



Miljø- og  
Fødevareministeriet  
Miljøstyrelsen

# Bedre udnyttelse af valle på mindre mejerier

Miljøprojekt nr. 2064

Januar 2019

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Eleonora Miquel Becker, Teknologisk Institut

Maria Barmar Larsen, Teknologisk Institut

ISBN: 978-87-7038-032-4

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

# Indhold

<b>1.</b>	<b>Forord</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Introduktion</b>	<b>6</b>
2.1	Præsentation af Mammen Mejeri, Endrup Andelsmejeri og Løgismose Mejeri	6
2.1.1	Mammen Mejeri A/S	6
2.1.2	Endrup Andelsmejeri	6
2.1.3	Løgismose Mejeri	6
2.2	Valle og vallens bestanddele	6
2.2.1	Bestanddele i mælk – råvaren for produktion af ost og valle	6
2.2.2	Beskrivelse af osteproduktionen og dannelse af valle som biprodukt	7
2.2.3	Valletyper og bestanddele	7
2.2.4	Nuværende anvendelsesområder for vallens bestanddele	8
<b>3.</b>	<b>Arbejdspakke 1 - Separation af valleprotein og genanvendelse af vand</b>	<b>9</b>
3.1	Aktivitet 1.1. Opsætning af separationsanlæg i laboratorieskala	9
3.1.1	Vallefiltrering ved brug af engangsdialysefiltre	9
3.1.2	Brug af hæmodialysefiltre til koncentreret af valle og produktion af WPC60	10
3.1.3	Økonomisk sammenligning - forudsætninger	11
3.1.4	Driftsøkonomisk sammenligning	11
3.1.5	Samlet vurdering	11
3.2	Opstilling af separationsanlæg i laboratorieskala	12
3.3	Aktivitet 1.2 Opkoncentreret af valle i forskellige proteinfraktioner	12
3.3.1	Vallemængder og anvendelse af vallen fra mejerierne	17
3.4	Aktivitet 1.3 Opkoncentreret af biprodukter som laktose og mulig afsætning	20
3.5	Aktivitet 1.4 Rensning af overskudsvand til teknisk vand	21
<b>4.</b>	<b>Arbejdspakke 2 – Karakterisering af valleproteinfraktioner og -produkter</b>	<b>22</b>
4.1	Aktivitet 2.1 Udvælgelse af metoder til karakterisering af valleprotein	22
4.2	Aktivitet 2.2 Karakterisering af valleproteinfraktioner	23
4.3	Aktivitet 2.3 Karakterisering af biprodukter ved oprensning af valleprotein	25
4.4	Aktivitet 2.4 Karakterisering af vandkvalitet	26
4.5	Aktivitet 2.5 Analyser til massebalance	26
<b>5.</b>	<b>Arbejdspakke 3 – Udvikling af indkapslede valleprotein-produkter</b>	<b>27</b>
5.1	Aktivitet 3.1 Teoretisk videnindsamling omkring indkapsling med valleprotein	27
5.1.1	Baggrund: Mikroindkapsling af fødevaringredienser	27
5.1.2	Valleproteiner som indkapslingsmateriale	27
5.1.3	Eksempler på fødevaringredienser indkapslet i valleproteiner	34
5.1.4	Indkapsling af probiotika	35
5.2	Aktivitet 3.2 Indkapsling af valgte aktivstoffer	37
5.2.1	Komplekse coacervater – indledende forsøg uden aktivstof	37
5.2.2	Olie-i-vand-emulsioner – indledende forsøg uden aktivstof	40
5.2.3	Indkapsling af carvon i spraytørrede olie-i-vand-emulsioner	41
5.3	Aktivitet 3.3 Evaluering af indkapslede produkt	43
5.4	Aktivitet 3.4 Vurdering af forretningspotentiale for indkapslet produkt	45

<b>6.</b>	<b>Arbejdspakke 4 – Udvikling af ingrediens til drikkeligt produkt</b>	<b>47</b>
6.1	Aktivitet 4.1 Fastlæggelse af egenskaber for det anvendte valleprotein	47
6.2	Aktivitet 4.2 Anvendelse af koncentrerede vallefraktioner i drikkelige produkter	49
6.3	Aktivitet 4.3 Evaluering af det drikkelige produkt	50
6.4	Aktivitet 4.4 Vurdering af potentiale for drikkeligt produkt	51
<b>7.</b>	<b>Referencer</b>	<b>53</b>
	<b>Bilag 1. Økonomisk beregning</b>	<b>56</b>

# 1. Forord

Dette er afslutningsrapporten for projektet "Bedre udnyttelse af valle på mindre mejerier" under Miljø- og Fødevarerministeriets tilskudsordning "Program for Grøn Teknologi".

Projektet blev gennemført i perioden 1. november 2014 til 31. marts 2017.

Projektet er gennemført i et samarbejde mellem Endrup Andelsmejeri, Mammen Mejeri A/S, Løgismose Mejeri A/S, Aarhus Universitet, MyDrink Beverages og Teknologisk Institut.

Denne rapport giver et samlet overblik over det arbejde, der er udført i løbet af projektet.

Til at følge projektet var der nedsat en følgegruppe, der bestod af:

- Niels Jacob Nyborg, Mejeriforening
- Stefan Borre-Gude, Aarhus Universitet
- Lasse Tellerup Møller, Miljøstyrelsen
- Maria Barmar Larsen, Teknologisk Institut.

Valle, et biprodukt fra osteproduktion, har mange anvendelsesmuligheder, men opkoncentrering af den flydende valle til eksempelvis mælkeprotein er en dyr og kompliceret proces, som de færreste små mejerier har råd til selvom det åbner nye forretningsmuligheder. Som det er i dag, sælger de små mejerier den overskydende valle til enten landmændene som grisefoder eller til store mejerier, som netop råder over et opkoncentreringsanlæg og derfor kan forædle vollen selv.

Projektet har arbejdet med at finde alternative anvendelser for den flydende valle, så de mindre mejerier kan springe tørreprocessen over og optimere deres indtjening. Der er undersøgt to anvendelsesområder: Ét hvor den flydende valle anvendes direkte til fitnessdrikke og et andet, hvor vollen bruges som indkapslingsmateriale i tyggegummi.

De fitnessdrikke, der kan købes på markedet i dag forudsætter brugen af tørret valle. Derfor har man arbejdet med at oprense små mængder flydende valle via membranfiltrering, som herefter er blevet afprøvet til drikke tilsat forskellige smage. Smagstest viste, at produkterne er på højde med de kommercielle drikke fremstillet på vallepulver. Udfordringen er på nuværende tidspunkt den flydende valles begrænsede holdbarhed der stiller krav til logistikken.

Den anden anvendelsesmulighed der er undersøgt i projektet er brugen af flydende valle til indkapsling af eksempelvis smagsstoffer i tyggegummi. I dag anvender man ofte maltodextrin, men indtil videre tegner brugen af flydende valle lovende. Forsøgene viste, at vollen har gode egenskaber som stabilisator af olie-i-vand-emulsioner. Indkapsling af smagsstof, carvon, i tyggegummi var ikke så entydig og flere forsøg er nødvendigt for at belyse den applikation.

## 2. Introduktion

Projektet har været opdelt i fire arbejdsplaner med henblik på at nå projektets mål, nemlig at undersøge potentialet i at etablere decentral opkoncentrering af valleprotein på mindre mejerier.

Arbejdsplanerne i projektet har været:

- Separation af valleprotein og genanvendelse af vand
- Karakterisering af valleproteinfraktioner og -produkter
- Udvikling af indkapslede valleproteinprodukter
- Udvikling af ingrediens til drikkeligt produkt.

Resultaterne fra hver arbejdsplan gennemgås i kapitel 3-kapitel 6.

I de følgende afsnit gives der en kort introduktion til de tre deltagende mejerier samt til valle og vallens bestanddele.

### 2.1 Præsentation af Mammen Mejeri, Endrup Andelsmejeri og Løgismose Mejeri

De tre mejerier, som har valgt at deltage i projektet Bedre udnyttelse af valle på mindre mejerier, er Mammen Mejeri, Endrup Andelsmejeri og Løgismose Mejeri.

#### 2.1.1 Mammen Mejeri A/S

Mammen Mejeri producerer ud over de kendte Danbo-oste en række andre gule oste af typerne Samsø og havarti. Ud over de traditionelle ostetyper fremstilles hvidost, flødeost, specialoste, skæreoste og blåskimmelost. Mammen mejeri producerer årligt 6.000 tons ost og en årlig valle-mængde på 73.000 tons (Staunsbæk, 2015).

#### 2.1.2 Endrup Andelsmejeri

Endrup Andelsmejeri producerer de kendte Danbo- og havartityper med hver deres kendetegn og særlige smag. Produktionen foregår i den lille landsby Endrup i Vestjylland, hvor der er produceret ost siden 1884. Endrup Andelsmejeri producerer årligt 2.000 tons ost og en årlig valle-mængde på 20.000 tons (Frandsen, 2015).

#### 2.1.3 Løgismose Mejeri

Løgismose Mejeri blev grundlagt i 1969 på det tidligere Haarby Mejeri. Mejeriet, der i 1990 blev omlagt til økologisk produktion, har i dag til huse i det tidligere Allested Mejeri, der er fra 1910, men som er ombygget ad flere omgange. Løgismose Mejeri fremstiller forskellige mejeriprodukter, herunder rygeost, salatost og skyr. Mejeriet har en årlig produktion af valle på 2.250 tons valle fra deres skyrproduktion, 1.000 tons fra salatostproduktionen og 500 tons fra rygeostproduktionen (Toft, 2015).

### 2.2 Valle og vallens bestanddele

#### 2.2.1 Bestanddele i mælk – råvaren for produktion af ost og valle

Mælk er en unik råvare, som bruges af koen til at ernære kalven. Derudover anvendes mælken og dens bestanddele til at brødføde verdens befolkning på samtlige kontinenter. Mælk betragtes både som en emulsion, en kolloidalopløsning og en ægte opløsning på grund af de forskellige bestanddeles dispersionsgrad i mælken og de dertilhørende egenskaber (Fox & McSweeney, 1998).

Mælken består af forskellige indholdsstoffer, såsom vand, fedtstoffer, proteiner, kulhydrater, ioner og salte. Variationer i mælkens sammensætning afhænger af arveanlæg, fodring, tidspunkt i laktationsperioden, årstiden, malkningstidspunktet og eventuelle sygdomme. Disse variationer vil have betydning for mælkens sammensætning, og tilsvarende vil mælkens opbevaring og processering have betydning for ostens og vallens beskaffenhed (Hambræus, L. & Lønnerdal, 2003).

Vallens sammensætning og beskaffenhed, herunder denaturering af proteinerne, vil afhænge af råvaren og af den proces, som vollen gennemgår, dvs. om vollen er fjernet fra ostemælken inden ostningsprocessen eller vollen gennemgår en traditionel ostningsproces (Sørensen, 2014).

### **2.2.2 Beskrivelse af osteproduktionen og dannelse af valle som biprodukt**

Fremstilling af ost er en ældgammel metode til konservering af mælk. For at undgå skadelige bakterier i osten pasteuriseres mælken, inden den anvendes. I ostetanken eller ostekarret tilsættes forskellige ingredienser, afhængigt af typen af ost der skal fremstilles. Der tilsættes enten vegetabilsk eller animalsk løbe, for at mælken kan koagulere og vollen drænes fra. Kalciumklorid tilsættes for at forbedre mælkens evne til at koagulere. Nitrat eller salpeter tilsættes ostemælken for at modvirke udvikling af smørsyrebakterier. I nogle ostetyper tilsættes der salt ved ostning for at forbedre vandbindingen af proteinerne.

Der findes som udgangspunkt tre typer processer for ost kaldet stukket, fisket og æltet. Danbo og Samsø er typiske stukne ostetyper, Havarti og Esrum er fiskede og Maribo er karakteriseret som en æltet ost.

Vallen drænes fra ostemassen under fremstillingen, både i ostetanken og i for- og efterpresen. Vallen filtreres for ostesnus fra osteproduktionen, pasteuriseres og køles, hvorefter den kan anvendes som prima råvare til fremstilling af diverse vallebaserede produkter. Vallen var tidligere et biprodukt, som blev givet til foder til grise og andre dyr i besætningen for at få afsat produktet. Ved at udvinde valleproteinerne fra mælken i stedet for senere i processen opnås mindst mulig beskadigelse af valleproteinerne og de bioaktive komponenter. Idéen med at udvinde valleproteinerne direkte fra mælken er på nuværende tidspunkt i en udviklingsfase, og små og mindre mejerier i Danmark fremstiller ost under de traditionelle forhold (Nielsen, 2000), hvor ost er det primære produkt og vollen biproduktet, som bliver anvendt til foder eller solgt til store mejerier.

### **2.2.3 Valletyper og bestanddele**

Vallen karakteriseres på baggrund af måden den er produceret på, og som hovedregel inddeles vollen efter, om den er sød eller sur. Sur valle opnås, hvis mælken koaguleres med syre og har et lavere pH. Sød valle opnås, hvis valle koaguleres med proteolytiske enzymer, såsom chymosin og pepsin, og har et højere pH. Den kemiske sammensætning af vallepulver afhænger af, hvilken type koagulation der er anvendt. Indholdet af protein, laktose og fedt er lidt lavere i sur valle end i sød valle. Som eksempel kan nævnes, at vollen fra Quark (Løgismose) har et lavere indhold af protein sammenlignet med vollen fra almindelig gul ostproduktion (Mammen, Endrup). Sammensætning af vollen varierer fra produktion til produktion og vil afhænge af mælkens forbehandling og henstand inden anvendelse. Endvidere vil mælkens og vallens kemiske sammensætning afhænge af enhedsoperationerne i mejeriet og af, hvilken type valle som udnyttes fra produktionen til videre bearbejdning.

Vallens holdbarhed er forholdsvis kort, og hvis vollen udnyttes til human ernæring, vil der ofte blive foretaget en løbende bearbejdning af vollen i mejeriet. Indledningsvis fjernes vallesnus (fines), som består af små ostekorn fra vollen, vollen centrifugeres, og vallefedt indgår i en

ny produktion. Vallesnus kan genanvendes i smelteostproduktion eller genindarbejdes i osteproduktionen i recepter, som tillader dette. Det skal bemærkes, at det langt fra er alle mejerier, der genanvender ostefines i produktionen.

Den totale mængde valle, som er til rådighed på de små mejerier i Danmark, udgør mellem 150 og 170 mio. kg per år med et gennemsnitlig tørstofindhold på 5-6 %. Mange af de mindre mejerier har ingen faciliteter til behandling af valle, hvorfor vollen pumpes i en tank og henstår, indtil den bliver afhentet og anvendt som foder eller bliver udspreddt på mark. De fire største af de små mejerier er Them, Mammen, Thise og Endrup, som producerer ca. 90 % af den tilgængelige valle på de små mejerier, mens Åsaa, Grøndahl, Ingstrup, Jernved, Nørup og Løgismose mejeri har en årlig indvejning af mælk på 2-4 mio. liter, hvoraf ca. den samme mængde bliver til valle ved osteproduktion.

#### **2.2.4 Nuværende anvendelsesområder for vallens bestanddele**

Vallen og vallens bestanddele har stor værdi og anvendelsesmuligheder i mange industrier, herunder fødevarerindustrien og medicinalvarerindustrien. Vallen leveres fra mejerierne filtreret, skummet og pasteuriseret. Valleproducenterne adskiller vollen og dens komponenter i de ønskede fraktioner, der sælges som ingredienser til fødevarerindustrien eller medicinalvarerindustrien.

Valleproteinerne sælges som rene enkeltproteiner og som kombinationer af forskellige proteiner. Produkter omfatter valleproteinkoncentrat, valleprotein-isolat, hydrolyseret valleprotein, mikropartikulerede valleproteiner og forskellige pulverprodukter afledt af de pågældende produkter. I vollen udvindes endvidere laktosen og en gruppe af enzymer, herunder lactoperoxidase (LP), som anvendes som naturlig antimikrobiel agent.

Valleproteinkoncentrat fremstilles ved, at vollen opkoncentreres til et proteinindhold mellem 29 og 89 %. Koncentrat kan indgå som ingrediens i forskellige fødevarer-systemer, mens valleproteinisolat indeholder mellem 89 og 92 % protein. Ved et højere proteinindhold opnås et lavere fedt- og laktoseindhold, som kan være ønsket i nogle produkter. Proteinhydrolysater er produkter, hvor proteiner er nedbrudt til mindre molekyler ved hydrolyse. De mikropartikulerede valleprodukter er tilgængelige i forskellige varianter, hvor der ændres på den kemiske sammensætning af vollen i kombination med fremstillingsprocessen.

Mikropartikuleret valleprotein bruges i mejeriindustrien til fx oste med lavt fedtindhold og i mælkedrikke som fedtstatning, hvor der ønskes mere viskositet og mundfornemmelse. På nogle store mejerier, hovedsageligt i udlandet, bruges vollen til fremstilling af ricottaost, eller vollen mikropartikuleres direkte og tilsættes som ingrediens til eksisterende produkter.

Valleproteinerne sælges som rene enkeltproteiner til medicinalvarerindustrien og som ernæring (nutrition) til ældre og sportsudøvere, som ønsker eller har behov for et ekstra kosttilskud. I fødevarerindustrien bruges de forskellige valleprodukter indenfor baby mad, diæt mad, kødprodukter, supper og dressinger, bageriprodukter, mejeriprodukter og forskellige drikkevarer og konfektur. Endvidere udvindes laktosen fra vollen for at udnytte alle komponenter, og laktosen sælges ligeledes som en ingrediens til fødevarerindustrien, fx til konfektursegmentet og til farmaindustrien, hvor den fx anvendes i matricen af tabletter (3A Business Consulting/ADPI/EWPA/ZMP, Bylund, 1995; Poulsen, 2015).



# 3. Arbejdspakke 1 - Separation af valleprotein og genanvendelse af vand

Denne arbejdspakke har fokuseret på miljøvenlige, tidsbesparende og energirigtige teknologier til opkoncentrering af valle. Arbejdspakken har været inddelt i fire aktiviteter, som gennemgås nedenstående.

## 3.1 Aktivitet 1.1. Opsætning af separationsanlæg i laboratorieskala/valg af membrantype

I projektansøgningen var der til *Arbejdspakke 1: Separation af valleprotein og genanvendelse af vand* foreslået, at man kunne anvende to forskellige typer af filtreringsudstyr til koncentring af vallen:

- filtre til koncentring af valleprotein af samme type, som man anvender medicinsk til hæmodialyse af blod fra patienter med nyresvigt
- konventionelt membranfiltreringsudstyr (mikro-, ultra- og nanofiltrering).

I afsnit 3.1.1 gives en kortfattet analyse af tekniske og økonomiske aspekter ved anvendelse af engangsdialysefiltre til koncentring af proteiner i valle.

### 3.1.1 Vallefiltrering ved brug af engangsdialysefiltre

Sterile engangsfiltre til ultrafiltrering af blod ved hæmodialyse har til formål dels at fjerne vand fra patienternes blodbaner, dels at fjerne lavmolekylære affaldsstoffer som fx urea. Fjernelsen sker ved en kombination af trykdrevet og diffusionsdrevet ultrafiltrering af blodet og overførsel af stoffer fra blodbanen til dialysevæsken (dialysat). Dialysat er den vandige opløsning af bl.a. salte og sukker, der cirkulerer på bagsiden af filtermembranen. Hæmodialysefiltre er typisk små stavformede hollow-fibre-filtre, ca. 20-30 cm lange, med et dødvolumen på 50-100 ml og et effektivt membranareal på 1-2 m<sup>2</sup>.

Membranerne i dialysefiltrene har typisk en MWCO (molvægt cut-off) i størrelsesordenen 30-60 KDa. De største molekyler, der ønskes fjernet fra blodet, er  $\beta$ 2-microglobulin (MW=11,8 KDa). Proteiner skal så vidt muligt tilbageholdes i blodbanen. Den mindste af molekylerne er serum albumin med en MW på 66 KDa (Barzin et al., 2004). Serum albumin findes også i vallen (udgør ca. 10 % af proteinindholdet), mens valleproteinernes hovedbestanddele,  $\beta$ -lactoglobulin og  $\alpha$ -lactalbumin, er mindre molekyler med en vægt på 15-20 KDa, og MWCO for UF-anlæg til koncentring af valleproteiner er typisk i størrelsesordenen 20 KDa. Hæmodialysefiltrene er således designet til tilbageholdelse af proteiner, der er større end de typiske valleproteiner.

Produktet FX1000 er et af de dialysefiltre fra Fresenius Medical Care, der har størst kapacitet, se Figur 3.1.

**Figur 3-1** Tekniske data for FX1000.

Tekniske data	
Effektivt areal (m <sup>2</sup> )	2,2
Flow (ml/min)	250-600

Et filter som FX1000 har typisk en blodgennemstrømningsrate på 250-600 ml/min med et væsketræk (permeatflow) på fra 1 til 3 l/h. Dette svarer til et permeatflow i størrelsesordenen 1 l/(m<sup>2</sup>·h) (Holm, 2015). En dialysesession varer typisk 3-4 timer, hvorefter det brugte filter kasseres. Den maksimale kapacitet (rent filter og ved et maksimalt transmembrantryk (TMP) på ca. 60 KPa) giver jf. den oplyste UF-koefficient et maksimalt permeat flow på 17 l/(h·m<sup>2</sup>) (Holm, 2015). Det reelle flow ligger dog i praksis under dette niveau, dels fordi membranen vil tilstoppe under brugen, dels fordi behov for gennemstrømning (crossflow) i fibrene giver et tryktab i enheden og dermed et mindre gennemsnitligt, drivende tryk end det maksimale. Crossflow etableres dels for at minimere tilstopning af membranen, dels for at undgå for stor koncentrationsvariation i feedvæsken fra indløb til udløb (og deraf følgende stigende viskositet).

