ibland  $\beta$ -glukaner, tenderar att sänka totala plasma- och LDL kolesterolet i blodet. Plasma kolesterol är positivt korrelerat med incidenter av kranskärlsjukdomar. En orsak till kolesterolsänkningen tros vara bindning av gallsalter till fibrerna vilket ökar koncentrationer av gallsalter i avföringen och följaktligen leverns gallsaltsutsöndring och kolesteroluttag från blodet. Även  $\beta$ -glukans förmåga att öka viskositeten sägs ha inverkan då rörligheten och mixningen minskar och till följd av det även minskar näringsupptaget av bland annat kolesterol. Viskositetshöjningen sänker även hastigheten i tarmen vilket leder till en längre mättnadskänsla och därmed ett minskat intag av föda, och följaktligen kolesterol. (Xu, 2012)

Konsumtion av  $\beta$ -glukaner har hos överviktiga visat sig öka frisläppandet av aptitdämpare som kolecytokinin. Tillsammans med den längre mättnadskänslan efter sänkningen av hastigheten i tarmen förebygger detta sjukdomar som fetma. (Othman, et al., 2011)

Fiber har även visat sig reducera risken för diabetes typ II och fetma genom att minska insulinkoncentrationen i blodet; en studie gjordes där den glykemiska responsen minskade hos hälsosamma objekt. Frisläppandet av kortkedjade fettsyror från fermentering av fiber i tjocktarmen tros sänka den postprandiala glukosnivån i blodet. (Xu, 2012)

Lipidinhållet i havre är relativt högt jämfört med andra sädeslag, men fettsyror är huvudsakligen omättade. De omättade fettsyror tros bidra till den kolesterolsänkning som är sammankopplad med havre och framför allt dess  $\beta$ -glukaner. Detta är en möjlig fördel med att byta ut vanlig komjölk, där majoriteten av fettsyror är mättade, till en havredryck. (Önning, et al., 1998)

Havre innehåller antioxidanter där det största antioxidantsystemet tros vara olika fenolämnen. Särskilda fenoler i havre är avenantramider, deriverade från kaffeinsyra och ferualsyror, som dessutom har visat upp anti-åderförkalknings och anti-inflammatoriska egenskaper (Welch, 2011).

#### 2.1.4.1 Hälsopåståenden

1997 erkände USAs Food and Drug Administration, FDA, relationen mellan ökat intag av lösliga fibrer och en minskning av kolesterol i blodet, vilket tillät ett hälsopåstående för havre efter en granskning av 33 kliniska studier. En minimum dos av 3 g/dag av havre  $\beta$ -glukaner föreslogs för en hälsosam reduktion av blodkolesterolhalter och följaktligen en sänkt risk för kranskärlsjukdomar. Matprodukter måste innehålla minst 0,75 g havre  $\beta$ -glukaner per servering för att få inneslutas av hälsoeffekten. Denna mängd erhålls vid intag av 0,17 liter av Oatlys havredryck (Önning, et al., 1998). (Othman, et al., 2011)

UKs Joint Health Claims Initiative, JHCI, uppmärksammade 2004 betydelsen av att inkludera havre  $\beta$ -glukan i det brittiska folkets diet för att sänka blodkolesterolet och därmed risken för kranskärlsjukdomar. Hälsopåståendet anger att intaget av 3 g/dag av havre  $\beta$ -glukan som en del av en diet med låg halt av mättat fett och en hälsosam livsstil kan hjälpa till att reducera halten kolesterol i blodet. (Othman, et al., 2011)

#### 2.1.4.2 Utnyttjande av näringsinnehållet

För att konsumenten ska kunna tillgodose sig så mycket som möjligt av det ursprungliga näringsinnehållet i havren är det viktigt att veta vad som påverkar havren på vägen från havrefälten till blodomloppet i människan.

##### Tillverkning av Oatlys havredryck

Framställandet av havredrycken innehåller flera behandlingar av havre som våtmalning, hydrolysering av stärkelse med enzymet amylas, dekantering (separering), formulering, Ultra High Temperature (UHT) behandling och aseptisk paketering. Dessa fysiska, biologiska och hydrotermiska behandlingar som efterföljs av en utdragen lagring kan påverka fördelningen och koncentrationen av näringsämnen i havren. (Zhang, et al., 2007)

Våtmalningen och den enzymatiska hydrolysen underlättar för ett bättre lösande av beståndsdelarna, medan dekanteringen separerar och isolerar olösliga delar från vätskefasen. Bland de olösliga delarna finns olösliga fibrer och till dessa bundna vitaminer, mineraler och proteiner, det är detta material som bearbetades i projektet. Dekanteringen orsakar en 45-75 % förlust av kalcium, järn och zink. Dessa mineraler är delvis lagrade som fytater och delvis som komplex med fiber. Järn, zink och kalcium har observerats vara hårt bundna till fiber i havreprodukter och bara delvis frisläppta vid en fytashydrolysering. (Zhang, et al., 2007)

##### Nedbrytning av $\beta$ -glukaner

Både molekylvikten och koncentration har ett samband med  $\beta$ -glukans förmåga till viskositetshöjning och därmed till de hälsoeffekter som är kopplade till  $\beta$ -glukan. Det är därför ur ett hälsoperspektiv av intresse att behålla den molekylära integriteten av  $\beta$ -glukan i havredrycken. Inom livsmedelsproduktion har den främsta orsaken till nedbrytning av  $\beta$ -glukan kopplats till syra- eller enzymatisk nedbrytning. (Faure, et al., 2012)

##### Biotillgänglighet

Biotillgängligheten beskriver hur stor del av mikronäringsämnena i havren som är tillgängliga för absorption i tarmen. Fytinsyran, som inte till en signifikant nivå degraderas i magen, kan binda till flera olika mineraler och vitaminer och bilda komplex som blir otillgängliga för absorption. Mineralerna kan, som ovan nämnt, även binda hårt till fiber och på så sätt också



undgå absorption. Analytisk data för vitaminer och mineraler, som även kan presenteras på produktens förpackning, överensstämmer därför inte med de mängder som är tillgängliga för nedbrytning och absorption och produktens näringsvärde överskattas. (Welch, 2011)

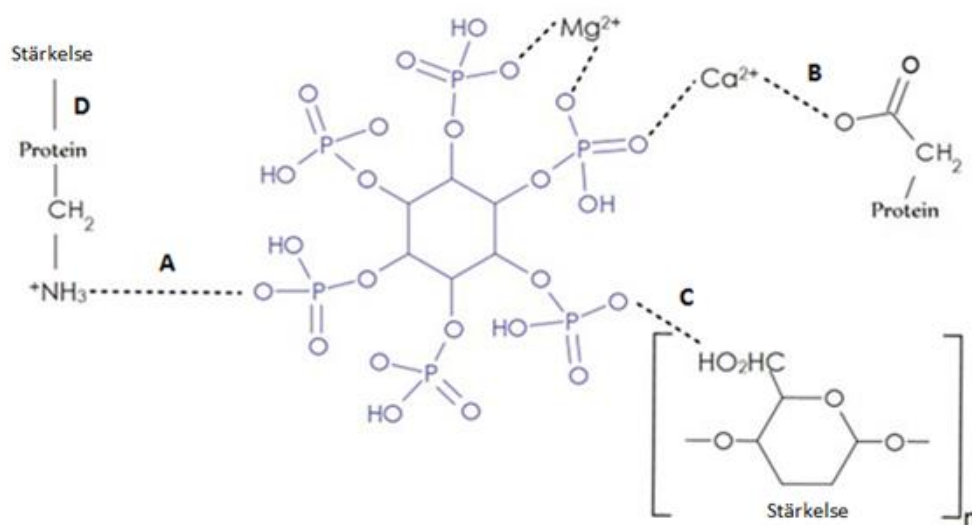
Det är frisättningen av mineraler och följaktligen en ökad biotillgänglighet av dessa som är målet i projektet. Fytinsyran som har en central roll i projektet kommer beskrivas mer utförligt i nästa avsnitt.

## 2.2 Fytinsyra

För att ge en mer detaljerad bild av molekylen och dess interaktioner presenteras fytinsyran utifrån struktur och funktionalitet samt hur den uppför sig i människokroppen.

### 2.2.1 Kemisk struktur och funktionalitet

Fytinsyra, med det systematiska namnet inositolhexafosforsyra,  $IP_6$ , är den huvudsakliga lagringsformen av fosfor i spannmål och växter och kan stå för upp till 80 % av plantans fosforinnehåll (Lopez, et al., 2002). Fytinsyran består av sex fosfatgrupper och beroende på lösningens pH bildas olika anjoner. De negativt laddade fosfatgrupper har lätt för att bilda komplex med positivt laddade joner, katjoner, till exempel mineraler. Komplexen som bildas mellan fytinsyran och jonerna kallas för fytater, möjliga inbindningar visas nedan (Figur 6). (Frontela, et al., 2011)



Figur 6. Möjliga inbindningar med fytinsyran i mitten (Cabrera-Orozco, et al., 2013).

I de flesta spannmål är omkring 90 % av fytaterna lokaliserade i aleuronlagret och endast 10 % i grodden. Under groddning bryts dessa ned av det endogena enzymet fytas. Enzymet hydrolyserar då fytinsyran till andra lägre inositolfosfater,  $IP_5$ - $IP_1$ , med lägre kapacitet att binda mineraler. Denna degradering av fytinsyran är viktig då den förser växten med fosfor och mineraljoner under tillväxtperioden. (Lopez, et al., 2002)

Fytinsyran kan även binda in proteiner och stärkelse. Protein kan bindas in antingen direkt via den positivt laddade gruppen (A i Figur 6) eller indirekt via den negativa gruppen genom en positiv laddad mineraljon (B i Figur 6). Dessa komplexbildningar tros reducera lösligheten och nedbrytningen av protein (Thompson, 1993). Stärkelsen kan bindas till fytinsyran antingen direkt via en vätebinding (C i Figur 6) eller indirekt genom ett protein som stärkelsen är kopplad till (D i Figur 6). (Cabrera-Orozco, et al., 2013)

### 2.2.2 Fytinsyra i människokroppen

Vid fysiologiskt pH är fytinsyrans fosfatgrupper negativt laddade och binder lätt in till positivt laddade komponenter så som mineraler och proteiner (Coulibaly, et al., 2011). Ett kriterium för en fungerande mineralabsorption i tunntarmen är att mineralerna befinner sig i jonform. Tarmens olika regioner absorberar mineraler olika mycket. Merparten av absorptionen sker i den övre delen av tunntarmen, duodenum. Absorptionen avtar sedan genom jejunum och

ileum och i tjocktarmen sker ingen mineralabsorption. Den begränsande närvaron av bakterier i den övre tunntarmen tillsammans med det faktum att människan, liksom andra monogastriska djur, har låg nivå av endogent fytas bidrar till att människan har svårt att tillgodose sig de mineraler som är bundna till fytinsyra (Greiner & Konietzny, 2006). (Lopez, et al., 2002)

För att upprätthålla en tillräcklig mineralbalans i kroppen är det viktigare att se till den tillgängliga mängden än till den totala mängden mineral man får i sig (Frontela, et al., 2011). Om man exempelvis ätit mycket fiberrik mat med stor halt fytinsyra finns det risk för att den mängd mineraler man fått i sig under samma måltid är otillgängligt. Vilken nivå av fosforylerad inositol, IP<sub>6</sub>-IP<sub>1</sub>, som fytinsyran befinner sig i påverkar också inbindningen till mineraler. Det är främst inositolhexafosforsyra, IP<sub>6</sub>, samt inositolpentafosforsyra, IP<sub>5</sub>, som binder in mineraler. I nutritionsstudier kopplat till mineraltillgänglighet är det därför intressant att bestämma koncentrationen IP<sub>5</sub> respektive IP<sub>6</sub>. (Chen, 2004)

Mineralbrist är vanligt förekommande i utvecklingsländer men existerar också i industriländer; ofta hos veganer, gravida kvinnor och snabbt växande barn. Mineralerna har en viktig roll i aktivering av intra- och extracellulära enzymer, i reglering av pH i kroppsvätskor och för osmotisk balans i kroppens celler. Brist av någon form av mineral kan därför resultera i allvarliga störningar och rubba cellens metabola funktion. Viktiga mineraler som har visats binda in starkt till fytinsyra är kalcium, järn och zink. Brist på dessa mineraler kan bland annat leda till järnbrist (anemi), rakitis, benskörhet och ett försämrat immunförsvar. (Lopez, et al., 2002)

Den individuella effekten av fytinsyra beror på fysiologiska faktorer så som ålder, basföda, graviditet och/eller sjukdomstillstånd (Coulibaly, et al., 2011). Med hjälp av humanstudier utförda på Göteborgs Universitet har ett riktmärke tagits fram på hur stor mängd fytinsyra som kan ingå i en portion utan att påverka järnupptaget negativt. Nivån av fytinsyra ska motsvaras av mindre än 10 mg per serverad portion, vilket motsvarar 240 ml av den aktuella havredrycken. (Eriksson, 2012)

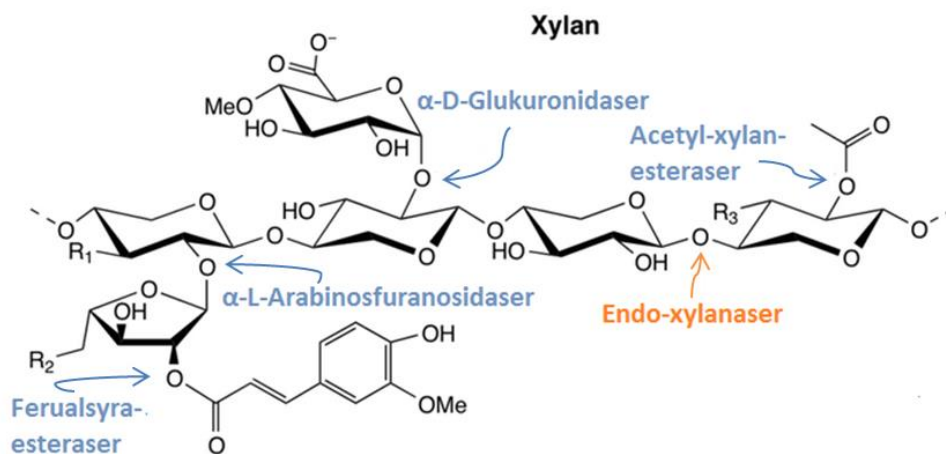
## 2.3 Enzymer

Det primära målet med projektet var att bryta ned fytinsyran i den olösliga fraktionen till den nivå som presenterades i föregående kapitel. För att uppnå det användes ett fibernedbrytande enzym, xylanas, och fytas som bryter ned fytinsyra. Förhoppningen var att uppnå en synergieffekt dem emellan. I efterföljande avsnitt presenteras de olika enzymerna mer ingående.

### 2.3.1 Xylanas

Xylanaser, med det officiella namnet endo-1,4- $\beta$ -xylanaser, upptäcktes 1955 och hade då namnet pentosanaser. De är glukosidaser som klyver ryggraden av den komplexa växtcellspolysackariden xylan genom att slumpmässigt katalysera endo-hydrolysen av 1,4- $\beta$ -D-xylosidbindningarna. Var på xylankedjan xylanaset klyver varierar, det finns dels enzymer som bara klyver vid en icke-substituerad enhet och de som kräver närvaro av en sidokedja. (Javier Pastor, et al., 2007).

Eftersom xylan är en komplex polysackarid behövs flera enzymer med olika specificiteter för en fullständig hydrolyt (Figur 7). Dessa enzymer kan delas upp i två olika grupper; de som klyver huvudkedjan av xylosheter samt de som är aktiva på sidokedjorna. En enzymbehandling med enbart xylanas ger därför bara en delvis hydrolyt av xylan. (Collins, et al., 2005)



Figur 7. Enzymer involverade i nedbrytning av xylan (van Driel, et al., 2010).

Det finns många xylanaser och de är uppdelade på olika sätt. Ett sätt att kategorisera dem är genom närvaro av kompletterande domäner såsom xylanbindande, cellulosa-bindande och även en del med okänd funktion. Andra har delat upp xylanaser i två grupper; de med låg molekylärvikt (<30 kDa) och basiskt isoelektrisk punkt samt de med en hög molekylärvikt och en sur isoelektrisk punkt. Det finns dock vissa enzymer som inte passar in i denna uppdelning. Ett tredje sätt, och det som idag har blivit standard, är klassifikationssystemet som omfattar alla glukosidaser. (Collins, et al., 2005)

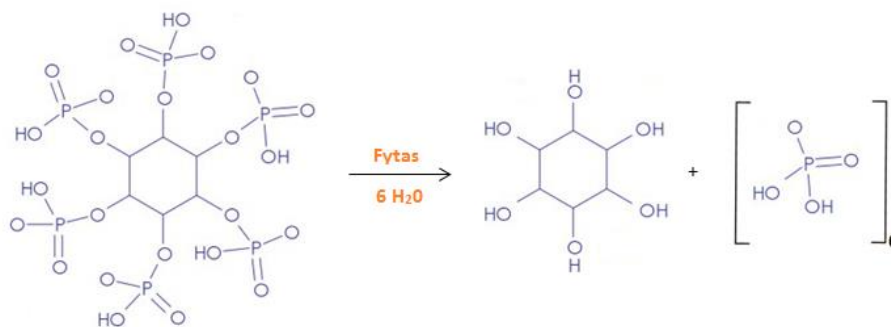
Klassifikationssystemet för glukosidaser bygger på jämförelser mellan primärstrukturen av de katalytiska domänerna och grupperar enzymer med liknande sekvenser i familjer. Klassificeringen speglar de molekylära mekanismerna av enzymerna eftersom dessa är

relaterade till den primära strukturen. Xylanaser har rapporterats tillhöra familj 10 och 11 men ett fåtal har hamnat inom familjerna 5, 7, 8 och 43. (Collins, et al., 2005)

Jämförelser av familj 10 och 11 har visat att familj 11 är mer specifik än familj 10 som verkar vara mer allsidig. Familj 10 har också visat sig ha större aktivitet på xylooligosackarider vilket indikerar på att enzymet har mindre bindningssäten. Som tidigare nämnt kan närliggande sidokedjor påverka enzymets inbindning. Familj 10 kan attackera substituerade regioner medan familj 11 uppges ha svårare för detta på grund av steriska hinder. (Javier Pastor, et al., 2007)

### 2.3.2 Fytas

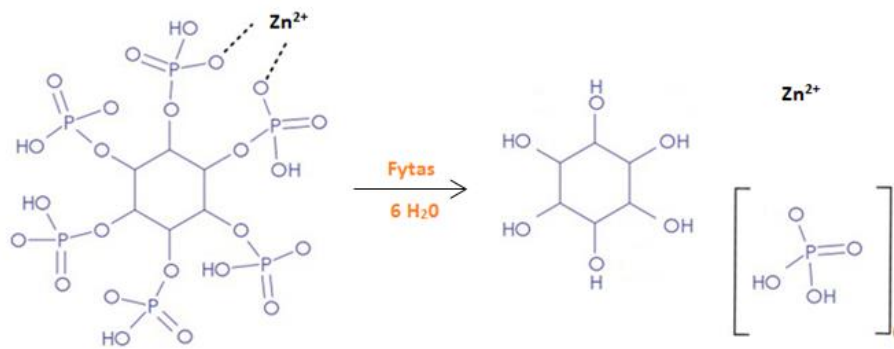
Fytas, *myo*-inositolhexakisfosfat-fosfohydrolas, har förmågan att hydrolysera fytinsyra till *myo*-inositol och *myo*-inositolfosfaterna IP<sub>5</sub>-IP<sub>1</sub>. En total hydrolysis av fytinsyra till inositol är illustrerad nedan (Figur 8).



Figur 8. Nedbrytning av fytinsyra till inositol och oorganisk fosfor med hjälp av fytas (Cabrera-Orozco, et al., 2013).

Fytas har identifierats i växter, mikroorganismer samt djurvävnad. Baserat på vilket kol som fytaserna initialt angriper i inositolringen har de blivit uppdelade i 3-fytaser, 5-fytaser och 6-fytaser, där siffran före indikerar vilket kol på ringen som angrips först. (Greiner & Konietzny, 2006)

Flera djurstudier har visat på förbättrat utnyttjande av fosfor från fytat vid tillskott av mikrobiellt fytas. Fytas har bland annat tillförts i grisfoder för att bryta ned fytatkomplex (Figur 9), och på så sätt öka tillgängligheten av fosfor och mineraler men också för att minska utsöndringen av fosfor vilket i sin tur kan ha miljömässiga konsekvenser (Oatway, et al., 2001). Djuren kan liksom människan inte bryta ner fytinsyra och fytat vilket leder till att fosfor följer med avföringen och sedan utnyttjas av jordbakterier. Den frisläppta fosfor kan då nå ytvatten och skapa problem som övergödning. (Adlercreutz, et al., 2010)



Figur 9. Nedbrytning av fytat och frisättande av joner med fytas (Cabrera-Orozco, et al., 2013).

Hos människan har studier visat att en diet rik på fytat bland annat har reducerat absorptionen av mineraler i kosten. Tillförsel av fytas i livsmedel har därför omtalats som ett möjligt sätt att öka mineralabsorptionen och skulle på så sätt kunna bli ett tillägg i konceptet Functional Foods. (Greiner & Konietzny, 2006)

Möjliga vinster med en fytasbehandling innefattar sålunda förbättrad tillgänglighet av viktiga näringsämnen, förbättrat utbyte samt minskad påverkan på miljön.

### 2.3.3 Enzymer i livsmedel

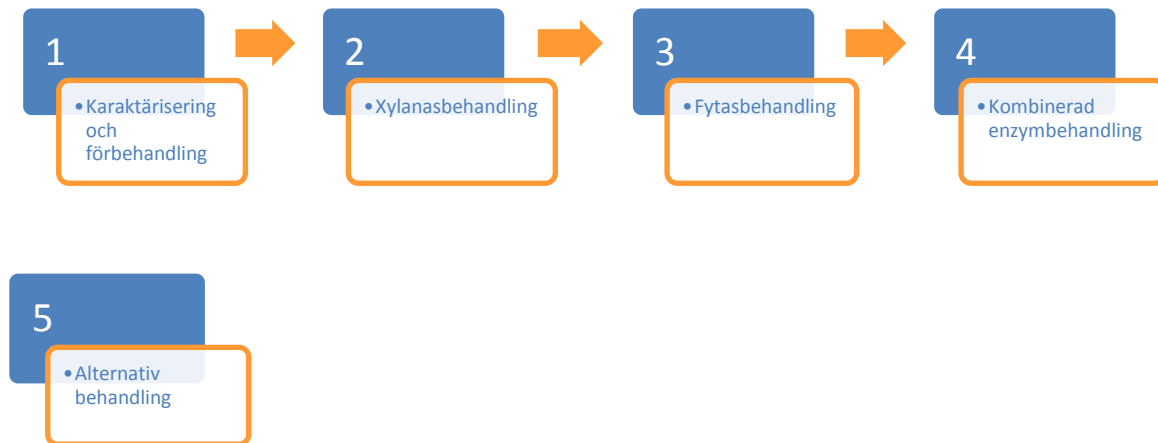
Liksom livsmedelstillsatser och aromer behöver enzymer genomgå säkerhetsbedömning innan de tillåts i livsmedel. Enzymer som används med tekniskt syfte under processen ska följa de regler som uppges i förordningen (EG) nr 1332/2008 om livsmedelsenzymer. Från vilken mikroorganism som enzymet är förberett har betydelse utifrån odlings- säkerhets- samt ekonomiskt perspektiv (Adlercreutz, et al., 2010). De enzymer som får användas i livsmedel uppges i en så kallad gemenskaphetsförteckning över livsmedelsgodkända enzymer. I denna ska uppgifter som exempelvis ursprung, renhetskriterier, lämpliga doser, livsmedel som enzymet får tillföras samt särskilda krav i fråga om märkning ha angetts. (Pöttering & Le Maire, 2008)

## 3 Försöksplan

Kapitel 3 presenterar försöksplanen med de avgränsningar som gjorts i projektet. Denna del presenterar och motiverar de moment som utfördes under projektets gång.

