

SLUTRAPPORT

NR. 2012-113

Mikropartikuleret mælkeprotein som naturlig fedtstatter i fødevarer



Slutrapport til Mejeribrugets ForskningsFond

Mikropartikuleret mælkeprotein som naturlig fedtstatter i fødevarer

Projektleder:

Richard Ipsen, Mejeriteknologi, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet (KU),
Rolighedsvej 30, 5 1958 Frederiksberg C, 35333225, ri@life.ku.dk

Projektdeltagere:

Isabel Celigueta Torres, Mejeriteknologi, Institut for Fødevarevidenskab, KU, 35332887,
ict@life.ku.dk

Pia Skjødt Petersen, Mejeriteknologi, Institut for Fødevarevidenskab, KU, 35333187,
psp@life.ku.dk

Projektperiode

1/6 2008 til 31/12 2011

Financieringskilder:

MFF

Direktoratet for FødevareErhverv (Fødevareforskningsprogrammet 2007)

Sammendrag

Mikropartikuleret valleprotein kan i mejeriprodukter bruges til at erstatte fedt. Det produceres ud fra valleprotein koncentrat som varmes op og udsættes for mekanisk behandling. Partikler med forskellige kemiske og fysiske egenskaber kan dannes som følge af justeringer i produktionsparametre f.eks. pH, calcium, laktose koncentration, temperatur og styrken af den mekaniske behandling.

Der blev tilsat ti forskellige typer af mikropartikler til mælk med lavt fedtindhold (0,5%) og det viste sig at en lav grad af proteindenaturering (dvs. høj koncentration af nativt valleprotein, særligt β -lactoglobulin) gav yoghurt med høj viskositet og tæt på at match egenskaberne i en fuldfed yoghurt (3,5% v/v fedt). Yoghurternes mikrostruktur blev analyseret ved mikroskopi og var karakteriseret af store sammenhængende proteinaggregater,

hvor små og mellemstore porer (30-60 μm) tilbageholdt serum. Proteinnetværket havde en god vandbindingsevne og udviste kun en mindre grad af valleudskillelse. Et trænet sensorisk panel beskrev disse yoghurter som cremede, tyktflydende og bløde, med en syrlig smag. Det var også muligt, ud fra en række instrumentelle reologiske at forudsige den fremstillede yoghurts sensoriske egenskaber.

Den indledende partikelstørrelse i det pulver der blev anvendt påvirkede ikke relateret de sensoriske egenskaber, såsom cremethed. Under produktion af yoghurt vil partikelstørrelsen dog ændres og størrelsen af de aggregater, der dannes under produktionen af yoghurt, har en større betydning for den sensoriske oplevelse af yoghurt end den oprindelige størrelse af partiklerne.

Projektet har desuden udviklet en ny metode til karakterisering og kvantificering af ændringer i yoghurts mikrostruktur baseret på analyse af mikroskopibilleder. Denne metode kan finde anvendelse i en række andre sammenhænge hvor man har brug for at kunne adskille mikrostrukturen i sammenlignelige produkter.

For at øge funktionaliteten af mikropartiklerne er det afgørende af mælken bliver processeret og homogenisering førte til dannelse af nye grænseflader på overfladen af partiklerne. Det viste sig at partiklerne var mest reaktive når de havde en høj koncentration af små partikler ($<1 \mu\text{m}$) samt en høj koncentration af nativt valleprotein ($\approx 8\text{-}13\%$ β -lactoglobulin). Opvarmning af mælk med tilsatte partikler førte til dannelse af proteinaggregater, hvor både kovalente og ikke-kovalente interaktioner medvirkede. Balancen mellem disse kolloide interaktioner blev påvirket af homogeniseringen.

Viden fra dette projekt forventes at kunne bidrage til udviklingen af nye skræddersyede MVP løsninger til fremstilling af yoghurt med en ønsket funktionalitet.

English abstract

Microparticulated whey protein (MWP) consists of particles with sizes between 0.005 and 100 μm which are intended for fat replacement in dairy products. They are usually created by simultaneous heating and shearing whey protein concentrate. Whey particles with diverse chemical and physical characteristics can be formed as a result of adjustments in manufacturing parameters, e.g. pH, calcium, lactose content, temperature, and shearing force.

The results presented in this thesis have provided a novel insight into the importance of the interplay between particle characteristics of MWP, milk composition and the processing steps involved in the manufacture of yoghurt for optimisation of texture and sensory perception of the final product.