Prisen på et FX1000 filter er ved køb af få antal ca. 140 kr./stk. (Holm, 2015). Ved store indkøb reduceres prisen naturligvis, men det har ikke været muligt at få oplyst hvor meget.

### 3.1.2 Brug af hæmodialysefiltre til koncentrering af valle og produktion af WPC60

I det følgende foretages en kvalitativ vurdering af mulighederne for at anvende engangsfiltre (som dem, der anvendes til hæmodialyse, fx Fresenius Medical Care FX1000) til produktion af WPC60 (koncentrat med et tørstofindhold på ca. 15-18 %, hvoraf 60 % er protein, og 40 % er laktose og salte). Desuden foretages en grov økonomisk sammenligning af den traditionelle metode til produktion af WPC60 baseret på UF-anlæg med spiralvundne moduler med en situation, hvor engangsdialysefiltre anvendes til vallekoncentreringen. Nøgledata brugt i vurderingen er samlet i Figur 3.2.

Figur 3-2 Nøgletal for vurdering.

Parameter	Spiralvundne 6" UF-moduler	FX1000 hæmodialysefilter
TMP drift	2-3 bar	Maks 0,7 bar <sup>1)</sup>
Crossflowhastighed	0,5-1 m/s <sup>8)</sup>	0,03 m/s
Permeatflux	15 l/(m <sup>2</sup> ·h) <sup>2)</sup>	17 l/(m <sup>2</sup> ·h) <sup>3)</sup>
Feedlumen	ca. 1000 µm	210 µm
MWCO	Ca. 15-20 KDa	40-50 KDa <sup>4)</sup>
Membranareal pr. modul	Ca. 18 m <sup>2</sup> <sup>5)</sup>	2,2 m <sup>2</sup>
Modulpris	2.500-3.000 kr./stk. <sup>6)</sup>	140 kr./stk. <sup>7)</sup>
Membranpris (pr. m <sup>2</sup> )	160 kr.	64 kr.
Levetid	2 år	24 timer <sup>9)</sup>

Noter: 1) Holm (2015); 2) Kønigsfeldt (2013); 3) Baseret på uf-koefficient for blod ved 37 °c på 75 ml/(h·mmhg) for en fx1000 med 2,2 m<sup>2</sup> effektiv membranareal (Fresenius, 2007). Dette er korrigeret under antagelse af en viskositetsforøgelse for valle som for vand ved ændring af driftstemperatur fra 37 til 10 °c (ca. fordobling af viskositet og dermed halvering af ydelsen); 4) Ikke specifikt oplyst af Fresenius, men vurderet ud fra angivne filtreringskoefficienter og ønske om stor passage af stoffer under 10 kda og tilbageholdelse af serum albumin (mw 66 KDa); 5) areal afh. af valg af feedspacer, her en "46-mil" (1,2 mm) spacer; 6) pris for ét stk. spiralmodul ø 6" l = 100 cm, Kønigsfeldt (2013); 7) holm (2015) 8) ca. 20 m<sup>3</sup>/h for et 6" filterelement. Baseret på at ca. 50-60 % af tværsnitsarealet blokeres af feedspacer, membran og permeatspacer; 9) Under forudsætning af at filtrene ikke kan CIP-renses, men skal bortskaffes efter en anvendelse.

Membranerne i hæmodialysefiltrene har som nævnt en noget større MWCO-værdi, end traditionelt anvendt til vallefiltrering. Hvis filtrene anvendes med uændret membrantype, vil man risikere at få et stort tab af valleprotein med permeatet.

Filtrene kan evt. produceres med en mere egnet (tæt) membrantype, men det er usikkert, hvad det vil koste, og det vil alt andet lige betyde en lavere permeatflux pr. filter.

### 3.1.3 Økonomisk sammenligning - forudsætninger

Det forudsættes, at omkostninger til opførelse af det nødvendige anlæg med rør i rustfrit stål, pumper, CIP-anlæg mv. er i samme størrelsesorden for anvendelse af traditionelle spiralvundne moduler som ved anvendelse af engangshæmodialysefiltre. De rørsystemer, slanger og pumper, der bruges, skal i begge tilfælde kunne tåle CIP-rengøring og skal derfor udføres som fx syrefast, rustfrit stål. Godstykkelse kan formentligt reduceres for engangsfiltrene, der kører ved betydeligt lavere tryk end de spiralvundne filtre. De traditionelle spiralvundne UF-filtre monteres typisk i rør indeholdende 3 stk. moduler med samlet ca. 65 m<sup>2</sup> membran (base-ret på Ø 6" modul, L 100 cm/modul og 46-mil feedspacer). Det kræver ca. 30 stk. FX1000 for at få et tilsvarende membranareal. Disse skal monteres i sæt, så udskiftning af brugte filtre kan ske hurtigt, og det samlede system kan CIP-renses.

Udgifter til tab af produkt, brug af vand og kemikalier til CIP vil være nogenlunde lige store for de to systemer. I begge tilfælde vil en forbehandling af vallen med keramisk UF-filtrering være nødvendig for at holde antallet af bakterier i vallen lavt og dermed muliggøre en driftstid mellem CIP på ca. 20-24 timer ved 10 °C, som det er tilfældet i dag på konventionelle anlæg med spiralvundne filtre.

Det antages, at permeatydelse angivet for engangsfiltrene ved filtrering af blod (der har ca. 6 % proteinindhold) svarer nogenlunde til ydelsen ved filtrering af WPC60 (ca. 11 % proteinindhold, og TS ca. 16-17 %). Traditionelle spiralmembraner fungerer ved højere transmembran tryk og crossflow, hvilket giver en højere ydelse sammenlignet med engangsfiltrene. Engangsfiltrene har til gengæld en større MWCO, hvilket påvirker ydelsen positivt (men effektiviteten for proteintilbageholdelse negativt).

### 3.1.4 Driftsøkonomisk sammenligning

For et anlæg med en kapacitet til behandling af et valleflow på 50 m<sup>3</sup>/h (og dermed produktion af ca. 2,3 m<sup>3</sup>/h WPC60 og ca. 48 m<sup>3</sup>/h permeat) giver de årlige omkostninger til membraner for de to løsninger:

- Konventionelle membraner ca. 0,26 mio. kr./år
- Engangsenheder FX1000 ca. 75 mio. kr./år (se bilag 1).

Det nødvendige membranareal er sammenligneligt for de to løsninger, ca. 3.200 m<sup>2</sup>. Selv med en indkøbspris ved indkøb af meget store mængder på 1/10 af den oplyste, vil omkostningerne til membraner være helt uoverstigelige sammenlignet med den konventionelle løsning. Hertil kommer automatik eller mandetimer til daglig udskiftning af de nødvendige ca. 1.500 filterenheder, for ikke at tale om omkostninger til affaldsbortskaffelse. Det er ikke klart, om engangsfiltrene evt. vil kunne genbruges efter CIP, men da filtrene ikke er designet til CIP, er det meget tvivlsomt, dels om filtrene kan holde til den kemiske påvirkning fra CIP-væskerne, dels om CIP-væskerne kan gennemskylle alle dele af filtrene og dermed effektivt kan rense filtrene efter brug. Det er bl.a. dette krav, de spiralvundne moduler er udviklet til at kunne opfylde.

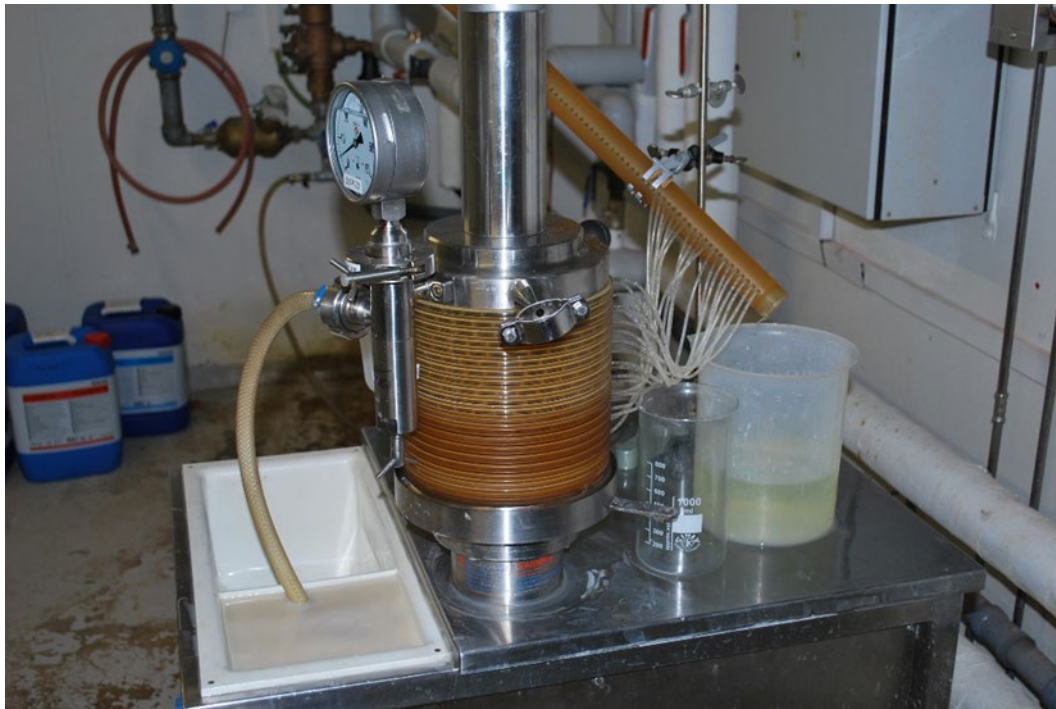
Til sammenligning med ovenstående udgifter er verdensmarkedsprisen for valleprotein i størrelsesordenen 40-50 kr. pr kg protein for spraytørret WPC-produkt. Ovenstående case med 50 m<sup>3</sup>/h valle og drift 20 timer/dag svarer til en mulig proteinindtægt på i størrelsesordenen 90 mio. kr./år. Set i det lys bliver udgiften til engangsmembraner helt urealistisk høj.

### 3.1.5 Samlet vurdering

Teknisk vil der muligvis kunne anvendes engangshæmodialysefiltre til koncentrering af valle, men der er en række forhold, der kan komme i vejen for dette, både i relation til membrantype og i relation til muligheden for at CIP-rende og genanvende filteret. Økonomisk er det med stor sikkerhed ikke et realistisk alternativ, selv med de skøn og usikkerheder, der ligger i ovenstående analyse.

### 3.2 Opstilling af separationsanlæg i laboratorieskala

Som det fremgår af ovenstående afsnit, viste det sig ikke økonomisk rentabelt at filtrere vollen med engangsdialysefiltere. I stedet blev det besluttet at udføre alle nødvendige udviklingsforsøg med et membranfiltreringsudstyr bestående af en M20 plate-and-frame-modul med UF-membran af typen Alfa Laval GR73PP (10 kDa), se Figur 3.3. Resultaterne fra de gennemførte forsøg er beskrevet i det følgende afsnit.



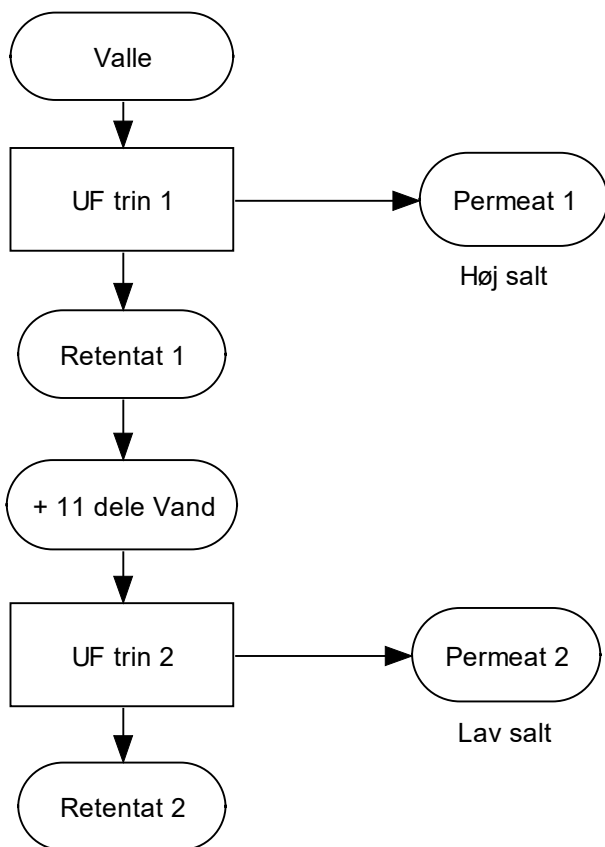
**Figur 3-3** Membranfiltreringsudstyr benyttet til udvinding af protein fra valle fra de deltagende mejerier.

### 3.3 Aktivitet 1.2 Opkoncentrering af valle i forskellige proteinfraktioner

Det overordnede formål med denne aktivitet var at fremstille forskellige kvaliteter af opkoncentreret valle til de to anvendelsesformål i projektet, nemlig produktion af et drikkeligt produkt samt indkapsling af aktivstoffer. Anvendelserne stiller forskellige krav ift. tørstofindholdet:

- Drikkeligt produkt: 15-25 % tørstof. Salt 0,1-0,3 %
- Indkapsling: 10-15 % tørstof. Salt 0,1-0,3 %.

Til begge anvendelser er der anvendt samme fremgangsmåde til at opkoncentrere vollen som illustreret på Figur 3.4. Således er vollen blevet ultrafiltreret batchvis med henblik på at opkoncentrere tørstof og proteinindhold. Herefter er der blevet udført en reduktion af indholdet af salte og sukke i retentatet a la diafiltrering. Dette er gjort ved at tilsætte vand efterfulgt af en sekundær ultrafiltrering. Alle membranfiltreringer er udført ved brug af vandkøling ved 12-14 °C for at mindske mikrobiologisk vækst.



**Figur 3-4** Anvendte metoder til udvinding og oprensning af protein leveret alle fra mejerier.

I projektet er der i alt blevet filtreret 390 liter valle fra Endrup og 150 liter valle fra Mammen over en periode på ca. tre uger igennem 12 batchforsøg med en typisk behandlet mængde på 50-60 liter pr. dag. Der er efter hver batchforsøg kørt CIP-behandling på anlægget ved brug af base ved pH=13 ved ca. 50 °C fulgt af skylning. Herudover er der foretaget en mere grundig 3-trins-CIP-rensning 1 gang pr. uge med brug af et enzymmix, syre og base -alle ved ca. 50 °C. Rensemidlerne er leveret af firmaet Ecolab.

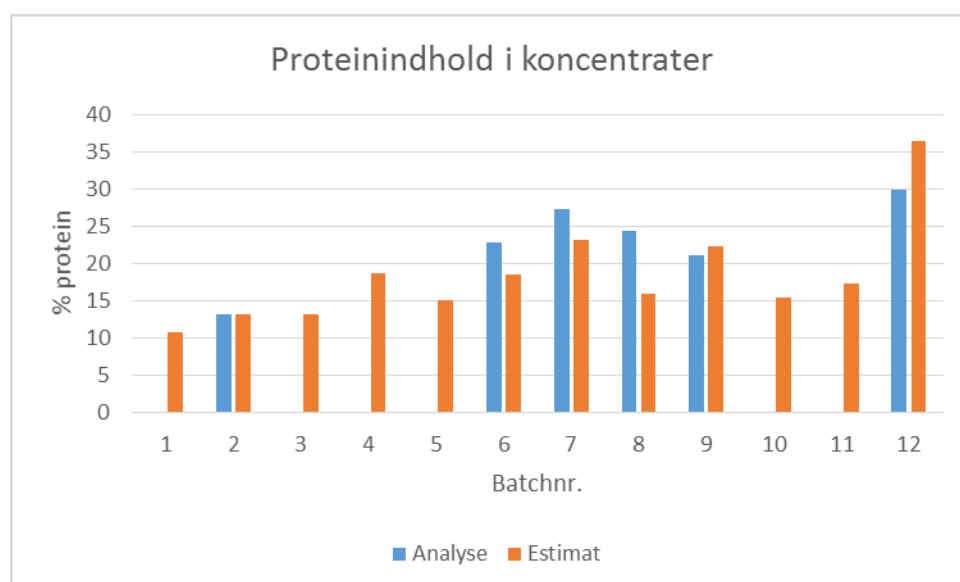
I Figur 3.5 er proteinindholdet af retentatet for de 12 batchforsøg angivet som analyseresultat samt som estimeret indhold på baggrund af opkoncentreringsfaktoren. Proteinindholdet er bestemt ud fra to interne analysestandarder.

**Figur 3-5** Resultater for membranbehandlinger af valle fra mejerier.

Batch	Mejeri	Analyse	% protein analyse	% protein estm.	Salt %	Fedt %	Total sukre %
1	Endrup	Opkoncentrering x1		10,79	0,32	0,1	2,9
2	Endrup	Opkoncentrering x1	13,24	13,16			
2	Endrup	Input (råvalle)	0,60				
3	Endrup	Opkoncentrering x1		13,16			
4	Endrup	Opkoncentrering x1		18,65			
5	Endrup	Opkoncentrering x1		15,12			
6	Endrup	Opkoncentrering x2	22,89	18,59	<0,027		1,2
7	Endrup	Opkoncentrering x1	27,24	23,21			
8	Endrup	Opkoncentrering x1	24,32	15,96			
9	Mammen	Opkoncentrering x1	21,11	22,30			
10	Mammen	Opkoncentrering x1		15,49			
11	Mammen	Opkoncentrering x2		17,37			
11	Mammen	Input (råvalle)	0,66		0,1	0,05	
11	Mammen	Opkoncentrering batch 10 og 11	17,69	16,47			7,3
12	Mammen	Opkoncentrering x2	29,85	36,49	<0,008		

De estimerede proteinkoncentrationer er bestemt ud fra den analyserede proteinmængde i den tilførte valle, tilført mængde valle (l), fraført mængde koncentrat og en estimeret restmængde af væske på 0,48 liter i membranudstyret (restmængden findes i slanger og hulrum og kan ikke pumpes ud).

De analyserede og estimerede protein koncentrationer er vist på Figur 3.6 og viser god overensstemmelse.



**Figur 3-6** Analyserede og estimerede proteinkoncentrationer.

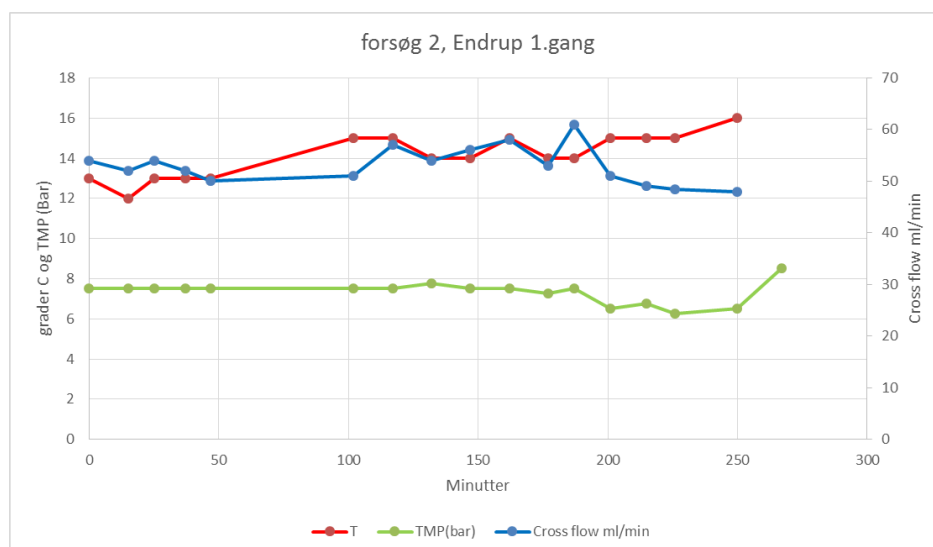
Med den benyttede ultrafiltreringsmembran, som er permeabel for salt og sukre, forventes saltkoncentration samt koncentration af sukre at være i den samme størrelsesorden i både retentat og permeat for begge filtreringstrin. Saltkoncentrationen i råvallen er 0,1-0,32 %. Efter anden filtrering er saltkoncentrationen reduceret til 0,008-0,027, hvilket er på grænsen af, hvad der kan smages ifølge Loryn, L. (2014). Referencen angiver således en smagsgrænse for natriumklorid i vand på mellem 0,03-0,08 %. Fedtindholdet er generelt meget lavt.