### 3.1 Översikt

Arbetet med att enzymatiskt bryta ned fytinsyra i Oatlys fibermaterial delades upp i fyra huvudmoment (Figur 10). Den alternativa behandlingen låg som ett parallellt spår i det laborativa arbetet.



Figur 10. Huvudmoment i laborationsarbetet.

Som första steg i processen utfördes olika karaktäriseringsförsök samtidigt som fibermaterialen förbehandlades. Därefter studerades och optimerades xylanasbehandlingen och senare fytasbehandlingen. Slutligen studerades en kombinerad enzymbehandling för att analysera och utvärdera eventuella synergieffekter. Det parallella steget innefattar analys och utvärdering av havre som genomgått en alternativ behandling i form av groddning. Ett detaljerat tillvägagångssätt presenteras i efterföljande avsnitt.

### 3.2 Steg 1 - Karaktärisering och förbehandling

Olika karaktäriseringsförsök gjordes på fibermaterialen och enzymerna med syfte att få en detaljerad bild av det material som skulle komma att behandlas. Fibermaterialen förbehandlades för att skapa ett homogent material och på så sätt öka reproducerbarheten.

#### 3.2.2 Fibermaterial

Inledningsvis bestämdes ask- och vatteninnehåll i fibermaterialen. Därefter förbehandlades fibermaterialen genom frystorkning och malning. Eftersom den malningsteknik som skulle vara aktuell i Oatlys produktion inte går att utföra på ett reproducerbart sätt på laboratoriet utvärderades eller optimerades inte malningens påverkan inom projektet.

Fytinsyrainnehållet i det förbehandlade fibermaterialen bestämdes. En fytinsyraanalys, egentligen total fosforanalys, utfördes på laboratoriet men fibermaterialen skickades även iväg för en analys specifik för fytinsyra med hjälp av HPIC – high-performance ion chromatography på Chalmers, Göteborg. Fibermaterialens mineral- och proteininnehåll bestämdes för att möjliggöra utvärdering av hur stor andel som kommit ut i lösning efter framtida enzymbehandlingar.

En monosockeranalys utfördes på det malda fibermaterialet för att karaktärisera kolhydratinnehållet. Ur detta resultat kunde mängden AX i fibermaterialet bestämmas genom xylos och arabinosinnehållet.

### 3.2.2 Enzymer

Arbetet med att karaktärisera tillhandahållna enzymer påbörjades med koncentrations- och renhetsbestämningar. Därefter undersöktes stabilitet och aktivitet inom aktuella tids- och temperaturintervall. Dessa analyser utfördes på ren fytinsyra för fytaserna och på rent AX från havre för xylanaset. Stabilitetstestet för xylanaset låg till grund för de processparametrar som användes i efterföljande enzymbehandlingar. Eftersom enzymerna i Oatlys produktion inte tillåts ha någon  $\beta$ -glukannedbrytande sidoeffekt undersöktes aktiviteten på  $\beta$ -glukan för xylanaset som erhöles från Oatly.

Under karaktäriseringsförsöken genomfördes även en oligosackaridanalys på enzymbehandlat AX från havre för att erhålla xylanasets hydrolyprofilen. Syftet var att karaktärisera hur xylanaset arbetar på rent AX och analysen visade vilka xylooligosackarider, X1-X5, som erhöles efter xylanasbehandling.

Försöksplaneringen inkluderade en hydrolyprofilanalys av fytaserna för att erhålla vilka produkter, IP<sub>1</sub>-IP<sub>5</sub> som erhöles vid nedbrytning med respektive fytas.

### 3.3 Steg 2 - Xylanasbehandling

Efter att karaktäriseringsförsöken utförts påbörjades arbetet med att studera xylanasbehandlingen för att uppnå optimal aktivitet av xylanaset på fibermaterialet. Optimal koncentration xylanaset bestämdes utifrån hydrolyprofilen på fibermaterialet erhållen genom en oligosackaridanalys av den lösliga fraktionen. Relationen mellan oligosackarider, X1-X5, låg som grund till koncentrationsbestämningen. En monosockeranalys genomfördes också på den lösliga fraktionen efter för att få ett kvantitativt mått på hur stor del AX som brutits ned och gått ut i lösning.

### 3.4 Steg 3 - Fytasbehandling

Fytasbehandlingen studerades för att uppnå optimal aktivitet av fytaserna på fibermaterialet. De optimala koncentrationerna bestämdes utifrån mängd nedbruten fytinsyra, mätt i form av fosforkoncentrationen i den lösliga fraktionen efter enzymbehandlingen.

För att inte utesluta om någon annan temperatur än den för xylanaset optimala var mer fördelaktig för fytaserna studerades deras aktivitet under olika temperaturer inom aktuellt intervall.

### 3.5 Steg 4 - Kombinerad enzymbehandling

Den kombinerade enzymbehandlingen genomfördes för att avgöra om nedbrytningen av AX till oligosackarider har någon påverkan på fytasbehandlingen. Xylanaset som erhöles från Oatly och optimerats koncentrationsmässigt i xylanasbehandlingen kombinerades med fytaserna som undersökts i fytasbehandlingen. Hur väl enzymbehandlingarna fungerat bedömdes genom att mäta fosforkoncentrationen i den lösliga fraktionen, precis som i fytasbehandlingen. De mest intressanta proverna skickades iväg till Göteborg för specifik fytinsyraanalys. De senare nämnda proven utvärderades även utifrån protein- och mineralinnehåll i de lösliga fraktionerna.



### 3.6 Steg 5 - Alternativ behandling

Den studerade behandlingen med syfte att bryta ner fytinsyra baseras på tillsatts av enzymer. En alternativ behandling med samma syfte fast utan tillsatts av enzymer eller andra ämnen utvärderades även inom projektet. Den alternativa behandlingen bestod av groddning. Fytinsyran i havre befinner sig i form av fytater, bundna med mineral och protein (2.2 Fytinsyra). Dessa fytater bryts ner under groddning av ett endogent fytas och tillgängliggör således viktiga näringsämnen för tillväxt. Förhoppningen var att groddade havrekärnor skulle ha ett lägre fytinsyrainnehåll och följaktligen fler lösliga mineraler och proteiner, och därmed vara ett alternativ till att tillsätta enzymer.

Icke groddade samt groddade havrekärnor från en potentiell leverantör av havre till Oatly undersöktes. För att analysera groddningens effekt analyserades fytinsyrainnehållet i havrekärnorna samt mineral- och proteininnehållet i den lösliga fraktionen. Koncentrationen av fytinsyra erhöles med hjälp av HPIC – high-performance ion chromatography på Chalmers, Göteborg.

### 3.7 Avgränsningar

I samband med att Oatly utfört malningsstudier har slutsatser dragits att utbytet ökar betydligt om provet mals i någon form. Däremot har det visat sig vara svårt att separera alltför finmalda prov och utrustningen har då kommit att ha stor betydelse (Eriksson, 2011). Separatorers kapacitet kopplat till partikelstorlek på havrefibrerna är med andra ord intressanta parametrar att studera. Men på grund av tidsramen på 20 veckor och begränsad tillgång av utrustning togs beslutet att inte studera malningen ingående. Malning med liten partikelstorlek utfördes med hjälp av den utrustning som fanns tillgänglig på Kemacentrum.

Avgränsningar i det studerade parametrarna för enzymbehandlingarna gjordes efter intervall som är lämpliga i den befintliga produktionsprocessen hos Oatly. De processparametrar som var av intresse att titta på var temperatur, tid och koncentration av enzym. Oatlys processparametrar begränsar enzymbehandlingens till temperaturintervallet 50-60°C och tidsintervallet 60-120 minuter. pH är fast och bestäms av kranvattnet.

För att efterlikna den lösliga fraktionen till vilken det behandlade materialet ska återvända (Figur 1) gjordes alla enzymbehandlingar på fiberprov med 6 % torrs substans. Kranvatten används i produktionen i Landskrona och därför användes kranvatten vid uppblandningen.

Oatly har tidigare utfört studier med flera fytas och dessa användes vidare i projektet. Däremot hade företaget endast ett xylanas i sin kännedom som uppfyllde Oatlys krav på enzymer. Antalet studerade enzymer, som skulle kunna bli en del av Oatlys process, avgränsades därför till tre fytaser samt ett xylanas. De enzymer som undersöktes i projektet var tvungna att uppfylla Oatlys krav på enzymer för att möjliggöra närvaro i produktionsprocessen. Följande tre krav gällde:

1. Livsmedelsgodkänt, så kallat Food Grade
2. Ej genmodifierat, GMO
3. Ingen  $\beta$ -glukannedbrytande sidoeffekt

Förutom att man i Oatlys process vill skydda  $\beta$ -glukanerna från enzymatisk nedbrytning vill man undvika att produkten xylos, X1, erhålls vid nedbrytning av AX med xylanas. Xylos, monosockerenheten som bygger upp huvudkedjan av AX, kan till skillnad från

xylooligosackarider tas upp av kroppen och bidrar därmed inte till önskvärd prebiotisk effekt. Xylos är dessutom inte selektiv för probiotiska bakterier utan kan utnyttjas av alla sorters bakterier. Väl i kroppen metaboliseras inte xylos som exempelvis glukos utan lämnar via njurarna (Helmer & Fouts, 1936).

## 4 Material och metod

### 4.1 Material och förbehandling

*I denna del presenteras materialet i projektet samt hur det förbehandlats.*

#### 4.1.1 Fibermaterial

Fibermaterial som behandlades i projektet togs från den olösliga fraktionen som separerats bort i Oatlys nuvarande produktionsprocess (Figur 1) den 27 februari 2013.

##### 4.1.1.1 Frystorkning

Fibermaterial förvarades i kylrum, 4°C, i en vecka innan det frystorkades. Två rundkolvar fylldes med fibermaterial och placerades i frysen, -20°C, i 90 min. Därefter fästes rundkolvarna på frystorken Labconco Freeze Dryer System, LYPH LOCK 12 med EDWARDS XDS 10 oljefri pump (Figur 11) och torkades under två dygn.



Figur 11. Frystork och torkat fibermaterial.

##### 4.1.1.2 Malning

Malningen utfördes på avdelningen för Tillämpad Näringslära på Lunds Tekniska Högskola. En bordskvarn, modell CYCLOTEC 1093 Sample mill från FOSS TECATOR (Figur 12) användes med ett filter med storlek 1 mm. Efter malningen frystorkades det malda materialet enligt ovan.



Figur 12. Bordskvarn, CYCLOTEC 1093 Sample mill från FOSS TECATOR.

### 4.1.2 Enzymer

Två xylanas och tre fytaser studerades under arbetets gång (Tabell 4 och Tabell 5).

Tabell 4. Xylanaserna i projektet.

Xylanaser	Benämning	Fysisk form	Angiven aktivitet från producenten (FXU-W/g*)	EC nummer
Pentopan <sup>®</sup> Mono Conc. BG	Xylanas 1	Pulver	60 000	3.2.1.8
Xyn1 från <i>Rhodothermus marinus</i>	Xylanas 2	Lösning	-	3.2.1.8

\* Enheten FXU-W/g definieras som hur många  $\mu\text{mol}$  av reducerat socker, xylos ekvivalenter, multiplicerat med 7,8 som frigörs från arabinoxylan från vete av ett gram enzym per minut under 30 minuter vid 50 °C och pH 6,0 (Shrestha, 2012).

Tabell 5. Fytaserna i projektet.

Fytaser	Benämning	Fysisk form	Angiven aktivitet från producenten (FTU/g*)	EC nummer
Phytase <sup>®</sup> 5000 L	Fytas 1	Lösning	5750	3.1.3
Quantum <sup>™</sup> TR 5000 L	Fytas 2	Lösning	5000	3.1.3.26
Sternzym PHY 21097	Fytas 3	Pulver	2000	3.1.3.26

\* Enheten FTU/g definieras som hur många  $\mu\text{mol}$  oorganiskt fosfat som frigörs av ett gram enzym per minut vid 37 °C och pH 5,5 under testförhållandena (DSM Food Specialities B.V., 2010).

Enzymerna i pulverform löstes upp i buffert till en koncentration av 10 mg/ml. Alla enzymer centrifugerades vid 4000 rpm i 10 minuter, löslig fraktion användes som stamlösning. Alla spädningar som har gjorts av enzymerna under försöken har skett med buffert. I de inledande karaktäriseringsförsöken samt xylanasbehandlingen användes en citratfosfat buffert, 50 mM, pH 6, därefter användes en natriumacetat buffert, 0,1 M, pH 5,5.

### 4.1.3 Havregroddar

Fyra olika typer av havrekorn erhöles av Oatly. En typ var icke groddad medan de andra tre hade groddats olika länge. Värmebehandling hade utförts på alla havrekärnorna för att motverka härskning då havren innehåller lipas. Groddningstekniken är inte känd. (Eriksson, 2013)

Alla kornen skalades och kärnorna sparades (Figur 13). Därefter maldes havrekärnorna på samma sätt som fibermaterialet. För att erhålla löslig fraktion blandades de malda havrekärnorna med vatten till en torrs substans av 6 %, och inkuberades i 38°C i 120 minuter innan den lösliga fraktionen separerades efter sedimentering och centrifugering.



Figur 13. Icke groddat samt tre groddade havrekärnor.

### 4.1.4 Vatten

Kranvattnet på Kemicentrum i Lund användes i projektet.

## 4.2 Utrustning och analysmetoder

I denna del beskrivs principen och utförandet av alla delmoment under projektets gång.

### 4.2.1 Enzymbehandlingar

Inför alla enzymbehandlingar vägdes det malda fibermaterialet upp och kranvatten tillsattes till en torrs substans av 6 %. Därefter tillsattes enzymerna. Proverna inkuberades i en Thermoshaker model MKR 13 från HLC BioTech med en hastighet på 600 rpm. Efter inkuberingen höjdes temperaturen till 99°C i fem minuter för inaktivering av enzymerna. Proverna fick därefter svalna innan de centrifugerades och den lösliga fraktionen separerades.

### 4.2.2 Torrsubstansanalys

Torrsubstansanalysen utfördes enligt protokoll NREL/TP-510-42621 – "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples" (Sluiter, et al., 2008). Tre prover vägdes upp i en aluminiumform och torkades i 105°C över natt i en G Therm Thermostatic ugn. Vatteninnehållet för proven bestämdes genom att beräkna viktförlusten under torkning. Medelvärde och standardavvikelse beräknades i Excel.

### 4.2.3 Askinnehåll

Bestämningen av aska utfördes enligt protokoll NREL/TP-510-42622 – "Determination of Ash in Biomass" (Sluiter, et al., 2005). De tre torkade proven som använts i torrsubstansanalysen placerades i 120 min i en Nabertherm ugn modell LVT9/11/B180 i 505 °C. Efter en timmes nedkyllning vägdes det kvarvarande materialet, askan. Medelvärde och standardavvikelse beräknades i Excel.

### 4.2.2 BCA-metoden

Koncentrationsbestämningen utfördes enligt "Analysis Procedure" i protokollet för "Total Protein Determination (BCA - method)" i laborationshäftet erhållet i kursen Bioprosessteknik, kurskod KBT115, på Lunds tekniska högskola 2010 (Wennerberg, et al., 2010). Protokollet följer "Protein Determination by the Bicinchoninic Acid (BCA) Method" enligt SIGMA-ALDRICH. Medelvärde, från standardkurva, och standardavvikelse beräknades i Excel.

BCA-metoden bygger på en kolorimetrisk reaktion mellan en blandning av  $\text{BCA}/\text{CuSO}_4$ , bichinchoninic syra samt kopparsulfat, och protein i alkaliskt medium. Proteinerna bildar komplex med  $\text{Cu}^{2+}$  joner vilka under alkaliska förhållanden reduceras till  $\text{Cu}^{1+}$  joner. BCA bildar därefter ett lila komplex med  $\text{Cu}^+$  jonerna. Absorbansen vid 562 nm är proportionell mot den totala proteinkoncentrationen och kan därmed bestämmas med hjälp av en kalibreringskurva erhållen från en standard med känd proteinkoncentration från bovint serum albumin, BSA.

### 4.2.3 SDS-PAGE

Renhetsbedömning av enzymerna utfördes genom proteinseparationen, SDS-PAGE, på en färdiggjuten 12 % akrylamidgel, Mini-PROTEAN® TGX™ cat# 456-1043 från BIO-RAD. Fytaserna späddes 1:1 och Xylanas 1 1:2 med provbuffert innan laddning. En molekylviktsstandard, Precision Plus Protein™ Standards Unstained cat# 161-0363 från BIO-RAD laddades bredvid enzymerna. Körningen utfördes i enlighet med protokoll från samma laborationshäfte som för BCA-metoden med undantag att spänningen var 100 V i 120 min.

Principen för SDS-PAGE, eller egentligen natriumlaurylsulfat polyakrylamidgelelektrofores, är att separera denaturerade proteiner utifrån storlek med hjälp av spänning. Spänning drar proteinerna genom gelen och de stora proteinerna vandrar långsammare än de små. Molekylvikten bestäms genom att jämföra de erhållna banden med en markör för molekyylvikt.

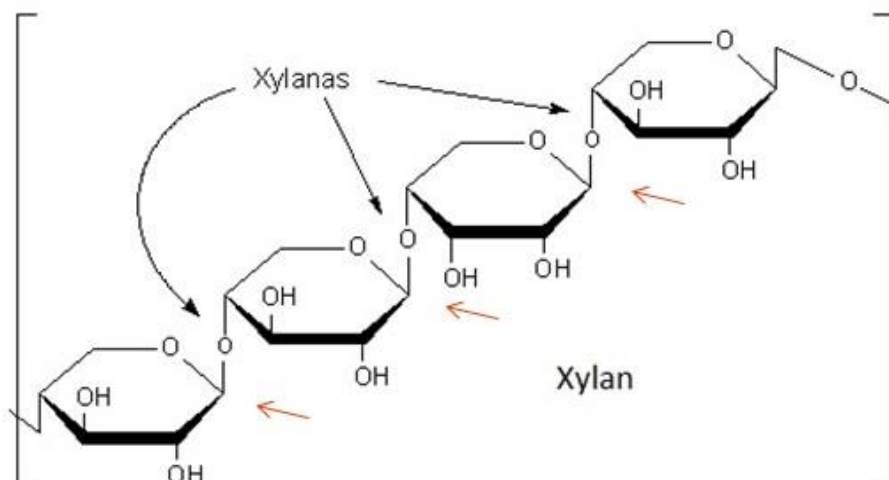
#### 4.2.4 DNS-metoden

Aktivitetsbestämningar av xylanaserna är gjorda genom DNS-metoden där koncentration reducerat socker mäts genom en kolorimetrisk reaktion med DNS.

I utförandet av metoden blandades 40 µl av substrat, 1 % AX (Oat Spelts cat# 9014-63-5) från Sigma) respektive 1 % β-glukan (Oat; Medium Viscosity från Megazyme) med 20 µl av respektive xylanasa samt med en standardserie med xylos respektive glukos i intervallet 0-50 mM. Därefter inkuberades det i 10 minuter. För Xylanasa 1 var inkubationstemperaturen 70°C och för Xylanasa 2 60°C. Därefter tillsattes 100 µl DNS och allt mixades väl innan det inkuberades vid 99°C i fem minuter. Reagensen förbereddes enligt Vliet & Muller (1968). Efter nedkyllning mättes absorbansen vid 550 nm. Medelvärdet, från standardkurva, och standardavvikelse beräknades i Excel.

DNS-metoden utnyttjades även för stabilitetsundersökning av xylanaserna. Värmebehandling av Xylanasa 1 inför DNS-analysen skedde i en PCR maskin med temperaturgradient, THERMOGRADIENT från Biometra vid 50, 54,4 och 60°C. Värmebehandlingen av Xylanasa 2 skedde i ett värmeblock på 60°C.

När bindningen mellan två sackarider i en polysackarid bryts bildas en fri karbonylgrupp, en så kallad reducerande ände. Lokaliseringen av de reducerande ändarna då xylanasa bryter ned xylan är illustrerad nedan (Figur 14). DNS, 3,5-dinitrosalicylic syra reagerar med karbonylgruppen och oxiderar dessa till ketongrupper samtidigt som DNS reduceras till 3-amino-5-nitrosalicylic syra som har en röd färg. Intensiteten på färgen är proportionell mot koncentrationen 3-amino-5-nitrosalicylic syra och därmed även koncentrationen av reducerande ändrar som indikerar aktiviteten på nedbrytning av polysackariden. (Wang, u.d.) (van Vliet & Muller, 1968)



Figur 14. De röda pilarna visar var de reducerande ändarna bildas när xylanasa arbetar på xylan (Goldman, 2009).

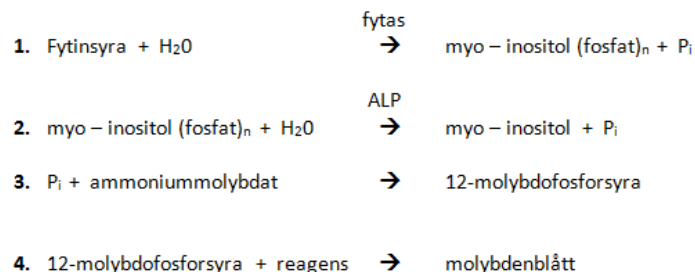
#### 4.2.5 Fytinsyra/Total fosforanalys

Bestämning av total fosfor genomfördes med Megazyme kitet ”*Phytic acid/total phosphorus – cat# K-PHYT*” (Megazyme, 2007). Protokollet till den totala fosforanalysen efterföljdes helt vid bestämningen av fytinsyra/total fosfor i fibermaterialet.

Metoden för bestämning av total fosfor enligt det ovan nämnda Megazyme kitet är en snabb metod som inkluderar tillsatts av två enzymer som bryter ned inositolfosfater,  $IP_6$ - $IP_1$ . Koncentrationen fytinsyra/total fosfor i provet bestäms genom att ta reda på skillnaden på koncentrationen fosfor i ett prov behandlat med dessa enzymer samt ett prov utan enzymatisk behandling.

Metoden inkluderar en syraextraktion av inositolfosfater i provet. Det extraherade provet neutraliseras och delas upp i två; ett som följs av enzymer och ett som inte enzymbehandlas. Det första följs av tillsatts av ett fytas specifikt för  $IP_6$ - $IP_1$ . Efter denna fytasbehandling tillsätts ett alkaliskt fosfatas som är specifikt för  $IP_1$ . Då  $IP_1$  kan vara svårt för fytaset att bryta ned försäkras således det alkaliska fosfataset att all  $IP_1$  har hydrolyserats. Koncentrationen fri fosfor i de två olika proven mäts slutligen genom kolorimetrisk reaktion. Skillnaden mellan proven ger på så sätt ett mått på den totala mängden fosfor som frisatts av den enzymatiska nedbrytningen och som således befunnit sig i någon form av inositolfosfat i det ursprungliga provet.

Den kolorimetriska metoden bygger på att ammoniummolybdat reagerar med fritt fosfor (Steg 3 i Figur 15). Den bildade 12-molybdofosforsyra reagerar sedan med ett reagens bestående av svavelsyra och askorbinsyra,  $H_2SO_4$  och  $C_6H_4O_2(OH)_4$ , och bildar molybdenblått (Steg 4 i Figur 15). Absorbansen vid 655 är proportionell mot koncentrationen fosfor och kan beräknas med hjälp av en standard med givna fosforkoncentrationer.



Figur 15. Princip för Megazymes *Phytic acid/Total phosphorus*.

