

Afslutningsrapport

Kaseiners geldannelse

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-14

Januar 1998



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport

Kaseiners geldannelse

Medarbejdere, adresse

Projektleder:

Professor Rogert Bauer, dr. scient., Fysisk Laboratorium – Institut for Matematik og Fysik, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C.

Øvrige medarbejdere:

Følgende personer har i kortere eller længere tid været involveret i projektet:

Stig Lomholt, Lars Øgental, Maria Sperotto, Martin Bøgsted Hansen, Steen Hansen, Bjarne Schmidt, Mats Rudemo, Anne Skriver, Peder Worning og Karsten Qvist.

Formål

1. Hvordan influerer pH, temperatur, evt. varmebehandling, enzymkoncentration, ionstyrke og calciumionaktiviteten på geldannelsesprocessen og på gelens rumlige struktur.
2. Hvilke sammenhænge er der mellem gelers rumlige opbygning og deres reologiske egenskaber.

Faser/aktiviteter

- A: Opbygning og indkøring af måleopstilling og udstyr samt udarbejdelse af modeller for analyse af data.
- B: Udarbejdelse og indkøring af metoder til billedanalyse.
- C: Indledende reologiske målinger. Start på lys- og elektronmikroskopi.
- D: Måledata fra QELS-målinger samt korrelering med data fra reologiske målinger.
- E: Korrelering af data fra QELS reologi med data fra lys- og elektronmikroskopi. Supplerende SANS-målinger.
- F: Udarbejdelse af matematiske modeller for løbekoaguleringen på grundlag af data fra alle de anvendte metoder.

Kontakter opnået i projektperioden

Gennem deltagelse i en EU Concerted Action vedrørende "Molecular description of aggregation, denaturation, gelation and surface activity of whey proteins" kaldes MAGDELAS under koordination af Hannah Research Institute i Skotland er der skabt et aktivt samarbejde med mange forskellige forskergrupper i Europa. Eksperimentelt samarbejde med professor Otto Glatter, Universität Graz, Østrig.

Opnåede resultater

A:
Et instrument til simultan statisk og dynamisk lysspredning er konstrueret og programmel til at optage data for et tidligt forløb af for eksempel løbekoagulering udviklet. Instrumentet til simultan statisk og dynamisk lysspredning måler i otte vinkler og har været benyttet til forsøg med løbekoagulering for 1000, 500 og 100 gange fortyndet mælk. Instrumentet er det første af sin art i verden. Et spektrometer til simultan multivinkel statisk lysspredning er indkøbt og installeret. Det indeholder en brydningsindexmåler (koncentrationsbestemmelse) og et HPLC-udstyr (samfinansiering) til kromatografisk analyse af kaseinmiceller (med henblik på polydispersitet).

Der er nu konstrueret et apparat til turbidimetri (modificeret spektrofotometer) som har en veldefineret og justérbar optisk geometri. Samtidig er der til apparatet konstrueret en kuvette med kontinuerligt justérbar lysvej. Dette er afgørende for at få minimeret såkaldt multipel spredning af lys på ufortyndet mælk. Vi har foretaget turbidimetriske forsøg med apparatet på ufortyndet mælk og analyseret data ved inverse transformationsmetoder.

Turbidimetri betyder i forhold til statistisk lysspredning tab af vinkelinformation (kun transmission måles).

Vi har derfor som noget helt nyt konstrueret et statistisk lysspredningsdokument som kan måle på stærkt turbide systemer. De første resultater med instrumentet er opnået. Ud fra disse resultater vil vi kunne opnå meget mere sikre resultater om gelstrukturen dannet ud fra ufortyndet mælk. For eksempel regner vi med at kunne svare på om gelen kan beskrives som en fraktal struktur eller ej.

B:

Der er udført elektronmikroskopi på mælkegeler og udarbejdet programmel til analyse af disse. Det er vist, at man med billedanalyse kan kende forskel på gelstruktur i sure mælkegeler, hvor mælken er varmebehandlet forskelligt.