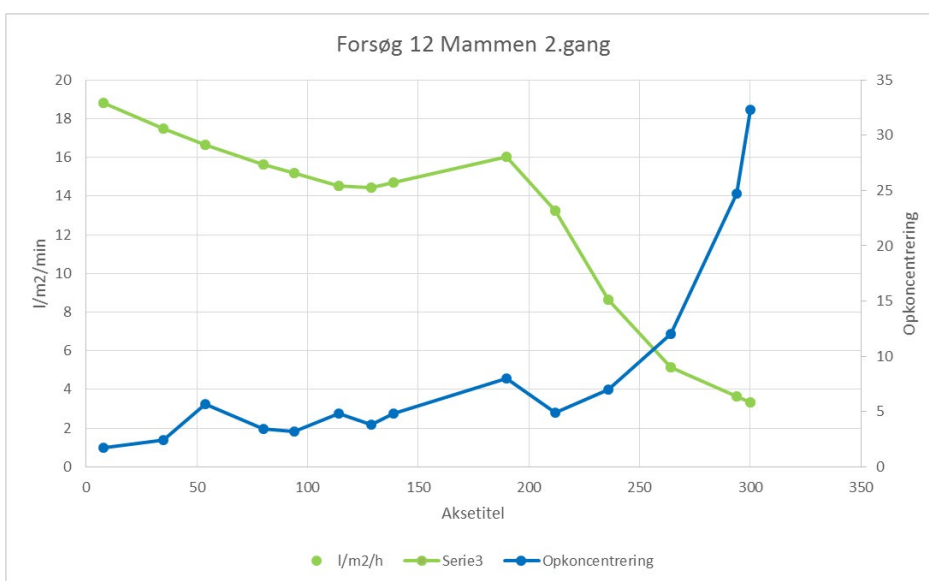
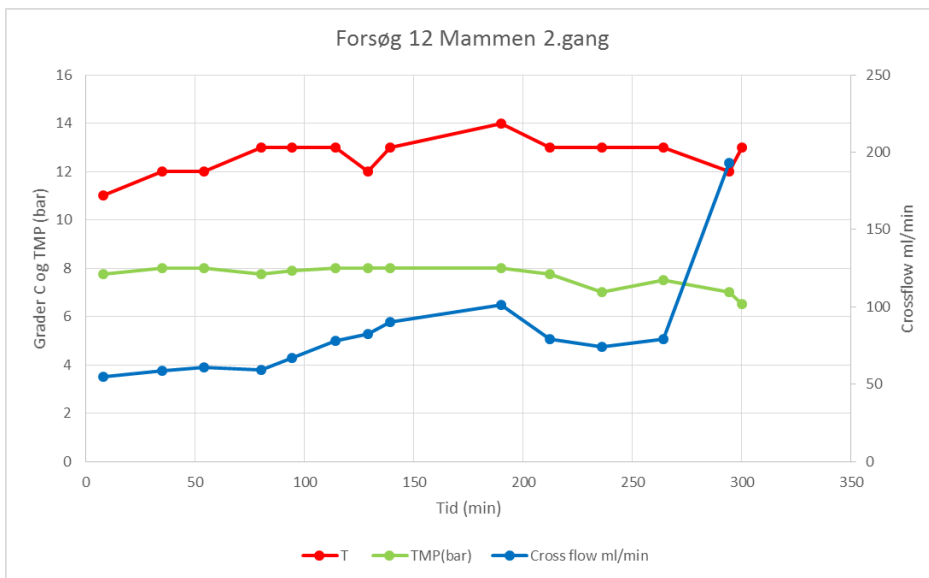
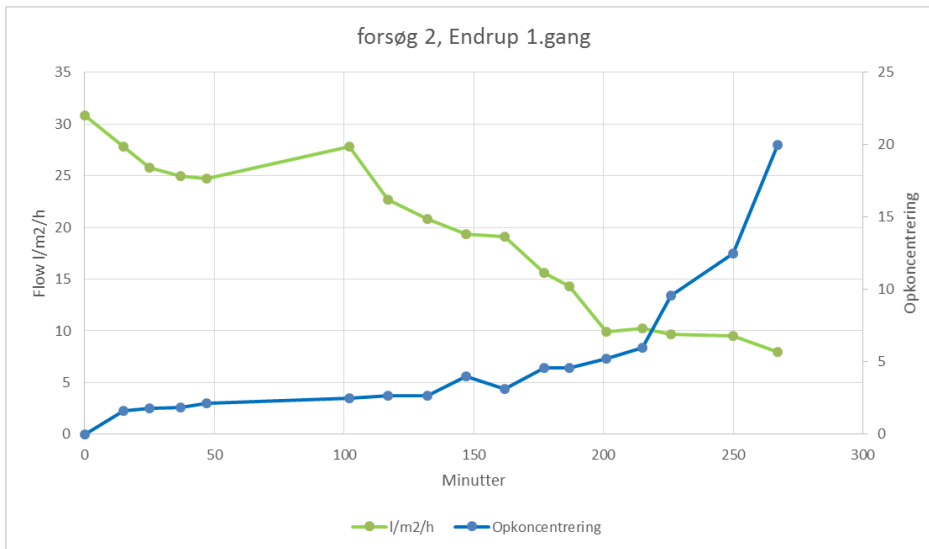
Figur 3.7 viser et eksempel på væskerne med retentat (opkoncentreret proteinopløsning) og permeat af vallen. Det ses, at permeatet som forventet er en klar væske (uden partikler) dog med en gullig farve.



**Figur 3-7** Opkoncentrering af valleretentat (proteinkoncentrat til venstre), permeat (laktoseholdig til højre).

For hver batchkørsel er flowet over membranen, driftstemperatur, transmembrantryk, opkoncentreringsgrad og crossflow målt som funktion af tid. I de nedenstående grafer er der vist eksempler på disse data:







Af graferne ses, at der er filtreret ved 12-15 °C og med et crossflow på ca. 50 ml/min. Det ses, at der er benyttet et transmembrantryk på ca. 6-8 bar, hvor driftsgrænsen for plate-and-frame-membranerne er 10 bar. Ved industriel drift vil der typisk blive benyttet et lavere driftstryk på 2-3 bar, hvilket medfører et lavere flow (l/m<sup>2</sup>/min). Produktionstemperaturen vil ved industriel drift være lidt lavere (10 °C) end de benyttede 12-15 °C, som det var muligt at opnå ved brug af kølevand fra hanen. En 5 °C lavere driftstemperatur vil yderligere sænke flowet gennem membranerne (l/m<sup>2</sup>/min), bl.a. på grund af at viskositeten af væsken stiger ved lavere temperatur. Graferne viser endvidere, at flowet gennem membranen falder over tid, samtidig med at retentatet opkoncentreres. Flowet er således kun ca. ¼ af startværdien i slutningen af hvert batch-forsøg.

For alle producerede koncentreter og saltreducerede koncentreter blev udtaget prøver til mikrobiologisk analyse for total kim og koliforme bakterier (bl.a. *E. coli*, listeria og salmonella) samt for indhold af shigatoksiner. Der blev i ingen af prøverne konstateret listeria eller shigatoksin, men i nogle prøver var der et forhøjet indhold af *E. coli*. Dette vurderes at skyldes, at filtreringen foregik på en åben opstilling, hvilket ikke vil være tilfældet ved en evt. implementering i industriel sammenhæng. Koncentreterne blev derfor pasteuriseret, og der blev foretaget en ny mikrobiologisk analyse. Denne viste, at pasteuriseringen var effektiv på nær i batch 7, hvorfor de resterende koncentreter, der overholdt mikrobiologiske krav, kunne anvendes i det videre forløb (arbejdspakke 3 og 4).

Vedrørende proteinudbytte er der foretaget analyse af permeatkoncentrationen for batch 2 og 3 samt beregning af en massebalance.

Den målte proteinkoncentration i permeaterne fra batch 2 og 3 i slutningen af forsøgene var henholdsvis 0,028 % og 0,0285 %. Massebalancerne er baseret på følgende data: En estimeret rest i anlægget på 0,48 l, en fraført mængde retentat i begge forsøg på 1,8 l, en tilført mængde på 50 liter og koncentrationer på 0,6 % i valle og ca. 13,2 % i retentat baseret på både analyse og beregning ud fra opkoncentrering. Der beregnes en tilført mængde protein på 301 g og en mængde i retentat på 300 g samt i permeat på 13 gram. Det kan herefter beregnes, at tabet af protein med permeatet udgør 4,2-4,3 % for batch 2 og 3, og at massebalancen stemmer inden for ca. 4 %.

Det vurderes derfor, at tabet af protein med permeat i alle forsøg er mindre end 4-5 %.

### **3.3.1 Vallemængder og anvendelse af vallen fra Mammen Mejeri, Endrup Andelsmejeri og Løgismose Mejeri**

I denne aktivitet er der ligeledes blevet udført økonomiske beregninger på investerings- og driftsomkostninger samt merindtægt ved etablering af et membranfiltreringsanlæg ved de tre deltagende mejerier. Dette inkluderer indhentning af relevante oplysninger fra mejerierne (drifts- og mængdedata) samt tilbud fra udstyrsleverandører. Beregningerne baserer sig på vallepriser fra 2015.

De tre mejerier som deltager i projektet (Endrup, Mammen og Løgismose) har en samlet vallemængde på omkring 95.000 tons, mens den samlede vallemængde fra de små mejerier i Danmark er på omkring 170.000 tons. Mejerierne, som ud over Endrup, Mammen og Løgismose har en relevant produktion af valle, er: Them, Thise, Asaa, Grøndahl, Ingstrup, Jernved og Nørup Mejeri, som eventuelt ville kunne få gavn af en fælles løsning for alle mejerierne.

Den samlede mængde af valle for de tre mejerier i projektet er henholdsvis 73 mio. liter, 20 mio. liter og 1,2 mio. liter for henholdsvis Mammen, Endrup og Løgismose Mejeri. Der er udarbejdet en SWOT-analyse omkring styrker, muligheder, svagheder og trusler inden for bedre udnyttelse af valle på mindre mejerier.

I det nedenstående præsenteres businesscasen for Endrup Mejeri og Mammen Mejeri. For begge cases gælder det, at rentabiliteten vil være meget afhængig af anvendelsen af den opkoncentrerede valle og dermed prissætningen samt afsætningsmulighederne for biproduktet laktose og vand.

### **Endrup mejeri**

Endrup Mejeri har været meget interesseret i en fællesløsning som skulle skabe værdi for alle små mejerier i Danmark, og på samme tid ønskes der en stor afsætningsikkerhed for vallen, da fokus for Endrup Mejeri ligger i produktion af gul ost.

Der er efter ønske fra Endrup Mejeri udarbejdet tre forskellige løsninger, som alle er sammenlignet med den nuværende valleløsning, hvor vallen filtreres, RO-behandles og pasteuriseres inden afsendelse til videre forarbejdning eksternt. Der er udarbejdet en businesscase for hver af de ønskede løsninger, som er sammenlignet med den nuværende løsning på Endrup Mejeri. Der er følgende: 1) Nuværende løsning; 2) RO-behandling af valle; 3) Fremstilling af UF-koncentrat; og 4) Fremstilling af WPC60. I de pågældende businesscases er der medtaget visse forudsætninger, hvilket har været nødvendigt for at kunne gennemføre beregningerne. I Figur 3.8 er en oversigt over businesscase-beregningen opstillet.

**Figur 3-8** Overblik over businesscase-beregninger på Endrup Mejeri.

Løsninger	Indtjening (DKK / år)	Transportudgift (DKK/år)	Ekstra driftsudgifter ved ny løsning (DKK/år)	Nettooverskud/nettooverskud ift. normal R/O-behandling (DKK/år)	Tilbagebetaling	Forudsætning i beregning
RO-behandling (nuværende)	3.000.000	597.222	0	2.402.778		
RO-behandling af valle med genbrug af vand	3.064.167	597.222	12.000	2.454.945 / 52.167	Ca. 5 år	Investering: 250.000 DKK
UF koncentrat	3.148.148	110.597	280.741	2.756.811 / 354.033	Ca. 10 år	Afsætning af: 0,85 DKK/kg Investering: 3.750.000 DKK
WPC60	3.333.333	110.597	280.741	2.941.996 / 539.218	Ca. 13 år	Afsætning af WPC60: 0,9 DKK/kg Investering: 6.900.000 DKK

Den nuværende løsning på Endrup Mejeri med R/O-opkoncentrering giver en årlig indtjening på 3.000.000 kr. pr. år ved salg, hvorfra skal fratrækkes transportudgifter på 597.222. Nettooverskuddet er herefter 2.402.778 for den eksisterende R/O-løsning, hvis man ikke medtager driftsudgifter til anlægget. Der er herefter regnet på 3 supplerende løsninger, som forudsætter, at det eksisterende R/O-anlæg bevares. Ved den første løsning investeres i udstyr, så vand fra R/O-anlægget kan benyttes som teknisk vand. Denne løsning har en anslået tilbagebetalingstid på ca. 5 år. Den anden løsning, fremstilling af UF-koncentrat, giver en forøget besparelse ved transport og har ved en afregningspris på 0,85 kr./kg og en lang tilbagebetalingstid på ca. 10 år på grund af den forholdsvis høje investering. Endelig har den tredje løsning, fremstilling af WPC60, en tilbagebetalingstid ved en afregning på 0,9 kr./kg. Estimerne viser, at det er for dyrt at producere UF-koncentrat eller WPC 60 i så lille skala, og Endrup mejeri er da heller ikke interesseret i at gå videre med løsningerne omkring fremstilling af UF-koncentrat og WPC60. Brug af R/O-vand til teknisk vand kan dog være en mulighed med den anslåede tilbagebetalingstid på 5 år.

### Mammen Mejeri

Mammen Mejeri har været meget interesseret i en løsning, som skal være til gavn for mejeriet, og på samme tid ønskes der en stor afsætningsikkerhed af vollen, da fokus for Mammen Mejeri ligger i produktion af gul ost.

Der er efter ønske fra Mammen Mejeri udarbejdet et løsningsforslag, som er sammenlignet med den nuværende valleløsning, hvor valle filtreres, pasteuriseres og køles inden afsendelse til eksternt leverandør. Der er udarbejdet en businesscase for hver af de ønskede løsninger, som sammenlignes med den nuværende valleløsning på Mammen Mejeri. De tre løsninger er: 1) Nuværende løsning; 2) RO-behandling af valle; og 3) RO-behandling af valle med genanvendelse af RO-vand til teknisk vand. I de pågældende businesscases er der medtaget visse

forudsætninger, hvilket har været nødvendigt for at kunne gennemføre beregningerne. I nedenstående Figur 3.9 er en oversigt over businesscase-beregningerne opstillet.

**Figur 3-9** Overblik over businesscase-beregninger på Mammen Mejeri.

Løsninger	Indtjening (DKK/år)	Transportudgift (DKK/år)	Driftsudgift (DKK/år)	Nettooverskuds/nettooverskud ift. nuværende løsning (DKK/år)	Tilbagebetaling	Forudsætning i beregning
Nuværende løsning	11.680.000	4.380.000		7.300.000		
RO-behandling	11.680.000	1.825.000	1.178.083	8.676.917 / 1.376.917	Ca. 2-3 år	Investering: 4.100.000 kr.
RO behandling med genanvendelse af vand	11.935.500	1.825.000	892.000	9.218.500 / 1.918.500	Ca. 2 år	Investering: 4.350.000 kr.

Den nuværende løsning på Mammen Mejeri giver en årlig indtjening på 11.680.000 kr. per år. En etablering af et RO-anlæg vil reducere transportudgifter, hvilket vil resultere i en tilbagebetalingstid på omkring 3 år. Hvis genanvendelse af RO-vand til teknisk vand på mejeriet medtages, mindskes tilbagebetalingstiden til omkring 2 år. Beregningen viser, at investeringen i RO-løsningerne har en meget kort tilbagebetalingstid. Mammen Mejeri har da også ønsket at gå videre med en projektering af en RO-behandling af vallen. En løsning, hvor vallen opkoncentreres med RO, vil alt andet lige være en økonomisk fordel for Mammen Mejeri, da transportomkostningerne vil blive reduceret væsentligt.

### 3.4 Aktivitet 1.3 Opkoncentrering af biprodukter som laktose og mulig afsætning

Det er valgt ikke at gennemføre forsøg med opkoncentrering af biprodukter fra udvindingen af proteinindholdet. Nedenfor diskuteres imidlertid mulighederne for opkoncentrering og afsætning af biprodukterne.

Hvis man ønsker at opkoncentrere protein med UF, som beskrevet i aktivitet 1.2, vil restvæsken være et permeat (biprodukt) som hovedsageligt er en blanding af laktose og salte. Permeatet kan enten benyttes til udvinding af laktose som efterfølgende vil kunne afsættes til foder eller til biogasproduktion. Ved brug af ultrafiltrering til opkoncentrering og udvinding af et proteinkoncentrat udgør permeatet mere end 95 % af vægten, som det fremgår af aktivitet 1.2.

Ved en stor transportafstand til afsætningsstedet kan det muligvis være en fordel at opkoncentrere permeatet ved brug af RO. Endrup benytter i forvejen RO til opkoncentrering af vallen (dvs. protein, laktose og salte), og der er foretaget en beregning for etablering af RO ved Mammen. Ved opkoncentrering af valle forøges indholdet af indholdsstoffer med en faktor ca. 2,5, og det forventes, at det er muligt at opnå lignende opkoncentrering på permeatet. Da mængderne af permeat er nogenlunde de samme som vallemængderne, forventes det, at udgifterne til opkoncentrering af permeat vil være sammenlignelige med beregningscasen i aktivitet 1.2 for Mammen Mejeri. Hvorvidt det kan betale sig at foretage opkoncentreringen afhænger dog af afsætningspris og afstand, hvilket ikke er blevet nærmere undersøgt.

Permeatet indeholder primært laktose, hvilket er en nemt omsættelig kulstofkilde i en biogasproduktion. Det teoretiske udbytte af laktose er 393 ml CH<sub>4</sub>/gVS. Forsøg med udrådning af råvallen fra Mammen og Endrup viste som forventet en hurtig omsætning med hovedparten af vallen omsat på 5-10 dage og methanpotentialer på 381-471 ml CH<sub>4</sub>/gVS. Vallen indeholder primært laktose som kulstofkilde, men også lidt protein og fedt. De bestemte metanpotentialer er som forventet i nærheden af laktoses teoretiske udbytte. Ved et indhold af 3 % mælkesukker må forventes, at der kan produceres 12 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ton permeat. Dette svarer nogenlunde til produktionen fra kvæggylle med tørstofindhold på 7,5 % (Jacobsen, 2013) og altså en biomasse, som anlæggene i forvejen behandler. Ifølge Jacobsen et al., 2013 regnes der ved dimensionering af nye biogasanlæg med en typisk produceret mængde gas på 23 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ton tilført biomasse. Om man kan få en bedre aftale med et biogasanlæg ved at levere opkoncentreret permeat (fx opkoncentret 2,5 gange til ca. 7,5 % laktose med indhold på 30 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ton) vil være afhængig af de løbende priser for mere energiholdige biomasser. Fx er prisen for majsensillage med et energiindhold på 113 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ton ca. 300 kg/ton. Kvæggylle med energiindhold på 12 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ton modtages til 0 kr. (Jacobsen, 2013), hvorfor der muligvis vil kunne betales lidt for opkoncentreret permeat med højere energiindhold.

Der vil ikke være krav til overholdelse af krav vedr. indhold af sygdomsfremkaldende mikroorganismer ved afsætning af det laktoseholdige permeat til biogas i modsætning til anvendelse til foder og ved afsætning til oparbejdning med udvinding af laktose. Der må således forventes en besparelse på køling og håndtering ved anvendelse til biogas i forhold til foder og evt. råvare til laktoseudvinding.

Biogaspotentialer er blevet bestemt ved brug af Bioprocess Control-udstyr (Measurement protocol for biogas potential measurements for verification tests (ETV, CBMI), v6, 16/5-2011), metode 2: Measurement using the bioprocess control system).

Der er ved nærværende test benyttet følgende fremgangsmåde:

- Mesofil udrådning ved 37 °C ved brug af bioprocess control-udstyr
- Der er anvendt tripelbestemmelse af prøverne samt duplikatbestemmelse af blind
- Tørstofbestemmelse: 105 °C, 48 timer
- Askeindhold: 550 °C, 24 timer
- Prøver er tilsat i en koncentration på ca. 10 gVS/l, som ved sammenlignelige tests har vist sig ikke at medføre hæmmende betingelser.
- Der er foretaget tripelbestemmelse på en cellulosereference (sigmacell cellulose type 50) til kontrol
- Data for akkumuleret metanproduktion er angivet som målt værdi i nml CH<sub>4</sub>/gVS efter fuld udrådning.

### **3.5 Aktivitet 1.4 Rensning af overskudsvand til teknisk vand**

I umiddelbar forbindelse med opstarten af indeværende projekt, blev der opstartet et stort sideløbende projekt (Det vandløse mejeri), som alene har fokuseret på vandbesparelser. Således blev det efter ønske fra de tre deltagende mejerier besluttet, at denne del blev nedprioriteret ift. de øvrige aktiviteter. I stedet er udviklingen og resultaterne fra Det vandløse mejeri-projekt blevet fulgt nærgående, og flere af projektdeltagerne har deltaget i mødeaktiviteter i Det vandløse mejeri-projekt. I forbindelse med de økonomiske beregninger er rensning af overskudsvand og økonomien, som er forbundet hermed, også blevet belyst.

## 4. Arbejdspakke 2 – Karakterisering af valleproteinfraktioner og -produkter

Indeværende arbejdspakke har fokuseret på udvælgelse og udvikling af metoder til karakterisering af proteinfraktioner. I de nedenstående afsnit er de anvendte metoder beskrevet og de opnåede resultater kort opsummeret.

### 4.1 Aktivitet 2.1 Udvalgelse af metoder til karakterisering af valleprotein

Mælkens proteiner består af henholdsvis caseinerne og valleproteinerne, hvor hovedproteinerne er  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ -, og  $\kappa$ -casein, mens den resterende del, 20 % (w/w) af proteinerne, er valleprotein, herunder  $\beta$ -lactoglobulin A og B,  $\beta$ -lac (~ 49 %),  $\alpha$ -lactalbumin,  $\alpha$ -lac (~ 18 %) blod serum albumin, BSA (~ 6 %), immunoglobulin, Ig (12 %), proteose-peptone fraktion, PP (~15 %) og laktoferrin (~ 1 %).

Valleproteinerne betegnes som globulære serumproteiner med en gennemsnitsstørrelse på 3-6 nm. Valleproteinerne har et højt indhold af aminosyren cystein, som bevirker, at der ved kraftig varmpåvirkning dannes svovlbroer. De globulære proteiner er kun marginalt stabile, og kan ved påvirkning skifte fra nativ, til intermedært stadie til et denatureret stadie. Denatureringen kan fx initieres ved pH-, mineral-, tryk- eller temperaturændringer i processen.