#### 4.2.6 Fri fosforanalys

För att få ett mått på effektiviteten av respektive studerad enzymbehandling samt utvärdera stabilitetstesterna av fytaserna utnyttjades delar av protokollet från Megazyme kitet ”*Phytic acid/total phosphorus – cat# K-PHYT*” (Megazyme, 2007). De lösliga fraktionerna från enzymbehandlingarna och stabilitetstesterna användes som provextrakt och utförandet startades från punkt B. *Enzymatic dephosphorylation reaction* i protokollet. Därefter följdes endast kolumnen för fri fosfor dvs. ingen tillsats av Megazyme kitets egna IP-nedbrytande enzymer utfördes. Koncentrationen fri fosfor bestämdes slutligen genom samma kolorimetriska reaktion som för fytinsyra/total fosforanalys. Denna koncentration användes sedan i jämförelsesyfte för att utvärdera behandlingarna. Medelvärde, från standardkurva, och standardavvikelse beräknades i Excel.

Vid stabilitetstesterna för fytaserna skedde värmebehandling i ett värmeblock vid 60°C i 120 min. Fytaserna inkuberades med dikaliumfytat, *cat# P5681* från Sigma, med en koncentration på 10 mg/ml i värmeblock vid 60°C i 10 minuter innan fosforanalysen utfördes på löslig fraktion som beskrivet i föregående text.

#### 4.2.7 Saeman hydrolysis

Saeman hydrolysen, där polymera sackarider bryts ned till respektive monosockerenhet utfördes enligt protokoll NREL/TP-510-42618 – "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass" (Sluiter, et al., 2011). Då lösliga prover användes startade hydrolysen vid steg 10.1.6. En standard med en koncentration på 20 µM av monosocker behandlades parallellt med proven för att i monosockeranalysen se hur stor del av monosockerenheterna som under syrabehandlingen förstörts, detta värde används som korrigeringsfaktor efter monosockeranalysen av proven.

Metoden bygger på extraktion och hydrolysis av polymera sackarider genom behandling med saltsyra och värme.

#### 4.2.8 Monosockeranalys

Monosockeranalysen genomfördes genom separation och detektion av olika monosocker med Dionex-tekniken som utgörs av High-Performance Anion Exchange Chromatography med Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD. Metoden separerar och detekterar anjoner med en anjonbytare vilka sedan identifieras och kvantifieras med hjälp av en standard. Monosockerenheterna arabinos, galaktos, glukos, xylos, fruktos och mannos ingick i standarden med koncentrationer mellan 1-20 µg/ml. CarboPac PA20 kolonnen användes för monosockeranalysen. Analysen genomfördes efter filtrering av proven med ett filter på 0,2 µm. Medelvärde och standardavvikelse beräknades i Excel. (Stehlin & Pettersson, 2009)

#### 4.2.9 Oligosackaridanalys

Oligosackaridanalysen genomfördes genom separation och detektion av oligosackarider med Dionex-tekniken som utgörs av High-Performance Anion Exchange Chromatography med Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD. Metoden separerar och detekterar anjoner med en anjonbytare vilka sedan identifieras och kvantifieras med hjälp av en standard (Stehlin & Pettersson, 2009). Xylooligosackariderna X1 till X5 ingick i standarden med koncentrationer mellan 0-20 µM. CarboPac PA200 kolonnen användes för oligosackaridanalysen. Analysen genomfördes efter filtrering av proven med ett filter på 0,2 µm. Medelvärde och standardavvikelse beräknades i Excel.

#### 4.2.10 Mineralanalys

Mineralanalysen utfördes av personal på Växtekologens laboratorium på Biologiska institutionen på Lunds Universitet genom Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES. Analysen bygger på att excitera atomer vilka emitterar ljus med en, för respektive ämne, karaktäristisk våglängd som därefter detekteras (Manning & Grow, 1997).

#### 4.2.11 Proteinanalys

Dumas-metoden utfördes med hjälp av utrustning på avdelningen för Tillämpad Näringslära på Lunds Tekniska Högskola. Dumas-metoden mäter liksom Kjehldal-metoden mängden kväve vilken sedan korreleras, med hjälp av en korrelationsfaktor, till total mängd protein. Fördelen med Dumas-metoden är att den är snabbare.



#### 4.2.12 Specifik fytinsyraanalys

Den specifika fytinsyraanalysen utfördes av personal vid Kemi- och Bioteknik, Livsmedelsvetenskap på Chalmers Tekniska Högskola i Göteborg där man har utvecklat en metod för bestämning av fytinsyra, det vill säga specifikt för inositolformen IP<sub>6</sub>. Metoden bygger på high-performance ion chromatography, HPIC och detektionsgränsen för analysen är 5 µM. (Carlsson, et al., 2001)

## 5 Resultat och diskussion

Alla resultat där flera mätningar gjorts på samma prov anges med medelvärdet  $\pm$  en standardavvikelse. Felstaplarna i diagrammen representerar standardavvikelse. Försöken i projektet har inte inbringat tillräcklig datamängd för fullvärdiga statistiska analyser och således har ingen signifikans påvisats. Resultatet har däremot analyserats och tolkats vilket presenteras med en sammanhängande diskussionsdel.

### 5.1 Karaktärisering och förbehandling

#### 5.1.1 Fiber materialet

Karaktäriseringen av materialet började med aska- och torrsubstansanalys, därefter frystorkades och maldes fiber materialet. Förbehandlingen av fiber materialet genomfördes för att erhålla ett homogent material.

Fiber materialet hade ett vatteninnehåll på  $36,8 \pm 0,2$  vikt%. Askinnehållet bestämdes till  $8,61 \pm 0,10$  vikt% av torrsubstansen. Det frystorkade fiber materialet blev en aning hårt och det bildades några klumpar som var svåra att få isär. I övrigt såg fibrerna ut att vara helt torra. Resultatet från torrsubstansanalysen användes här för att verifiera att fiber materialet blev helt torrt vid frystorkningen. Den frystorkade havren maldes och eftersom det malda fiber materialet drog till sig en del fukt torkades det därför ytterligare en omgång i frystorken. Fiber materialet innan och efter malning visas nedan (Figur 16).



Figur 16. Frystorkat fiber material, före respektive efter malning.

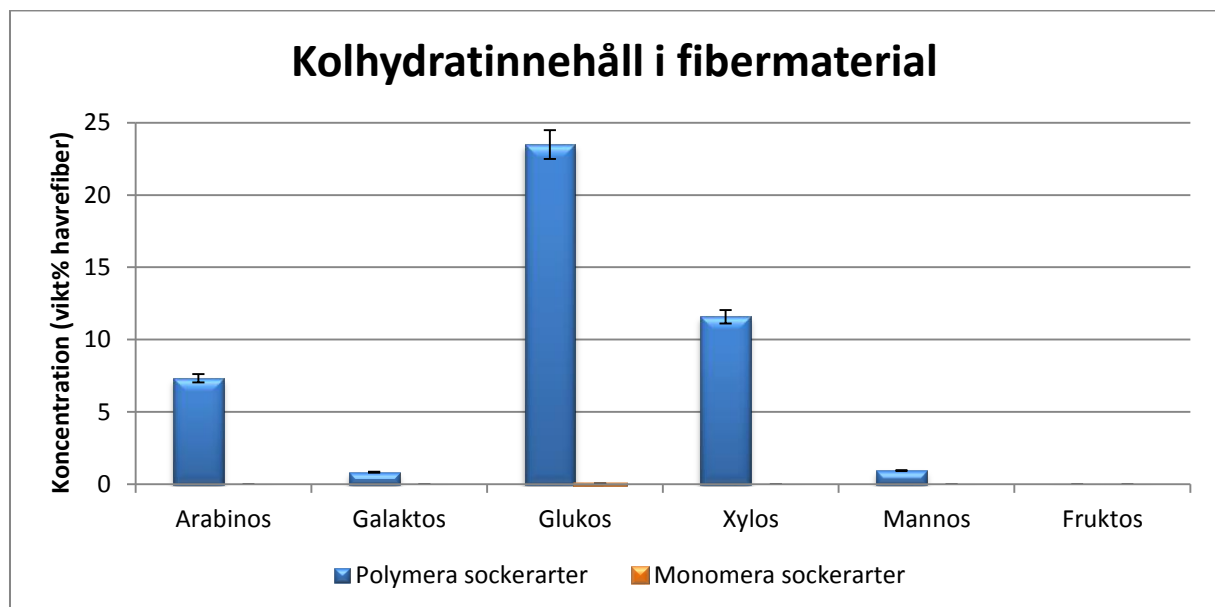
Efter frystorkning och malning skickades fiber materialet iväg för analys av total mängd proteiner, kalcium, järn, zink och fytinsyra, IP<sub>6</sub> (Tabell 6).

Tabell 6. Erhållna resultat från protein-, mineral- och fytinsyraanalys.

Analysat	Mängd (vikt%)
Protein	22,9
Kalcium	0,441
Järn	0,024
Zink	0,016
Fytinsyra, IP <sub>6</sub>	3,69

Koncentration kalcium, järn och zink i det bortseparerade fibermaterialet är större än den av Welch (2011) angivna som presenterats tidigare (2.1.2 Näringsinnehåll). Detsamma gäller för proteinerna. Detta tyder på att stor del av dessa näringsämnen följer med det bortseparerade fibermaterialet och går förlorat i den befintliga produktionsprocessen. Den bestämda mängden fytinsyra, IP<sub>6</sub>, jämfördes med en studie i vilken bestämningen av fytinsyra hade genomförts enligt Wheeler och Ferrel metoden med utfällning av järn (Lolas, et al., 1976). I studien hade mängden fytinsyra bestämts hos 19 olika sorter av havre, vilka låg mellan 0,79–1,01 vikt%. Detta visar på att halten av fytinsyra, liksom proteiner och mineraler, är betydligt större i fibermaterialet än i rent havre. Det tyder på att proteiner, mineraler och fytinsyra till stor del är bundna till olösliga fibrer.

Kolhydratinnehållet i fibermaterialet analyserades genom att fiberprovet behandlades genom Saeman hydrolys följt av en monosockeranalys (Figur 17). Den lösliga delen analyserades med monosockeranalys utan Saeman hydrolys för att detektera monomera sockerarter i fiberprovet.



Figur 17. Kolhydratinnehåll i fibermaterialet. Diagrammet illustrerar mängden av respektive sockerart i polymer- och monomerform i fibermaterialet.

Fibermaterialets väldigt lilla innehåll av monomera glukosmolekyler (orange stapel) tros komma från den tidigare enzymbehandlingen med amylas. Amylas bryter ned stärkelse som är en polymer av glukos. Den stora mängden glukos i polymer form antas komma från cellulosa, stärkelse och  $\beta$ -glukan i fibermaterialet.

De två sockerarterna xylos och arabinos är huvudbyggstenarna i polysackariden AX. Med utgångspunkten att alla xylos- och arabinosenheter finns i AX, är detta substituerat med  $0,663 \pm 0,036$  arabinosenheter per xylosenhet. Förhållandet mellan arabinos och xylos i fibermaterialet stämmer överens med de siffror som presenteras av Welch (2011) för monosockerinnehållet från olösliga, icke-stärkelse polysackarider där förhållandet var 0,70 mellan sockerarterna. Welch (2011) rapporterar små mängder av galaktos och mannos vilket överensstämmer med det erhållna resultatet. Andelen glukos i monosockerinnehållet av icke-stärkelse polysackarider var 35 % i Welch rapport vilket är en mindre andel än vad som detekterades i fibermaterialet. Detta tros bero på att en del lösliga  $\beta$ -glukaner hamnat i

fibermaterialet efter separationen i Oatlys process. Vid uppblandning av fibermaterialet i vatten bildas ett grumligt skikt med högre viskositet som tros vara lösliga  $\beta$ -glukaner (Figur 19). Efter frystorkning av samma prov kvarstår ett lager från den lösliga fraktionen som tros vara kolhydrater (Figur 18).  $\beta$ -glukans höga viskositet i vattenlösning skulle kunna vara en orsak till att en del lösliga fibrer separerats bort i den process som tillämpas på Oatly. En del av glukosen i den olösliga fraktionen skulle möjligen kunna komma från stärkelse, detta är dock mindre troligt då nedbrytningen med amylas resulterar i korta och lösliga oligosackarider.



Figur 19. Ett prov med i 6 % fibermaterial efter inkubering i 60°C i 120 minuter och sedimentering.



Figur 18. Ett prov med i 6 % fibermaterial efter inkubering i 60°C i 120 minuter, sedimentering och frystorkning

Den bestämda substansmängden polymera xylosheter i fibermaterialet likställs hädanefter med substansmängden AX i materialet för vidare beräkningar inför xylanasbehandlingen eftersom det aktuella xylanaset arbetar specifikt på xyloskedjan som bygger upp AX (Figur 7).

## 5.1.2 Enzymer

För att ta reda på hur stor andel enzym som de erhållna pulverenzymerna samt enzymlösningarna innehöll utfördes en BCA-analys, dvs. en analys av proteininnehållet, följt av en analys av renheten av proteinerna. Därefter studerades enzymernas stabilitet inom de aktuella temperatur- och tidsintervallen.

### 5.1.2.1 Proteininnehåll

Genom BCA-metoden bestämdes proteinhalten i de erhållna enzymerna (Tabell 7).

Tabell 7. Resultatet från bestämning av proteinhalten i enzymerna genom BCA metoden.

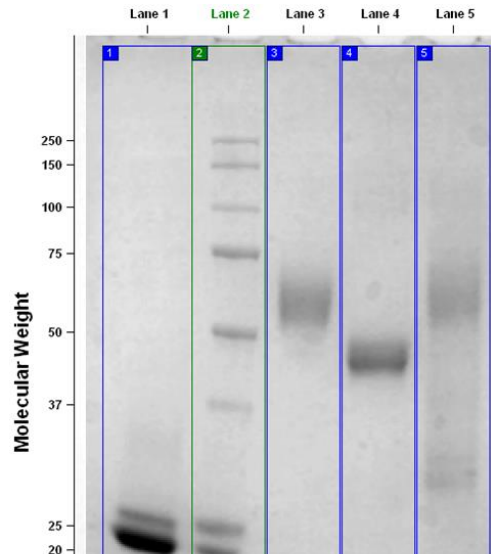
Enzym	Fysiskt tillstånd	Koncentration
Xylanas 1	Pulver	32,3 ± 0,0 vikt%
Fytas 1	Vätska	54,3 ± 3,8 mg/ml
Fytas 2	Vätska	7,4 ± 0,2 mg/ml
Fytas 3	Pulver	60,3 ± 0,0 vikt%

### 5.1.2.2 Renhet

Renheten och även molekylvikten på de erhållna enzymerna uppskattades genom SDS-PAGE (Tabell 8 och Figur 20).

Tabell 8. Molekylvikt och renhet av enzymerna från SDS-PAGE.

Enzym	Molekylvikt (kDa)	Renhet (%)
Xylanas 1	27,1	21,3
	<b>22,1</b>	<b>78,7</b>
Fytas 1	56,4	100
Fytas 2	44,2	100
Fytas 3	<b>55,4</b>	<b>73,0</b>
	30,9	27,0



Figur 20. SDS-PAGE gel av enzymerna: Lane 1 – Xylanas 1, Lane 2 - Molekylstege, Lane 3 - Fytas 1, Lane 4 - Fytas 2, Lane 5 - Fytas 3.

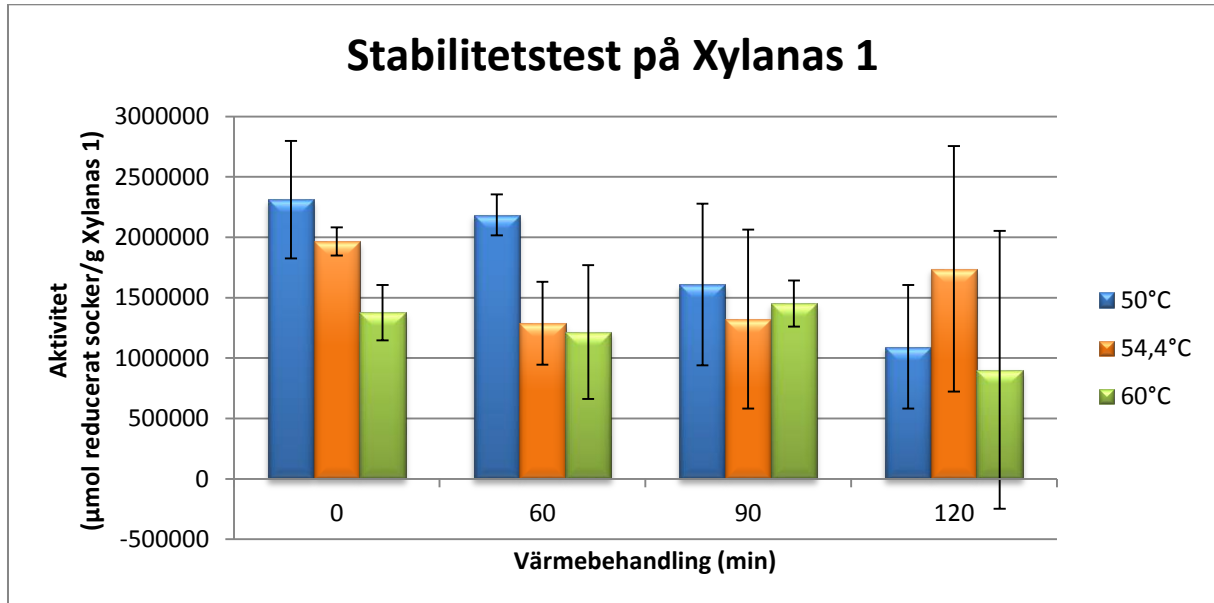
Resultatet från SDS-PAGE analysen visar att de två enzymerna i löslig form, Fytas 1 och Fytas 2, hade en renhet på 100 % medan de två pulverenzymerna gav flera band och därmed innehöll flera proteiner av olika storlek. De tjockaste banden, markerat i fetstil antas utgöra enzymerna Fytas 3 respektive Xylanas 1.

Att Xylanas 1 har en molekylvikt på 22,1 kDa tyder på att det tillhör familj 11. Familj 11 inkluderar den grupp av xylanaser med låg molekylvikt (<30 kDa) och en hög isoelektrisk punkt från det tidigare uppdelningssystemet (Pastor, et al., 2007).

Den bestämda molekylvikten på 56,4 kDa för Fytas 1 stämmer inte överens med angiven molekylvikt från leverantören som uppges vara 85 kDa. (DFS Food Processing Enzymes, 2010) Enzymet har förvarats under en längre tid och skillnaden kan möjligen bero på att enzymets eventuella domäner separerats.

### 5.1.2.3 Stabilitet

För att ta reda på om Xylanas 1 var ett lämpligt enzym för tillämpningen i projektet testades enzymets stabilitet inom de aktuella tids- och temperaturintervallet. Stabiliteten av Xylanas 1 testades genom att aktiviteten mättes med DNS-metoden efter värmebehandling under olika temperaturer och tider (Figur 21).



Figur 21. Stabilitetstest på Xylanas 1. Enzymet värmebehandlades i 50, 54,4 resp. 60°C i 0, 60, 90 resp. 120 min innan aktiviteten bestämdes med DNS-metoden på lösligt AX från havre. Aktiviteten nättes som nedbrytningen efter inkubering vid 70°C i 10 minuter.

Stabilitetstestet visade ingen markant reducering av enzymets aktivitet efter värmebehandlingen i upp till 120 minuter. Därtill kunde ingen tydlig skillnad urskiljas mellan olika temperaturer inom det aktuella intervallet. Metoden som tillämpats, DNS-metoden, är en osäker metod vilket förklarar de höga standardavvikelserna. Slutsatsen efter stabilitetsförsöket var att stabiliteten på Xylanas 1 inte begränsas av enzymbehandlingsens temperatur eller tidsintervall i de aktuella intervallen.

Den från leverantören angivna aktiviteten på enzymet var 60 000 FXU-W/g (Novozymes A/S, 2011). Den uppmätta aktiviteten vid 50°C var motsvarande 29 600 FXU/g. Då standardavvikelsen i resultaten är höga och då det är en skillnad i substrat, vete- respektive havrexylan, anses resultaten vara rimliga. Den lägre aktiviteten skulle kunna bero på att enzymet förvarats under en längre tid.

Temperaturen för enzymbehandlingen bestämdes till 60°C och tiden till 120 minuter. Den högre temperaturen valdes för att främja livsmedelskvaliteten samt att Xylanas 1 har ett optimum på 70°C (Maharaj, et al., 2011). Den längsta tiden valdes för att utnyttja enzymerna maximalt. Alla efterkommande värmebehandlingar inför stabilitetstest och enzyminkuberingar skedde under dessa förhållanden om inget annat anges.

## Xylanas 2

Stabilitetstest på Xylanas 2 genomfördes genom att aktiviteten mättes med DNS-metoden före och efter värmebehandling (Tabell 9).

Tabell 9. Stabilitetstest på Xylanas 2. Aktiviteten mättes som nedbrytningen efter inkubering vid 60°C i 10 minuter. Enzymet värmebehandlades vid 60°C i 0 resp. 120 minuter innan aktiviteten bestämdes med DNS-metoden på rent AX.

Behandling	Aktivitet (µmol reducerat socker/g Xylanas 2)
Ej värmebehandlat Xylanas 2	647000 ± 61900
Värmebehandlat Xylanas 2	737000 ± 12400
Aktivitet kvar efter värmebehandling (%)	114 ± 24

Resultatet visar att Xylanas 2 behåller sin aktivitet efter värmebehandlingen och därmed beslutades att enzymet var lämpligt att användas i vidare försök.

Tidigare gjorda aktivitetsmätningar med DNS-metoden angav en aktivitet på 2670 nmol reducerat socker/(mg·s) (Nordberg Karlsson, et al., 1998). Aktiviteten var mätt vid 60°C och på samma substrat. Motsvarande aktivitet i projektets mätning var 80,1 nmol reducerat socker/(mg·s). Skillnaden mellan aktiviteterna svarar för en faktor på 33. En bidragande orsak till den för projektets lägre uppmätta aktivitet är temperaturskillnaden, enzymet har ett optimum på 80°C (Nordberg Karlsson, et al., 1998). Ytterligare orsak skulle kunna vara att instabilitet av enzymet då en längre förvaringstid reducerat enzymets aktivitet.

## Fytas 1-3

Stabilitetstesten på de tre fytaserna utfördes av samma skäl som de två ovan nämnda enzymerna. Stabiliteten undersöktes genom att bestämma aktiviteten av respektive enzym med hjälp av Megazyme kitet före och efter värmebehandling (Tabell 10). Koncentrationen enzym som tillsattes i testet bestämdes till den koncentration som skulle ge fullständig nedbrytning av fytinsyran beräknad med den från producenterna angivna aktiviteten.

Tabell 10. Stabilitetstest på Fytas 1-3. Aktiviteten mättes som nedbrytningen efter inkubering av enzym och ren fytinsyra vid 60°C i 10 minuter. Enzymerna värmebehandlades vid 60°C i 0 resp. 120 minuter innan aktiviteten bestämdes.

Enzym	Aktivitet (µmol frisatt fosfat/g enzym)	Aktivitet, efter värmebehandling (µmol frisatt fosfat/g enzym)	Aktivitet efter värmebehandling (% jmf med innan värmebehandling)
Fytas 1	15700	14400	91,8
Fytas 2	12600	15200	121
Fytas 3	562	257	45,7

Resultatet visar att Fytas 1 och Fytas 2 behåller majoriteten av aktiviteten efter värmebehandling vid 60°C i 120 minuter och ansågs lämpliga att använda i vidare försök. Fytas 3 tappade däremot mer än hälften av aktiviteten och uteslöts i kommande försök eftersom det inte är lämpligt under de rådande förutsättningarna.

Jämförelse mellan de från leverantören angivna aktiviteterna (4.1.2 Enzymer) och de uppmätta visar att alla fytas har en lägre uppmätt aktivitet. Fytas 1 och 2 mätte ungefär en fjärdedel av den angivna medan den uppmätta aktiviteten för Fytas 3 var 22 gånger mindre

än den angivna. Det senare är ännu en anledning att utesluta Fytas 3 för vidare undersökning. De lägre uppmätta aktiviteterna skulle kunna bero på en lång förvaringstid. I analysen av Fytas 1 och Fytas 2 bröts nästan all fytinsyra ned. Den lägre uppmätta aktiviteten för dessa enzym kan därmed bero på att substratet var begränsat.