Incorporation in milk (0.5 % w/w fat) of ten types of MWP with diverse chemical and physical characteristics showed that low protein denaturation of MWP, i.e. high native β -lactoglobulin content, resulted in yoghurts with high viscosity and elastic properties, close to that of full-fat yoghurt (3.5 % w/w fat). Their microstructure assessed by confocal laser scanning microscope had large interconnected protein aggregates forming a network where medium and small sized pores (30-60 μm) retained serum. The network had good water holding capacity and exhibited low syneresis. Further assessment by a trained sensory panel described the yoghurts as creamy, viscous, and soft, with sour taste, amongst several other positive sensory attributes. In addition, prediction of sensory attributes from rheological properties of the yoghurts was successfully accomplished.

The initial particle size of the MWP was not relevant for sensory attributes related to fat perception, such as creaminess. However, during yoghurt production the particle size of the MWP changes. Therefore, the size of the aggregates formed during processing may have a higher impact on the sensory perception of yoghurts than the initial size of particles. Additionally, a novel method for characterisation and quantification of morphological changes in yoghurt microstructure using fractal image analysis was developed.

Processing of milk with MWP was essential in enhancing the functionality of the microparticles. Homogenisation created a new interface on the surface of the microparticles, whose ability to interact with other proteins upon heating depended on their characteristics. The reactivity of the interface was maximum when MWP with high proportions of small particles ($<1 \mu\text{m}$) and high fraction of native whey protein content ($\approx 8\text{-}13\%$ β -lactoglobulin) was used. Heating of milk with MWP created aggregates where both covalent and non-covalent interactions were involved. The balance between these colloidal interactions was influenced by the previous homogenisation step.

The knowledge obtained from these results is expected to ease the task of producing tailor-made MWP to achieve a desired functionality in yoghurt.

Projektets baggrund og mål og resultater

Mikropartikuleret valleprotein (MVP) består af mono- eller poly- disperse partikler med en størrelse på 0,005 til 100 μm , og kan i mejeriprodukter bruges til at erstatte fedt. MVP produceres ud fra valleprotein koncentrat som varmes op og udsættes for mekanisk behandling. Valleprotein partikler med forskellige kemiske og fysiske

egenskaber dannes som følge af justeringer i produktionsparametre f.eks. pH, Ca^{2+} , laktose koncentration, temperatur og kraften af den mekaniske behandling.

Projektets formål har været at afdække mekanismerne bag mikropartikulerede mælkeproteiners funktionalitet i udvalgte produkter, herunder undersøge hvordan strukturnedbrydningen i munden påvirker opfattelsen af vigtige, sensoriske egenskaber (f.eks. cremethed). Hensigten var at udvide anvendelsen af mikropartikuleret mælkeprotein i fødevarer, særligt i lavfedtholdige mejeriprodukter, ved at undersøge samspillet mellem fremstillingsproces, partikelegenskaber og virkemåde og dermed understøtte udviklingen af fremtidens mikropartikulerede mælkeproteiningredienser. Projektet har fokuseret på yoghurt, men resultaterne vil kunne anvendes på fødevarer generelt.

Projektets væsentligste to delmål har været at undersøge:

1. Effekten af partikelstørrelsesfordeling og denatureringsgrad for at kortlægge om mikropartiklernes grad af denaturering og dermed kemiske reaktivitet har nogen praktisk betydning for deres indbygning i prote-innetværket i yoghurt. Desuden, at undersøge om mikropartiklernes størrelsesfordeling har betydning for yoghurts mikrostruktur og reologiske egenskaber, og om dette har indflydelse på den sensoriske opfattelse af produktet.
2. Effekten af interaktioner mellem mikropartikler og resten af komponenterne i mælken under fremstillingen af yoghurt.

Arbejdet med det første delmål har været baseret på en række (to forskellige) mikropartikulerede valleprotein produkter (MVP) fra Arla Foods Ingredients med variation i fremstillingsmetoden således at der blev opnået en spænd i forhold til grad af denaturering og partikelstørrelsesfordeling. Prøverne blev karakteriseret og fremstilling af yoghurt i pilotskala foretaget i KU's pilotanlæg. Der blev til formålet anskaffet et nyt udstyr til reproducerbar nedkøling og mekanisk behandling af yoghurt (styret modtryk). De færdige yoghurter blev undersøgt reologisk, sensorisk og med hensyn til mikrostruktur.