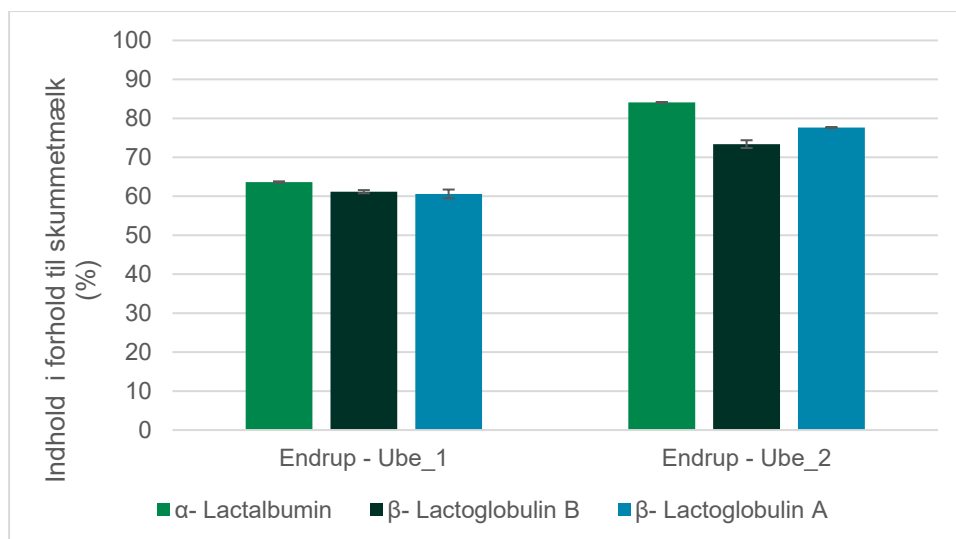
Valleproteiner karakteriseres ved forskellige teknikker, hvoraf de mest generelle belyses nedenfor. Standarddefinitionen på valleprotein er defineret på basis af en standardmetode til bestemmelse af casein. Standarddefinitionen af casein er den fraktion af protein, som bundfældes ved pH 4,6, mens supernatanten kollektivt kaldes valleproteinerne. Problemet ved denne definition er, at caseinerne og valleproteinerne kan ændre opløselighed og derved optræde modsat i forhold til standarddefinitionen, fx at valleproteinerne bliver uopløselige ved pH 4,6 pga. denaturering af proteinerne under processen (Fox & McSweeney, 1998b).

Valleproteinerne kan bestemmes ved hjælp af søjlekromatografiske oprensningsmetoder med og uden massespektroskopisk detektion og elektroforetiske metoder. Valleproteinerne kan bestemmes ved hjælp af omvendt fase-højtryksvæskrokromatografi (RF-HPLC) (Kielberg & Rasmussen, 2000), og i projektet er det valgt at udarbejde en HPLC-metode til karakterisering af valleproteinerne. Der foreligger en metode til bestemmelse af total valleprotein og opløseligt valleprotein (Sørensen et al., 2014). Total valleprotein anvendes til at bestemme det totale valleproteinindhold i valleprøverne, mens det opløselige valleprotein bestemmes ved pH 4,6.

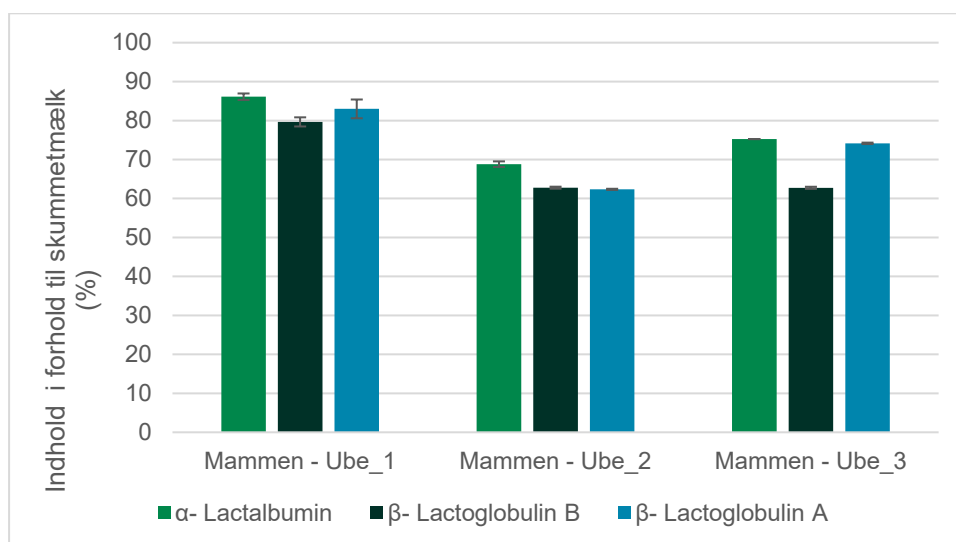
Sammenholdes total valleprotein og opløseligt valleprotein vil forskellen mellem totalt og opløst valleprotein give information om, hvor kraftigt ostemælken er behandlet, idet denaturerede valleproteiner vil ændre opløselighed og derved kun blive registreret som totalt valleprotein. Metoden til bestemmelse af opløseligt valleprotein er velegnet til vurdering af mælkens historik, herunder procespåvirkninger, da kraftig varmebehandling vil give lavere opløselige valleproteinniveauer.

## 4.2 Aktivitet 2.2 Karakterisering af valleproteinfraktioner

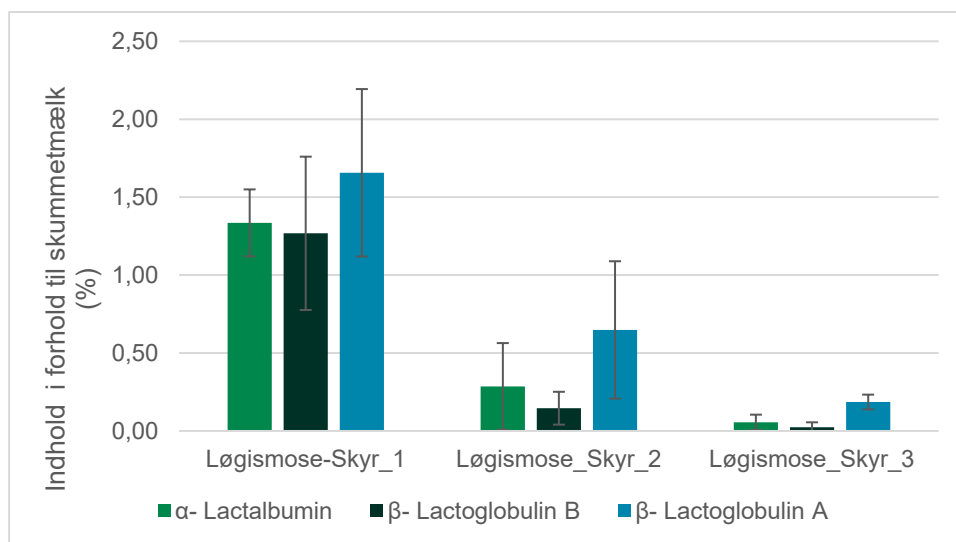
Mejerierne Endrup, Mammen og Løgismose har indleveret valleprøver til karakterisering vha. RF-HPLC-metoden til bestemmelse af valleproteinene  $\beta$ -lactoglobulin A og B og  $\alpha$ -lactalbumin. Resultaterne for total valleprotein for Endrup, Mammen og Løgismose mejerier er præsenteret i Figur 4.1, Figur 4.2 og Figur 4.3. Et indhold på 100 % svarer til indholdet i en skummetmælk (referenceskummetmælk brugt til bestemmelse af alle prøver), mens et lavere indhold svarer til, at valleproteinene er overgået til osten.



**Figur 4-1** Total valleprotein for to ufortyndede valleprøver fra to forskellige produktioner (Danbo) leveret fra Endrup Mejeri. Resultatet er korrigeret for indholdet af valleprotein i skummetmælk og i valleprøven for at dataene kan sammenlignes. Ube x ( $x=1, 2$ ); Ubehandlet valle. Nummer 1, 2 og 3 henviser til tre uafhængige produktioner.



**Figur 4-2** Total valleprotein for tre ufortyndede valleprøver fra tre forskellige produktioner (Danbo) leveret fra Mammen Mejeri. Resultatet er korrigeret for indholdet af valleprotein i skummetmælk og i valleprøven, for at dataene kan sammenlignes. Ube x ( $x=1, 2$ ); Ubehandlet valle. Nummer 1, 2 og 3 henviser til tre uafhængige produktioner.



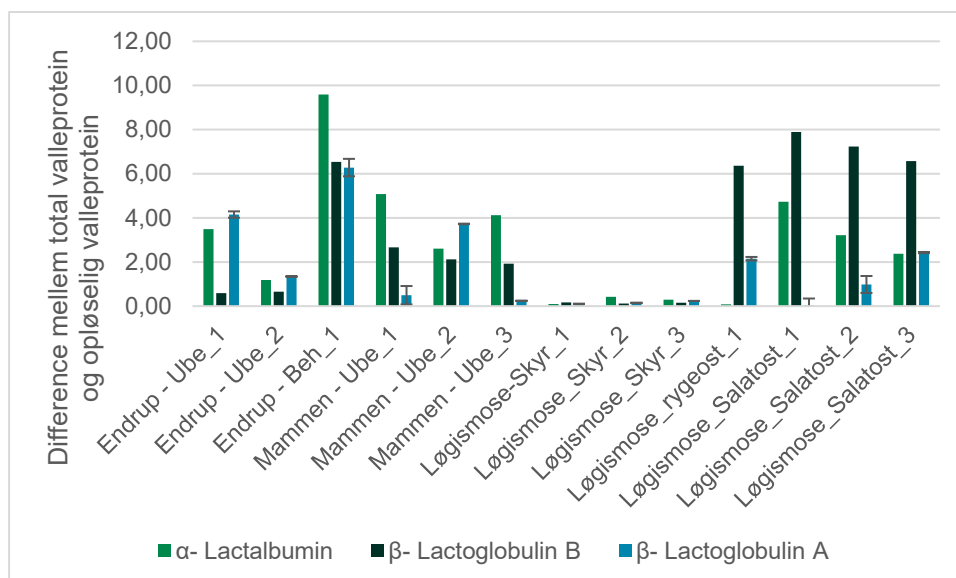
**Figur 4-3** Total valleprotein for tre ufortyndede valleprøver fra tre forskellige produktioner (Skyr) leveret fra Løgismose Mejeri. Resultatet er korrigeret for indholdet af valleprotein i skummetmælk og i valleprøven, for at dataene kan sammenlignes. Skyr x (x=1, 2, 3); Valle fra skyrproduktion. Nummer 1, 2 og 3 henviser til tre uafhængige produktioner.

På Endrup og Mammen mejeri, som begge producerer gul ost-typer, genfindes der mellem 60 og 80 % af det totale valleproteinniveau i prøverne. Ved osteproduktion er det almindeligt, at en delmængde af valleproteinerne overgår til osten og derfor ikke detekteres i vollen. Der genfindes gennemsnitlig lidt mere valleprotein i prøverne fra Mammen Mejeri sammenlignet med valleprøverne fra Endrup Mejeri, hvilket kan være forårsaget af en kraftigere varmebehandling af ostemælken fra Endrup Mejeri.

Valleprøverne fra skyrproduktionen på Løgismose Mejeri indeholder meget lave niveauer af de målte valleproteiner, hvilket var forventet på basis af produktionsmetoden til fremstilling af skyr. Skyrvallen kan ikke anvendes til udvinding af valleproteiner pga. det lave niveau af valleproteiner, men laktosen kan udvindes, såfremt vallemængden er tilstrækkelig for en lønsom produktion.

Sammenholdes indholdet af totalt valleprotein og opløseligt valleprotein for prøverne (Figur 4.4) fra Endrup, Mammen og Løgismose mejerier ses, at stort set hele den totale vallemængde i valleprøverne er opløselig, et højere niveau (værdi) er udtryk for mere denatureret valleprotein i prøverne.





**Figur 4-4** Difference mellem total valleprotein og opløselig valleprotein for valleprøverne fra Endrup, Mammen og Løgismose mejeri. Ube; Ubehandlet valle; Beh; valle som er opkoncentreret; nummer 1, 2 og 3 henviser til tre uafhængige produktioner. Et indhold på 100 % svarer til indholdet i en skummetmælk (referenceskummetmælk brugt til bestemmelse af alle prøver), mens et lavere indhold svarer til, at valleproteinerne er overgået til osten.

Prøverne fra Endrup mejeri, som er opkoncentreret, har et højere indhold af uopløst valleprotein, hvilket kan skyldes den længere driftstid og temperaturpåvirkning ved opkoncentrering end ved fremstilling af uforyndet valle. Tilsvarende ses et højere niveau af uopløseligt valleprotein i valleprøverne fra rygeostproduktionen, hvilket tillægges produktionsmetoden til fremstilling af rygeost.

Ved at sammenholde det totale valleproteinniveau med det opløselige valleproteinniveau kan der genereres viden omkring ostemælkenes historik, herunder tids- og temperaturforhold, som vil påvirke beskaffenheden af valleproteinerne og dermed deres opløselighed og heraf denaturering.

### 4.3 Aktivitet 2.3 Karaktering af biprodukter ved oprensning af valleprotein

Der kan være flere forskellige værdifulde biprodukter efter oprensning af valleprotein. Specielt mineraler og kulhydrater findes i disse fraktioner. Kulhydratfraktionen består primært af mælkesukkerlaktose. Laktose har interessante ernæringsmæssige egenskaber; det gælder for eksempel fiberlignende og præbiotiske egenskaber, der kan øge optagelsen af calcium og magnesium. Laktosen har en relativt lav sødeevne, en lav kalorieværdi og et lavt glykolemisk index. Laktose anvendes i fødevarerapplikationer og til farmaceutiske formål. Laktosekoncentrationen i human mælk er højere end i mælk fra andre individer. Human mælk indeholder ca. 7 g/100 ml, hvorimod komælk indeholder ca. 4,6 % (Schafsma, 2008). Laktose finder anvendelse i en bred vifte af fødevarer, drikkevarer, kosmetik, lægemidler og foderstoffer. Laktose har en mild smag og anvendes som stabilisator i en række formuleringer. Laktose har typisk en længere holdbarhed og er billigere end mælk. Laktose bruges ofte i modermælkserstatninger, chokolade, kiks, slik, is og brød til at øge aroma og smag. Laktose anvendes som fyldstof i lægemidler i tabletter, kapsler og inhalatorer på grund af sin fysiske og kemiske stabilitet både til human og veterinær medicin. Laktose til inhalatorer tegner sig i øjeblikket for en mindre del af det farmaceutiske marked, men forventes i vækst, da producenterne har udviklet en ny inhalator baseret på det medicinale leveringssystem som attraktivt alternativ til tabletter for flere kundesegmenter. Anvendelsen af laktose i foderprodukter er faldende, som en andel af

det samlede applikationsområde. Foderanvendelser af laktose (i visse former) omfatter fjerkræfoder, foderblandinger til smågrise, fiskefoder, kalvemælkeerstatninger og foder til kæledyr.

Vallekoncentraterne oprenset i dette projekt indeholdt fra 1,1 til 7,5 % laktose (Figur 4.5). Test af 4 forskellige kommercielle drikkelige produkter anmærket med "høj protein", viste laktoseindhold på mellem 2,7-4,1 %. To af de kommercielle produkter indeholdt desuden 5,7-5,8 % sukker (sukrose) (Figur 4.5).

**Figur 4-5** Indhold af kulhydraterne glukose, laktose og sukrose i forskellige batcher af valleopkoncentrater og 4 forskellige kommercielle drikkelige proteinprodukter fra det danske marked.

Prøver	X	sd	X	sd	X	sd	X	sd
	% Glu- kose	% Glu- kose	% Lak- tose	% Lak- tose	% Su- krose	% Su- krose	total sukre	total sukre
Valle opkonc. Batch 1	0,01	0,002	2,9	0,0	ud	ud	2,88	0,03
Valle opkonc. Batch 6	0,03	0,005	1,1	0,0	ud	ud	1,15	0,04
Valle opkonc. Batch 9	0,02	0,004	7,5	0,2	ud	ud	7,49	0,24
Kommercielt drikkeligt produkt 1	0,06	0,012	4,0	0,9	5,8	0,1	9,80	0,83
Kommercielt drikkeligt produkt 2	0,02	0,002	2,7	0,8	0,0	0,0	2,19	0,01
Kommercielt drikkeligt produkt 3	0,05	0,001	4,1	0,1	5,7	0,1	9,88	0,03
Kommercielt drikkeligt produkt 4	1,89	0,029	3,1	1,3	1,0	0,1	2,91	0,13

Ud: underdetektionsgrænsen for analyse.

#### 4.4 Aktivitet 2.4 Karakterisering af vandkvalitet

Som allerede beskrevet ved aktivitet 1.4 er der i projektet ikke fokuseret på anvendelsen af teknisk vand fra permeatet, hvorfor der i projektet ikke er gennemført karakterisering af vandkvaliteten.

Dog er der foretaget estimater vedrørende økonomien ved genanvendelse af teknisk vand fra R/O for Mammen og Endrup som er beskrevet under aktivitet 1.2.

#### 4.5 Aktivitet 2.5 Analyser til massebalance

Der er foretaget proteinanalyser af input, retentat og permeat, som er benyttet til beregning af massebalance beskrevet under aktivitet 1.2.

# 5. Arbejdspakke 3 – Udvikling af indkapslede valleprotein-produkter

## 5.1 Aktivitet 3.1 Teoretisk videnindsamling omkring indkapsling med valleprotein

### 5.1.1 Baggrund: Mikroindkapsling af fødevaringredienser

En række fødevaringredienser er kendt for at have sundhedsfremmende egenskaber, blandt andet vitaminer, probiotiske bakterier, bioaktive peptider, flerumættede fedtsyrer og antioxidanter. Andre ingredienser er kendt for at have funktionelle egenskaber, eksempelvis farvestoffer og aromastoffer, som kan anvendes i fødevarer. Ved at tilsætte funktionelle og sundhedsfremmende ingredienser forbedres funktionaliteten og sundhedsprofilen af fødevarer, og der er derfor bred interesse fra fødevarerindustrien for anvendelse af disse ingredienser. Produktionen og anvendelsen af funktionelle fødevarer og fødevaringredienser beskrives, blandt mange udgivelser, særligt i to bøger af henholdsvis Smith & Carter (Smith & Charter, 2010) og Shi (Shi, 2016).

Det er en udfordring, at mange funktionelle og sundhedsfremmende fødevaringredienser er ustabile overfor eksempelvis varme, lys, luft, høje/lave pH-værdier samt tilstedeværelse af andre ingredienser. For at bevare deres funktionalitet skal det derfor sikres, at ingredienserne ikke nedbrydes under fremstillingsprocessen, under opbevaringen i holdbarhedstiden eller under processering i produktets tænkte formål. Endvidere skal ingredienser med sundhedsfremmende virkning forblive aktive efter indtag, dvs. under oral administration og opholdstid i maven ved lav pH, og de skal frigives på det korrekte sted i mave-tarm-kanalen. For disse ingredienser gælder endvidere, at de ikke må ændre på de organoleptiske egenskaber ved fødevarerproduktet. Alt dette kræver, at ingrediensen stabiliseres, hvilket kan ske gennem mikroindkapsling. Mikroindkapslingsteknikker er beskrevet i adskillige udgivelser, blandt andet førnævnte af Smith & Carter (2010) og Shi (2016).

Et klassisk eksempel vedrører tilsætning af fiskeolie til fødevarer, som er gennemgået i Barrow og Shahidis *"Marine nutraceuticals and functional foods"* fra 2007 (Barrow & Shahidi, 2007). Fiskeolie har et højt indhold af sundhedsgavnige omega-3-fedtsyrer, og der er derfor interesse i at tilsætte fiskeolie til fødevarer med henblik på at øge indtaget af disse fedtsyrer. Smagen og lugten af fiskeolie gør det imidlertid helt uacceptabelt blot at tilsætte fiskeolie til de fleste fødevarer. Endvidere er det en udfordring, at fiskeolie ikke umiddelbart er kompatibel med vandbaserede fødevarer. Med den korrekte stabilisering kan smagen og lugten af fiskeolien maskeres, og olien kan gøres kompatibel med de fleste fødevarer. Denne stabilisering sker gennem mikroindkapsling, eksempelvis i mikrostrukturer baseret på valleprotein.

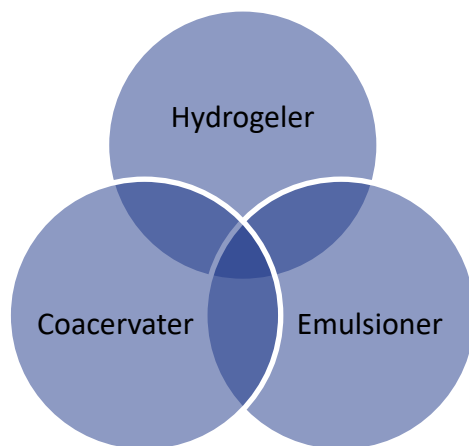
### 5.1.2 Valleproteiner som indkapslingsmateriale

Valleprotein er en biopolymer med en række egenskaber som kan anvendes til mikroindkapsling af fødevaringredienser. Eksempelvis kan valleproteiner danne hydrogeler, og de kan stabilisere emulsioner grundet deres overfladeaktive egenskaber. Endvidere kan de deltage i en proces kaldet kompleks coacervation, hvor mikrostrukturer (coacervater) dannes på grund af elektrostatiske tiltrækningskræfter mellem to eller flere biopolymerer.

#### Biopolymerer

Biopolymerer er polymerer produceret af levende organismer. Polymerer er lange kæder opbygget af repeterende enheder. Proteiner, polysakkarider og fibre er eksempler på biopolymerer.

Mekanismerne bag dannelse af disse mikrostrukturer (hydrogeler, coacervater og emulsioner) er forskellige, men ikke helt adskilte. Der er derfor et overlap i litteraturen angående begreberne, og hvordan de bruges til at beskrive forskellige mikroindkapslingsstrukturer. Eksempelvis kan en emulsion stabiliseres af valleproteiner grundet proteinernes overfladeaktive egenskaber, men ved at danne en proteinhydrogel i samme system, eksempelvis via varmebehandling, kan systemet stabiliseres yderligere, og den dannede mikrostruktur vil blive placeret i grænsefladen mellem *emulsion* og *hydrogel* i Figur 5.1.