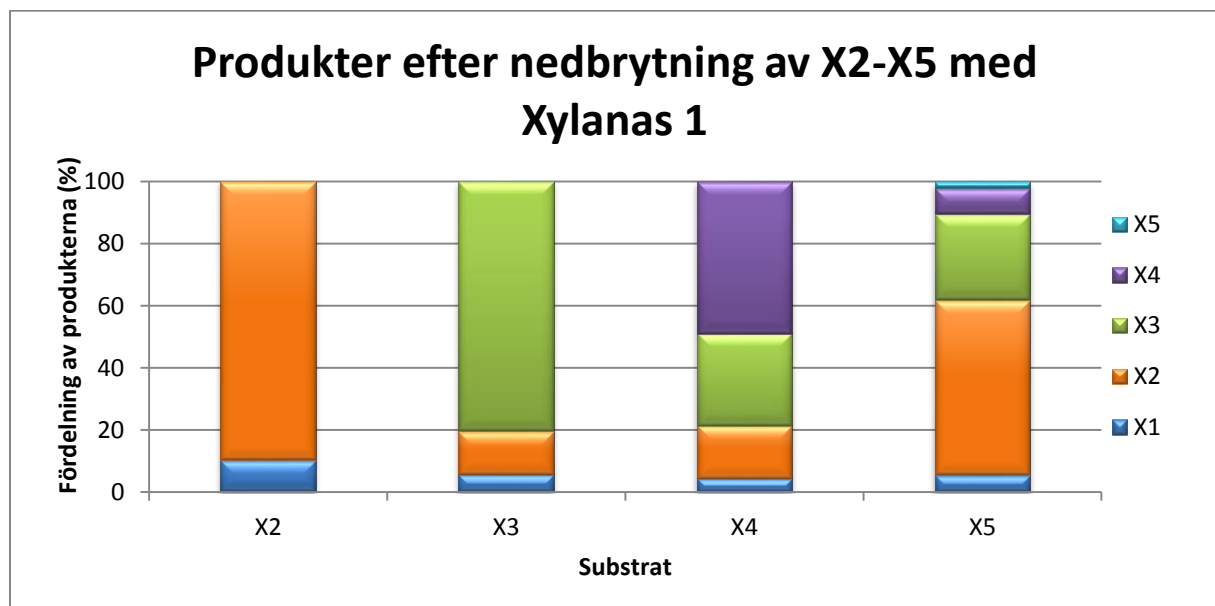
#### 5.1.2.4 Aktivitet på $\beta$ -glukan med Xylanas 1

Eftersom enzymer i Oatlys produktion inte tillåts ha någon  $\beta$ -glukannedbrytande sidoeffekt undersöktes enzymets aktivitet på  $\beta$ -glukan. Aktivitet testades genom DNS-metoden. Resultatet visade en aktivitet på  $4100 \pm 9200 \mu\text{mol}$  reducerande socker/g Xylanas 1. Den höga standardavvikelsen tyder på en stor osäkerhet av proverna. Testet genomfördes inte ytterligare utan med tanke på den låga aktiviteten och den höga standardavvikelsen som erhöles antogs att aktiviteten på  $\beta$ -glukan inte är ett problem. Xylanas 1 kan därför användas i Oatlys process. Slutsatsen stärks av resultat från en annan studie där aktivitet på  $\beta$ -glukan på samma enzym analyserats (Palmero Rivera Cambas, 2011).

#### 5.1.2.5 Hydrolysisprofil för Xylanas 1

Hydrolysisprofil för nedbrytning av xylooligosackarider

Eftersom Oatly vill undvika att nedbrytningsprodukten xylos, X1, erhålls vid behandling med xylanas utfördes en hydrolysisprofil av Xylanas 1 på xylooligosackariderna X5-X2. Xylanas 1 inkuberades med rena xylooligosackarider, X2 till X5, i  $50^\circ\text{C}$  i 120 minuter och analyserades därefter med oligosackaridanalys (Figur 22).



Figur 22. Fördelning av produkterna efter inkubering av xylooligosackariderna X2 till X5 och Xylanas 1 vid  $50^\circ\text{C}$  i 120 minuter. Fördelningen definieras som substansmängden xylos i respektive produkt i förhållande till total substansmängd xylos i alla produkter.

Hydrolysisprofilen visar på en effektiv nedbrytning av X5 och någorlunda effektiv nedbrytning av X4. Nedbrytningen av X3 och X2 uppvisades däremot inte vara lika effektiv. Resultatet tyder på att xylooligosackariderna inte bryts ned till X1 i någon större utsträckning. Xylanas 1 verkar ha lätt att bryta ned substrat till X3 och X2 men inte lika lätt för nedbrytningen av X2 till X1. Enzymet antogs vara lämpligt med tanke på företagets önskan om liten mängd xylos.

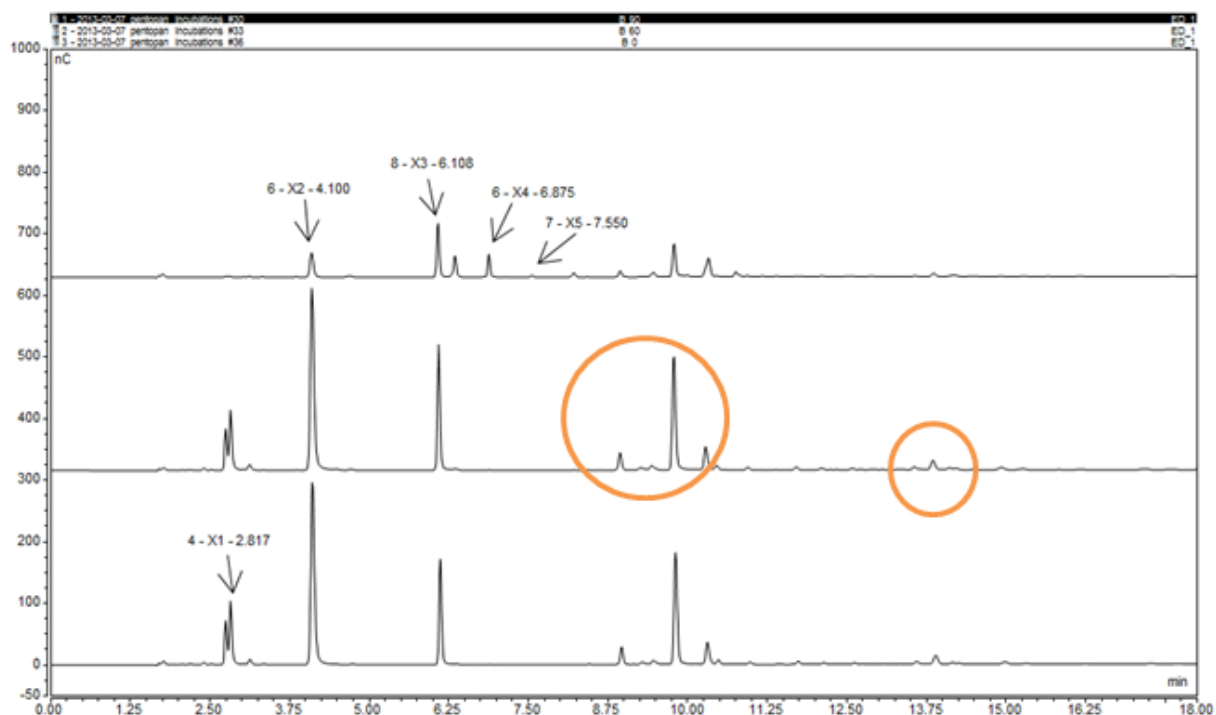


### Hydrolysprofil för nedbrytning av AX

För att ta reda på hur Xylanas 1 arbetar på AX utfördes en hydrolysprofil på rent AX från havre. Xylanas 1 inkuberades med rent AX från havre i 50°C och provet analyserades därefter med en oligosackaridanalys (Tabell 11). Kromatogrammen av ett prov innan inkubering respektive ett prov efter 60 och 90 minuters inkubering visas nedan (Figur 23).

Tabell 11. Produkterna efter nedbrytning av rent AX från havre med Xylanas 1 i 180 minuter. Andelen är beräknad på substansmängden xylos i respektive produkt i förhållande till total substansmängd xylos i det tillsatta xylanet.

Produkt	Andel av totalt AX (%)	Andel av produkterna X1–X5
X1	2,86	23,7
X2	7,23	59,9
X3	1,98	16,4
X4	0	0
X5	0	0
<b>Totalt</b>	<b>12,1</b>	<b>100</b>



Figur 23. Kromatogrammen från oligosackaridanalysen över nedbrytningen av AX med Xylanas 1. Från ovan, ett icke inkuberat prov, ett prov efter inkubering vid 50°C i 60 minuter och längst ner ett prov efter inkubering vid 50°C i 90 minuter.

Kromatogrammet och tabellen redovisar att huvudprodukten för nedbrytningen i de inkuberade proverna är xylooligosackariden X2. Även X3 och den oönskade monomera formen xylos, X1, identifierades i de inkuberade proverna. Det gjorde däremot inte X4 och X5. I det icke inkuberade provet identifierades samtliga xylooligosackarider mellan X2-X5. Att xylooligosackariderna X4 och X5 inte identifierades i de inkuberade proverna tyder på att de som fanns från början har brutits ned till lägre xylooligosackarider. Möjligheten att längre fragment brutits ned till X4 och X5 finns men dessa har i så fall vidare brutits ned till lägre fragment då de inte urskiljs i kromatogrammen. En annan möjlig förklaring är att xylanet är substituerat med mycket arabinos och att långa rena xylooligofragment inte existerar och därför kan inte nedbrytningsprodukterna X4 och X5 bildas. Den senare förklaringen skulle

innebära att det i så fall finns fragment av arabinoxylos, dessa kan däremot inte identifieras med den använda metoden. De inringade topparna i kromatogrammet skulle kunna vara arabinosubstituerade xylooligofragment eftersom de ökar efter inkubering och således är ett resultat av enzymbehandlingen.

Eftersom den använda analysmetoden endast visar koncentrationen xylooligosackarider i proven utesluts andra nedbrytningsprodukter från nedbrytningen så som arabinoxylosenheter. Då utbytet, andel av totalt AX (Tabell 11) har beräknats på xylooligosackarider kan inte detta representera den fullständiga hydrolysen utan detta mått antas vara en underskattning av nedbrytningen. Detta värde har däremot använts som utbytet i vidare beräkningar i samband med xylanasbehandlingen.

### 5.1.3 Vatten

Eftersom Landskronas kranvatten utnyttjas i Oatlys produktion användes även kranvatten på laboratoriet på Kemicentrum till projektet. Vattnet kommer ursprungligen från Bolmen i både Landskrona och Lund men det utesluter däremot inte lokala skillnader. Det kranvatten som användes till enzymbehandlingarna skickades iväg för mineralanalys av kalcium, järn och zink (Tabell 12).

Tabell 12. Erhållna resultat från mineralanalys på kranvatten.

Mineral	Koncentration (mg/l)
Kalcium	26,0
Järn	0,05
Zink	0,078

År 2011 uppmättes pH i Landskrona till 8,2 och i Lund till 8,1 (NSVA, 2011), (Sydvatten, 2011). Stora skillnader på pH hade möjligen påverkat enzymernas aktivitet. Någon större påverkan på enzymerna har däremot uteslutits då skillnaderna mellan pH i de två städernas kranvatten är små.

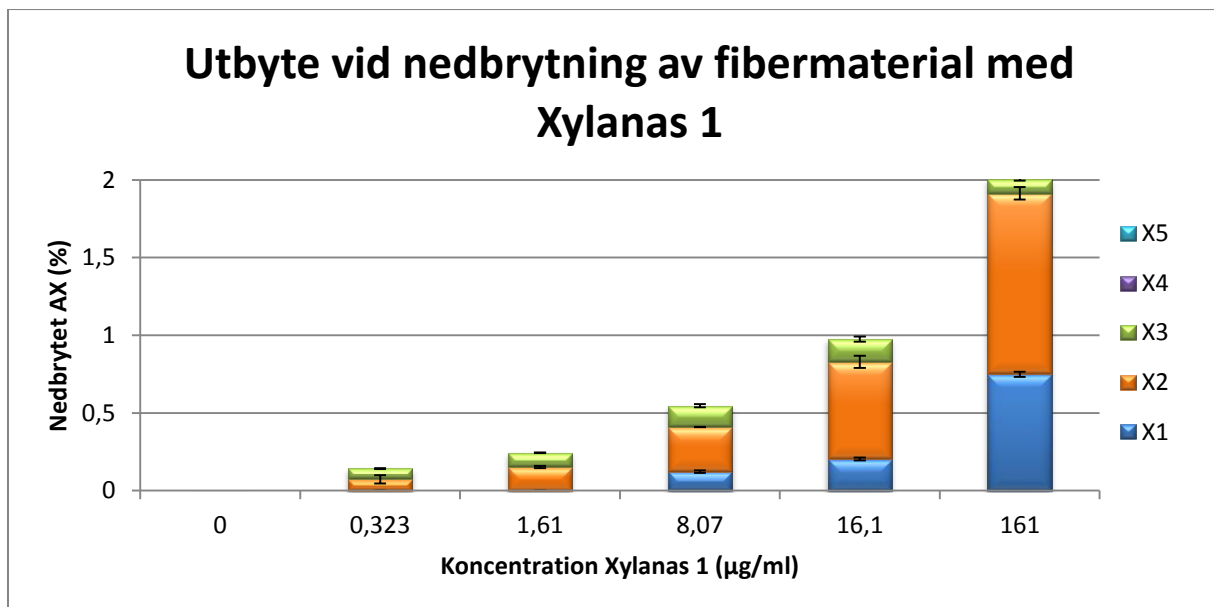
## 5.2 Xylanasbehandling

Under xylanasbehandlingen studerades xylanasernas nedbrytande effekt på fibermaterialet för att bestämma optimal koncentration av enzymen inför den kombinerade enzymbehandlingen.

### 5.2.1 Xylanas 1

#### 5.2.1.1 Hydrolyprofil

För att bestämma koncentrationen enzym för xylanasbehandlingen beräknades först den optimala koncentrationen av Xylanas 1 som teoretiskt skulle ge total nedbrytning av AX i fibermaterialet. Detta gjordes med hjälp av beräknat utbyte från nedbrytningen av rent AX från havre, uppmätt total mängd AX i fibermaterialet och den från leverantörerna givna aktiviteten. Den teoretiska koncentrationen samt större och mindre koncentrationer inkuberades med fibermaterialet. Därefter analyserades proverna med en oligosackaridanalys för att erhålla en hydrolyprofil (Figur 24).



Figur 24. Utbyte vid nedbrytning av fibermaterialet med Xylanas 1 vid 60°C i 120 minuter. Utbytet är beräknat på substansmängden xylos i produkterna X1 till X5 och angivet som procent av substansmängden xylos i havrefibern.

Utgångspunkten för den optimala nedbrytningen var att bryta ned så mycket AX som möjligt men samtidigt undvika produkten X1. Mellan koncentrationerna 16,1 och 161 µg/ml sker en stor ökning av produkten X1 som inte motsvaras av samma ökning av de andra nedbrytningsprodukterna. Fram till koncentration 16,1 µg/ml ökar X3 men vid 161 µg/ml minskar X3 samtidigt som X1 ökar kraftigt. Detta tolkades som att nedbrytningen innan 16,1 µg/ml i huvudsak har skett på längre fragment. Vid högre koncentrationer antogs nedbrytningen till större grad ske på de kortare fragmenten vilket resulterar i stora mängder X1. Koncentrationen 16,1 µg/ml användes i vidare försök med Xylanas 1.

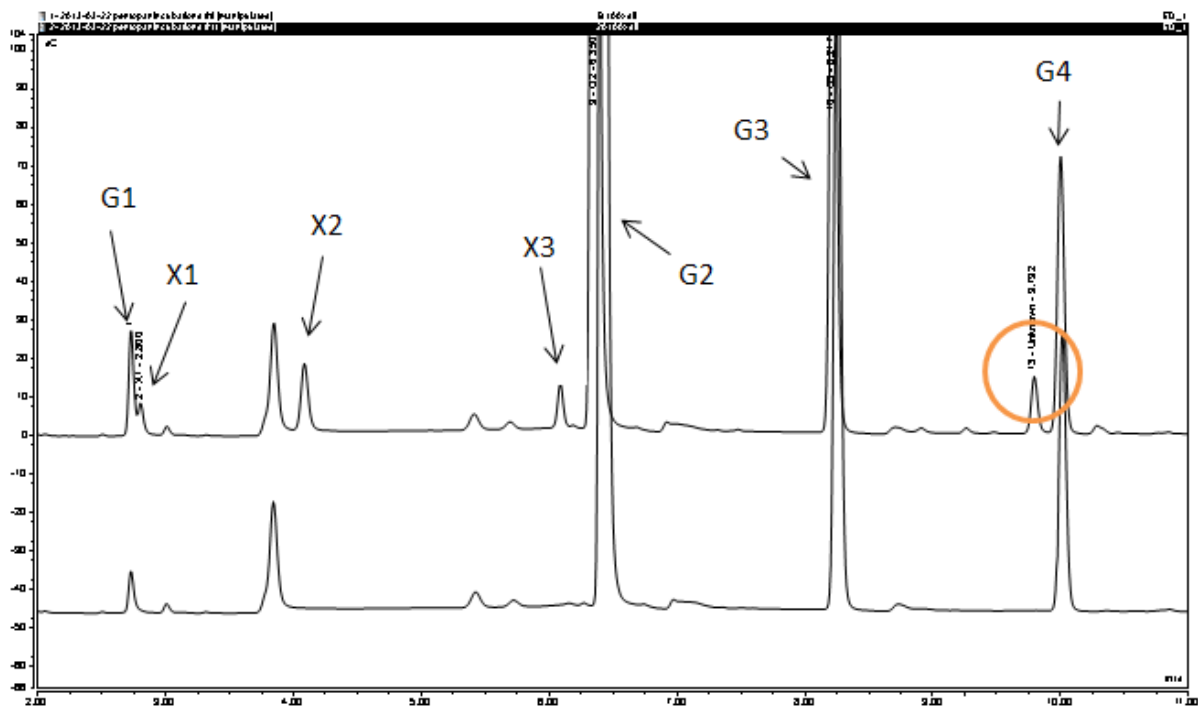
Utbytet av xylooligosackariderna med den teoretiskt uträknade koncentrationen var drygt 0,5 %. Detta kan jämföras med 12 % för den teoretiska mängden på rent AX. Enzymets aktivitet på rent substrat är ofta inte detsamma i en livsmedelsmatris. Omfattningen av hydrolysen beror på råvaran och tillverkningsprocessen (Greiner & Konietzny, 2006). Havrens cellväggar, där AX är lokaliserat, innehåller olika komponenter som interagerar

vilket kan leda till att substratet är mer svåråtkomligt för xylanaset. Detta kan vara en förklaring på den stora skillnaden mellan utbytena på rent AX från havre och på AX i fibermaterialet.

En studie som genomförde nedbrytning av havrekli med Xylanas 1 med en koncentration på motsvarande 600 µg/ml, i förhållande till mängden substrat, resulterade i att koncentrationen xylos ökade med 0,56 mM (Palmero Rivera Cambas, 2011). De valda processparametrarna var 40°C och inkuberingstiden 60 minuter. Ökningen av xyloskoncentrationen vid tillsats av 161 µg/ml mättes i projektet till 0,40 mM. Studiens valda temperatur och inkuberingstid resulterar i lägre aktivitet men den högre koncentrationen kompenserar detta. Resultatet från projektets mätning anses därmed rimligt.

### Kromatogram

Kromatogrammen för inkubering i 60°C i 120 minuter med och utan enzym av den valda koncentrationen av Xylanas 1 visas nedan (Figur 25).



Figur 25. Kromatogrammen från oligosackaridanalys för nedbrytning av fibermaterial med Xylanas 1. Överst visas ett prov efter inkubering vid 60°C i 120 minuter och under ett prov utan enzyminkubering.

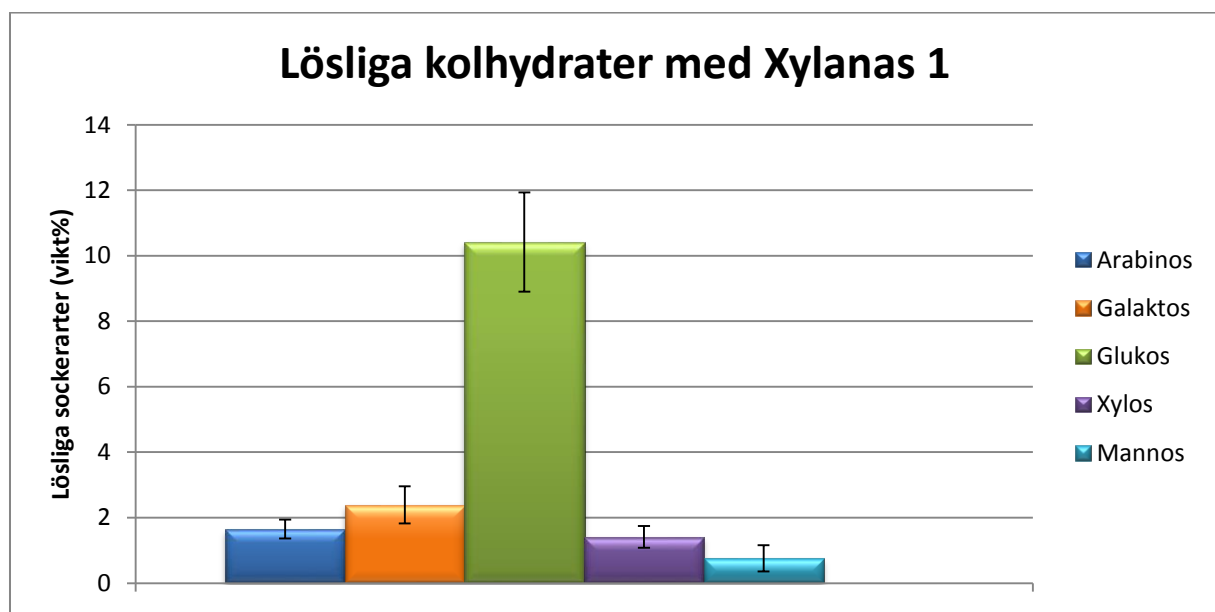
Koncentrationen xylooligosackarider ökar efter enzymbehandlingen. Den inringade toppen visar ytterligare en produkt efter enzymbehandlingen vilken inte kan identifieras med den använda metoden. Toppen antas motsvara en arabinossubstituerad xylooligosackarid. Övriga oidentifierade toppar i kromatogrammet återfinns både före och efter inkubering och är därmed inte nedbrytningsprodukter.

Kromatogrammet från icke enzymbehandlat fibermaterial visar stora toppar glukooligosackarider. Dessa återfanns i det enzymbehandlade provet. Koncentrationen G1, glukos, visar en tydlig ökning i det inkuberade provet. Med andra ord kan det inte uteslutas att enzymbehandlingen påverkar nedbrytningen av glukooligosackarider. Glukosenheterna kan komma från både stärkelse, cellulosa och β-glukaner. Det har däremot tidigare

konstaterats att aktiviteten på  $\beta$ -glukan är mycket lågt. Det är därför troligt att Xylanas 1 skulle kunna ha en sidoeffekt på nedbrytning av stärkelse då cellulosa består av samma bindningar som  $\beta$ -glukan. Xylanas 1 är inte helt rent, vilket visades genom SDS-PAGE, och det är därför troligt att sidoeffekter, som exempelvis nedbrytning av stärkelse, kan förekomma. En alternativ teori som skulle förklara närvaron av glukosenheterna är att rester av amylaser, som bryter ned stärkelse till kortare glukoskedjor, har aktiverats under inkuberingen. Amylaser tillsätts nämligen i ett tidigare steg i Oatlys process för att bryta ned stärkelsen i havren.