C:

Der er udført reologiske målinger på syrnede mælkeprodukter. I ufortyndet mælk kan udvikling af G' , G'' og δ følge uden problemer ved hjælp af et Bohlin Rheometer. Med viskosimetri er det problematisk at følge udviklingen i ufortyndet mælk (og værre i fortyndet) på grund af problemer med drift. Der er indkørt scanning elektronmikroskopi, thin section transmissions elektronmikroskopi, samt freeze fracture transmissions elektronmikroskopi i forbindelse med studiet af sure kaseingeler.

D:

Et større arbejde vedrørende løbekoagulering studeret med både statistisk og dynamisk lysspredning er udført. Arbejdet er udført i samarbejde med Dr. David Horne, Hannah Research Institute i Skotland, som har mange års erfaring og en lang publikationsliste vedrørende forskning i kasein og dets evne til geldannelse. Princippet om indirekte inverse transformationer anvendt på statistisk lysspredning (indirekte Fourier transformation) er i arbejdet anvendt til at foretage såkaldte indirekte Laplace-transformationer af dynamisk lyssprednings data.

Konklusionen fra dette arbejde er at der først dannes meget åbne aggregater at ligne med grenene på et træ som så ved yderligere vækst bliver meget kompakte (området mellem grenene bliver fyldt ud).

Det sidste betyder at aggregeringshastigheden bliver sat dramatisk ned specielt med hensyn til at danne større aggregater. Vi er af den opfattelse at aggregeringsprovessen for ufortyndet mælk og 100-1000 gange fortyndet mælk foregår på samme måde i hovedprincippet med først at danne åbne aggregater som senere danner et forgrenet og kompakt netværk.

Forskelle er, at for ufortyndet mælk er afstanden mellem aggregaterne, når de begynder at blive kompakte og tunge, så store at de sedimenterer hvorimod de for fortyndet mælk når hinanden og danner en gel. Dette arbejde har været præsenteret ved et ICODRL-møde ved Hannah Research Institute.

Selvom de opnåede data er meget informationsrige kan de kun udsige noget om løbekoagulering for fortyndet mælk (op til 100 gange fortyndet mælk).

Dette er et problem da geldannelse ikke foregår ved 100 ganges fortynding men først under ca. 10 ganges fortynding. Vi har nu udviklet et ny analysemetode som har gjort det muligt at foretage indirekte Fourier transformationer af turbidimetriske data.

En serie turbidimetriske målinger på ufordyndet og henholdsvis to og fire gange fortyndet mælk er gennemført. Der er foretaget tidsstudier efter tilsætning af løbeenzym. Ved Monte Carlo simuleringer af multipel lysspredning har vi vist, at det er muligt at korrigere for denne uønskede effekt for stærkt spredende systemer som mælk. Resultatet antyder kraftigt at vi har ret: Ufordyndet mælk aggregerer i store træk som 1000 gange fortyndet. Dette er ny viden. Det har været præsenteret ved en konference for spredningsmetoder på Stromboli. Tilsvarende målinger på det nye instrument til småvinkel lysspredning forventes gennemført i den nærmeste fremtid. Et sådant instrument er det andet af sin art i verden, idet professor Otto Glatter ved Universitetet i Graz for nylig også har konstrueret et. Vi har den i den anledning startet et samarbejde med Otto Glatter.

Monte Carlo simuleringer af lysspredning har vist, at multipel spredning ændrer sig med størrelsen af aggregaterne under løbekoagulering. Dette har vanskeliggjort en teoretisk tilpasning til de turbidimetriske data for koagulering af ufordyndet mælk. Dette problem har vi løst ved at måle ved forskellige lysveje, som har gjort det muligt at ekstrapolere til grænsen, hvor multipel spredning ikke påvirker data. I forbindelse med vores statistiske lysspredningsmålinger (samtidig måling i mange vinkler) på ufordyndet mælk, som er mere informative end turbiditetsmålinger (kun måling i én retning) har Peder Worning og Lars Øgendal været hos professor Otto Glatter ved Universitetet i Graz og gennemført løbekoaguleringsstudier ved hans nye instrument. Kontakten til Otto Glatter har givet os mange gode ideer til forbedring af vores eget instrument til statistiske lysspredningsmålinger på mælk.