**Figur 5-1** Typer af mikrostrukturer, som valleproteiner kan danne, og som kan anvendes til mikroindkapsling af fødevaringredienser.

Fordelene ved at bruge valleprotein til mikroindkapsling er blandt andet, at proteinerne er helt naturlige og bionedbrydelige, og der kræves ingen kemiske stoffer til fremstillingen af mikrostrukturerne. Derudover har valleprotein en høj antioxidantaktivitet, som kan udnyttes funktionelt når valleprotein anvendes til indkapsling af oxidationsfølsomme ingredienser. Antioxidantaktiviteten af valleproteiner (koncentrat og isolat) er dokumenteret i flere studier (Gad, et al., 2011) (Ries, Ye, Haisman, & Singh, 2010).

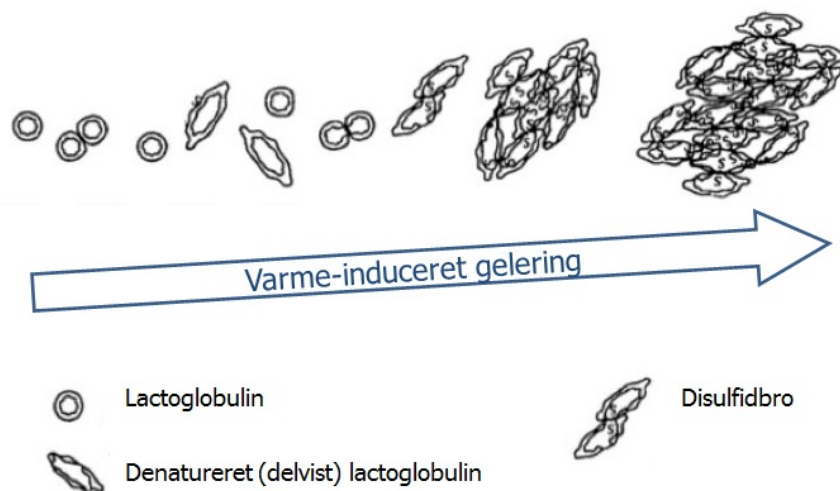
I de følgende afsnit gennemgås nogle af de egenskaber ved valleprotein, som gør det anvendeligt som mikroindkapslingsmateriale i forskellige sammenhænge. Dette efterfølges af en præsentation af en række eksempler på fødevaringredienser og bioaktive komponenter, som er blevet indkapslet ved brug af valleproteiner.

### Hydrogeler

Der findes en lang række naturlige og syntetiske polymerer, der kan danne hydrogeler, heriblandt valleproteiner. En hydrogel er et netværk af polymerer, som kan binde en betydelig mængde vand. Evnen til at binde vand skyldes tilstedeværelse af hydrofile grupper i polymerernes kemiske struktur. Valleproteinhydrogelers dannelse og struktur er beskrevet i flere udgivelser (Gunasekaran, Whey protein hydrogels and nanoparticles for encapsulation and controlled delivery of bioactive compounds, 2008).

Hydrogeler af valleproteiner kan dannes ved varmebehandling. Under varmebehandlingen udfoldes proteinernes polypeptidstruktur delvist, og hydrofobe aminosyrer, som før lå skjult i proteinernes indre, bliver eksponeret til de vandige omgivelser og drives til selv-aggregering, hvorved et netværk dannes. Vand kan bindes i dette netværk, som kan styrkes tredimensionelt gennem forskellige typer interaktioner, blandt andet hydrogenbindinger, van der Waals og ioniske interaktioner, og kovalente interaktioner (disulfidbroer). Indflydelsen af især disulfidbroerne er blevet særligt studeret (Hoffmann & van Mil, 1997), idet disulfidbroerne har vist sig at have

stor indflydelse på stabiliteten af valleproteinhydrogeler. En illustration af varmeinduceret gelling af lactoglobulin er vist i Figur 5.2.



**Figur 5-2** Varmeinduceret gelling af lactoglobulin.

Varmeinducerede valleproteinhydrogeler finder mange anvendelser i forbindelse med mikroindkapsling af fødevaringredienser. Ingredienserne iblandes valleproteinopløsningen, som opvarmes og gelerer med ingrediensen indkapslet i den tredimensionelle hydrogelstruktur. Eksempelvis indkapslede Vonasek (2014) bakteriofager i varmeinducerede valleproteinhydrogeler med henblik på at danne en spiselig proteinfilm indeholdende bakteriofager, som potentielt kan anvendes som patogenspecifikt antimikrobielt materiale til pakning af fødevarer (Vonasek, Le, & Nitin, 2014).

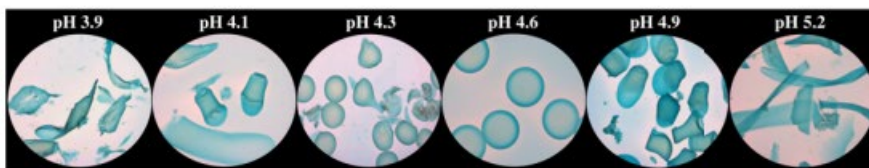
Den varmeinducerede gellingsteknik er begrænset af behovet for varmebehandling, og metoden er mindre anvendelig til indkapsling af varmfølsomme stoffer. Alternativt kan indkapsling af ingredienser i valleproteinhydrogeler foregå ved cold-induced gelling, hvor proteinerne først varmebehandles og denatureres og dernæst køles og blandes med den ingrediens, der skal indkapsles. Tilsætning af salte, eksempelvis salte af  $\text{Ca}^{2+}$ , krydsbinder polypeptidkæderne gennem interaktion med carboxylgrupperne, hvorved en netværksstruktur dannes, hvori ingrediensen er indkapslet. Ligeledes kan cold-induced gelling af valleproteiner foregå ved at justere pH-værdien. Når pH-værdien er langt fra proteinets isoelektriske punkt, er proteinet elektrisk ladet, og de enkelte proteinenheder vil frastøde hinanden (elektrostatisk frastødning).

Omvendt, når pH-værdien er tæt på proteinets isoelektriske punkt, fremmes interaktionen mellem proteinets enheder, og gelleringen fremmes. Ingredienser kan indkapsles i en cold-induced hydrogel af valleprotein ved først at denaturere valleproteinerne ved opvarmning ved en pH-værdi langt fra det isoelektriske punkt (hvor proteinenhederne frastøder hinanden) og dernæst køle proteinopløsningen og tilsætte den ingrediens, der skal indkapsles. Herefter justeres pH-værdien til proteinets isoelektriske punkt, hvorved de elektrostatisk frastødende kræfter mindskes, og gellingsprocessen fremmes. Ved at opbevare blandingen køligt i en periode på eksempelvis et døgn efter denne proces, styrkes gelen, og disulfidbroer kan dannes, som styrker hydrogelens tredimensionelle netværk. Herefter kan hydrogelen justeres til den ønskede pH og/eller tørres alt efter tænkt slutanvendelse.

#### Det isoelektriske punkt

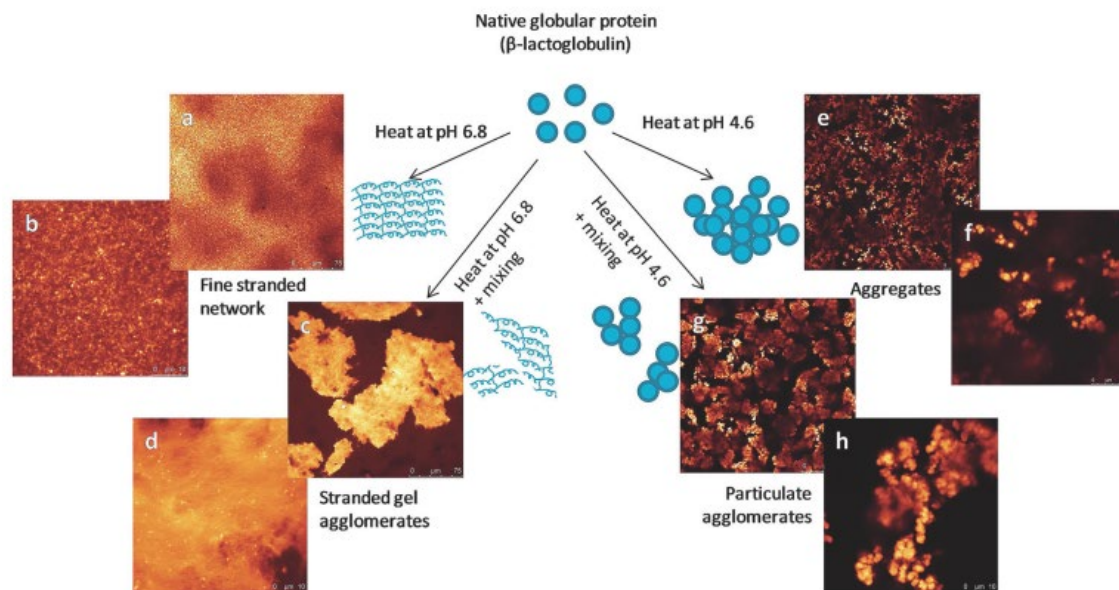
Det isoelektriske punkt (pI) er den pH-værdi ved hvilken et protein har en nettoladning lig nul. Dette betyder ikke, at molekylet er uden ladninger, blot at summen af alle ladninger er nul.

Mikropartikler af valleproteinhydrogeler kan dannes ud fra principperne om gelering ved at tilsætte en varmedenatureret proteinopløsning indeholdende den aktive ingrediens, der ønskes indkapslet, til en opløsning af krydsbindende salte med lav/høj pH. Når tilsætningen sker dråbevis, dannes partikler af valleproteinhydrogel, hvis størrelse er delvist bestemt af dråbestørrelsen. Således viste Doherty et al. (2011), at probiotiske bakterier kan indkapsles i mikropartikler af valleprotein dannet ved tilsætning af en varmedenatureret opløsning af valleprotein, der indeholder det ønskede probiotika, til en natrium-acetat-buffer. De studerede indflydelsen af bufferens pH-værdi på størrelsen og formen af valleproteinpartiklerne. Disse resultater er gengivet i Figur 5.3, som viser, at hydrogelpartiklerne dannet ved pH 4,6 (det isoelektriske punkt for proteinet) er mest sfæriske, mens hydrogelpartikler dannet ved højere eller lavere pH-værdier er mere irregulære (Doherty, et al., 2011).



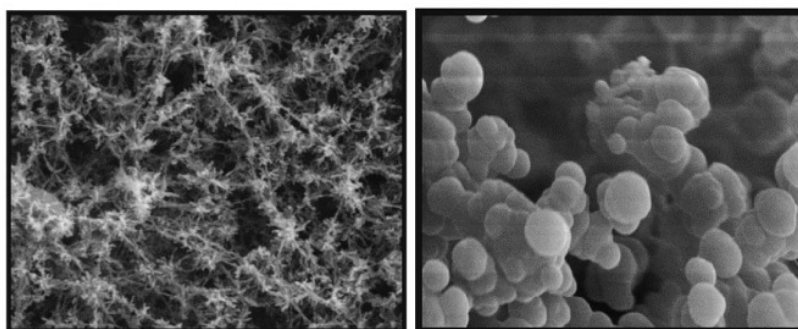
**Figur 5-3** Gelering af valleproteinhydrogel-partikler i buffer ved varierende pH-værdi (Doherty, et al., 2011).

Styrken og vandbindingskapaciteten af valleproteinhydrogeler kan altså styres ved at justere på en eller flere variable parametre, såsom proteinkoncentrationen, pH, ionstyrken og/eller geleringstemperaturen. Herved kan valleproteinhydrogelerne designes, så den ønskede permeabilitet, pH-følsomhed og mekaniske styrke opnås. Singh et al. (2014) viste, hvordan mikrostrukturen af en valleproteinhydrogel kan varieres ved at variere pH-værdien af proteinopløsningen under varmebehandlingen samt omrøringshastigheden under geleringsprocessen (Singh, Øiseth, Lundin, & Day, 2014). Figur 5.5 viser mikroskopibilleder af fire valleproteinhydrogeler, dannet ved henholdsvis pH 4,6 (højre) og pH 6,8 (venstre), med eller uden omrøring under geleringsprocessen. De viste, at når overfladeladningen var lav, og de elektrostatiske, frastødende kræfter dermed var lave (ved pH 4,6, tæt på proteinets isoelektriske punkt), samledes proteinmolekylerne i sfæriske aggregater på ca. 2  $\mu\text{m}$ , som igen samledes i større aggregater. Når geleringen foregik under omrøring dannedes adskilte aggregater, hvor de sfæriske partikler var tættere pakket og porestørrelsen dermed var mindre. Når pH-værdien derimod var længere fra proteinets isoelektriske punkt (pH 6,8), samledes proteinerne sig i finere strukturer ("stranded network"), som samledes i større agglomerater når geleringsprocessen forgik under omrøring. Mikrostrukturen, og dermed styrken og frigivelsesprofilen af valleproteinhydrogeler, kan altså styres ved at justere på simple procesparametre. Lignende studier er udført blandt andet af Gunasekaran et al. (Gunasekaran, Ko, & Xiao, Use of whey proteins for encapsulation and controlled, 2007).



**Figur 5-4** Mikrostrukturene af valleproteinhydrogeler dannet ved henholdsvis pH 4,6 og pH 6,8, med eller uden omrøring under geleringsprocessen (Singh, Øiseth, Lundin, & Day, 2014).

Mikrostrukturen af valleproteinhydrogeler dannet ved tilsætning af salte er blandt andet studeret af Romendetto et al. (Romendetto, Paquin, & Subirade, 2002). De viste blandt andet, at mikrostrukturen er under indflydelse af forholdet mellem proteinkoncentrationen og ionstyrken. De studerede strukturen af en hydrogel dannet fra beta-lactoglobulin ved tilsætning af jern ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ioner. De fandt, at trådformede geler bestående af fleksible, lineære strenge, som havde høj elasticitet og var meget modstandsdygtige, blev dannet ved lav jernkoncentration; mens en partikulær hydrogel med mindre elasticitet og modstandsdygtighed blev dannet ved højere jernkoncentrationer (Figur 5.5). Frigivelsesprofilen fra disse hydrogeler var markant forskellige, hvilket illustrerer endnu et eksempel på, at valleproteinhydrogeler kan designes til at have de ønskede egenskaber ved at justere procesparamenterne.

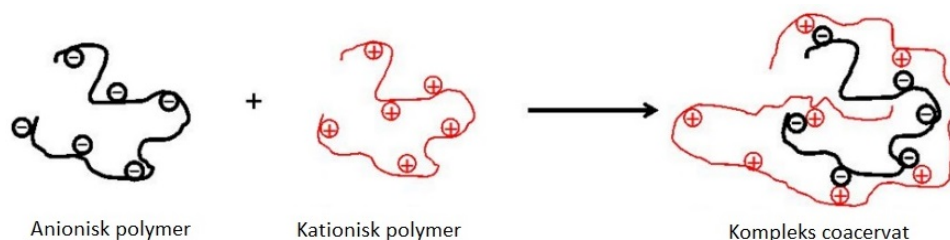


**Figur 5-5** SEM-billeder af valleproteinhydrogeler dannet ved lav  $\text{Fe}^{2+}$ -koncentration (venstre) og høj  $\text{Fe}^{2+}$ -koncentration (højre) (Romendetto, Paquin, & Subirade, 2002).

### Kompleks coacervation

Coacervation betyder "at samles", og begrebet kompleks coacervation henviser til en særlig type faseadskillelse, som opstår, når en vandig opløsning af en polymer adskilles i to faser: én med lav koncentration af polymeren, og én med høj koncentration af polymeren. Polymeren er altså samlet i den polymerrige fase. Faseadskillelsen udløses ved tilsætning af eksempelvis et

solvent, der er blandbart med vand, men som ikke kan opløse polymeren (eksempelvis ethanol), eller ved tilsætning af elektrolytter (salte), som vil interagere med den ladede polymer, og krydsbinde denne. Polymeren samles således i en særlig struktur i den polymerrige fase, som kaldes coacervatet. Kompleks coacervation henviser til coacervation (samling) af to polymerer i samme system. Samlingen drives af elektrostatiske interaktioner imellem to modsatladede makromolekyler, eksempelvis et positivt ladet protein og et negativt ladet polysakkarid. Processen forløber i vandig opløsning og styres ved at justere pH-værdien og dermed ladningen af de to makromolekyler. Ud over de elektrostatiske tiltrækningskræfter bidrager også hydrogenbindinger og hydrofobiske interaktioner til dannelsen af komplekse coacervater. Processerne og kemien bag kompleks coacervation er gennemgået i flere udgivelser (de Kruif, Weinbreck, & de Vries, 2004) (Schmitt & Turgeon, 2011) (Turgeon, Schmitt, & Sanchez, 2007). Kompleks coacervatdannelse mellem to modsatladede polymerer er illustreret i Figur 5.6.



**Figur 5-6** Kompleks coacervatdannelse mellem to modsatladede polymerer.

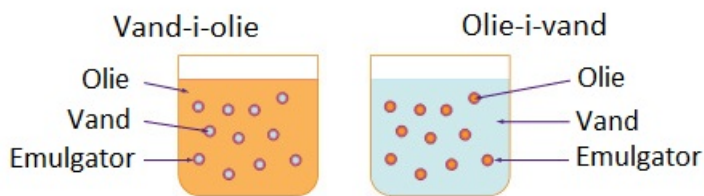
Et af de mest kendte systemer er baseret på kompleks coacervation mellem valleproteiner og gummi arabikum. Gummi arabikum er et naturligt gummistof, udvundet fra visse arter akacietræ, som bruges blandt andet i fødevarerindustrien som stabilisator. Vigtige studier af kompleks coacervatdannelse mellem valleproteiner og gummi arabikum blev udført af Weinbreck og forskerteam, og særligt to af deres udgivelser fra 2003 og 2004 er meget citeret i litteraturen (Weinbreck, de Vries, Schrooyen, & de Kruif, 2003) (Weinbreck, Tromp, & Kruif, 2004). De studerede indflydelsen af en række parametre på dannelsen af komplekse coacervater, såsom polymerkoncentration, ionstyrke, pH, temperatur, omrøringshastighed, processeringstid og flere og vigtige informationer om komplekse coacervater kan findes i disse udgivelser.

Coacervatdannelse kan kombineres med valleproteineres emulgerende egenskaber, når hydrofobe ingredienser skal indkapsles. Eksempelvis viste Jain et al. (2015), at beta-karoten kan indkapsles i en emulsion bestående af en oliefase, hvori beta-karoten var opløst, og en vandig opløsning af valleprotein, som oliefasen var emulgeret ind i. Efter emulgeringsprocessen blev pH-værdien sænket, og gummi arabikum blev tilsat. Coacervater blev dannet under omrøring og blev slutteligt krydsbundet ved brug af glutaraldehyd; et kemikalie, der kan krydsbinde proteiner. Indkapslingen gav beskyttelse til beta-karoten under opbevaringen og sikrede, at det blev frigivet korrekt i fødevarer (Jain, Thakur, Ghosal, Katara, & Shivhare, 2015).

### Emulsion

En simpel emulsion består af to ikke-blandbare væsker, eksempelvis olie og vand, hvor den ene væske er fordelt som dråber i den anden væske; eksempelvis oliedråber fordelt i vand (olie-i-vand-emulsion). Emulsioner er ustabile, og de to faser vil adskilles over tid, men ved at tilsætte en stabilisator kan emulsionen stabiliseres. En illustration af simple emulsioner er vist i Figur 5.7.





**Figur 5-7** Mikrostruktur af simple emulsioner.

Emulsioner benyttes ofte i forbindelse med mikroindkapsling, eksempelvis til indkapsling af sunde olier, såsom fiskeolie. Den sunde olie emulgeres i vand ved brug af en passende stabilisator (en emulgator), og emulsionen kan herefter tørres, eksempelvis ved spraytørring eller frysetørring, hvorved der dannes et pulver, som kan anvendes i fødevarerprodukter. Principperne bag emulsioners kemi og emulsioners anvendelse som mikroindkapslingsstruktur er blandt andet gennemgået af McClements (McClements, 2010).

Valleproteiner har både hydrofile og hydrofobe regioner og er således gode emulgatorer og er dermed anvendelige som stabilisatorer af emulsioner. Når olie og vand homogeniseres med valleproteiner, adsorberes proteinerne til overfladen af oliedråberne, når disse dannes i løbet af homogeniseringsprocessen. Således danner proteinerne et beskyttende lag omkring oliedråberne, hvilket forhindrer, at oliedråberne samler sig igen (sterisk hindring). Afhængigt af pH-værdien i emulsionen kan valleproteinerne være positivt eller negativt ladede, hvilket stabiliserer emulsionen yderligere, idet elektrostatiske frastødningskræfter forhindrer oliedråberne i at samle sig. Når ionstyrken øges, sænkes den elektrostatiske frastødning, idet modioner fra vandfasen interagerer med de ladede oliedråbeoverflader og skærmer dem (Demetriades, Coupland, & McClements, 1997).

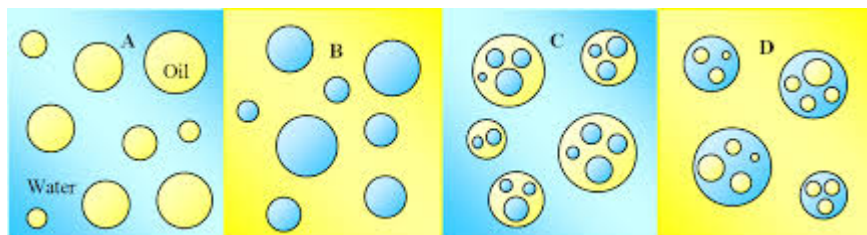
Der er adskillige eksempler på brug af valleproteiner til indkapsling af olier i simple olie-i-vand-emulsioner, eksempelvis fiskeolie (Na, Kim, Kim, & Lee, 2011), chiaolie (Rodea-González et al., 2012) og rosmarinolie (Turasan, Sahin, & Sumnu, 2015). Endvidere findes eksempler på indkapsling af hydrofobe ingredienser med valleproteiner. Her opløses den følsomme hydrofobe ingrediens først i en passende olie, som herefter emulgeres i vand med valleproteiner, eventuelt i kombination med andre stabilisatorer. Eksempler herpå inkluderer indkapsling af astaxanthin (Shen & Quek, 2014) og beta-karoten (Jain, Thakur, Ghosal, Katare, & Shivhare, 2015).