### 5.2.1.2 Totalt utbyte

För att kunna bestämma det totala utbytet av xylanasbehandlingen utfördes en Saeman hydrolys följt av en monosockeranalys på den lösliga fraktionen efter inkubering med den valda koncentrationen av Xylanas 1 (Figur 26).



Figur 26. Monosockerinnehållet efter Saeman hydrolys på ett prov inkuberat vid 60°C i 120 minuter med Xylanas 1.

Knappt 1,5 % av den xylos som detekterades i fibermaterialet var efter xylanasbehandlingen lösligt. Denna siffra är ett bättre mått på utbytet, än från oligosackaridanalysen, då detektionen inte har varit beroende på vilken form xylosenheterna befunnit sig i, substituerat eller inte substituerat med arabinos. Utbytet enligt oligosackaridanalysen var knappt en procent vilket innebär att de arabinossubstituerade xylosfraktionerna utgör cirka en tredjedel av nedbrytningsprodukterna.

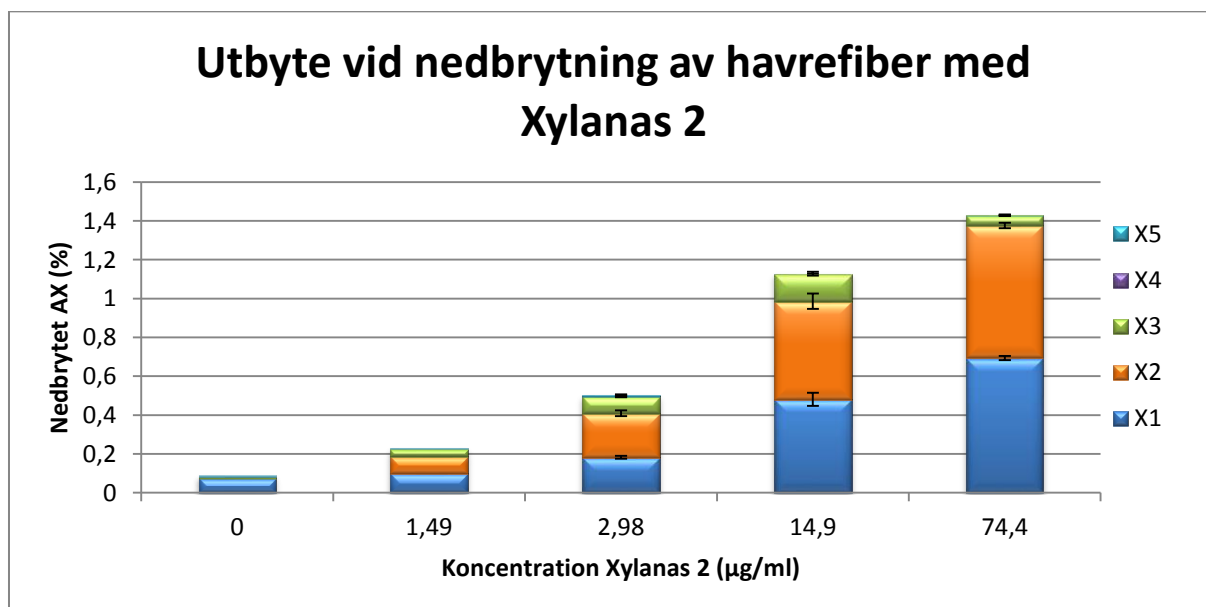
Mer galaktos, arabinos och mannos har gått ut i lösning än vad som rimligtvis borde komma från nedbrytningen AX. Då havre innehåller fler typer av fibrer än bara AX skulle de ovan nämnda sockerarterna komma från andra typer av fiber. I frövitans cellväggar finns bland annat glukomannan tillsammans med  $\beta$ -glukan, cellulosa och AX (Welch, 2011). Glukomannan, som består av glukos och mannos men som även kan vara substituerade med galaktos, är lös och skulle därmed kunna gå ut i lösning när AX bryts ned. Den stora mängden glukos som påträffats tros komma från  $\beta$ -glukaner som redan innan inkuberingen med Xylanas 1 gått ut i lösning. Detta stärks av den större mängd glukos som redan vid karakteriseringen påträffades i fibermaterialet. Ett icke inkuberat prov hade varit av intresse

för att konstatera detta och även för att se ifall några av de andra sockerarterna som detekterades fanns i lösning från början och därmed inte är nedbrytningsprodukter.

## 5.2.2 Xylanas 2

### 5.2.2.1 Hydrolyspprofil

Av samma anledning som för Xylanas 1 genomfördes en hydrolyspprofil för Xylanas 2. Den teoretiska koncentrationen Xylanas 2 som skulle ge en optimal nedbrytning av AX i fiber materialet beräknades på samma sätt som för Xylanas 1. Aktiviteten och utbytet hade tidigare uppskattas från stabilitetstestet. Den teoretiska koncentrationen samt större och mindre koncentrationer inkuberades med fiber materialet. Resultatet analyserades med oligosackaridanalys (Figur 27).



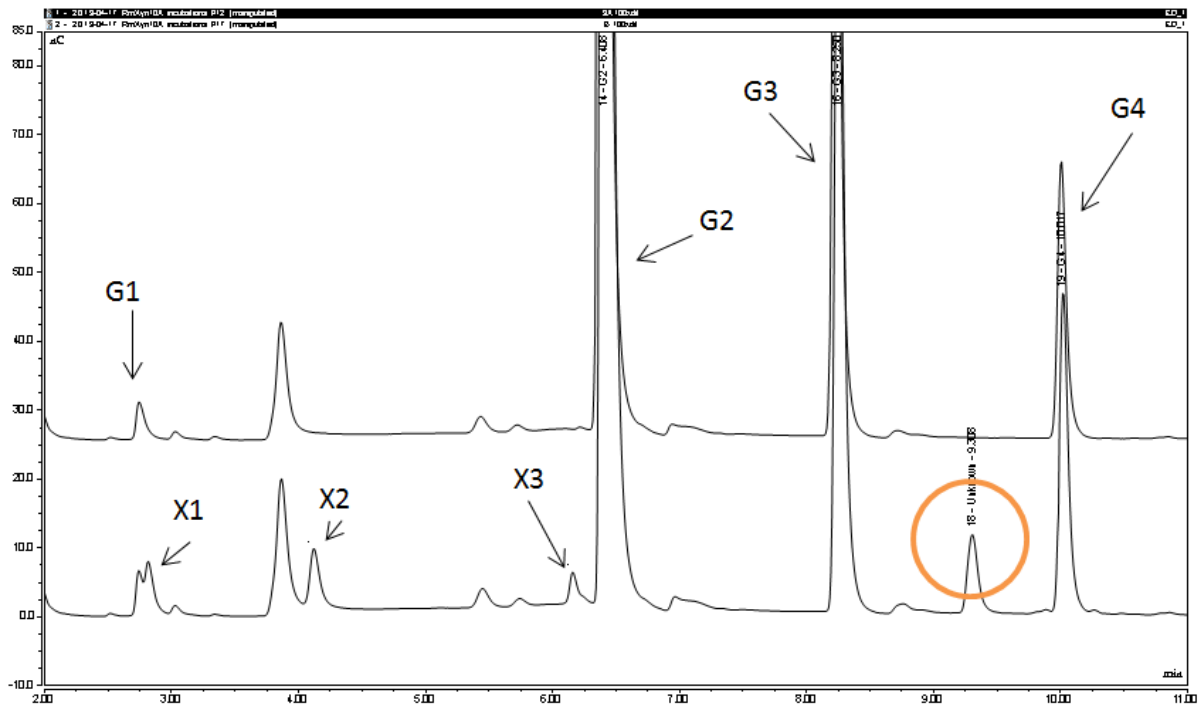
Figur 27. Utbyte vid nedbrytning av havrefiber med Xylanas 2 vid 60°C i 120 minuter. Utbytet är beräknat på substansmängden xylos i produkterna X1 till X5 och angivet som procent av substansmängden xylos i havrefibern.

Samma resonemang som vid nedbrytningen med Xylanas 1 låg till grund för valet av koncentration Xylanas 2 som användes vidare. Koncentrationen 14,9 µg/ml valdes.

Nedbrytningen med Xylanas 2 resulterade i en större andel X1 bland produkterna än vad nedbrytningen med Xylanas 1 gav. Xylanas 2 tillhör familj 10 (Nordberg Karlsson, et al., 1998). I tidigare försök i samband med renhetsbestämningarna för enzymerna bedömdes Xylanas 1 tillhöra familj 11. Familj 11 har visat sig ha lägre aktivitet på xylooligosackarider än familj 10 (2.3.1 Xylanas). Den lägre aktiviteten hos familj 11 har förklarats av att de inte har lika lätt att binda in till mindre bindningssäten som familj 10. Dessutom kan närliggande substituerade regioner göra det svårare för xylanas från familj 11 att bryta bindningar mellan xylosheter. Detta kan vara möjliga förklaringar till varför Xylanas 2 verkar ha lättare att bryta ned lägre xylooligosackarider till X1.

## Kromatogram

Kromatogrammen från icke enzyminkuberat och efter 120 minuters inkubering med den valda koncentrationen visas nedan (Figur 28).



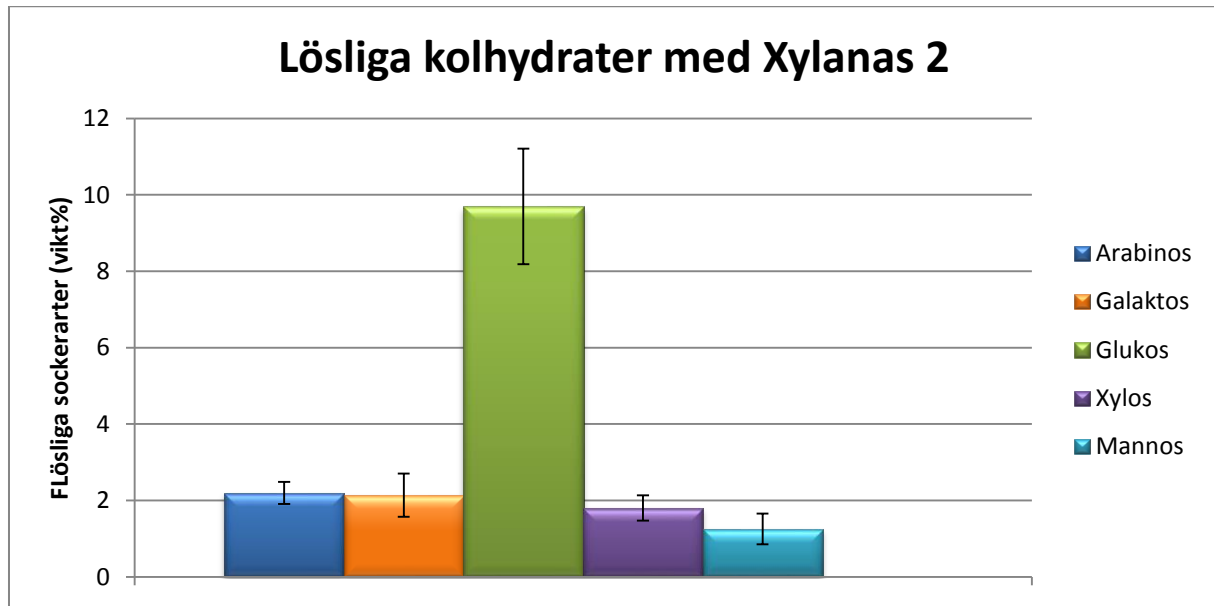
Figur 28. Kromatogram från oligosackaridanalys över nedbrytningen av fibermaterial med Xylanas 2. Från ovan ett icke enzyminkuberat prov och nederst ett prov efter inkubering vid 60°C i 120 minuter.

Kromatogrammen från nedbrytningen av fiber materialet med Xylanas 2 stämmer till stor del överens med kromatogrammen från nedbrytningen med Xylanas 1. Som redan diskuterats ovan skiljer sig de relativa mängderna mellan xylooligosackariderna sig åt efter nedbrytning av respektive enzym. Den okända produkt som fanns efter nedbrytningen med Xylanas 1 återfanns även efter nedbrytningen med Xylanas 2 och är inringat i kromatogrammet.

En skillnad mellan Xylanas 1 och Xylanas 2 är att koncentrationen G1, glukos, inte ökade efter inkuberingen med Xylanas 2. Detta förkastar teorin om att rester av amylas skulle aktiveras under inkuberingen då behandlingen genomförts på samma fiber material. Det tyder snarare på att Xylanas 1 kan bryta ned glukooligosackarider från stärkelse.

### 5.2.2.2 Totalt utbyte

För att ta reda på det totala utbytet av den valda koncentrationen utfördes en Saeman hydrolys följt av en monosockeranalys på den lösliga fraktionen efter inkubering med den bestämda koncentrationen av Xylanas 2 (Figur 29).



Figur 29. Monosockerinnehållet efter Saeman hydrolys på ett prov inkuberat vid 60°C i 120 minuter med Xylanas 2.

Vid nedbrytningen med Xylanas 2 konstaterades att en större mängd av arabinos och xylos kommit ut i lösning jämfört med nedbrytningen med Xylanas 1. Även mängden mannos är högre. Detta pekar på ett bättre utbyte av nedbrytningen på AX som i sin tur tros påverka hur mycket mannos i form av glukomannan som går ut i lösning. Utbytet beräknat på endast xylooligosackariderna uppgick till 1,2 % medan utbytet beräknat på xylos uppgår till knappt 2 %.

### 5.2.3 Sammanfattning

Xylanasbehandlingen utvärderades och diskuterades för att optimera koncentrationen av enzym inför den framtida kombinerade enzymbehandlingen med fytas. Utifrån en oligosackaridanalys av enzymbehandlat fibermaterial bestämdes optimal koncentration för vidare försök för Xylanas 1 till 16,1 µg/ml och för Xylanas 2 till 14,9 µg/ml. Andelen xylos bland xylooligosackariderna låg som grund för beslutet. Monosockeranalysen visade att Xylanas 2 gav ett bättre utbyte, knappt 2 %, än vad Xylanas 1 gjorde vid den valda koncentrationen, 1,5 %.

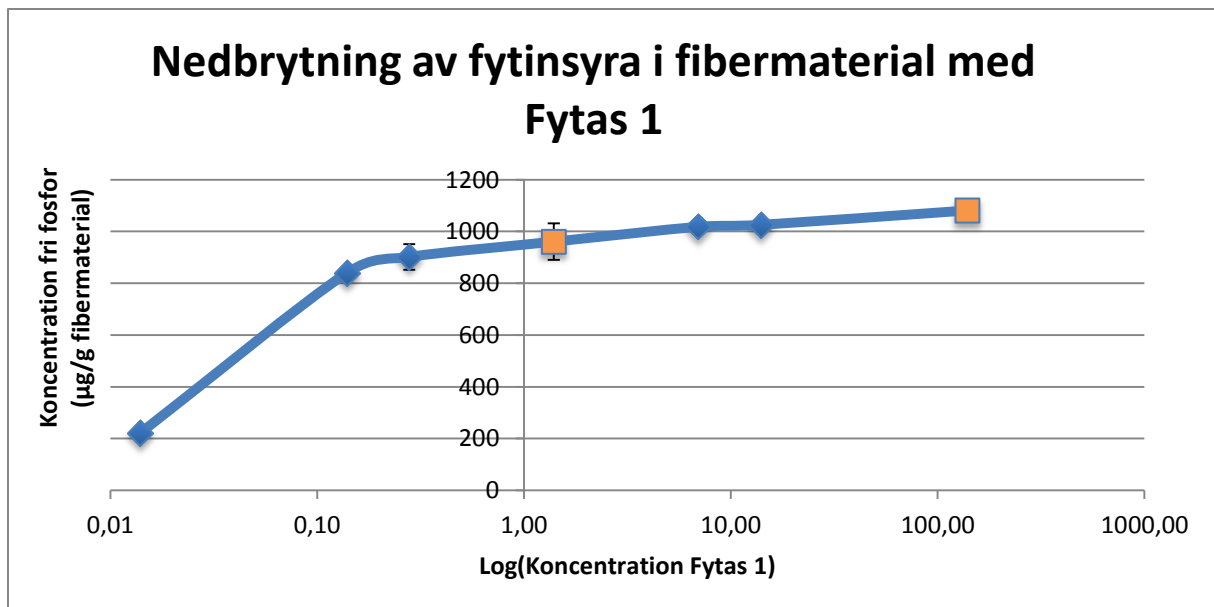


### 5.3 Fytasbehandling

Utifrån resultaten från karaktäriseringsförsöken bestämdes att endast två fytaser av de från början tre stycken skulle studeras vidare i projektet, Fytas 1 och Fytas 2. Fytasbehandlingarna genomfördes på fibermaterialet för bestämma optimal koncentration av fytaserna inför den kombinerade behandlingarna med Xylanas 1.

#### 5.3.1 Fytas 1

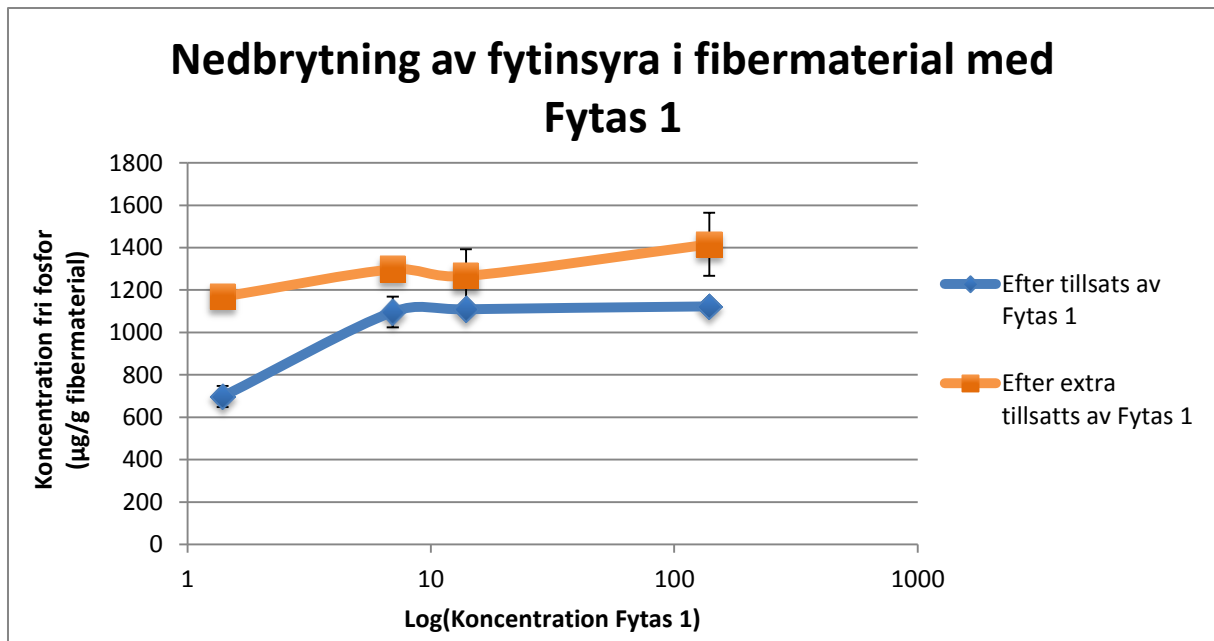
Den teoretiska koncentration Fytas 1 som skulle ge total nedbrytning av fytinsyra i fibermaterialet uppskattades med hjälp av den uppmätta mängden fytinsyra i fibermaterialet och den från producenten angivna aktiviteten på enzymet. Den teoretiska koncentrationen och större respektive mindre koncentrationer inkuberades med fibermaterialet. Koncentrationen fri fosfor analyserades på den lösliga fraktionen (Figur 30).



Figur 30. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med Fytas 1 efter inkubering vid 60°C i 120 minuter.

Resultatet visar att nedbrytningen av fytinsyran avstannar trots ökad koncentration av Fytas 1. Den uppmätta fytinsyran, endast IP<sub>6</sub>, i fibermaterialet motsvarar en koncentration på 10400 µg fritt fosfor/g fibermaterial, vilket innebär att det inte har skett en fullständig nedbrytning av fytinsyran i provet då koncentrationerna bara är en bråkdel av detta värde. Resultatet kan förklaras utifrån tre teorier. Antingen avstannar nedbrytningen för att (1) Fytas 1 deaktiveras under inkuberingen, för att (2) Fytas 1 inte bryter ned fytinsyran fullständigt eller för att (3) Fytas 1 inte kommer åt att bryta ned mer av fytinsyran.

(1) Deaktivering av enzymet skulle kunna vara ett resultat av en feedback inhibering där en produkt av nedbrytningen eller en annan molekyl binder till enzymet och ändrar dess aktiva säte så att enzymets aktivitet påverkas. För att undersöka om en feedbackinhibering förekommit gjordes ytterligare ett försök. Första delen av försöket är identisk med det ovanstående. I andra delen tillsattes ytterligare enzym för att se om det skulle ge ett ökat utbyte (Figur 31).



Figur 31. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med Fytas 1. Den blå linjen visar resultatet efter inkubering vid 60°C i 120 minuter. Den röda linjen visar samma prov efter en ytterligare inkubering med en ny tillsats av Fytas 1.

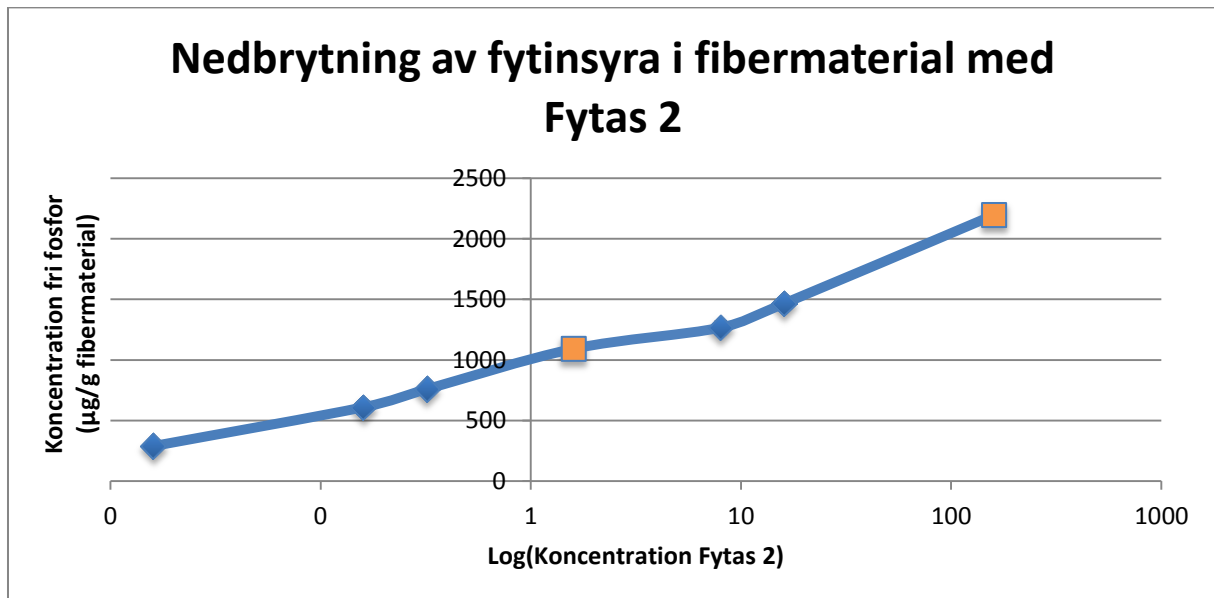
Koncentrationen av fri fosfor ökar marginellt efter en extra tillsats av Fytas 1. Den första punkten, med lägst koncentration av Fytas 1, tyder på att enzymet inte har hunnit med att bryta ned all fytinsyra då koncentrationen fri fosfor ökar kraftigt efter ytterligare en tillsats. I de efterföljande punkterna visar resultatet att en ytterligare tillsats av Fytas 1 ökar frisättandet av fosfor, men bara begränsat och inte till den nivå som skulle innebära att en feedback inhibering av Fytas 1 ägt rum. Resultaten pekar istället på att det finns ett tak för hur mycket fosfor som Fytas 1 kan frisätta, oberoende på ökat enzymkoncentration eller extra tillsats av enzymet, under de givna förhållandena. Detta kan bero på att enzymet inte bryter ned fytinsyran fullständigt.