Resultaterne er afrapporteret i de videnskabelige artikler 1 og 2 angivet nedenfor, samt i en række konferencebidrag (1-6). De viser tydeligt at egenskaberne af MVP kraftigt påvirker yoghurts kvalitetsegenskaber, således at MVP med lav denatureringsgrad – et højt indhold af nativt β -lactoglobulin – gav en yoghurt med reologiske egenskaber der lå tæt ved en fuldfed reference yoghurt (3,5% fedt).

Yoghurternes mikrostruktur blev analyseret ved confocal laser scanning mikroskop og proteinnetværket var karakteriseret af store sammenhængende proteinaggregater, hvor små og mellemstore porer (30-60 μm) tilbageholdte serum. Proteinnetværket havde en god vandbindingsevne og udviste kun en mindre grad af synerese. Et trænet sensorisk panel beskrev disse yoghurter som cremede, tyktflydende og bløde, med en syrlig smag. Desuden var det i projektet også muligt at forudsige yoghurts sensoriske egenskaber ud fra instrumentelle reologiske målinger.

Resultaterne viste også at den indledende partikelstørrelse af MVP var ikke relateret til de sensoriske egenskaber som er med til at karakterisere yoghurts fedtindhold, såsom cremethed. Der er dog således af produktionen af yoghurt forårsager ændringer i partikelstørrelsen af MVP. Derfor har størrelsen af de aggregater, der dannes under produktionen af yoghurt, have en mere afgørende betydning for den sensoriske oplevelse af yoghurt end den oprindelige størrelse af partiklerne i MVP.

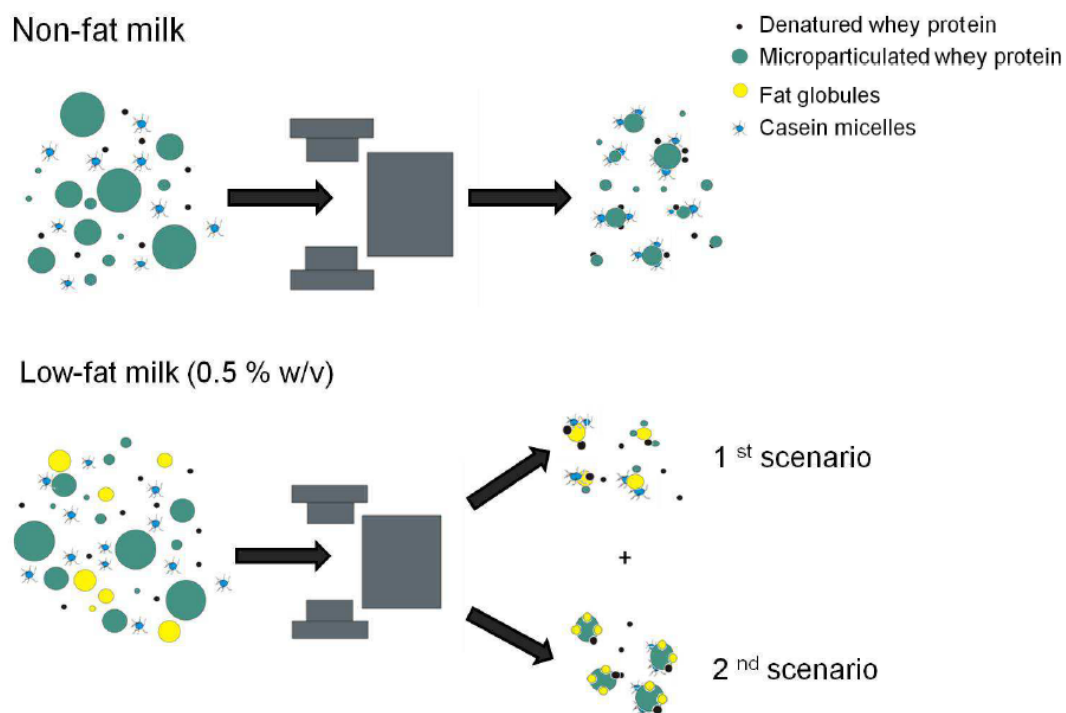
Der blev også i projektet udviklet en ny metode til karakterisering og kvantificering af morfologiske ændringer i yoghurts mikrostruktur baseret på fraktal billedanalyse. Metoden er særdeles velegnet til kvantificering af information i mange, næsten ens, billeder, og til at adskille mikrostruktur i yoghurt der har fået forskellig behandling (i dette tilfælde forskellige tilsatte MVP).