Simple olie-i-vand-emulsioner med valleprotein som emulgator kan stabiliseres yderligere ved at varmebehandle valleproteinet, hvorved en hydrogelstruktur dannes i kombination med emulsionsstrukturen. Et sådant indkapslingssystem vil placeres i grænsefladen mellem emulsion og hydrogel i Figur 5.1, og et eksempel herpå er demonstreret af Dybowska (2011), som viste, at stabiliteten af en raps olie-i-vand-emulsion stabiliseret med valleprotein kunne øges ved varmebehandling af valleproteinerne (Dybowska, 2011).

Simple emulsioner kan enten tørres og/eller anvendes, som de er, eller stabiliseres yderligere ved at coate med endnu et eller flere lag stabilisatorer (flerlagsemulsioner). Til dette anvendes delvist samme princip som ved kompleks coacervation, nemlig at modsatladede polymerer tiltrækkes. Således kan en olie-i-vand-emulsion stabiliseret med valleprotein, som er positivt ladet ved lav pH, stabiliseres yderligere ved tilsætning af et negativt ladet polysakkarid som eksempelvis gummi arabikum, som vil tiltrækkes af de positivt ladede olieoverflader.

Dobbelt-emulsioner består af flere end to ikke-blandbare væsker, som er emulgeret i en dobbeltstruktur, eksempelvis vand-i-olie-i-vand-emulsioner. Ingredienser kan indkapsles i sådanne

emulsioner ved at opløse dem i den inderste vandfase, som emulgeres ind i en olie ved brug af en stabilisator (den primære emulsion). Denne primære emulsion emulgeres ind i en vandfase, hvorved den sekundære emulsion dannes. Illustrationer af simple og dobbeltemulsioner er vist i Figur 5.8.



**Figur 5-8** Simple emulsioner (venstre) og dobbeltemulsioner (højre).

Der findes eksempler på brug af valleproteiner til stabilisering af både den primære og sekundære emulsion i dobbeltemulsioner. Pimentel-González (2009) indkapslede probiotiske bakterier i en vand-i-olie-i-vand-emulsion ved at tilsætte bakterierne til den inderste fase, som bestod af en vandig opløsning af valleproteiner, og emulgere denne vandfase ind i rapsolie. Yderligere emulgatorer blev tilsat i form af Panodan SDK og PGPR 90. Denne vand-i-olie-emulsion blev dernæst emulgeret ind i en vandfase stabiliseret med valleproteiner (Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009).

Dobeltemulsioner har også den egenskab, at de kan indkapsle både hydrofile og hydrofobe aktive ingredienser i et og samme system. Eksempelvis viste Li et al. (2011), at det fedtopløselige vitamin E og det vandopløselige vitamin B2 kan indkapsles i samme vand-i-olie-i-vand-emulsion, stabiliseret af valleproteiner og coatet med polysakkarider (gummi arabikum og guar-gummi) (Li, et al., 2011).

Dobeltemulsioner kan også stabiliseres ved at coate flere lag stabilisator i grænsefladerne mellem olie og vandfaserne. Eksempelvis viste Esfanjani et al. (2015), at safran kan indkapsles i den inderste vandfase af en vand-i-olie-i-vand-emulsion, hvor den sekundære emulsion stabiliseres med valleprotein og pektin, som adsorberes til oliedråberne sekventielt. Altså stabiliseres den sekundære emulsion (olie-i-vand) først med valleprotein, som tilsættes under homogeniseringsprocessen, og denne emulsion tilsættes dernæst til en opløsning af pektin, som tilføjer et yderligere lag coating (Esfanjani, Jafari, Assadpoor, & Mohammadi, 2015). Hele systemet blev slutteligt spraytørret, hvorved et pulver med en gennemsnitlig partikelstørrelse på ca. 480 nm blev dannet.

### 5.1.3 Eksempler på fødevarer ingredienser indkapslet i valleproteiner

Adskillige forskelligartede ingredienser er blevet indkapslet i mikrostrukturer baseret på valleproteiner. Nævneværdigt er der foretaget mange studier vedrørende indkapsling af sunde olier og probiotiske bakterier, som derfor er beskrevet særskilt i de følgende afsnit og listet i Figur 5.9 og Figur 5.10. Derudover er der udført studier vedrørende indkapsling af en række øvrige ingredienser i valleproteiner; ingredienser, som ofte både har en funktionel og en bioaktiv funktion, eksempelvis farvestoffer, som også har antioxidant aktivitet. Indkapsling af funktionelle og/eller bioaktive ingredienser i valleproteinstrukturer er listet i Figur 5-11

#### Indkapsling af olier

Fiskeolie har et højt indhold af omega-3-fedtsyrer, og et højt indtag af fisk og fiskeolieprodukter er forbundet med en række sundhedsgavnige effekter, blandt andet vedrørende hjerte-kar-sygdomme. Der er derfor stor interesse i at øge indtaget af fiskeolie, især hos den befolkning i den vestlige del af verden, hvis kost generelt indeholder for lave mængder fisk og fiskeprodukter. Dette kan opnås ved at tilsætte fiskeolie til fødevarer, som jævnlige indtages (Taneja & Singh,

2012). Udfordringen er, at fiskeolie er meget ustabil på grund af det høje indhold af flerumættede fedtsyrer og derfor nemt oxiderer. Ved oxidation af fiskeolie dannes smag- og lugtstoffer, som er uacceptable i fødevarer, og endvidere har oxiderede omega-3-fedtsyrer ikke de samme sundhedsgavnige effekter.

Andre olietyper, eksempelvis rosmarinolie, har et højt indhold af eksempelvis fenoler, som giver olien en række sundhedsgavnige effekter, blandt andet på grund af den høje antioxidantaktivitet. Der er derfor interesse i at tilsætte sådanne olier til fødevarer, men olien kræver stabilisering/mikroindkapsling, inden den kan tilsættes til fødevarer.

Fiskeolie og andre olier kan indkapsles ved først at emulgere olien i vand ved brug af en egnet emulgator og dernæst spraytørre emulsionen, hvorved der dannes et pulver med mikroindkapslet olie. For at forhindre oxidation af olien tilsættes ofte en antioxidant, som inkorporeres i indkapslingsmaterialet. Valleprotein er en meget velegnet emulgator til formålet, idet den både fungerer som emulgator og som antioxidant (Djordjevic, McClements, & Decker, 2004). Indkapsling af fiskeolie og andre omega-3 rige olier i en emulsion stabiliseret med valleprotein er illustreret adskillige gange, sammenfattet i Figur 5.9.

#### **5.1.4 Indkapsling af probiotika**

Probiotika er levende mikroorganismer, der, når de tilføres i tilstrækkelige mængder, bevirker en gavnlig helbredseffekt på modtageren. Udfordringen ved indtag af probiotika er, at bakterierne skal passere maven på deres vej til tarmsystemet. I maven mødes bakterierne af mavesyre og galdesalte, og probiotiske bakterier skal derfor være resistente overfor lav pH-værdi og galdesalte for at kunne give modtageren den sundhedsgavnige effekt. Visse typer bakteriestammer har vist sig at være mere naturligt resistente over for mavesyre end andre stammer, men generelt er det en udfordring for kosttilskudsindustrien, at bakterierne i deres frie form ikke overlever turen gennem maven (Burgain, Gaiani, & Scher, 2011).

For at overkomme disse udfordringer er det vist, at probiotiske bakterier kan indkapsles i syre resistente materialer, som kan beskytte dem på turen gennem maven. Der er eksempler på probiotiske bakterier, som er indkapslet ved brug af emulsioner stabiliseret med valleproteiner, eksempelvis dobbeltemulsioner (Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009). Der er også eksempler på probiotiske kulturer, hvor valle er tilsat direkte til fermenteringsblandingen, som så er spraytørret (Jantzen, Göpel, & Beer-mann, 2013). En oversigt over studier vedrørende indkapsling af probiotiske bakterier i valleproteiner er givet i Figur 5.10.

**Figur 5-9** Indkapsling af olier i valleproteiner.

Indkapslet olie-type	Indkapslingsstruktur	Vallefraktion	Reference
Fiskeolie	Olie-i-vand emulsion, stabiliseret med valleprotein koncentrat, cyclodextrin og xanthan gummi. Frysetørret.	Valleprotein koncentrat (ukendt proteinindhold)	(Na, Kim, Kim, & Lee, 2011)
Fiskeolie	Olie-i-vand emulsion, stabiliseret med valleprotein. Komplex coacervatdannelse med gummi arabikum. Spray- eller frysetørret.	Valleprotein isolat (WPI 895TM)	(Eratte, Wang, Dowling, Barrow, & Adhikari, 2014)
Fiskeolie	Olie-i-vand emulsion, stabiliseret i flere lag med valleprotein og gelatine.	Valleprotein isolat (HilmarTM 9400)	(Taherian, Britten, Sabik, & Fustier, 2011)
Chia olie (højt omega-3 indhold)	Simpel olie-i-vand emulsion, stabiliseret med valleprotein og gummi arabikum eller gummi mesquite. Spraytørret.	Valleprotein koncentrat (80 % protein)	(Rodea-González, et al., 2012)
Rosmarin olie (høj antioxidant aktivitet)	Simpel olie-i-vand emulsion stabiliseret med valleprotein og/eller maltodextrin. Frysetørret.	Valleprotein koncentrat (80 % protein)	(Turasan, Sahin, & Sumnu, 2015)
Hvedekimolie	Simpel olie-i-vand emulsion stabiliseret med valleprotein og maltodextrin. Frysetørret.	Valleprotein koncentrat (80 % protein).	(Yazicioglu, Sahin, & Sumnu, 2015)

**Figur 5-10** Indkapsling af probiotiske bakterier i valleprotein.

Indkapslet probiotisk stamme	Indkapslingsstruktur	Vallefraktion	Reference
Lactobacillus rhamnosus	Dobbeltemulsion (vand-i-olie-i-vand) med probiotika og valle i inderste vandfase; rapsolie; og mono- og diglycerider og PGPR som stabilisatorer.	Hel valle (sød) med 14,5 g/L protein og 47,0 g/L laktose	(Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009)
Lactobacillus reuteri	Hel valle tilsættes til fermenteringsblandingen, som spraytørres.	Hel valle	(Jantzen, Göpel, & Beermann, 2013)
Lactobacillus rhamnosus GC	Cold-induced hydrogel mikropartikler, dannet ved dråbevis tilsætning af proteinopløsning med probiotika til natrium acetatbuffer ved pH 4,6.	Valleprotein isolat (98 % protein)	(Doherty, et al., 2011)
Lactobacillus acidophilus	Probiotika tilsat til en emulsion af mælkefedt og vandig pektin. Emulsionen forstøves i CaCl <sub>2</sub> , hvorved mikropartikler dannes. Mikropartiklerne coats dernæst med valleprotein ved pH 4,0.	Valleprotein koncentrat (Lacprodan 80, Arla Food Ingredients)	(Gebara, et al., 2013)
Bifidobacterium BB-12	Probiotisk suspension tilsættes til sød valle, som spraytørres.	Hel valle (sød)	(Pinto, et al., 2015)
Lactobacillus plantarum	Probiotisk cellekoncentrat tilsættes vandig opløsning af valleprotein (nativt eller denatureret) og alginat. Spray- eller frysetørres.	Valleprotein isolat (ukendt protein indhold)	(Rajam, Karthik, Parthasarathi, Joseph, & Anandharamakrishnan, 2012)

**Figur 5-11:** Indkapsling af funktionelle og bioaktive ingredienser i valleprotein

Indkapslet ingrediens	Indkapslingsstruktur	Vallefraction	Reference
Safran	Dobbeltemulsion (vand-i-olie-i-vand) med safran i inderste vandfase, stabiliseret med valleprotein og maltodextrin. V-O-V emulsion stabiliseret med valleprotein med kompleks coacervatdannelse med pektin. Spraytørret.	Valleprotein koncentrat (80% protein)	(Esfanjani, Jafari, Assadpoor, & Mohammadi, 2015)
Astaxanthin	Simpel emulsion med solsikke olie og astaxanthin, stabiliseret med valleprotein og soluble corn fiber. Spraytørret.	Valleprotein isolat (ukendt proteinindhold)	(Shen & Quek, 2014)
Beta-karoten	Simpel emulsion med soyaolie indeholdende beta-karoten, stabiliseret med valleprotein. Kompleks coacervatdannelse med gummi arabikum. Krydsbinding med tilsætning af glutraldehyd. Frysetørret.	Valleprotein isolat (ukendt protein indhold)	(Jain, Thakur, Ghosal, Katare, & Shivhare, 2015)
Vitamin E og vitamin B2	Dobbeltemulsion (vand-i-olie-i-vand) med vitamin B2 i inderste vandfase, og vitamin E i oliefasen (soyaolie). V-O-V emulsion stabiliseret med valleprotein og guar gummi eller gummi arabikum. Frysetørret.	Valleprotein isolat (97% protein)	(Li, et al., 2011)
Vanillin	Vanillin homogeniseret med vandig valleproteinopløsning og tørret (spray-, fryse eller spray-fryse).	Valleprotein isolat (ukendt protein indhold)	(Hundre, Karthik, & Anandharamakrishnan, 2015)
Ethyl hexanoat (aroma)	Valleproteinhydrogeler, dannet ved pH-justering og tilsætning af CaCl <sub>2</sub> , krydsbundet med disulfidbroer gennem 22 timer ved 4°C. Homogeniseret.	Valleprotein isolat (92,6% protein)	(Giroux & Britten, 2011)

## 5.2 Aktivitet 3.2 Indkapsling af valgte aktivstoffer

Der blev i projektet fokuseret på at indkapsle smagsstoffer til brug i tyggegummi. Når smagsstoffer til tyggegummi indkapsles, kan man opnå en forlænget smagsoplevelse, sammenlignet med når smagsstoffet tilsættes i sin frie form.

Der blev først udført en række forsøg, som fokuserede på at afprøve forskellige koncepter for anvendelse af valle som indkapslingsmateriale. I disse forsøg blev der ikke indkapslet et aktivstof, men forsøgene blev udført for at teste valles egenskaber som indkapslingsmateriale. Koncepterne, der blev testet, var anvendelse af valle til brug i komplekse coacervater samt som stabilisator af olie-i-vand-emulsioner.

Dernæst blev der udvalgt et modelstof, carvon, som blev indkapslet i valle. Der blev fremstillet en række indkapslede produkter: med egen valle, med kommerciel valle, med maltodextrin som hjælpestof og med ren maltodextrin.

### 5.2.1 Komplekse coacervater – indledende forsøg uden aktivstof

Der blev udført forsøg dels med kommerciel valle (Whey 100 fra Laprodan), dels med valle produceret i projektet (batch 6 og 8).

Opløsninger af valle (kommerciel valleprotein i 3 %-opløsning eller valle fra projektet i 3 %- eller 20 %-opløsning) samt af gummi arabikum (20 % eller 3 % i vand) blev fremstillet. Der blev brugt 3 forskellige typer gummi arabikum, som ikke er yderligere specificeret. De angives med numrene 1063, 1064 og 1062. I nogle forsøg blev vollen forsuret ved at sænke pH-værdien til 4 og centrifugere vollen i 20 min ved 3.000 rpm og fjerne bundfaldet.

Til fremstilling af coacervaterne blev 30 ml valleopløsning blandet med 15 ml gummi arabikumopløsning ved 25 °C. Omrøringen blev udført med Silverston Homogenisator ved 4.500 rpm. pH-værdierne af hver prøve blev målt. En oversigt over prøverne er vist i Figur 5-12.

**Figur 5-12** Prøveoversigt, komplekse coacervater.

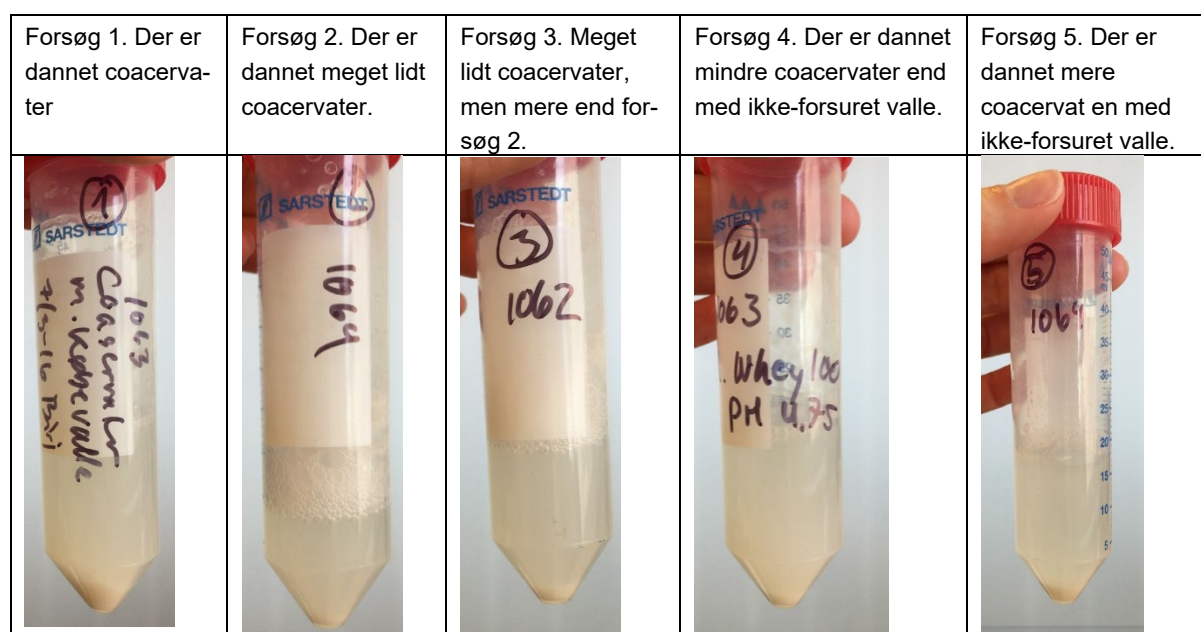
Prøve nr.	Gummi arabikum-type og -koncentration	Valletype og -koncentration	pH ved forsuring	pH inden coacervation
1	1063, 3 %	Laprodan, 3 %	Ingen forsuring	6,80
2	1064, 3 %	Laprodan, 3 %	Ingen forsuring	6,71
3	1062, 3 %	Laprodan, 3 %	Ingen forsuring	6,73
4	1063, 3 %	Laprodan, 3 %	4,75	5,11
5	1063, 3 %	Laprodan, 3 %	4,75	4,93
6	1063, 3 %	Batch 6, direkte	Ingen forsuring	6,66
7	1064, 3 %	Batch 6, direkte	Ingen forsuring	6,95
8	1063, 20 %	Batch 8, direkte	Ingen forsuring	6,63
9	1064, 20 %	Batch 8, direkte	Ingen forsuring	6,43
10	1063, 3 %	Batch 8, 3 %	3,84	6,79
11	1064, 3 %	Batch 8, 3 %	4,75	N/A
12	1063, 3 %	Batch 8, 3 %	4,75	N/A
13	1063, 20%	Batch 8, 20 %	4,75	N/A

pH-værdierne blev herefter sænket til 4 med HCl (1 M og 0,1 M). Opløsningerne blev hældt i 2x 50 ml rør og blev opbevaret ved 25°C uden omrøring. Højden af coacervaterne blev målt efter 5 minutters henstand samt efter 1 døgn og 2-4 døgn. Desuden blev coacervaternes opløselighed i vand vurderet. Resultater er sammenfattet i Figur 5-13.

**Figur 5-13** Resultatoversigt, komplekse coacervater.

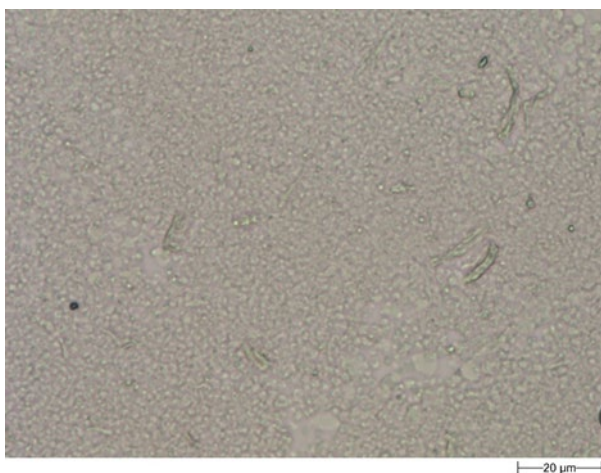
Prøve nr.	Henstand 5 min (cm)	Henstand 1 døgn (cm)	Henstand 2-4 døgn (cm)	Coacervaternes opløselighed i vand
1	0	1,0	N/A	Ikke opløselig
2	0	0,4	0,5	N/A
3	0	0,5	0,5	N/A
4	0	0,7	0,7	N/A
5	0	0,8	N/A	Ikke opløselig
6	0	0	0	N/A
7	0	0	0,4	N/A
8	0	0	0	N/A
9	0	0	2	Bundfald, ikke flydende
10	0	0,7	0,8	Ikke opløselig
11	0	0	0,4	Bundfald, ikke flydende
12	0	0,6	0,8	Ikke opløselig
13	0	0	0	N/A

Nogle af coacervaterne var væskelignende, mens andre dannede et ikke-flydende bundfald. Efter opbevaring natten over blev coacervatdannelse i prøverne 1-5 fotograferet. Billederne er vist i Figur 5-14.