(2) Möjligen bryter Fytas 1 bara ned tillgänglig  $IP_6$  till lägre inositolfosfater. Dock ska Fytas 1 enligt leverantörens uppgifter katalysera reaktionen där  $IP_6$  hydrolyseras till  $IP_1$ , dvs. fem av sex fosfatgrupper frisätts. (DFS Food Processing Enzymes, 2010). För att avgöra ifall de uppgifterna stämmer behöver produkterna av nedbrytningen analyseras. En  $IP_6$ - $IP_1$  analys var av intresse för att erhålla hydrolysisprofilen, men har inte utförts under utsatt tid för projektet.

(3) Upptäckten att molekylvikten för Fytas 1 inte överensstämde med den från leverantören angivna skulle som tidigare nämnt kunna bero på separering av enzymets eventuella domäner under den långa period då enzymet förvarades. Detta skulle i sin tur kunna påverka specificiteten av enzymet då subdomäner till den katalytiska domänen i många fall kan underlätta inbindningen för enzym till dess substrat. Det skulle också kunna förklara det låga utbytet.

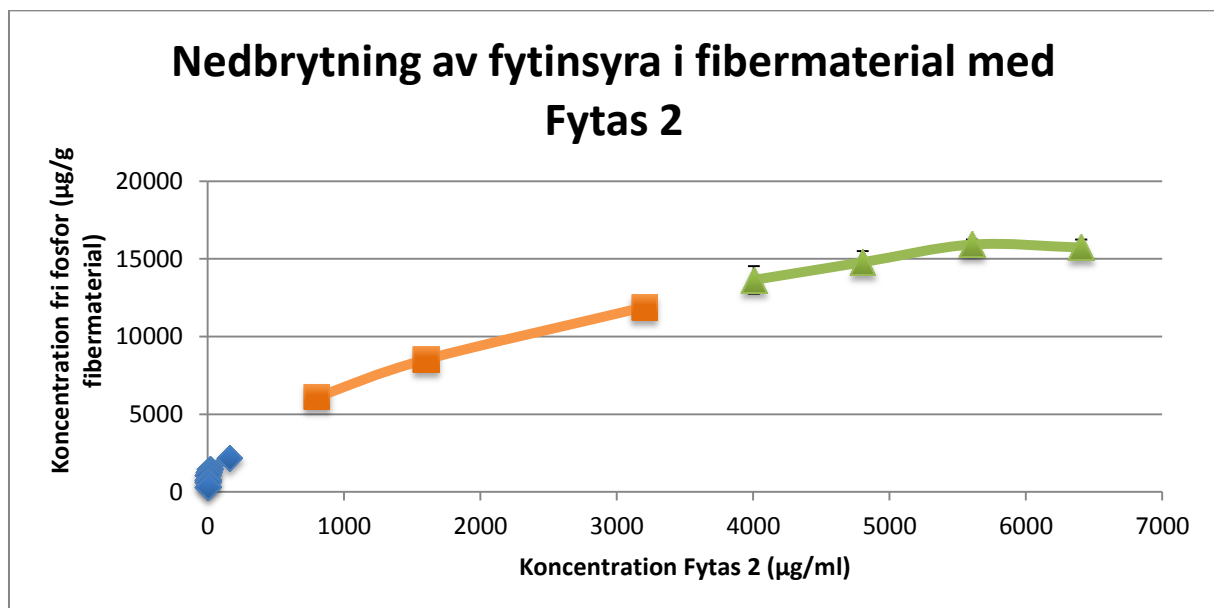
### 5.3.2 Fytas 2

Den teoretiska koncentration Fytas 2 som skulle ge total nedbrytning av fytinsyra i fibermaterialet uppskattades med hjälp av den uppmätta mängden fytinsyra i fibermaterialet och den från producenten angivna aktiviteten på enzymet. Den teoretiska koncentrationen samt större och mindre koncentrationer inkuberades med fibermaterialet. Koncentrationen fri fosfor analyserades på den lösliga fraktionen (Figur 32).



Figur 32. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med Fytas 1 efter inkubering vid 60°C i 120 minuter.

Ökade koncentrationer av Fytas 2 visade inte på avstannande i nedbrytningsprocessen eftersom den fria fosfor ökar med koncentrationen av Fytas 2. För att se hur mycket fri fosfor som skulle kunna erhållas med hjälp av Fytas 2 genomfördes två nya försök där enzymkoncentrationen ökades (Figur 33).



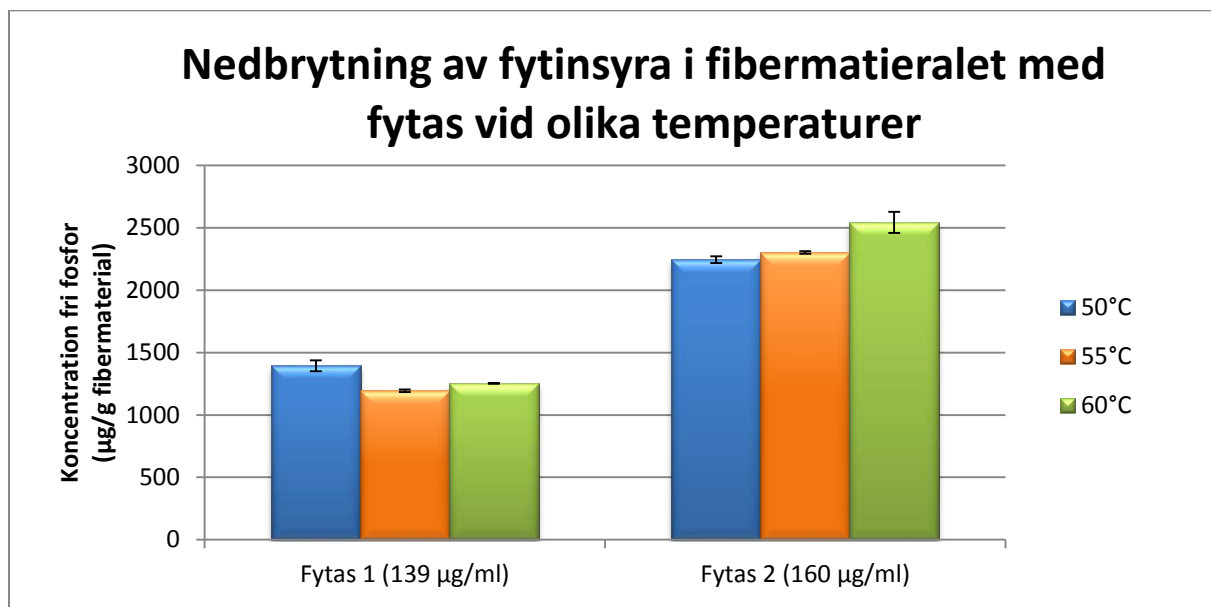
Figur 33. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med Fytas 1 efter inkubering vid 60°C i 120 minuter. De olika serierna motsvarar olika omgång av försök.

Grafen visar att det krävs höga koncentrationer av Fytas 2 innan nedbrytningen avstannar och når sitt maximum.

Då endast den ursprungliga koncentrationen fytinsyra,  $IP_6$ , motsvarar ett fritt fosforinnehåll på 10400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tyder den högre koncentrationen fritt fosfor från resultatet på att en del av den fria fosfor kommer från en annan källa. En teori är att det redan från början finns lägre intermediärer av fytinsyra,  $IP_5$ - $IP_1$ , som bidrar till en större mängd fosfor som också frisätts av enzymet.

### 5.3.3 Temperaturstudie

Den temperatur som bestämts för enzymbehandlingarna, 60°C, valdes för att Xylanas 1 hade högst aktivitet vid denna temperatur. Ifall resultatet från den kombinerade behandlingen skulle visa på att det inte var aktuellt att tillsätta Xylanas 1 testades aktiviteten på fytaserna vid andra temperaturer inom det för Oatly lämpliga intervallet. Fiber materialet inkuberades med fytas vid olika temperaturer och analyserades med fri fosforanalys (Figur 34).



Figur 34. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med fytas efter inkubering vid 50, 55 resp. 60°C i 120 minuter.

Figur 34 tyder på att 60°C är mest lämplig för behandling med Fytas 2. Däremot bör temperaturen optimeras för Fytas 1 om det är av intresse att gå vidare med detta enzym.

### 5.3.4 Utvärdering

Fytasbehandlingen med Fytas 1 och Fytas 2 visade att båda enzymerna är aktiva under de rådande förhållandena. Enzymernas aktivitet följs åt upp till den punkt där nedbrytningen avstannar för Fytas 1. Vid denna punkt pekade resultatet från fri fosforanalys på att 8 % av fosfor bunden i fytinsyra frisläppts. I den första omgången med Fytas 2 kunde 20 % av fosfor bundet i fytinsyra frisläppas (Figur 32). Vid extrema mängder Fytas 2 kunde all fosfor bundet i fytinsyra frisättas. Att Fytas 2 kan frigöra mer fri fosfor än Fytas 1 vid högre koncentrationer ansågs inte vara tillräckligt underlag för att utesluta Fytas 1 i vidare försök. Nedbrytningsprofilen för enzymerna, till vilken grad de bryter ned fytinsyra, har stor betydelse för bedömningen av vilket enzym som är mest effektivt eftersom det främst är  $IP_6$  och  $IP_5$  som har hög affinitet till mineraler och proteiner (2.2.2 Fytinsyra i människokroppen). Med andra ord behöver inte en lägre koncentration fri fosfor i den analys som utförts på

laboratoriet peka på att sämre resultat av enzymbehandlingen. En hydrolysisprofil över  $IP_6$ - $IP_1$  bör tas med i beräkningen vid bedömningen för vilket enzym som är lämpligast i Oatlys process. En sådan har däremot inte kunnat utföras inom projektets tidsram och således undersöktes både enzymerna i den kombinerade enzymbehandlingen.

Två koncentrationer av varje enzym, Fytas 1 respektive Fytas 2, togs ut inför de kombinerade enzymbehandlingarna. Dels en optimal koncentration för varje enzym, dels en koncentration för varje enzym som gav ungefär samma aktivitet. Eftersom de koncentrationer som undersöktes skulle vara rimliga för en användning i Oatlys process valdes en lägre koncentration för Fytas 2 än den som resulterat i högst mängd fri fosfor efter behandlingen.

Även om nedbrytningen av fytinsyra med Fytas 1 planade ut valdes både brytpunkten och en högre koncentration som den optimala för att inte utesluta att nedbrytning med xylanas skulle kunna höja brytpunkten. Koncentrationer för de kombinerade enzymbehandlingarna presenteras nedan (Tabell 13). De valda koncentrationerna är orangemarkerade i Figur 30 och Figur 32.

Tabell 13. Koncentrationer inför kombinerad enzymbehandling.

Enzym	Optimal koncentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Koncentration för samma aktivitet ( $\mu\text{g/ml}$ )
Fytas 1	1,39, 139	1,39
Fytas 2	160	1,60

## 5.4 Kombinerad enzymbehandling

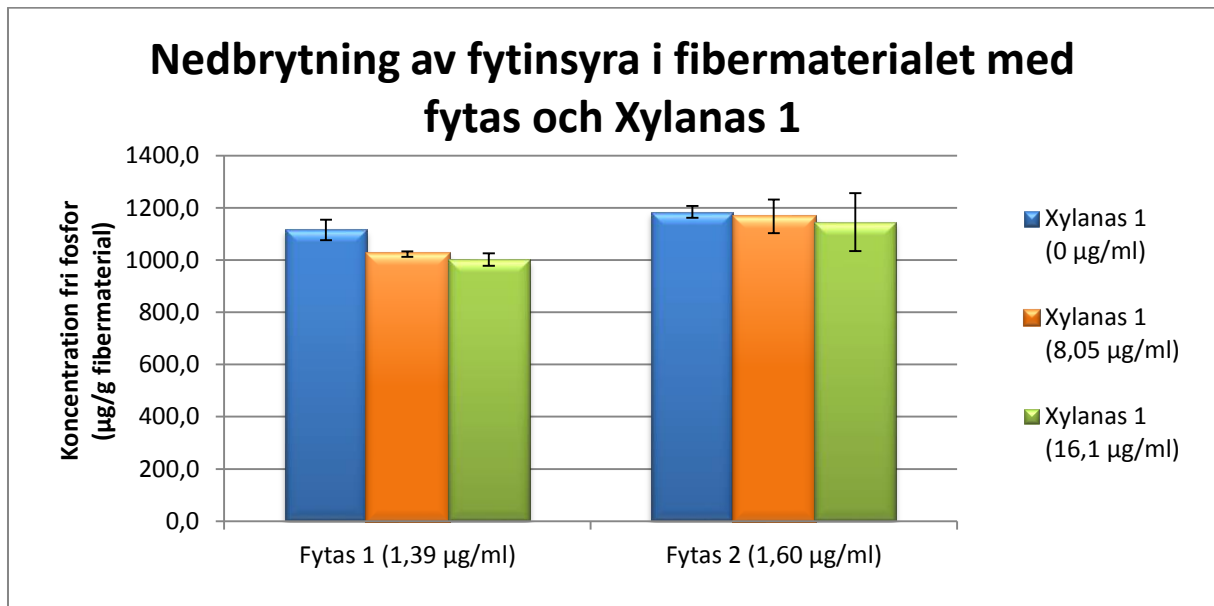
I den kombinerade enzymbehandlingen inkuberades xylanas och fytas samtidigt med fibermaterialet för att studera eventuella synergieffekter.

### 5.4.1 Kombinerad enzymbehandling med Xylanas 1

Inledningsvis inkuberades varje fytas med respektive utan Xylanas 1. De koncentrationer av fytas som användes var de lägre som i fytasbehandlingen visats ha liknande aktivitet.

#### 5.4.1.1 Fri fosforanalys

Koncentrationen fri fosfor analyserades på den lösliga fraktionen (Figur 35).



Figur 35. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med fytas och Xylanas 1 efter inkubering vid 60°C i 120 minuter.

Resultatet visar en marginell minskning av mängden fri fosfor när Xylanas 1 är närvarande. Eftersom standardavvikelsen är större än skillnaden mellan proven med och utan Xylanas 1 kan ingen tydlig effekt påvisas med Xylanas 1 i kombination med respektive fytas. En större datamängd hade behövts för att statistiskt analysera resultaten och eventuellt visa på skillnad dem emellan.

Då Xylanas 1 inte ansågs förbättra nedbrytningen av fytinsyra med Fytas 1 bestämdes den optimala koncentrationen av Fytas 1 under rådande förutsättningar till brytpunkten erhållen från fytasbehandlingen, 1,39 µg/ml.

#### 5.4.1.2 Specifik fytinsyraanalys

Nya inkubationer med de optimala koncentrationerna av fytas med respektive utan Xylanas 1 genomfördes och proven analyserades med avseende på fytinsyra med hjälp av HPIC – high-performance ion chromatography. Fytinsyraanalysen genomfördes på hela provet (Tabell 14). Resultaten var tänkt att jämföras med och komplettera analysresultaten för fri fosforanalys.

Tabell 14. Koncentration fytinsyra i hela proven efter inkubering vid 60°C i 120 minuter. De koncentrationer som använts är följande: Fytas 1 - 1,39 µg/ml, Fytas 2 - 160 µg/ml, Xylanas 1 - 16,1 µg/ml.

Provbehandling	Fytinsyra (vikt%)	Fytinsyra (mg/100 g vid 10 % torrsubstans)
Fytas 1	4,42	442
Fytas 1 + Xylanas 1	4,45	445
Fytas 2	3,71	371
Fytas 2 + Xylanas 1	3,60	360

Marginell skillnad uppmättes mellan prov med och utan Xylanas 1. Någon tydlig förbättring med närvaro av Xylanas 1 utslöts därför vid dessa koncentrationer. En större skillnad ses mellan Fytas 1 och Fytas 2 där Fytas 2 ger mer nedbruten fytinsyra. Detta styrks av tidigare resultat från fri fosforanalys.

#### Reflektioner kring specifik fytinsyraanalys

Värdet på fytinsyrainnehållet i fibermaterialet innan behandling, referensvärdet, var 3,69 vikt%. Resultatet erhållet från fytinsyramätningarna efter enzymbehandling (Tabell 15) visade snarlika värden, vissa till och med över referensvärdet. Det tyder på att en mycket liten del av den totala mängden fytinsyra i hela fibermaterial lyckats brytas ned genom enzymbehandlingarna. Att en del värden var högre än referensvärdet antas bero på att detta inte var analyserat vid samma tillfälle som de enzymbehandlade samt att metoden inte var tillräckligt repeterbar.

Idén om att säkerställa resultaten från fri fosforanalys med en specifik fytinsyraanalys visade sig inte vara möjlig eftersom de två metoderna gav resultat som pekade åt olika håll. Den specifika fytinsyraanalysen pekar på att nästintill ingen fytinsyra brutits ned i fibermaterialet med rimliga mängder fytas. Den fria fosforanalysen utförd med Megazyme kitet indikerade dock på en tydlig nedbrytning av fytinsyra i form av frisatt fosfor i den lösliga fraktionen.

#### 5.4.1.3 Mineral- och proteinanalys

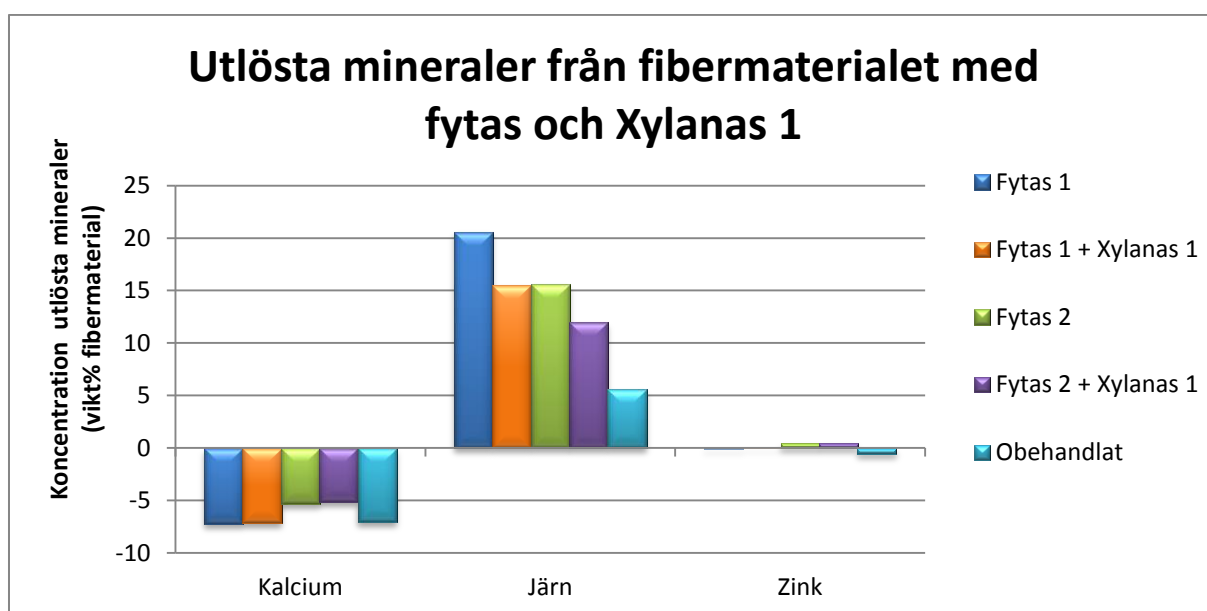
De nya inkubationerna med de optimala koncentrationerna av fytaserna med respektive utan Xylanas 1 analyserades på mineral- och proteinnehåll för att utvärdera behandlingarnas effekt för tillvaratagandet av näringsämnen. Ett obehandlat prov är inkluderat i denna analys. Detta prov har också blivit uppblandat till 6 % TS men inte vidare behandlats, den lösliga fraktionen har analyserats.

## Mineralanalys

Resultaten från mineralanalysen presenteras nedan (Tabell 15 och Figur 36). Denna analys gjordes bara på löslig fraktion.

Tabell 15. Lösliga mineraler efter inkubering vid 60°C i 120 minuter. De koncentrationer som använts är följande: Fytas 1 - 1,39 µg/ml, Fytas 2 - 160 µg/ml, Xylanas 1 - 16,1 µg/ml.

Provbehandling	Kalcium (µg/ml)	Järn (µg/ml)	Zink (µg/ml)
Fytas 1	5,7	3,15	0,070
Fytas 1 + Xylanas 1	6,0	2,42	0,085
Fytas 2	11,1	2,42	0,130
Fytas 2 + Xylanas 1	11,5	1,84	0,130
Obehandlat	6,2	0,88	0,022
Vatten	26,0	0,05	0,078



Figur 36. Utlösta mineraler från fibermaterialet med fytas och Xylanas 1 efter inkubering vid 60°C i 120 minuter. Mängden av mineralerna i det tillsatta vattnet är bortdraget från mängden i provet innan värdet relaterats till den ursprungliga mängden av mineralerna i fibermaterial.

Resultatet från analysen över de lösliga mineralerna skiljer sig tydligt åt mellan de tre olika mineralerna kalcium, järn och zink. Löslig mängd kalcium i förhållande till den ursprungliga mängden i fibermaterialet visade sig bli negativ för alla prov, inklusive det obehandlade provet (Figur 36). Detta tyder på att fibermaterialet har tagit upp kalcium från vattnet vid uppblandning till 6 % TS med kranvatten. En möjlig teori är att fytinsyran i fibermaterialet bundit in kalcium från kranvattnet. Eftersom mängden utlöst järn visade sig vara större föreslogs att järn-fytinsyrakomplex eventuellt hade bytts ut till kalcium-fytinsyrakomplex. Detta resonemang visade sig däremot vara aningen tveksamt då man i en studie över komplexbildningen med fytinsyra visat att järn hade starkare inbindning än kalcium vid pH 7,4 vilket ligger nära aktuellt pH (Ekholm, et al., 2003). Enzymbehandlingarna med Fytas 2, som visat sig ge större mängd fri fosfor och mer total nedbruten fytinsyra än Fytas 1 i tidigare analyser, visar på ett något lägre upptag av kalcium från kranvattnet. En teori är att lägre koncentration fytinsyra fanns tillgänglig för inbindning med kalcium från kranvattnet.



Utlöst mängd järn var positiv för alla prov (Figur 36) vilket tyder på att järn har lösts ut från det olösliga fibermaterialet vid uppblandning till 6 % TS. Den uppmätta lösliga mängden järn efter respektive enzymbehandling är även större i jämförelse med det obehandlade provet. Här ser behandlingarna med Fytas 1 ut som de mest effektiva vad gäller att erhålla lösligt järn. De prov som även behandlats med Xylanas 1 uppvisade en lägre halt av lösligt järn. En anledning till detta skulle kunna vara att när Xylanas 1 brutit ned AX kan de fosfatgrupper på fytinsyran som varit bundna till AX istället binda in nya mineraler.

Resultaten över zinkanalysen visar att utlöst mängd zink nästintill är obefintlig efter de olika enzymbehandlingarna. Det obehandlade provet visar på en något negativ mängd zink i förhållande till den ursprungliga mängden i fibermaterialet vilket liksom för kalcium tyder på att zink tagits upp av kranvattnet. Inbindningen av zink till fytinsyra har visat sig vara starkare vid närvaro av kalcium och att zink även bildar starka komplex med kalcium-fytinsyrakomplex (Foster, et al., 2012). Analysen över kalcium tyder på att kalcium bundits in till fibermaterialet och detta kan förklara varför zink inte lösts ut vid behandlingarna. Troligtvis har starka zink-kalcium-fytinsyrakomplex bildats vilka inte brutits ned vid enzymbehandlingarna. En teori är att järn har bytt plats med kalcium då zink-kalcium-fytinsyrakomplexen antas vara stabilare än järn-fytinsyrakomplexen.