Der er foretaget en række samtidige målinger af turbiditet, viskositet og gelstyrke under løbekoagulering i mælk ved 0.5, 1 og 2 gange normal koncentration af kasein. Før der kan foretages nogen sikker korrelering af disse målinger er det dog nødvendigt at sikre at de forskellige målegeometrier ikke også påvirker koaguleringsforløbet forskelligt.

Vi har startet forsøg med simultan kromatografisk adskillelse ved HPLC og multivinkel lysspredningsmålinger i forbindelse med et projekt omkring varmeaggregering af forskellige genetiske varianter af β -laktoglobulin. Dette sker indenfor et nyt samarbejdsprojekt med Petr Dejmeek og Ulla Elofsson, Institut for Fødevareteknologi Universitetet i Lund.

E:

Neutronspredningsforsøg på ufordyndet mælk har vist at den indre struktur af kaseinmicellerne er i overensstemmelse med forslag fra litteraturen om en opbygning i form af submiceller.

Yderligere er det vist, at den indre struktur af micellerne er bevaret under løbekoagulering. Arbejdet er udført i samarbejde med seniorforsker Jan Skov Pedersen og forskningsprofessor Kell Mortensen, Forskningscenter Risø.

F:

Der er foretaget indledende beregninger på enzymkinetikens indflydelse på masse- og størrelsesforhold under løbekoagulering helt frem til geldannelse og som funktion af fysiske relevante parametre, såsom ladning (pH og ionstyrke), temperatur og koncentration.

Der er udviklet værktøj til numerisk implementation af matematiske modeller for løbekoagulering. En række modeller er analyseret og adskillige har kunnet forkastes. Computersimuleringer af geldannelsen blev indledt for to modeller:

1. Gittermodel som giver åbne strukturer
2. Kontinuert diffusionsbegrænset aggregering, som giver ret kompakte strukturer

Sammen med Douglas Hyslop, University of Wisconsin, er Karsten Qvist i færd med at udarbejde manuskripter, der beskriver henholdsvis en modificeret model for løbekoagulering baseret på funktionalitet, og en model hvor proteolysen skal have et vist kritisk omfang før aggregering er mulig.

Vi har sat et system op til at lave mindste kvadraters tilpasning af parametre i de forholdsvis komplicerede modeller, der er tale om. Beregningsprocessen involverer en iterativ ikke-lineær estimering, hvor numerisk løsning af en differentiaalligning for hvert trin i processen er nødvendig.

G:

Der er udført målinger af koaguleringsforløbet med et særdeles følsomt automatiseret kapillarviskosimeter samt med dynamisk reologi, og i tilknytning hertil er fraspaltning af CMP med løbeenzym fulgt som en funktion af tid. Målingerne er udført ved 3 substratkoncentrationer og 2 enzymkoncentrationer.

Den foreløbige analyse af materialet tyder på, at viskositeten under koaguleringsforløbet ikke fuldt ud kan beskrives alene som funktion af omfanget af den proteolytiske reaktion, således som det er foreslået af Kruif fra NIZO i de seneste år.

Vore resultater tyder på, at aggregering i sig selv spiller en vigtig rolle for viskositetsudviklingen, og den antagelse undersøger vi i nærmeste fremtid ved hjælp af elektronmikroskopi. Det lykkedes ikke at skabe samtidige målinger af G' og G'' for perioden lige før geldannelse da reometret er for ufølsomt her.