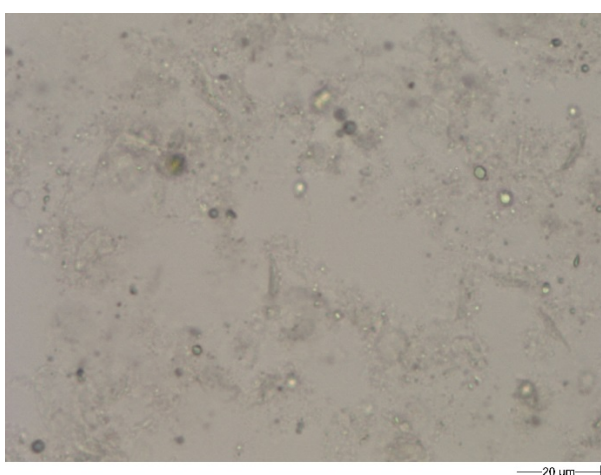


**Figur 5-14** Komplekse coacervater.

Prøver blev udtaget og analyseret under mikroskop. Dette viste, at coacervaterne mindede om små partikler. Mikroskopibillederne af coacervaterne i Prøve 1 og Prøve 2 er vist i Figur 5-16 og Figur 5-17.



**Figur 5-15** Mikroskopibillede af coacervater i Prøve 1.



**Figur 5-16** Mikroskopibillede af coacervater i Prøve 2.

Forsøgene viste, at vollen produceret i projektet ikke er egnet til at lave coacervater. Der fokuseres derfor på at anvende vollen til at stabilisere emulsioner.

### 5.2.2 Olie-i-vand-emulsioner – indledende forsøg uden aktivstof

Der blev fremstillet to prøver af olie-i-vand-emulsioner stabiliseret med enten kommerciel valle kombineret med maltodextrin eller valle produceret i projektet (batch 6).

Emulsionernes vandfase og oliefase blev fremstillet jf. Figur 5-17, og disse blev emulgeret ved brug af Silverston Homogenisator ved 6.000 rpm i 2 min efterfulgt af 4 runder højtrykshomogenisering ved 800 bar.

**Figur 5-17** Prøveoversigt, emulsioner.

Prøve nr.	Vandfase	Oli fase	Blandingsforhold
14	20 g Whey 100 / 100 g 20 g maltodextrin / 100 g	Solsikkeolie	0,6 g oli fase og 120 g vandfase
15	Batch 6, fortyndet 1:1	Solsikkeolie med 1 % limonen	10 g oli fase og 190 g vandfase



Dråbestørrelserne blev målt efter hver homogeniseringsproces (Zetasizer). Resultaterne er vist i Figur 5-18.

**Figur 5-18** Resultatoversigt, emulsioner. Alle værdier i nm.

Prøve nr.	Efter homogenisering med Silverston	Efter 1. runde højtrykshomogenisering	Efter 2. runde højtrykshomogenisering	Efter 3. runde højtrykshomogenisering	Efter 4. runde højtrykshomogenisering
14	211,9	189,0	185,0	185,0	180,0
15	327,1	308,8	233,2	214,1	N/A

Dråberne i prøve 15 var større end i prøve 14, hvilket sandsynligvis skyldes, at der blev anvendt mere olie til fremstilling af prøve 15. Emulsionerne blev vurderet til at være stabile efter et døgn ved opbevaring på køl, se Figur 5-19



**Figur 5-19** Stabil emulsion.

Forsøgene viste, at vallen har lovende egenskaber som stabilisator af olie-i-vand-emulsioner. Der arbejdes videre med denne indkapslingsstrategi i næste afsnit.

### 5.2.3 Indkapsling af carvon i spraytørrede olie-i-vand-emulsioner

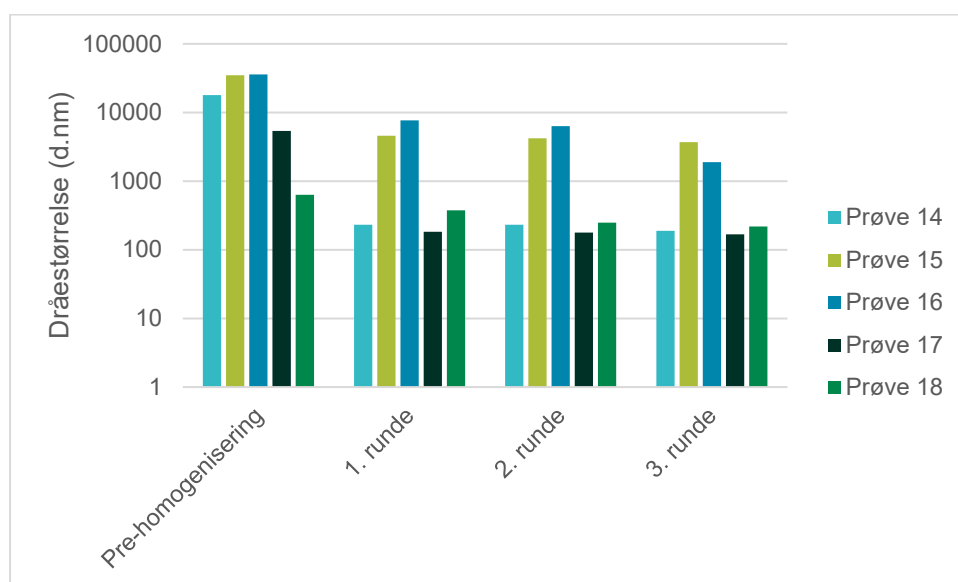
Carvon blev valgt som modelstof, idet der allerede er etableret en god analysemetode af carvon ved brug af gaskromatografi (GC).

Der blev fremstillet en række olie-i-vand-emulsioner med carvon som modelstof i henhold til Figur 5-20. Alle emulsionerne blev fremstillet ved brug af Silverston Homogenisator ved 6.000 rpm i 2 min efterfulgt af 3 runder højtrykshomogenisering ved 800 bar.

**Figur 5-20** Prøveoversigt, carvon indkapslet i emulsioner.

Prøve nr.	Vandfase	Oli fase	Blandingsforhold
14	Laprodan, 10 %	Solsikkeolie med 10 % carvon	190 g vandfase + 10 g oli fase
15	Maltodextrin, D.E. 12-16, 10 %	Solsikkeolie med 10 % carvon	190 g vandfase + 10 g oli fase
16	Maltodextrin D.E. 4,5-8,5, 10 %	Solsikkeolie med 10 % carvon	190 g vandfase + 10 g oli fase
17	Maltodextrin D.E. 12-16, 5 % Laprodan 5 %	Solsikkeolie med 10 % carvon	190 g vandfase + 10 g oli fase
18	Batch 12, fortyndet til 10 %	Solsikkeolie med 10 % carvon	190 g vandfase + 10 g oli fase

Dråbestørrelserne blev målt efter hver homogeniseringsproces (Zetasizer). Resultaterne er vist i Figur 5-21.



**Figur 5-21** Dråbestørrelser af hver prøve efter hver homogeniseringsproces.

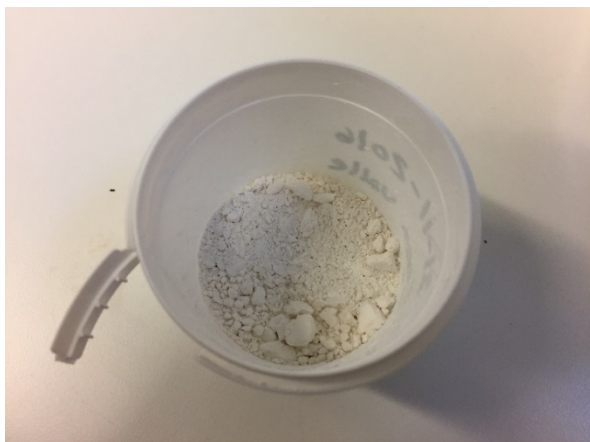
Det ses, at de mindste dråber blev opnået, når der blev anvendt valle til indkapsling, og at maltodextrin alene ikke kan stabilisere emulsionen tilstrækkeligt (store dråbestørrelser). Emulsionerne blev herefter spraytørret ved 80 °C ved luftflow 0,3 m<sup>3</sup>/time, fødestrøm 3,4 ml/min og 0,8 µm dyse. Udbyttet af pulver efter spraytørring er vist i Figur 5-22.

**Figur 5-22** Pulverudbytte efter spraytørring.

Prøve nr.	Udbytte (g)	Teoretisk udbytte (g)	Udbytte (%)
14	12,78	29	44,1
15	0,54	29	1,9
16	2,25	29	7,8
17	1	29	3,4
18	18	29	62,1

Udbyttet af pulver var højere, når der blev anvendt valle.

Det teoretiske indhold af carvon i alle pulverprøverne var 3,4 %. Dette kan øges ved eksempelvis at anvende ren carvon som oliephase (teoretisk carvonindhold bliver herved 34 %). Et billede af Prøve 18 (fremstillet med egen valle) er vist i Figur 5-23.



**Figur 5-23** Indkapslet carvon i egen valle (Prøve 18 efter spraytørring).

### 5.3 Aktivitet 3.3 Evaluering af indkapslede produkt

De indkapslede produkter (spraytørrede prøver 14-18) blev testet i tyggegummi. Forsøgene er indledende, og blev udført for at give et indblik i de indkapslede produkters funktioner. Flere forsøg er påkrævet i forbindelse med egentlig produktudvikling.

Tyggegummi blev fremstillet ved brug af kit "make your own chewing gum kit" indeholdende gummibase, flormelis og majsstivelse (se Figur 5-24).



**Figur 5-24** Make your own chewing gum kit.

Til tyggegummimassen blev tilsat enten frit carvon i olieopløsning eller indkapslet carvon. Frit carvon blev tilsat i form af en 10 % carvonopløsning i solsikkeolie.

Tyggegummimassen kunne maksimalt optage ca. 0,15 g pulver pr. 1 g tyggegummimasse. 0,15 g pulver indeholder teoretisk 0,005 g carvon. Til prøven med frit carvon (tilsat som 10 % opløsning) skulle der således tilsættes 0,05 g carvonopløsning pr. 1 g tyggegummimasse for at opnå samme carvonkoncentration. Ved en fejl blev der tilsat den dobbelte mængde (0,18 g carvonopløsning).

Mængden af tyggegummimasse og carvontilsætning i de forskellige prøver er vist i Figur 5-25. Til test af Prøve 15 burde have været anvendt 0,75 g, men udbyttet fra spraytørringsprocessen var kun 0,54 g, så derfor er denne mængde anvendt.

**Figur 5-25** Oversigt over tyggegummiprøver.

Prøve	Tyggegummimasse (g)	Pulver (g)	Olie (g)
14	60	8,7	
15	5	0,54	
17	5	0,75	
18	20	3,0	
Frit carvon (olieopl.)	18		1,8

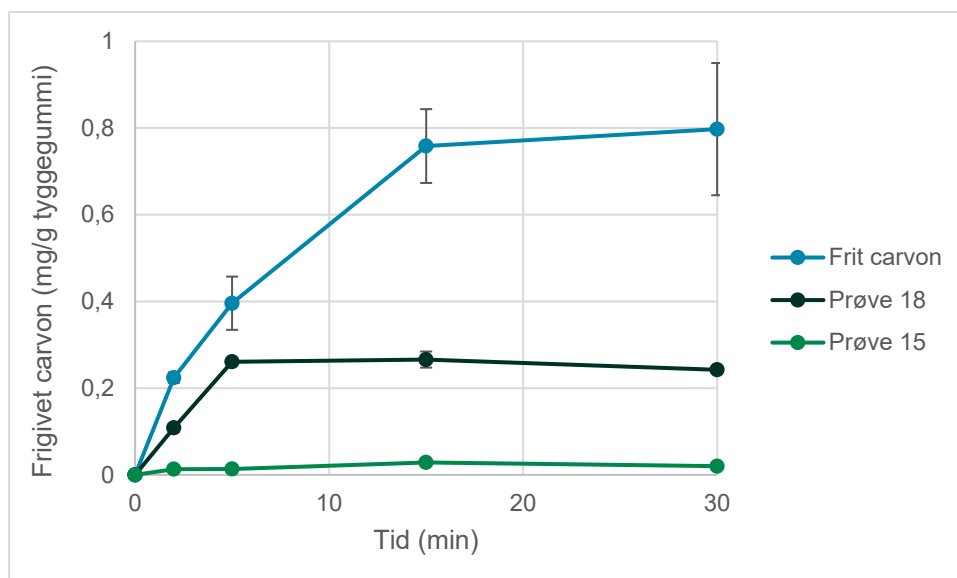
Et billede af tyggegummi efter fremstilling er vist i Figur 5-26.



**Figur 5-26** Tyggegummiprøve med carvon.

Indholdet af carvon i tyggegummiprøverne blev ikke analyseret i projektet. Frigivelse af carvon ved tygning blev målt ved brug af en tyggemaskine. Der blev anvendt en tyggebuffer, som blev fremstillet som følger: 2,72 g kaliumphosphat opløses i 1.000 ml demineraliseret vand. pH justeres med NaOH til pH 7,4.

Frigivelsen af carvon fra tyggegummiprøver med Prøve 15 (fremstillet med maltodextrin), Prøve 18 (fremstillet med egen valle) samt tyggegummi med frit carvon blev testet. 1-1,5 g tyggegummi blev testet pr. gang i 20 ml tyggebuffer. Prøverne blev testet i duplikater. Der blev udtaget prøver af tyggebufferen efter 2, 5, 15 og 30 min. Carvonkoncentrationen i alle prøverne blev analyseret med GC. Frigivelsesprofilerne er præsenteret i Figur 5-27.



**Figur 5-27** Frigivelsesprofiler for tyggegummi.

Mængden af frigivet carvon fra tyggegummi med Prøve 15 var meget lavt. Dette kan skyldes, at mængden af carvon i pulveret var meget lav fra start på grund af det store tab under spraytørringsprocessen. Ligeledes ser det ud til, at mængden af carvon i tyggegummi med Prøve 18 er mindre end halvt så lavt sammenlignet med carvonindholdet i tyggegummi med frit carvon. Dette kan skyldes procesvariationer.

Carvon i fri form frigives hurtigere sammenlignet med indkapslet carvon, men tyggegummi med frit carvon har i sig selv en fin frigivelsesprofil.

Uden kendskab til indholdet af carvon i tyggegummiprøverne er en vurdering af frigivelsesprofilen svær. Det vurderes umiddelbart, at indkapslingen ikke har forlænget frigivelsen af carvon, men samtidig vurderes det på baggrund af litteraturen at man ved at variere procesparametrene kan opnå et produkt, hvor frigivelsesprofilen er modificeret.

En fordel ved indkapslingsprocessen er, at carvon kan tilsættes på pulverform, hvilket typisk er lettere at håndtere sammenlignet med olieformen.

## 5.4 Aktivitet 3.4 Vurdering af forretningspotentiale for indkapslet produkt

I de udførte forsøg er maltodextrin anvendt til sammenligning, idet Alkalon oplyser, at der typisk anvendes maltodextrin til indkapsling af aktivstoffer i dag. Forretningspotentialet for det indkapslede carvonprodukt vurderes derfor i forhold til det tilsvarende produkt indkapslet i maltodextrin.

Fælles for indkapslingsprocesserne udført med valle og med maltodextrin er homogeniseringsprocessen samt spraytørringsprocessen. Omkostningerne til disse processer vurderes at være uafhængige af indkapslingsmaterialet (maltodextrin eller valle).

Prisen på maltodextrin varierer, men er typisk 5-25 \$/kg. Til fremstilling af en 10 % maltodextrinopløsning, som blev testet i projektet, vil udgiften til maltodextrin altså være 3,5-17,5 kr. pr. kg opløsning. Hertil kommer udgifterne til det vand, som maltodextrinen skal opløses i. Til sammenligning vil prisen for valle produceret i projektet være under 1 kr./kg.

Indkapslingsprocessen er udført med henblik på at få et godt resultat ved brug af valle. Maltodextrin blev anvendt til sammenligning, men pulverudbyttet ved brug af maltodextrin var meget lavt. Det er ikke testet, om dette udbytte kan øges ved at ændre procesparametrene. I en vurdering af forretningspotentialet bør de to processer sammenlignes under hver deres optimale produktionsbetingelser.

Alkalon har ikke tal for, hvor meget smag og aroma, der anvendes i tyggegummiproduktionen i dag, hvilket vanskeliggør en yderligere vurdering af forretningspotentialet.

## 6. Arbejdspakke 4 – Udvikling af ingrediens til drikkeligt produkt

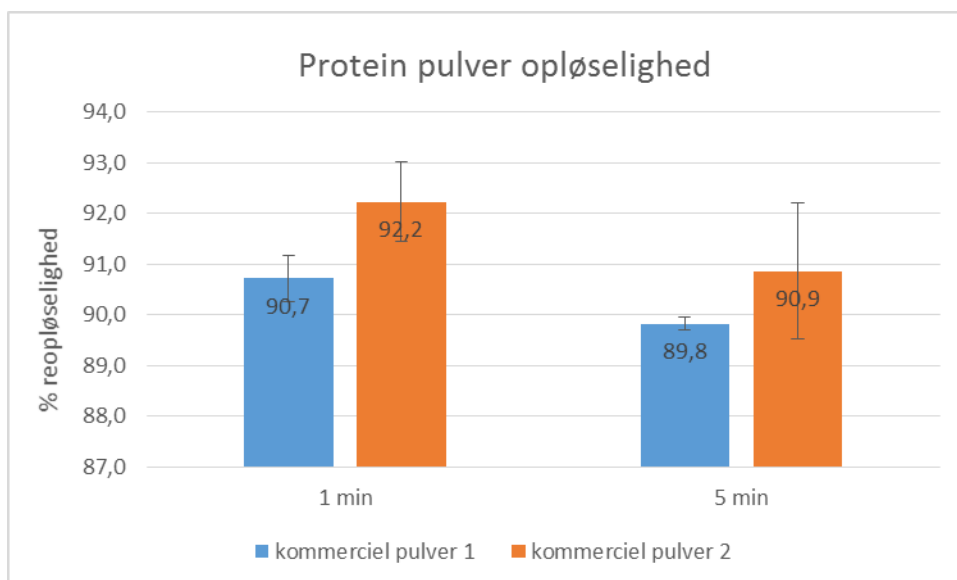
Markedet for proteinberigede produkter har igennem de senere år været i kraftig vækst. Således er det i dag muligt at købe proteinberigede drikkeprodukter i næsten alle supermarkeder/tankstationer, hvilket ikke var tilfældet for få år siden. Alene i 2015 blev der lanceret ca. 2.400 produkter med anmærkningen "høj protein". For at kunne anvende denne "høj protein"-anmærkning skal mindst 20 % af energiindholdet i fødevaren ifølge EU's krav (regulation (EU) No 1924/2006, No 1047/2012) komme fra protein. Anmærkningen med "høj protein" er steget med 530 % fra 2005 til 2015 og forventes at stige yderligere 1,1 % i 2016 i forhold til 2015 (Mintel, 2016). Det er primært snacks, mejeriprodukter, drikkelige produkter, bageriprodukter og færdigretter der undergår en proteinberigelse. I drikkelige produkter anvendes i dag primært vallepulver.

Indeværende arbejdspakke havde til formål at udvikle et drikkeligt produkt af tilsvarende kvalitet som allerede eksisterende kommercielle pulver med udgangspunkt i flydende valleproteinisolaterne fra arbejdspakke 1.

### 6.1 Aktivitet 4.1 Fastlæggelse af egenskaber for det anvendte valleprotein

Kvalitetskravene til ingredienser anvendt i drikkelige produkter varierer og afhænger bl.a. af ønskerne om produktets smag og pH og af, hvor tyktflydende produktet skal være. Det betyder, at nogle af kravene til kommercielt tilgængelig ingredienser anvendt i drikkelige produkter eksempelvis er pulverets udseende og viskositetsgivende egenskaber samt neutral smag og god genopløselighed. De funktionelle og kvalitetsmæssige egenskaber af flydende proteiner fra oprensningerne i projektet er derfor afgørende for deres kvalitet og anvendelsespotentiale. To kommercielle pulverprodukter blev derfor testet for smag, reopløselighedsevner og viskositetsgivende egenskaber.

Ved fremstilling af drikkelige produkter skal proteiningrediensen først opløses. Partikler, som ikke er opløst, kan potentielt have stor indflydelse på viskositet, tekstur og smag af det færdige produkt. Uopløste partikler risikerer desuden at ende som bundfald i det færdige produkt. Test af to kommercielle valleproteinpulvere viste, at reopløseligheden lå på omkring 90 % til 92 % ved kort tids mixning (1 min), og der kunne ikke opløses signifikant mere ved øget mixning (Figur 6-1).



**Figur 6-1** Test af pulverreopløseligheden ved stuetemperatur og anvendelse af højhastigheds-miksning 1 minut og 5 minutter af to forskellige kommercielle valleproteinpulvere.

Viskositeten af forskellige isolerede vallefraktioner blev testet og sammenlignet med de to kommercielle pulvere. Testen viste, at valleproteinfraktion batch 6 gav højere viskositet end batch 12, 9 og 8 (Figur 6-2). Inden test blev prøverne fortyndet til samme proteinkoncentration, således at prøverne kan sammenlignes indbyrdes. De to kommercielle pulver gav sammenlignelige viskositeter som batch 8, 9 og 12.



**Figur 6-2** Resultatet af viskositetsmålinger på forskellige batch af oprensede vallefraktioner. Testet ved 4 % proteinkoncentration, 22 grader og 50s-1 i omdrejningshastighed.

I kommercielle drikkelige produkter anvendes typisk forskellige typer af stabilisatorer til at skabe mere viskositet, da proteinerne i sig selv ikke giver de ønskede konsistenser.



## 6.2 Aktivitet 4.2 Anvendelse af koncentrerede vallefraktioner i drikkelige produkter

I indeværende aktivitet blev der med udgangspunkt i producerede valleproteinisolater udviklet en drikkelig proteindrik af MyDrink Beverages, som er partner i projektet. I udviklingen af drikkelige produkter er der en lang række af parametre herunder smag, surhedsregulering, sødestoffer og farve, som skal tages i betragtning. I de nedenstående afsnit beskrives disse kort.