Analysen över järn pekade på att enzymbehandlingarna varit positiva, till exempel frisattes upp till 20 % järn med Fytas 1. Idag tillsätter Oatly järn i sin havredryck. Resultatet visar på att man kan ta tillvara ta järn från fibermaterialet och eventuellt minska på tillsatsen. Däremot kunde inte samma tendens visas med analyser över lösliga mängder kalcium och zink. Analysen över lösliga mängder mineral på fibermaterialet har begränsats till tre mineraler. Det kan även vara av intresse att se hur andra mineraler påverkas av behandlingarna vid utvärdering av fytinsyranedbrytningens effekt.

### Proteinanalys

Eftersom fytinsyran visat sig binda in proteiner och på så sätt antas reducera lösligheten och nedbrytningen av dessa analyserades proteinkoncentrationerna i de lösliga fraktionerna (Tabell 16) (Thompson, 1993). Resultatet visar att alla enzymbehandlade prover erhöll en större mängd löslig protein än den obehandlade lösliga fraktionen. Därtill uppmättes en större andel löslig mängd protein i fraktionerna från de enskilda fytasbehandlingarna jämfört med de från kombinationerna med Xylanas 1.

Tabell 16. Lösliga proteiner efter inkubering vid 60°C i 120 minuter. De koncentrationer som använts är följande: Fytas 1 - 1,39 µg/ml, Fytas 2 - 160 µg/ml, Xylanas 1 - 16,1 µg/ml.

Provbehandlat	Andel lösliga proteiner (vikt% protein i fibermaterialet)	Koncentration lösliga proteiner (mg/ml)
Fytas 1	18,5	32,6
Fytas 1 + Xylanas 1	15,0	26,8
Fytas 2	14,6	25,9
Fytas 2 + Xylanas 1	10,3	17,9
Obehandlat	3,3	29,3

Resultatet visar att behandling med Fytas 1 ger mer proteiner i den lösliga fraktionen än Fytas 2 och att en xylanasbehandling sänker andelen lösliga proteiner. Samma resonemang

kring lösliga proteiner efter xylanasbehandling kan dras som för lösligt järn; de fosfatgrupper på fytinsyran som lösliggjorts från AX efter enzymbehandlingen tros binda in nya proteiner.

Analysen av proteinmängden genomfördes genom Dumas tekniken, vilken vanligtvis används på fasta prover. Då den lösliga fraktionen analyserats i detta fall har mängden protein som detekterats varit mycket liten vilket resulterar i osäkerhet i mätdata.

#### 5.4.2 Kombinerad enzymbehandling med högre koncentrationer Xylanas 1

En teori varför Xylanas 1 inte hjälper nedbrytningen av fytinsyra med fytasen är att utbytet för nedbrytningen av AX inte var tillräckligt effektiv, ca 1,5 % nedbrutet AX. För att se ifall ett större utbyte på nedbrytningen av AX skulle hjälpa inkuberades prover med fytas och upp till 100 gånger så höga koncentrationer än den optimerade av Xylanas 1 (Tabell 17).

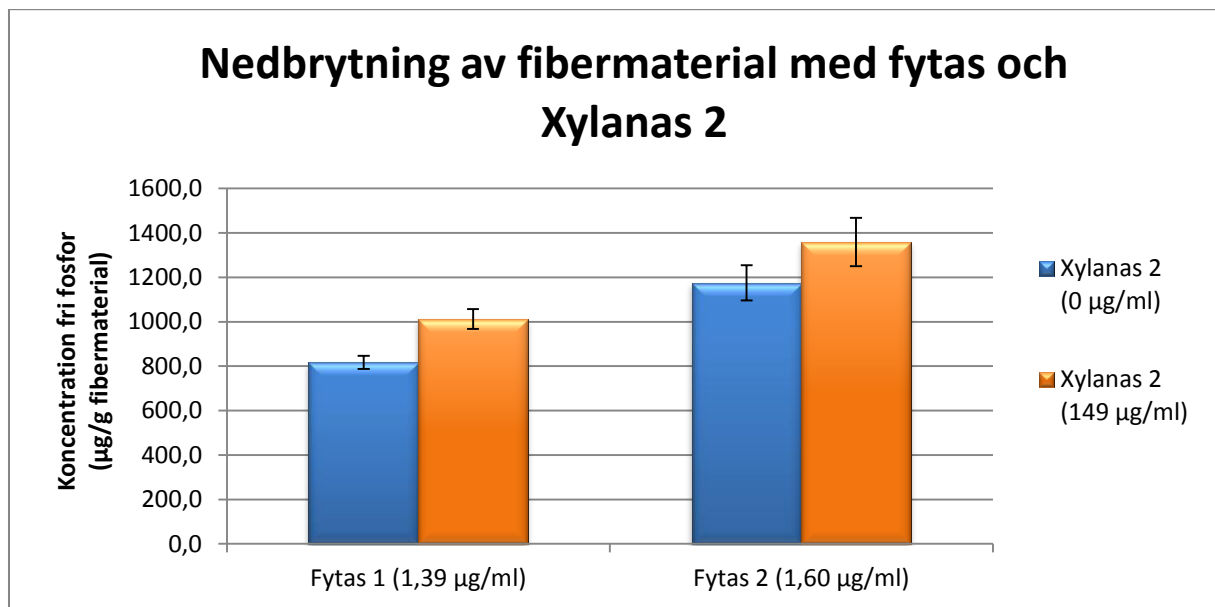
Tabell 17. Nedbrytning av fytinsyra, mätt i fri fosfor ( $\mu\text{g/g}$  fibermaterial) med fytas och Xylanas 1 efter inkubering vid  $60^\circ\text{C}$  i 120 minuter.

Koncentration Xylanas 1	Fytas 1 (139 $\mu\text{g/ml}$ )	Fytas 2 (160 $\mu\text{g/ml}$ )
0	1040 $\pm$ 60	2630 $\pm$ 240
16,1	1140 $\pm$ 0	2320 $\pm$ 10
161	1230 $\pm$ 10	2370 $\pm$ 30
1610	2570 $\pm$ 20	3880 $\pm$ 50

En högre koncentration av Xylanas 1 bidrar till ökad nedbrytning av fytinsyra enligt de resultat som erhöles. Den totala mängden av xylooligosackarider ökar med högre koncentrationer men det bidrar emellertid till ökad andel X1 bland produkterna. Stora koncentrationer av Xylanas 1 är inte applicerbart dels på grund av den stora mängden oönskad X1 men även ur en ekonomisk synvinkel. Eftersom resultatet visar att nedbrytningen av fytinsyra ökar med ökad mängd nedbrutet AX är det av intresse att studera andra möjliga sätt att öka mängden nedbrutet AX. För att se ifall ett annat enzym, med en annan hydrolyprofil skulle kunna öka nedbrytningen av fytinsyra testades därför Xylanas 2.

### 5.4.3 Kombinerad enzymbehandling med Xylanas 2

Kombinationen av fytaserna och Xylanas 2 undersöktes på samma sätt som för Xylanas 1 (Figur 37).



Figur 37. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med fytas och Xylanas 2 efter inkubering vid 60°C i 120 minuter.

Resultatet visar att nedbrytningen av fytinsyra blir marginellt bättre vid närvaro av Xylanas 2 för båda fytaserna. Trenden är däremot inte bevisad med statistiskt underlag. Eftersom de båda xylanaserna gav ungefär samma andel nedbrutet AX efter xylanasbehandlingarna tyder det på att produkterna som erhålls efter xylanasbehandling påverkar fytasernas åtkomst till fytinsyran. Att gå vidare med Xylanas 2 är däremot inte av intresse då det dels inte är livsmedelsgodkänt, dels för att hydrolyprofilen också visat på att det ger en större mängd X1 vilket inte är önskvärt.

### 5.4.4 Utvärdering

Mängden nedbruten fytinsyra utvärderades efter de kombinerade enzymbehandlingarna på samma sätt som efter fytasbehandlingarna. De mätningar som gjordes på laboratoriet med hjälp av fri fosforanalys visade inte på någon tydlig förbättring av nedbrytningen av fytinsyra med rimliga koncentrationer Xylanas 1, dessa resultat styrktes med den specifika fytinsyraanalysen. Däremot kunde en tydlig ökning av fytinsyranedbrytningen urskiljas när höga koncentrationer Xylanas 1 tillfördes. Resultatet tyder på att utbytet av nedbrutet AX har en koppling till nedbruten fytinsyra. Xylanas 2 testades för att se om ett annat enzym med annan hydrolyprofil kunde resultera i en bättre nedbrytning av fytinsyra. En liten förbättring kunde redovisas vilket leder till xylanasernas hydrolyprofil påverkar nedbrytningen av fytinsyra.

Hur nedbrytningen av fytinsyra påverkade tillgängligheten av proteiner och mineraler undersöktes också. Resultatet tydde på att en behandling med Fytas 1 ledde till att fler näringsämnen frisläpptes i den lösliga fraktionen. Denna fraktion är den som skulle kunna återföras till Oatlys process och således ger en behandling med Fytas 1 ett bättre tillvaratagande av den bortseparerade separationen.

De studerade enzymbehandlingarna var även tänkt att kunna tillämpas vid en fullfiberapplikation. I denna applikation skulle hela fiberfraktionen återföras till huvudlinjen. Professor Lena Hulten vid Göteborgs Universitet har fastställt att högst 10 mg fytinsyra per serverad portion ger ett bra järnupptag enligt citat i Eriksson (2013). 240 ml havredryck är likställt med en portion vilket tillåter en fytinsyrahalt på högst 42 mg/100 g fibermaterial i fullfiberapplikationen. Denna nivå har inte uppnåtts efter enzymbehandlingarna baserat på resultatet från den specifika fytinsyraanalysen. Idag har huvudlinjen en fytinsyranivå strax över det rekommenderade värdet men fytasbehandlingar har visat sig kunna sänka nivån till 1,17 mg/100 g (Eriksson, 2013). En uppblandning av fiberfraktionen med en fytasbehandlad huvudfraktion skulle dock inte resultera i en fytinsyranivå under det rekommenderade värdet.

De positiva effekterna från behandlingen, såsom mer lösliga proteiner, mineraler och lösliga oligosackarider, som bidrar till en prebiotisk effekt, erhålls från den lösliga fraktionen. Genom att endast återföra denna fraktion efter separering undgås problemet med den höga fytinsyrahalten som inte kunde sänkas till den önskade nivån i hela provet.

## 5.5 Alternativ behandling

I den alternativa behandlingen analyserades groddade havrekärnor på fytinsyrainnehåll samt löslig mängd av mineraler och proteiner för att utvärdera groddningens effekt på nedbrytningen av fytinsyra och frisättandet av proteiner och mineraler.

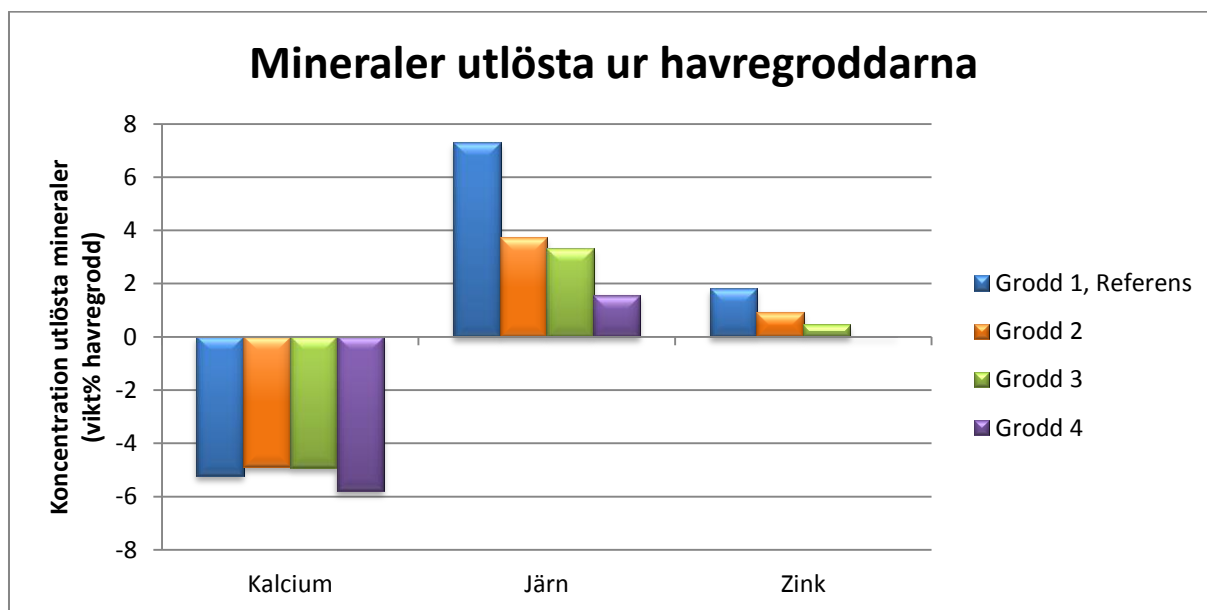
Mängden uppmätt fytinsyra, IP<sub>6</sub>, i de olika groddarna visas nedan (Tabell 18).

Tabell 18. Koncentration fytinsyra efter ökande (1-4) groddningstid.

Material	Fytinsyra (vikt%)
Grodd 1, Referens	0,825
Grodd 2	0,766
Grodd 3	0,739
Grodd 4	0,779

Förhoppningen var att fytinsyramängden i de groddade proverna skulle minska med längre groddningstid. Detta kunde däremot inte påvisas då endast en marginell minskning urskildes mellan grodd 1-3, medan grodd 4 hade en högre mängd än både grodd 2 och 3. Fytinsyrainnehållet i det icke groddade provet, grodd 1, stämmer överens med de av Lolas, et al. (1976) uppmätta värdena för fytinsyrainnehåll i havre.

Mängden lösliga mineraler (Figur 38 och Tabell 19) och löslig mängd protein (Tabell 20) i de olika groddningsproven presenteras nedan.



Figur 38. Utlösta mineraler från havregroddar efter ökande (1-4) groddningstid. Mängden av mineralerna i det tillsatta vattnet är borttaget från mängden i provet innan värdet relaterats till den ursprungliga mängden i havregroddarna.

Tabell 19. Mineraler i den lösliga fraktionen av groddar med ökande (1-4) groddningstid.

Material	Kalcium (µg/ml)	Järn (µg/ml)	Zink (µg/ml)
Grodd 1, Referens	11,2	1,15	0,264
Grodd 2	12,1	0,61	0,172
Grodd 3	12,1	0,55	0,125
Grodd 4	9,7	0,29	0,081
Vatten	26,0	0,05	0,078

Tabell 20. Lösliga proteiner efter ökande (1-4) groddningstid.

Material	Andel lösliga proteiner (vikt% protein i referensen)	Koncentration lösliga proteiner (mg/ml)
Grodd 1, Referens	16,1	80,4
Grodd 2	15,0	74,0
Grodd 3	10,1	50,5
Grodd 4	8,7	43,6

Löslig mängd mineraler och proteiner minskade med längre groddningstid vilket leder till att havrens egna näringsämnen går förlorade vid denna behandling. Då information angående vilken groddningsteknik som använts och vad som är skillnaden mellan de olika proven inte är tillgänglig är en mer ingående analys svår att utföra. Denna alternativa behandling med groddning av havre ansågs inte vara en lämplig metod för att bryta ned fytinsyra och erhålla mer lösliga mineraler och proteiner.

Tidigare studier har visat att groddning kunnat sänka nivån av fytinsyra i havre. En studie på groddning av havrekärnor resulterade i att fytinsyranivån sänktes med nästan 70 % (Tian, et al., 2010). Sänkningen förklaras genom en ökning av fytasaktiviteten under groddningsperioden. Havre tros ha en låg halt av endogent fytas jämfört med andra sädeslag. I en studie hade nedbrytning av fytinsyra med endast endogent fytas i råg ett utbyte 100 % efter två timmar medan utbytet för havre uppkom endast till 55 % efter 17 timmars groddning. (Sandberg & Svanberg, 1991). Då fytinsyranivån ökade i de erhållna groddande proven tyder det på att det endogena fytaset inte har varit aktivt.

En studie där blötläggning tillämpades som groddningsteknik på bondbönor visade resultatet att halten fytinsyra i bönorna minskade efter blötläggning. Studien visade även att en stor del av kalcium, järn och zink löses ut under blötläggningen. (Luo, et al., 2009)

Resultaten från mineralanalysen visar koncentrationen av lösliga mineraler efter uppblandning av malda groddar med vatten. Värdet är relaterat till det totala mineralinnehållet från det icke groddade provet, referensen. Ifall blötläggning har använts som groddningsteknik har det troligtvis resulterat i förluster av mineraler i de groddade proven. Det vore därför av intresse att mäta halten av mineralerna i hela proven efter blötläggningen. Det skulle visa ifall förlusterna av mineralerna sker under blötläggningen eller som resultat av de fysiska och kemiska förutsättningarna som existerar efter groddningen, exempelvis på grund av nivå fytinsyra. Samma resonemang skulle kunna förklara varför halten lösliga proteiner minskade i proven då även de skulle kunna ha lösts ut under en blötläggning.

## 5.6 Reflektioner kring Megazyme kitet för fytinsyra/ total fosforanalys

*Nedan följer observation och diskussion kring Megazyme kitet för fytinsyra/total fosforanalys som användes under projektets gång.*

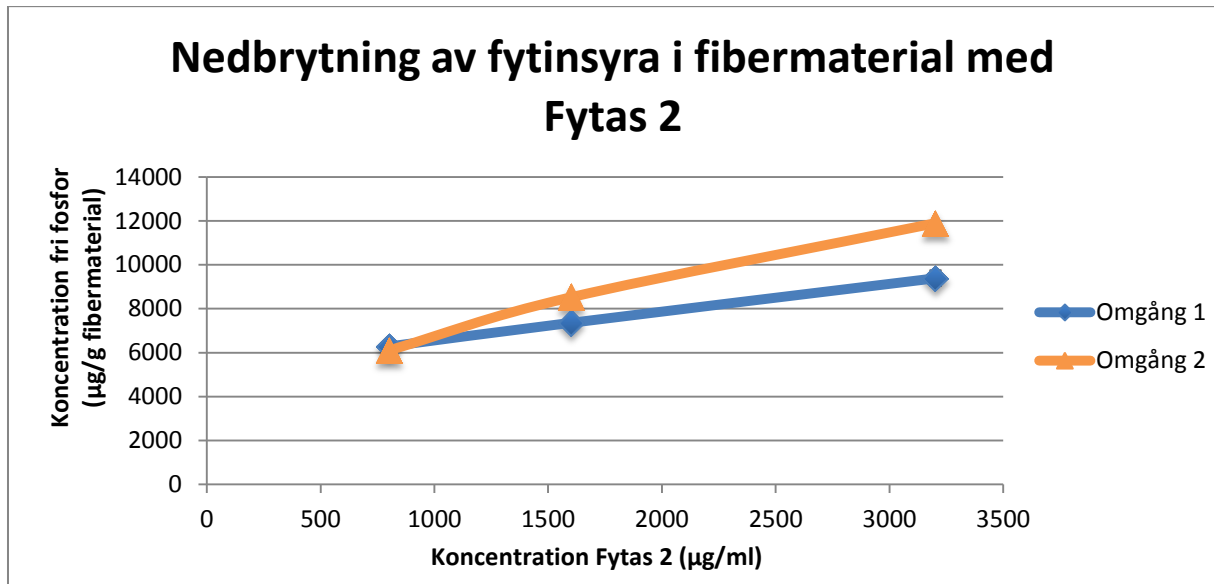
Kitet för fytinsyra/total fosforanalys från Megazyme är konstruerat för att snabbt mäta halten fytinsyra i ett prov. Kitet använder två enzymer för att bryta ned fytinsyran i proven och på så sätt frisätta fosfor som befinner sig i någon form av inositolfosfat. Mängden fosfor bestäms genom absorbansmätning efter en kolorimetrisk reaktion. Denna mängd fosfor benämns total fosfor. Parallellt mäts den fria fosfor genom absorbansmätning efter samma kolorimetriska reaktion på samma ursprungsprov men som inte enzymbehandlats. Skillnaden i koncentration mellan total och fri fosfor relateras till koncentration fytinsyra (4.2.5 Fytinsyra/Total fosforanalys). Beräkningarna från kitet bygger på att den fosfor som brutits ned med hjälp av de tillsatta enzymerna har funnits i form av fytinsyra,  $IP_6$  och inte i någon lägre form,  $IP_5$ - $IP_1$ .

I de inledande försöken mättes både total och fri fosfor efter fytasbehandling i proven. Resultaten från mätningarna av total fosfor, som borde varit ungefär lika, visade en gradient som ökade med koncentrationen av de fytas som användes i projektet. Detta tyder på att de enzym som ingick i kitet inte fullständigt hydrolyserade fytinsyran i proverna och att den totala mängden fosfor därmed underskattades.

Fytinsyrahalten i fibermaterialet analyserades genom kitet på det sätt som beskrivits ovan. Antagandet att all fosfor befunnits sig i form av fytinsyra tros inte vara rimligt utan lägre former av inositolfosfater,  $IP_5$ - $IP_1$  antas existera i fibermaterialet, exempelvis på grund av endogent fytas. Om man i beräkningarna tar hänsyn till detta skulle det resultera i en lägre halt fytinsyra än den uträknade genom de givna instruktionerna. Resultatet från kitet överensstämmer däremot med resultatet från fytinsyraanalysen genom HPIC på Chalmers. Att värdena överensstämmer tros bero på att underskattningen av total fosfor kompenseras med antagandet att all fosfor kommer från  $IP_6$ . De lägre formerna av inositolfosfat,  $IP_5$ - $IP_1$  detekteras inte i HPIC analysen från Chalmers.

Under fytasbehandlingen genomfördes analyser på fri fosfor med hjälp av Megazyme kitet för fytinsyra/ total fosforanalys på prover som inte enzymbehandlades, blankprover (4.2.6 Fri fosforanalys). Värdet för dessa prover varierade kraftigt men borde ha varit ungefär lika. Nio analyser gjordes på blankproverna och de varierade mellan 125 och 360  $\mu\text{g}$  fri fosfor/g fibermaterial med ett medelvärde på 262  $\mu\text{g}$  fri fosfor/g fibermaterial. Standardavvikelsen var 111  $\mu\text{g}$  fri fosfor/g fibermaterial.

En omgång med enzymbehandlade prov analyserades två gånger med ett par dagars mellanrum. Då enzymerna inaktiverats efter inkuberingen och proverna stått i kylskåp antas ingen signifikant skillnad uppstå i proven mellan analystillfällena. Resultatet av de fria fosforanalyserna från de båda analysomgångarna visas nedan (Figur 39). Dubbelprover har analyserats i båda fallen. Resultatet visar att analysen mellan de två analystillfällena skiljer sig tydligt åt.



Figur 39. Nedbruten fytinsyra, mätt genom fri fosfor, med Fytas 2 efter inkubering vid 60°C i 120 minuter. De olika serierna representerar mätning av samma prov vid olika tillfällen.

Standardavvikelseerna inom en batch är låg, men däremot är standardavvikelseerna mellan batcherna höga vilket illustreras i grafen ovan samt exemplifieras med blankproven. Det tyder på att repeterbarheten för analysmetoden inte är bra.

### 5.6.1 Projektets användning av Megazyme kitet för fytinsyra/ total fosforanalys

Eftersom hydrolysen med kitets egna enzymet inte tros vara fullständig har inga resultat från fytinsyra/total fosforanalys används i projektet förutom vid uppskattningsberäkningar inför fytasbehandlingen.

På grund av den dåliga repeterbarheten på fri fosforanalys med Megazyme kitet har värden inte jämförts mellan batcher. Detta har också uteslutit statistisk utvärdering av stora datamängder. Standardavvikelseerna inom batcherna har däremot varit låga och jämförelser mellan värden inom batcherna har därför ansetts vara trovärdiga.