Når det gælder hydrering af MVP inden syrning, er der udført en række forsøg med anvendelse af NMR i et modelsystem. Der ses in tydelig sammenhæng mellem hvorledes hydreringen foregår i MVP og så den efterfølgende kvalitet af fremstillet yoghurt. Anvendelse af MVP fører til en højere grad af immobiliseret vand i protein netværket sammenlignet med anvendelse af ikke-mikropartikuleret valleprotein koncentrat (WPC). Overfladeegenskaberne har vist sig at have stor indflydelse på hvorledes MVP virker i yoghurt. Således giver en effektiv hydrering af små mikropartikler inden varmebehandling af yoghurtmælken bedre interaktion med de andre proteiner i mælken og førte dermed til en bedre gelstyrke og mindre synerese. Store mikropartikler viste sig at kunne forsinke geleringen og gav yoghurter med lav viskositet. Disse forskelle skyldes sandsynligvis hvorledes native valleproteiner på partiklernes overflade kan reagere med valleproteiner/kasein i mælken.

Arbejdet med at afklare det andet delmål – hvorledes MVP spiller sammen med resten af mælkens komponenter – blev udført i modelsystemer med gradvis stigende kompleksitet. Der blev udviklet et modelsystem for mælk, hvor vi blev tilføjet kasein, fedt, valleproteiner og mikropartikler i forskellige forhold svarende til en fedtfattig mælk til yoghurt. Det blev undersøgt hvorledes de forskellige typer af MVP reagerer med kasein og fedt under såvel homogenisering som den ret kraftige varmebehandling man anvender i forbindelse med fremstilling af yoghurt og andre syrnede produkter. Denne aggregering har nemlig stor betydning for konsistens og mundfornemmelse. Der blev anvendt to proteinniveauer (4,25 og 5,0% w/w) og mælkesystemerne blev homogeniseret og pasteuriseret ved de forskellige temperaturer, der normalt anvendes i yoghurt fremstilling. Der blev udført en række analyser for denatureringsgrad af valleproteiner, størrelse af proteiner og aggregater, tilgængelige thiol grupper på overfladen af partikler og

zetapotentiale. Desuden blev mikrostrukturen undersøgt ved hjælp af Darkfield Microscopy ved Syddansk Universitet (Department of Physics and Chemistry).

Resultaterne har vist klart at der er afgørende for at øge funktionaliteten af MVP at mælken blev processeret. Homogenisering lader til at føre til dannelse af nye grænseflader på overfladen af mikropartiklerne. Partiklernes evne til at interagere med andre proteiner ved opvarmning afhæng af deres egenskaber og de havde højest reaktivitet når MVP med en høj koncentration af små partikler (<1 µm) samt en høj koncentration af nativt valleprotein (≈ 8-13% β-lactoglobulin) blev anvendt. Opvarmning af mælk med MVP førte til dannelse af proteinaggregater, hvor både kovalente og ikke-kovalente interaktioner var involveret. Balancen mellem disse kolloide interaktioner blev påvirket af homogeniseringen – se figur 1. Viden fra projektet forventes at kunne bidrage til udviklingen af nye skræddersyede MVP løsninger til fremstilling af yoghurt og andre produkter med en ønsket funktionalitet.



Figur 1: Skematisk illustration af mekanismen for interaktion mellem MVP, kasein miceller, denatureret valleprotein og fedtkugler ved homogenisering (10-20 MPa). Fra videnskabelig artikel 4.

Publikationer og offentliggørelse i forbindelse med projektet:

Artikler i internationale tidsskrifter (1 og 2 vedlagt)

1. *Torres, I.C., Ipsen, R., Janhøj, T. & Mikkelsen, B.Ø. 2011a Effect of microparticulated whey protein with varying content of denatured protein on the rheological and sensory characteristics of low-fat yoghurt International Dairy Journal, 21 (9), 645-655*
2. *Isabel Celiqueta Torres, José Manuel Amigo Rubio & Richard Ipsen 2011b Using fractal image analysis to characterize microstructure of low-fat stirred yoghurt manufactured with microparticulated whey protein, Journal of Food Engineering, In press, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.11.016*
3. *Isabel Celiqueta Torres, Jose Manuel Amigo, Jes Christian Knudsen, Alexander Tolkach, Bente Østergaard Mikkelsen, Richard Ipsen 2012 Rheology and microstructure of low-fat yoghurt produced with whey protein microparticles as fat replacer, International Dairy Journal, In preparation*
4. *Isabel Celiqueta Torres, Gülsüm Mutaf, Flemming Hofmann Larsen and Richard Ipsen 2012 Effect of hydration of microparticulated whey protein ingredients on their gelling behavior in non-fat milk model systems, Milchwissenschaft, In preparation*