**Smag:** De mest almindelige smagsvarianter på markedet for drikkelige produkter er banan, jordbær og andre bærsmage, og der anvendes ofte naturlige smagsstoffer. I de udarbejdede prototyper blev der anvendt jordbærsmag.

**Surhedsregulering:** Valleprotein har en stor bufferkapacitet med en pH på ca. 6,5. For at forbedre holdbarheden er det nødvendigt at sænke pH til omkring 3,5. Det mest almindelige surhedsregulerende middel i drikkelige produkter er citronsyre. Denne syre er en svag syre, hvilket bevirker, at der skal anvendes store mængder i drikke med et højt indhold af protein for at opnå det ønskede niveau. Dette kan i mange tilfælde influere negativt på smagen.

Mælke- og/eller fosfatsyre anvendes derfor ofte som surhedsregulerende middel i drikke med et højt proteinindhold. Da fosfatsyre har en mindre effekt på smagen, er denne anvendt til de udviklede prototyper.

**Sødemiddel:** Til at søde drikkeprodukter anvendes der enten kunstige eller naturlige sødemidler som eksempelvis stevia og sukrose. I drikkeprodukter med lave kalorieværdier anvendes der typisk sødemidlet sucralose. Dette sødemiddel har også den fordel, at det er stabilt ved høje temperaturer, som bruges ved pasteurisering, og har mindre eftersmag i forhold til øvrige kunstige sødemidler. I udvikling af prototyperne blev der afprøvet forskellige kombinationer af sødemidler.

**Farve:** Farven på de anvendte vallekoncentrater var 'mælket'; dog var en enkelt mere transparent, sammenlignelig med juice. Produktet blev farvet lyserød ved tilsætning af farvestof.

Proteinindholdet i kommercielle proteindrikkeprodukter på det danske marked varierer mellem 4 og 10 %. I projektet blev der udviklet forskellige drikkelige produkter med forskelligt proteinindhold ved anvendelse af forskellige vallekoncentrater fra arbejdsopgave 1. Et eksempel på en udviklet prototype kan ses i Figur 6-3.

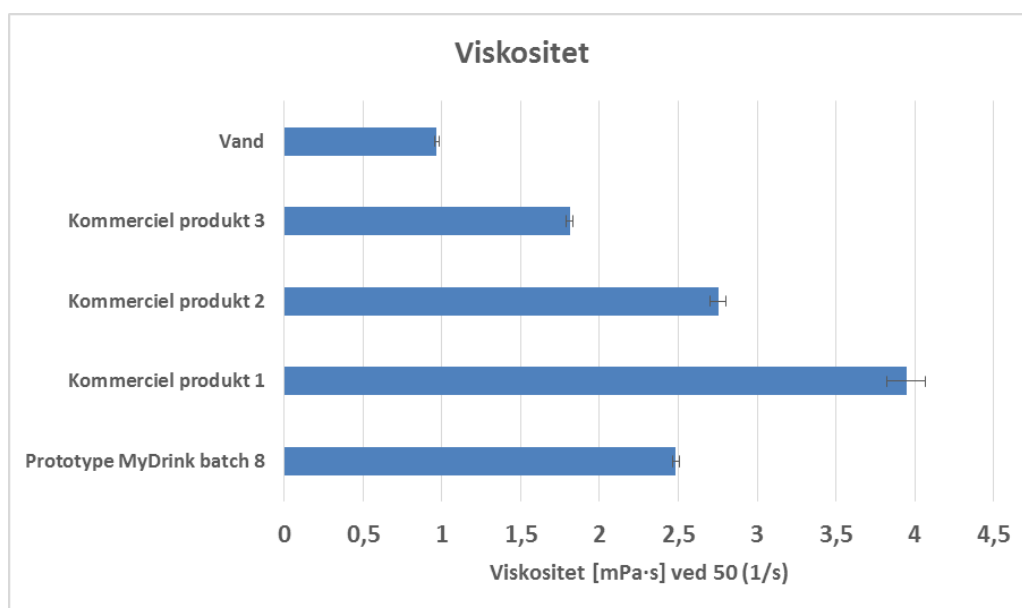


**Figur 6-3** Udarbejdet prototype af drikkelige produkt med jordbærsmag ud fra oprenset valleprotein, batch 8 med 4 g protein/100 ml. Prototype udarbejdet af partner i projektet MyDrink Beverages.

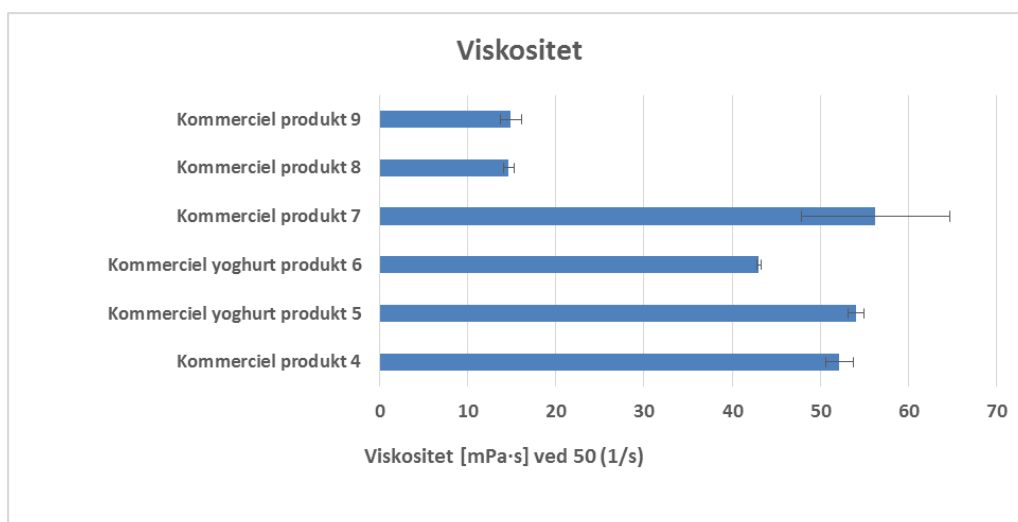
### 6.3 Aktivitet 4.3 Evaluering af det drikkelige produkt

I denne aktivitet blev prototypen indeholdende vallekoncentrat fra batch 8 sammenholdt med en række kommercielt tilgængelige drikkeprodukter fra det danske marked. Batch 8 blev valgt som en repræsentativ prøve for et koncentrat uden saltreduktion til fremstilling af prototypen. For prototypen og de kommercielle produkter blev testet vigtige parametre som viskositet, tekstur og smag.

Analyserne viste, at produkterne overordnet set kan kategoriseres i produkter med enten høj eller lav viskositet. Ud af ni kommercielle produkter havde tre af produkterne lav viskositet (<4 mPa\*s), hvorimod de resterende seks produkter havde høj viskositet (14 til 54 mPa\*s), se Figur 6.5. Den fremstillede prototype fra batch 8 havde en lav viskositet på omtrent samme niveau som de tre kommercielle produkter med lav viskositet (Figur 6.4).



**Figur 6-4** Produkter med lav viskositet. Målt som mPa\*s, ved 50 1/s og 22 grader.



**Figur 6-5** Kommerciel produkter nr. 4-9 med høj viskositet. Målt som mPa·s, ved 50 1/s og 22 grader.

Viskositeten blev også målt som funktion af omdrejningshastigheden. Ved denne analyse viste prototypen (batch 8) svagt hastighedsfortyndende egenskaber. De kommercielle produkter med lav viskositet viste enten ingen sammenhæng mellem viskositet og omdrejningshastighed (newtonsk opførsel) eller svagt hastighedsfortyndende egenskaber. Alle de kommercielle produkter med høj viskositet besad den fysiske egenskab der kaldes tixotropisk, der bevirker, at de ændre viskositet med tiden ved en konstant omdrejningspåvirkning. Det betyder, at de viste kraftigt hastighedsfortyndende egenskaber, og at viskositet ikke kommer tilbage til udgangspunktet, når omdrejningshastigheden ændres. Dette er helt normalt for yoghurt og eksempelvis maling. I kategorien med højere viskositet var to proteinberigede drikkeyoghurter. Viskositeten for to produkter lå omkring 15 mPa\*s, og fire produkter inkl. drikkeyoghurt har ca. 4 gange højere viskositet (43-56 mPa\*s) (Figur 6.5).

De teksturelle egenskaber viste, at kun 3 kommercielle drikkeprodukter (alle med høj viskositet) viste viskoelastiske egenskaber. Det betyder, at produkterne er både viskøse og elastiske på samme tid. Dette kan give en ændret mundfølelse ved indtag i forhold til, hvis produktet ikke udviser viskoelastiske egenskaber. Øvrige kommercielle produkter samt udviklet prototype havde ikke viskoelastiske egenskaber, og produkterne var uden hastighedsafhængighed. Smag, mundfølelse og eftersmag blev vurderet for alle produkter. De fleste produkter, både de kommercielle, som er på markedet, samt prototypen, viste klar eftersmag fra proteinerne. Eftersmagen beskrives som proteineftersmag, som kan være lidt sur og udtørrende (astringerende).

#### **6.4 Aktivitet 4.4 Vurdering af potentiale for drikkeligt produkt**

Sports- og energidrikkeprodukter udgør 8 % af det totale europæiske marked for drikkeprodukter (Innova Market insights, 2014). Markedet er vokset, og der bliver til stadighed lanceret nye proteinprodukter. England er det land i Europa, hvor der lanceres flest nye produkter, dobbelt så mange som for eksempel Spanien, Tyskland og Italien. I England blev der lanceret 293 nye proteinprodukter i 2015 og 260 indtil august 2016 (Mintel, 2016). Drikkelige produkter med "høj protein" udgør 12 % af det totale marked for proteinberigede produkter (Mintel, 2016).

Det vurderes, at den udviklede prototype på et drikkeligt produkt, hvor opkoncentreret valle fra de deltagende mejerier benyttes, har sammenlignelige fysiske og smagsmæssige egenskaber med lignede kommercielle produkter, der allerede er på markedet. Den udviklede prototype med

flydende proteiningrediens afviger således ikke væsentligt i forhold til produkter på markedet, hvori der anvendes pulver. Resultaterne for den udviklede prototype viste smag, udseende, eftersmag og mundfornemmelse, som blev vurderet bedre end eller på samme niveau som produkter på markedet indeholdende valleproteinpulver. Den bedre smag blev opnået på produktet ved at kombinere sødestofferne, hvor indholdet af det kunstige sødemiddel sucralose er noget mindre end i lignende konkurrerende produkter på marked. Kalorieindholdet i den udviklede prototype blev evalueret i forhold til teoretiske beregninger og viste et lavt indhold på ~60 Kcal/100 ml i forhold til øvrige kommercielle produkter.

# 7. Referencer

- Barrow, C., & Shahidi, F. (2007). *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press.
- Barzin, J., C. Feng, K.C. Khulbe, T. Matsuura, S.S. Madaeni & H. Mirzadeh (2004): Characterization of Polyethersulfone Hemodialysis Membrane by Ultrafiltration and Atomic Force Microscopy. *Journal of Membrane Science*, Vol. 237, July 2004, issue 1-2, p77-85.
- Burgain, J., Gaiani, C., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, s. 467-483.
- Bylund, G. (1995). *Dairy processen handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sverige.
- de Kruijff, C., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, s. 340-349.
- Demetriades, K., Coupland, J., & McClements, D. (1997). Physical Properties of Whey Protein Stabilized Emulsions as. *Journal of Food Science*, s. 342-347.
- Djordjevic, D., McClements, D., & Decker, E. (2004). Oxidative Stability of Whey Protein-stabilized Oil-in-water Emulsions at pH 3: Potential  $\omega$ -3 Fatty Acid Delivery Systems (Part B). *Journal of Food Science*, s. 356-362.
- Doherty, S., Gee, V., Ross, R., Stanton, C., Fitzgerald, C., & Brodtkorb, A. (2011). Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, s. 1604-1617.
- Dybowska, B. (2011). Whey protein-stabilized emulsion properties in relation to thermal modification of the continuous phase. *Journal of Food Engineering*, s. 81-88.
- Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C., & Adhikari, B. (2014). Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. *Food & Funktion*, s. 2743-2750.
- Esfanjani, A., Jafari, S., Assadpoor, E., & Mohammadi, A. (2015). Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, s. 149-155.
- Fox, P.F., & McSweeney, P.L.H. (1998a). Production and utilization of milk. *Dairy chemistry and biochemistry* (1 st ed., pp 1-20). London, UK: Blackie Academic & Professional.
- Fox, P.F., & McSweeney, P.L.H. (1998b). Milk proteins. *Dairy chemistry and biochemistry* (1 st ed., pp 146-237). London, UK: Blackie Academic & Professional.
- Frandsen, C. (2015). Personlig samtale med Carsten Frandsen. Direktør på Endrup Andelsmejeri. Bygaden 43, 6740 Bramming.
- Fresenius, 2007. Produktbrochure fra Fresenius Medical Care AG, Hamburg: Haemodialysis - Dialysis and Filters – Product Range. [www.fmc-ag.com](http://www.fmc-ag.com).
- Gad, A., Khadrawy, Y., El-Nekeety, A., Mohamed, S., Hassan, N., & Abdel-Wahhab, M. (2011). Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition*, s. 582-589.
- Gebara, C., Chaves, K., Ribeiro, M., Souza, F., Grosso, C., & Gigante, M. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, s. 872-878.
- Giroux, H., & Britten, M. (2011). Encapsulation of hydrophobic aroma in whey protein nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, s. 337-343.
- Gunasekaran, S. (2008). Whey protein hydrogels and nanoparticles for encapsulation and controlled delivery of bioactive compounds. I C. Onwulata, & P. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits*. Wiley-Blackwell.
- Gunasekaran, S., Ko, S., & Xiao, L. (2007). Use of whey proteins for encapsulation and controlled. *Journal of Food Engineering*, s. 31-40.

- Hambræus, L. & Lønnerdal (2003). Nutritional aspects of milk proteins. In P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry, volume 1, proteins, part A* (3rd ed., 605-640). New York, NY, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Hoffmann, M., & van Mil, P. (1997). Heat-Induced Aggregation of b-Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, s. 2942–2948.
- Holm, H. (2015). Personlig telefonsamtale, december 2015. Dialysekonsulent firma Fresenius Medical Care, tel 4322 6100, henrik.holm@fma-ag.com.
- Hundre, S., Karthik, P., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Effect of whey protein isolate and b-cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray–freeze drying method. *Food Chemistry*, s. 16–24.
- Jacobsen, Brian H., et al. Biogasproduktion i Danmark–Vurderinger af drifts-og samfundsøkonomi. Institut for Fødevare-og Ressourceøkonomi, Københavns Universitet, 2013.
- Jain, A., Thakur, D., Ghosal, G., Katare, O., & Shivhare, U. (2015). Microencapsulation by Complex Coacervation Using Whey Protein Isolates and Gum Acacia: An Approach to Preserve the Functionality and Controlled Release of β-Carotene. *Food Bioprocess Technology*, s. 1635-1644.
- Jantzen, M., Göpel, A., & Beermann, C. (2013). Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*, s. 1029-1036.
- Kielberg, V. & Rasmussen, L. (2000). *Proteiner – Oprensning og karakterisering*. Gads Forlag. København.
- Kønigsfeldt, P. (2013). Personlig samtale, april 2013. MSc udviklingsingeniør ved. Danmark Protein A/S (Arla), Videbæk.
- Li, B., Jiang, Y., Liu, F., Chai, Z., Li, Y., & Leng, X. (2011). Study of the Encapsulation Efficiency and Controlled Release Property of Whey Protein Isolate—Polysaccharide Complexes in W1/O/W2 Double Emulsions. *International Journal of Food Engineering*.
- Loryn, L. (2014). Evaluation of Sensory Thresholds and Perception of Sodium Chloride in Grape Juice and Wine. *Am.J.Enol.Vitic*, 65:1, s.124-133.
- McClements, D. (2010). Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, s. 241-269.
- Na, H., Kim, J., Kim, J., & Lee, K. (2011). Encapsulation of Fish Oil Using Cyclodextrin and Whey Protein. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*(16), s. 1077-1082.
- Nielsen, W. E. (2000). *Omdannes i ost under syrning og modning*. Jordbrugsforlaget. København.
- Pimentel-González, D., Campos-Montiel, R., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., & Vernon-Carter, E. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, s. 292-297.
- Pinto, S., Verruck, S., Vieira, C., Prudencio, E., Amante, E., & Amboni, R. (2015). Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium-BB-12* under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, s. 1004-1009.
- Poulsen, C. (2015). Personlig samtale omkring valle og valleprodukter. Videbæk, Danmark: Arla Foods Ingredients.
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, s. 891-898.
- Ries, D., Ye, A., Haisman, D., & Singh, H. (2010). Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, s. 72-78.
- Rodea-González, D., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M., Vernon-Carter, E., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey. *Journal of Food Engineering*, s. 102-109.

- Romendetto, G., Paquin, P., & Subirade, M. (2002). Cold gelation of b-lactoglobulin in the presence of iron. *Food Chemistry and Toxicology*(2), s. 586-595.
- Schaafsma, G., Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal* 18 (2008) 458–465.
- Schmitt, C., & Turgeon, S. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, s. 63-70.
- Shen, Q., & Quek, S. (2014). Microencapsulation of astaxanthin with blends of milk protein and fiber by spray drying. *Journal of Food Engineering*, s. 165-171.
- Shi, J. (2016). *Functional food ingredients and nutraceuticals* (Årg. 2). CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Singh, T., Øiseth, S., Lundin, L., & Day, L. (2014). Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins. *Food and Function*, s. 2686–2698.
- Smith, J., & Charter, E. (2010). *Functional food product development*. (F. Shahidi, Red.) Wiley-Blackwell.
- Somasundaran, P. (2006). *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Taylor and Francis.
- Sørensen, H. (2014). Analysis and application of whey protein depleted skim milk systems – In relation to microstructure caused by microfiltration and ultra-high pressure homogenization (PhD, KU-LIFE), 1-77 (Frederiksberg, Denmark).
- Sørensen, H., Mortensen, K., Humborstad, G., Larsen, F-H, Paulsson, M. & Ipsen, R. (2014). Dynamic ultra-high pressure homogenisation of milk casein concentrates: Influence of casein content. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 122-131.
- Staunsbæk, N. (2015). Personlig samtale med Niels Staunsbæk. Teknisk direktør på Mammen Mejeri A/S. Mammen Byvej 32, 8850 Bjerringbro.
- Taherian, A., Britten, M., Sabik, H., & Fustier, P. (2011). Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, s. 868-878.
- Taneja, A., & Singh, H. (2012). Challenges for the Delivery of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Functional Foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, s. 105-123.
- Toft, H. (2015). Personlig samtale med Henrik Toft. Mejeri Chef på Løgismose Mejeri. Ny Vestergade 2-4, Allested, 5672 Broby.
- Turasan, H., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, s. 112-119.
- Turgeon, S., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein – polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, s. 166-178.
- Vonasek, E., Le, P., & Nitin, N. (2014). Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended. *Food Hydrocolloids*, s. 7-13.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., & de Kruif, C. (2003). Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules*, s. 293 - 303.
- Weinbreck, Tromp, R., & Kruif, C. (2004). Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates. *Biomacromolecules*, s. 1437-1445.
- Yazicioglu, B., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Microencapsulation of wheat germ oil. *J Food Sci Technol*, s. 3590-3597.

# Bilag 1. Økonomisk beregning

Nødvendige membranareal  $A = Q_p / \Phi$

Hvor:

A: membran areal [ $m^2$ ]

$Q_p$  : Permeatflow [ $m^3/h$ ]

$\Phi$  : Specifik permeatflux [ $m/h$ ]

Antaget  $\Phi = 0,015$  m/h (for begge filtre, se Figur 3-2)

$$A = 48 \text{ m}^3/h / 0,015 \text{ m/h} = 3200 \text{ m}^2$$

Årlig udgift  $U = A \cdot P / T$

Hvor:

T: Membranlevetid [år]

P: Membranpris (enhedspris / areal pr enhed) [ $kr./m^2$ ]

Antaget:

Tdialysefilter = 1/365 år, Tspiralmoduler = 2 år (se Figur 3-2)

$$\text{Dialysefilter} \quad U = 3200 \text{ m}^2 \cdot 64 \text{ kr./m}^2 / (1/365) \text{ år} = 74,8 \text{ mio. kr./år}$$

$$\text{Traditionelt spiralfilter} \quad U = 3200 \text{ m}^2 \cdot 160 \text{ kr./m}^2 / 2 \text{ år} = 256.000 \text{ kr./år}$$





### **Bedre udnyttelse af valle på mindre mejerier**

Projektet har arbejdet med at finde alternative anvendelser for flydende valle, så de mindre mejerier kan springe tørreprocessen over og optimere deres indtjening. Val-len fra mejerierne er blevet opkoncentreret ved forskellige membranbehandlinger og der er undersøgt to anvendelsesområder: Ét hvor den flydende valle anvendes di- rekte til fitnessdrikke og et andet, hvor vallen bruges som indkapslingsmateriale i tyg- gegummi.

De fitnessdrikke, der kan købes på markedet i dag forudsætter brugen af tørret valle. Derfor har man arbejdet med at oprense små mængder flydende valle via membran- filtrering, som herefter er blevet afprøvet til drikke tilsat forskellige smage. Smagstest viste, at produkterne er på højde med de kommercielle drikke fremstillet på vallepul- ver. Udfordringen er på nuværende tidspunkt den flydende valles begrænsede hold- barhed der stiller krav til logistikken.

Den anden anvendelsesmulighed, der er undersøgt i projektet, er brugen af flydende valle til indkapsling af eksempelvis smagsstoffer i tyggegummi. I dag anvender man ofte maltodextrin, men indtil videre tegner brugen af flydende valle lovende.



Miljøstyrelsen  
Haraldsgade 53  
2100 København Ø

[www.mst.dk](http://www.mst.dk)