Ændringer i den elastiske styrke ses først ifølge de turbidimetriske målinger efter at meget store aggregater er dannet.

Publikationer

Skriver, A., Rømer, H. and Qvist, K. B. (1993): Rheological characterization of stirred yoghurt. *Viscometry. Journal of Texture Studies* 24, 185-198.

Skriver, A., Rømer, H. and Qvist, K. B.: Rheological characterization of stirred yoghurt. Dynamic oscillatory measurements. sendt til publication.

Skriver, A., Holstborg, J. and Qvist, K. B.: Sensory texture analysis of stirred yoghurt related to rheological properties in multivariate statistical methods. sendt til publication.

Skriver, Anne: Characterization of stirred yoghurt by rheology, microscopy and sensory analysis. Ph.D. Thesis 1995, KVL.

Hansen, M. B.: Spatial Statistics for Network Structure in Processed Milk. Ph.D. Thesis. Dina Research Report no. 30 1995.

Bauer, R., Hansen, M., Hansen, S., Øgendal, L., Lomholt, S., Qvist, K. and Horne, D. (1995). *Journal of Chemical Physics* 103: 2725-2737.

Skriver, A., Buchheim, W. and Qvist, K. B.: Electron microscopy of stirred yoghurt: Ability of three techniques to visualize exopolysaccharides from ropy strains. *Milchwissenschaft* (1995) 50: 683-686.

Hansen S., Bauer, R., Pedersen, J. S., Mortensen, K., Lomholt S., Qvist, K. B. Structure of casein micelles studied by small-angle neutron scattering. *European Biophysics Journal* (1996) 24: 143.

Hansen M. B. (1996). Kaplan-Meier type estimators for linear contact distributions. *Scand. J. Statist.* 23: 129-155.

Lomholt, S.: The kinetics of the aggregation of casein micelles by rennet. Ph.D. afhandling KVL 1996.

Hyslop, D. B. and Qvist, K. B.: Application of numerical analysis to a number of models for chymosin-induced coagulation of casein micelles. *Journal of Dairy Research* (1996) 63:223.

Skriver, A. Hansen, M. B., Qvist K. B. Image analysis applied to electron micrographs of stirred yoghurts. *J. Dairy Res.* (1997) 64, 135-143.

Lomholt, S. B., Qvist, K. B. Relation between reological properties and degree of kappa-casein proteolysis during renneting of milk. *J. Dairy Res.* In press.

Worning, P., Bauer, R., Øgendal, L., Lomholt, S. A novel approach to turbidimetry of dense systems: An investigation of the enzymatic gelation of casein micelles. Sendt til publication.

Lomholt, S.B., Worning, P., Qvist, K.B., Hyslop, D.B. and Bauer, R. Testing of a number of kinetic models for the renneting reaction by comparison of predicted and experimental values of a weight average degree of polymerisation as a function of time. Sendt til publication.

Projektet blev i forbindelse med Mejeribrugets ForskningsFond finansielt afsluttet 1. maj 1997. Arbejdet er dog fortsat siden finansieret af KVL annum og andre fondsmidler.

Det drejer sig primært om lysspredningsmålinger på ufortyndet mælk og geler produceret deraf. Peder Worning afleverer en Ph.d.-afhandling vedrørende dette i foråret 1998. Selvom der oprindeligt var sat projekter af ikke-mejerirelateret karakter på Peder Worning's har det udviklet sig således at hans projekt omhandler kaseiners geldannelse.

Det skal yderligere tilføjes at den lokale interesse for at fortsætte studier omkring kaseiners geldannelse er stor for undertegnede og Lars Øgendal's vedkommende. Vi er gennem samarbejde med NIZO (Holland), Hannah Research Institute (Skotland) og Afdelingen for Food Technology (Lund) nu kraftigt engageret i varmeaggregering af β -laktoglobulin delvist finansieret af Statens Naturvidenskabelige Forskningsråd og EU.