De mest intressanta proven skickades till Chalmers analys med HPIC – high-performance ion chromatography som antogs vara mer specifik och noggrann. Däremot visade sig dessa analyser inte vara jämförbara och resultaten pekade åt olika håll.



## 6 Slutsats

Vid projektets början bestämdes att tre fytaser skulle undersökas. Fytas 3 visade sig inte vara stabilt under de valda processförhållandena och inbegreps inte i vidare försök. Analysresultaten i projektet visade att Fytas 1 frisatte fler näringsämnen i den fraktion som skulle återföras till Oatlys process med rimliga mängder enzym. 20 % järn och 19 % protein från innehållet i fibermaterialet återfanns i den lösliga fraktionen efter enzymbehandling med Fytas 1. Resultaten från specifika fytinsyraanalysen indikerade däremot på att fytinsyranedbrytningen varit mer effektiv med Fytas 2. Den fria fosforanalysen gav större koncentration fri fosfor med rimliga mängder Fytas 2, cirka 20 % av ursprunglig mängd fosfor bundet i fytinsyra, än med rimliga mängder Fytas 1, motsvarande cirka 8 %. Detta tolkades som att fytinsyranedbrytningen varit mer effektiv med Fytas 2. För att vidare utvärdera de tvetydiga resultaten från de två enzymerna vore det lämpligt att analysera dess nedbrytningsprodukter.

De behandlingar med Fytas 1 och Fytas 2 som analyserades med specifik fytinsyraanalys resulterade i en mycket högre nivå än den rekommenderade högsta nivån för tillämpning i en fullfiberapplikation även efter utblandning med huvudfraktionen som efter fytasbehandling kan nå en fytinsyranivå långt under det rekommenderade värdet.

Resultaten från de kombinerade enzymbehandlingarna med rimliga värden Xylanas 1 pekade inte på någon tydlig effekt från xylanaset på nedbrytningen av fytinsyra i fibermaterialet. Däremot konstaterades att enzymbehandling med stor mängd xylanas i kombination med fytas gav ett högre utbyte av nedbruten fytinsyra, baserat på det resultat som erhöles med fri fosforanalys. Dessa försök genomfördes dock med orimliga mängder Xylanas 1 och ökad andel oönskad X1. Resultatet stödjer dock hypotesen om att fytinsyran är lättare att bryta när de olösliga fibrerna luckrats upp och öppnar upp för funderingar på alternativa behandlingar för att bryta ned fiberstrukturen.

Den alternativa behandling för fytinsyranedbrytning i form av groddning som undersöktes i projektet visade sig inte ge några positiva effekter på varken fytinsyra-, mineral- eller proteininnehåll. Flera tidigare studier har dock visat att groddning kan sänka fytinsyranivån och öka halten av lösliga mineraler och proteiner. De groddar som undersöktes anses inte vara ett bättre alternativ än icke groddad havre men groddning i sig skulle vara av intresse att undersöka under mer kontrollerade former.

## 7 Förslag till fortsatt arbete

Inom tidsramen för projektet fanns inte utrymme att utföra en IP<sub>6</sub>-IP<sub>1</sub> analys. En sådan analys skulle ge värdefull information över fytasernas hydrolysisprofil. Analysen är ett viktigt komplement för att kunna utvärdera fytasernas nedbrytningsprodukter vilket har visat sig påverka tillgängligheten av mineraler och proteiner.

Ur närings synpunkt är det viktigt att se till både fytinsyrainnehåll och mineral- och proteininnehåll. Utbytet av flera viktiga mineraler än de som studerats kan vara värt att titta vidare på. Efter en studie utförd av Ekholm et. al (2003) över lösligheten av mineraler i havre med hjälp av fytas och naturliga kelaterande ämnen drog slutsatsen att tillgängligheten av mineraler kunde ökas med en kombination av fytasbehandling och tillsatts av citronsyra. Citronsyran innehåller tre karboxylgrupper och bildar lätt lösliga komplex med katjoner så som mineraler. Eftersom citronsyra är godkänt för tillsatts i Oatlys produktionsprocess kan det därför vara av intresse att undersöka hur mineraltillgängligheten skulle påverkas med en kombination av fytasbehandling och tillsatts av citronsyra. (Ekholm, et al., 2003)

I projektet visade det sig vara svårt att bryta ned AX och därmed göra det lösligt. AX måste isoleras från cellväggen för att bli löslig, när den befinner sig i den intakta väggen är den korslänkad med andra komponenter vilka formar en olöslig struktur (Palmero Rivera Cambas, 2011). Det är därför av intresse att fortsätta titta på vilka sätt man kan tillämpa för att bryta ned AX, exempelvis med enzymer eller alternativa metoder.

I bakgrundsdelen och enzymkapitlet klargjordes att polysackariden AX, är en komplex molekyl som kräver en blandning av enzymer för att hydrolyseras fullständigt. Eftersom det visade sig vara svårt att uppnå ett högt utbyte på nedbrytningen av AX med rimliga mängder av studerat xylanas föreslås vidare studier på olika enzymblandningar för att öka utbytet nedbruten AX. Det skulle då även vara av intresse att analysera dessa blandningar i kombination med Fytas 1.

Vid examensarbetets start gjordes avgränsningen att inte studera malningens effekt på fiberbehandlingen mer ingående på grund av tidsramen. En mer optimerad mekanisk bearbetning av fiber materialet än vad som utförts skulle däremot kunna luckra upp fiberstrukturen ytterligare och eventuellt öka utbytet av nedbruten fytinsyra. Eftersom ett malningssteg är applicerbart i det föreslagna sidospåret i Oatlys process är detta ytterligare en möjlig bearbetning som skulle vara av intresse för Oatly att titta vidare på.

Exempel på andra förbehandlingar som luckrar upp fiberstrukturen är alkalisk-, värme- samt ångbehandling. Om dessa skulle kunna vara applicerbara i Oatlys process är de också värda att titta vidare på i framtiden.

## 8 Referenslista

Adlercreutz, P., Dicko, C., Larsson, P.-O. & Månsson, M.-O., 2010. *Enzyme Technology*. Lund: Center for Applied Life Sciences, CALS.

Cabrera-Orozco, A., Jiménez-Martínez, C. & Dávila-Ortiz, G., 2013. Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality. i: H. A. El-Shemy, red. "*Soybean - Bio-Active Compounds*". CC BY 3.0 License.

Bergman, E.-L., Carlsson, N.-G., Hasselblad K, Sandberg A.-S., Skoglund E, 2001. Radid Analysis of Inositol Phosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1695-1701.

Chen, Q., 2004. Determination of Phytic Acid and Inositol Pentakisphosphates in Foods by High-Performance Ion Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4604-4613.

Collins, T., Gerday, C. & Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 3-23.

Coulibaly, A., Koukou, B. & Chen, J., 2011. Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1: 1-22.

DFS Food Processing Enzymes, 2010. *Phytase® 5000 L Enzyme Data Sheet*. DSM Food Specialities B.V..

DSM Food Specialities B.V., 2010. *PHYTASE® 5000 L (1000kg container) Product Specification Sheet*. DSM Food Specialities B.V..

Ebringerová, A. & Heinze, T., 2000. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communication*, 21: 542-556.

Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M. & Johansson, L., 2003. The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry*, 80: 165-170.

Eriksson, L., 2011. *Malning av havrefiber med Supermasscolloider på VTT Finland*.

Eriksson, L., 2012. *Projektupplägg Examensarbete - "Förbättrade hälsoeffekter på flytande havrebas"*.

Eriksson, L., 2013. [Intervju] (09 04 2013).

Faure, A. M., Münger, L. H. & Nyström, L., 2012. Potential inhibitors of the ascorbate-induced  $\beta$ -glucan degradation. *Food Chemistry*, 134: 55-63.

Chu, A., Foster, M., Hancock, D., Karra, M., Petocz, P., Picone, T., Samman S., 2012. Dietary Fiber Intake Increases the Risk of Zinc Deficiency in Healthy and Diabetic Women. *Biological Trace Element Research*, 149: 135-142.

Frontela, C., Ros, G. & Martínez, C., 2011. Phytic acid content and "in vitro" iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. *Journal of Cereal Science*, 54: 173-179.

Goldman, N., 2009. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. *Basic Biotechnology*, 5: 31-36.

Greiner, R. & Konietzny, U., 2006. Phytase for Food Application. *Food Technology and Biotechnology*, 44: 125-140.

Hammermeister, A., 2008. *The Anatomy of Cereal Seed: Optimizing grain quality involves getting the right proportions within the seed.* [Online]

Available at: [http://www.oacc.info/NewspaperArticles/na\\_anatomy\\_seed\\_ah.asp](http://www.oacc.info/NewspaperArticles/na_anatomy_seed_ah.asp)

[Använd 27 maj 2013].

Helmer, O. M. & Fouts, P. J., 1936. *Gastro-intestinal studies. VII. The excretion of xylose in pernicious anemia*, Indianapolis: Lilly Laboratory for Clinical Research, Indianapolis City Hospital, and the Department of Medicine, Indiana University School of Medicine.

Holguin-Acuña, A. L., 2011. Non-Stach Polysaccharides in Maize and Oat: Ferulated Arabinoxylan and  $\beta$ -Glucans. i: V. Preedy, R. Watson & V. Patel, red. *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. p. 153-159.

Javier Pastor, F. J., Gallardo, Ó., Sanz-Aparicio, J. & Díaz, P., 2007. Xylanases: Molecular Properties and Applications. i: J. Polaina & A. P. MacCabe, red. *Industrial Enzymes*. Springer Netherlands, p. 65-82.

Livsmedelsverket, 2012. *Livsmedelsverket*. [Online]

Available at: [www.slv.se](http://www.slv.se)

[Använd 03 06 2013].

Lolas, G. M., Palamidis, N. & Markakis, P., 1976. The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oat, soybeans and wheat. *Cereal Chemistry*, 53: 867-871.

Lopez, H. W., Leenhardt, F., Coudray, C. & Remesy, C., 2002. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition?. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 727-739.

Li, Y., Luo, Y., Xie, C., Xie, W., Zhenxin, G., 2009. Impact of soaking and phytase treatments on phytic acid, calcium, iron, and zinc in faba bean fractions. *International Journal of Food Science & Technology*, 44: 2590-2597.

- Maharaj, M., Kumar, A., Permaul, K. & Singh, S., 2011. Purification and Fluorescence Spectroscopy Analysis of A Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 and its Thermostability Under Denaturation Conditions. *Atlas Journal of Chemistry & Biochemistry*, 1: 1-9.
- Manning, T. J. & Grow, W. R., 1997. Inductively Couple Plasma - Atomic Emission Spectrometry. *The Chemical Educator*, 2.
- Megazyme, 2007. *Phytic Acid (Phytate) / Total Phosphorus*, Bray: Megazyme International Ireland Ltd..
- Miller, S. S. & Fulcher, R. G., 2011. Microstructure and Chemistry of the Oat Kernel. i: F. H. Webster & P. J. Wood, red. *Oats: Chemistry and Technology Second Edition*. St. Paul, MN: AACC International, Inc, p. 77-94.
- Dahlberg, L., Gorton, L., Holst, O., Nelson T., Nordberg Karlsson, E., 1998. Enzymatic specificity and hydrolysis pattern of the catalytic domain of the xylanase Xyn1. *Journal of Biotechnology*, 60: 23-35.
- Novozymes A/S, 2011. *Pentopan® Mono Conc. BG Product Data Sheet*. Novozymes A/S.
- NSVA, 2011. *NSVA Nordvästra Skånes Vatten och Avlopp*. [Online] Available at: <http://www.nsva.se/Global/Dokument/Vattensammans%C3%A4ttning/F%C3%B6r%C3%A4ndring%20av%20vattensammans%C3%A4ttning%20%C3%A5ter%20Bolmen%2020110310.pdf> [Använd 22 maj 2013].
- Oatway, L., Vasanthan, T. & Helm, J. H., 2001. Phytic Acid. *Food Reviews International* , 17: 419-431.
- Othman, R. A., Moghadasian, M. H. & Peter, J. J., 2011. Cholesterol-lowering effects of oat  $\beta$ -glucan. *Nutrition Reviews*, 69: 299-309.
- Palmero Rivera Cambas, P., 2011. *Palatability improvements of a full fiber oat drink by enzymatic cell-wall degradation*, Lund: Lund University.
- Pastor, J. F. I., Gallardo, Ó., Sanz-Aparicio, J. & Díaz, P., 2007. Xylanases: Molecular properties and applications. i: J. Polaina & A. P. MacCabe , red. *Industrial enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer Netherlands, p. 65-74.
- Pöttering, H. & Le Maire, B., 2008. EUROPAPARLAMENTETS OCH RÅDETS FÖRORDNING (EG) NR 1332/2008. *Europeiska unionens officiella tidning*.
- Sandberg, A.-S. & Svanberg, U., 1991. Phytate Hydrolysis by Phytase in Cereals; Effects on In Vitro Estimation of Iron Availability. *Journal of Food Science*, 56: 1330-1333.

- Shrestha, D. R., 2012. *Effects of supplemented NSP-degrading enzymes on nutrient digestibility of diets containing co-products fed to grower pigs*, Edmonton: University of Alberta.
- Sluiter, A., 2008. *Determination of Total Solids in Biomass and Total dissolved Solids in Liquid Process Samples*, Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter, A., 2005. *Determination of Ash in Biomass*, Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter, A., 2011. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*, Golden, US: National Renewable Energy Laboratory.
- Stehlin, J. & Pettersson, J., 2009. *PAD detektorer och analys av kolhydrater - en St. Bernhards lathund*.
- Sydvatten, 2011. *Sydvatten*. [Online]  
Available at: [http://www.sydvatten.se/\\$2/ny-vattensammansattning-lund-2011-02-18.pdf](http://www.sydvatten.se/$2/ny-vattensammansattning-lund-2011-02-18.pdf)  
[Använd 22 maj 2013].
- Thompson, L. U., 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International*, 26: 131-149.
- Tian, B., 2010. Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chemistry*, 119: 1195-1200.
- van Driel, K. A., Rodbumrer, J., Pandee, P. & Poonmak, J., 2010. *Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University*. [Online]  
Available at: <http://www.sc.mahidol.ac.th/scmi/phytase.htm>  
[Använd 20 maj 2012].
- van Vliet, W. F. & Muller, K., 1968. *The determination of sugar in potatoes (A preliminary report)*, European Association for Potatoe Research, Section Physiology, Sugar Analysis Committee, Section 8.
- Wang, N. S., *Glucose Assay*. [Online]  
Available at: <http://terpconnect.umd.edu/~NSW/ench485/lab4a.htm>  
[Använd 28 maj 2013].
- Welch, R. W., 2011. Nutrient Composition and Nutritional Quality of Oats and Comparisons with Other Cereals. i: F. H. Webster & P. J. Wood, red. *Oats: Chemistry and Technology Second Edition*. St. Paul, MN: AACC International, Inc, p. 95-107.
- Wennerberg, C., Nordberg Karlsson, E. & Holst, O., 2010. *Batch Cultivation of Genetically Engineered Escherichia coli for Recombinant Protein Production*. Lund.

Xu, R., 2012. Oat fibre: overview on their main biological properties. *European Food Research and Technology*, 234: 563-569.

Zhang, H., Önning, G., Öste Triantafyllou, A. & Öste, R., 2007. Nutritional properties of oat-based beverages as affected by processing and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2294-2301.

Önning, G., Åkesson, B., Öste, R. & Lundquist, I., 1998. Effects of Consumption of Oat Milk, Soya Milk, or Cow's Milk on Plasma Lipids and Antioxidative Capacity in Healthy Subjects. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 42: 211-220.

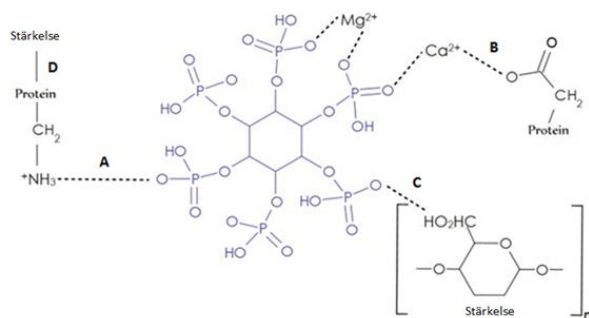
## Appendix 1 – Populärvetenskaplig artikel

### Enzymbehandling av fiber i havredryck – ett sätt att förbättra tillgängligheten av näringsämnen?

Anna Aronsson, Sara Strandberg

Oatly är ett företag som tillverkar en dryck baserat på en flytande havrebas. De har uppmärksammat att höga halter fytinsyra, som finns i havre, är kopplat till försämrad biotillgänglighet av mineraler och proteiner. Syftet med vårt arbete är därför att sänka nivån av fytinsyra i den flytande havrebasen. (Eriksson, 2013)

Fytinsyra ( $IP_6$ ) är den huvudsakliga lagringsformen av fosfor i spannmål och växter och kan stå för upp till 80 % av plantans fosforinnehåll (Lopez, et al., 2002). Fytinsyran består av sex fosfatgrupper och beroende på lösningens pH bildas olika anjoner. Vid fysiologiskt pH är fytinsyrans fosfatgrupper negativt laddade och binder lätt in till positivt laddade komponenter såsom mineraler och proteiner (Figur 1). Dessa bildade komplex absorberas inte i tarmen och kan följaktligen inte heller metaboliseras. (Coulibaly, et al., 2011).

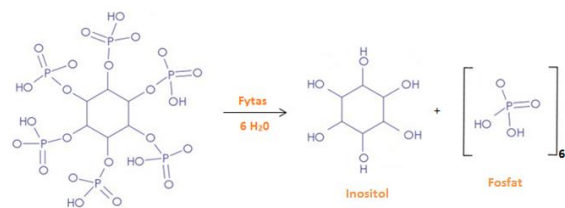


Figur 1. Möjliga inbindningar med fytinsyran i mitten (Cabrera-Orozco, et al., 2013).

Den tillgängliga mängden mineral är viktigare än den totala mängden mineral man får i sig för att bibehålla en tillräcklig mineralbalans i kroppen. Om man

exempelvis ätit mycket fiberrik mat med stor halt fytinsyra finns det risk för att de mineraler och proteiner man fått i sig under samma måltid är bundna till fytinsyran och därmed är otillgängliga. (Frontela, et al., 2011)

Fytas är ett enzym som har förmågan att hydrolysera fytinsyra ( $IP_6$ ) till inositol och inositolfosfaterna  $IP_5$ – $IP_1$ , där siffran indikerar antalet fosfatgrupper. En fullständig nedbrytning till inositol (Figur 2) och delvis nedbrytning till olika inositolfosfater förekommer. Det är främst fytinsyra ( $IP_6$ ) samt  $IP_5$ , som binder in mineraler. Fytaser bör därför bryta ner fytinsyra till  $IP_4$  –  $IP_1$  eller inositol för att näringsämnen ska frisättas och bli tillgängliga. (Chen, 2004)



Figur 2. Nedbrytning av fytinsyra med fytas (Cabrera-Orozco, et al., 2013).

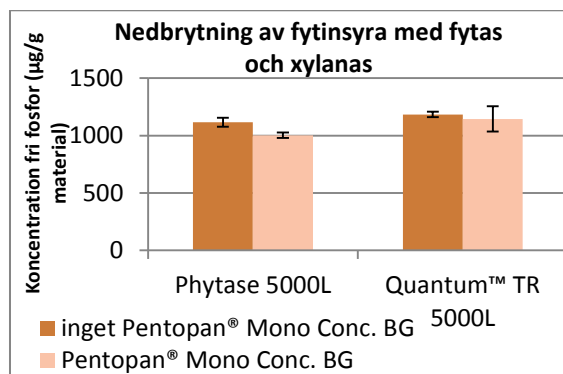
Tidigare försök att med hjälp av enzymet fytas bryta ned fytinsyran i havredryckens fiberfraktion visade att det var problematiskt att bryta ned fytinsyran i det olösliga materialet. En möjlig orsak kan vara att fytinsyran sitter hårt bunden till olösliga fibrer och därför är svåråtkomlig. I det olösliga materialet sitter näringsämnen, såsom proteiner och mineraler, bundna. Av både miljömässiga och ekonomiska skäl är det värdefullt att utnyttja havrens ursprungliga näringsämnen. Oatly har därför varit intresserade av att undersöka en bearbetning som bryter ned de olösliga fibrerna i kombination med en



fyttasbehandling på olösligt fibermaterial (Eriksson, 2013).

I vårt arbete har ett fibernedbrytande enzym, xylanas, studerats för att degradera och lösliggöra fibrerna. Tre fytaser studerades enskilt och i kombination med xylanaset. Xylanaset förväntades bryta ned en del av de fibrer som fytinsyran tros vara bunden till och förhoppningen var att fytinsyranedbrytningen skulle bli mer effektiv vid närvaro av xylanas.

Optimal koncentration av xylanaset Pentopan® Mono Conc. BG som bryter ned fiberstrukturen arabinoxylan i havrens cellväggar, bestämdes och kombinerades med de bestämda optimala koncentrationerna av Phytase 5000L och Quantum™ TR 5000L (Figur 3). Det tredje fytaset, Sternzym PHY 21097, undersöktes inte vidare då det inte visat sig vara aktivt vid lämpliga tids- och temperaturintervall.



Figur 3. Nedbrytning av fytinsyra. Felstaplarna indikerar en standardavvikelse.

Ingen tydlig synergieffekt kunde urskiljas med xylanaset och fytaserna med optimerade mängder xylanas. Större mängder xylanas tillsattes för att se ifall mer nedbrutna fiber skulle ge en effekt. Dessa mängder är inte rimliga att tillsättas i Oatlys produktion då koncentrationen av nedbrytningsprodukten xylos blir för hög. Xylos bör undvikas då den bland annat tillför drycken en sötare smak, inte kan metaboliseras och tyder på att prebiotiska

produkter brutits ned. Större mängder xylanas än den optimerade visade på en förbättring av fytinsyranedbrytningen (Tabell 1) men gav samtidigt frisättning av xylos.

Tabell 1. Nedbrytning av fytinsyra, mätt i µg fri fosfor/g material, angivet som medelvärde ± en standardavvikelse. Fet stil visar optimal koncentration av Pentopan® Mono Conc. BG.

Koncentration Pentopan® Mono Conc. BG (µg/ml)	Phytase 5000L	Quantum™ TR 5000L
0	1040 ± 60	2630 ± 240
<b>16,1</b>	<b>1140 ± 0</b>	<b>2320 ± 10</b>
161	1230 ± 10	2370 ± 30
1610	2570 ± 20	3880 ± 50

Resultatet med höga mängder xylanas stödjer hypotesen om att fytinsyran är lättare att bryta ner när de olösliga fibrerna luckrats upp. Problemet att bryta ned en tillräckligt stor del av fibrerna kvarstår. Alternativa behandlingar för att bryta ned fiberstrukturen rekommenderas därför att titta vidare på i samband med en fytasbehandling. Dessa skulle kunna inkludera cocktails av olika fibernedbrytande enzymer, mekanisk nedbrytning i form av malning eller värme-alkalisk- samt ångbehandling.

## Referenser

Cabrera-Orozco, A., Jiménez-Martínez, C. & Dávila-Ortiz, G., 2013. Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality. i: H. A. El-Shemy, red. "Soybean - Bio-Active Compounds". CC BY 3.0 License.

Chen, Q., 2004. Determination of Phytic Acid and Inositol Pentakisphosphates in Foods by High-Performance Ion Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4604-4613.

Coulibaly, A., Koukou, B. & Chen, J., 2011. Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1: 1-22.

Eriksson, L., 2013. [Intervju] (09 04 2013).

Frontela, C., Ros, G. & Martínez, C., 2011. Phytic acid content and "in vitro" iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. *Journal of Cereal Science*, 54: 173-179.

Lopez, H. W., Leenhardt, F., Coudray, C. & Remesy, C., 2002. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition?. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 727-739.