Populærvidenskabelige artikler (vedlagt)

1. *Celiqueta Torres, I. & Ipsen, R.H. Mikropartikuleret mælkeprotein som fedtstatte i fødevarer. Mælkeritidende, 2009, 268-269.*

Studenteropgaver

1. *Gülsüm Mutaf: Effect of hydration on the gel structure of microparticulated whey protein added yoghurts, May 2009*

Indlæg ved faglige kongresser, symposier, etc.

1. *Torres, I.C., Ipsen, R. and Knudsen, J.C. 2009 Microparticulated whey protein as Fat Replacer in Yoghurt in Proceedings of the 5th International Symposium on Food Rheology and Structure, Zürich, CH, 15-18.06.2009, pg 404-407 (vedlagt)*
2. *Isabel Celiqueta Torres: Microparticulated whey protein as fat replacer in yoghurt, Mundtlig indlæg på Conference on Dairy Structure - Health and Functionality, Wadahl, Norway, 25-27th March 2009*
3. *Isabel Celiqueta Torres: Microparticulated whey protein as fat replacer in yoghurt, Mundtlig indlæg på 6th NIZO Dairy Conference on Dairy Ingredients, Papendal, The Netherlands, 30th September-02nd October 2010*
4. *Torres, I.C., and Ipsen, R.: Microparticulated milk protein addition to yoghurt in relation to the viscosity of low-fat yoghurt. Poster indlæg på: Thirteenth Conference of Food Colloids 2010, 21st - 24th March 2010: On the Road... From Interfaces to Consumers. 1 udg. Campus Universitario de Cartuja, Granada: Editorial Universidad de Granada. 2010, s. 133. (vedlagt)*
5. *Torres, I.C., Amigo, J.M., Tolkach, A. and Ipsen, R.: Effect of whey protein microparticles on characteristics of stirred low-fat yoghurt. Mundtligt og posterindlæg på: Den 5th European Workshop*

of Food Engineering and Technology og deltage i Julius Maggius Research Award 2011 (22-23 Marts 2011, Valencia, Spanien) (vedlagt)

6. *Torres, I.C, Amigo, J.M., and Ipsen, R.: Using fractal image analysis to characterize microstructure of low-fat stirred yoghurt manufactured with microparticulated whey protein. Posterindlæg på: Den 12th Scandinavian Symposium on Chemometrics (7-10 Juni 2011, Billund).*

Mødeindlæg

1. *Richard Ipsen: Mikropartikuleret mælkeprotein som naturlig fedtstatter i fødevarer, indlæg på mejeriforskningens Dag 17 Marts 2011*

Andet

1. *Isabel Celigueta Torres: Microparticulated whey protein as fat replacer in yoghurt, PhD Thesis, University of Copenhagen, March 2012.*
2. *Interview til Mejeri, januar 2012: En fed fornemmelse – uden fedt*

Forskeruddannelse:

Ph.d.-studerende: Isabel Celigueta Torres blev færdig som ph.d. den 23. marts 2012.

I forbindelse med sit studie have hun tæt kontakt til forskningsgruppen Fysikalisk Kemi ved Lunds Universitet samt til Memphys gruppen på SDU i Odense.

Gæsteforskere: Han Cuiping fra North Eastern Agricultural University, Harbin, China var delvis tilknyttet projektet i perioden november 2009 til december 2012. Hun udførte en del NMR målinger af hydrering af mikropartikuleret valleprotein.

National og internationalt samarbejde:

Projektet blev udført i tæt samarbejde med Arla Foods Ingredients, hvor Bente Østergaard var medvejleder for Isabel Celigueta Torres under hele projektforløbet.

Desuden har der gennem projektet været tæt kontakt til forskningsgruppen Fysikalisk kemi ved Lunds Universitet (Tommy Nylander) samt til Memphys gruppen på SDU i Odense (Adam Cohen Simonsen). Derudover har der været et meget tæt samspil med Jose Amigo fra faggruppen for Kvalitet og Teknologi ved Institut for Fødevidenskab, KU samt med instituttets sensorikgruppe.

Projektets praktiske og videnskabelige betydning for mejeribrugget:

Projektet har afklaret de egenskaber ved mikropartikler fremstillet på baggrund af valleprotein der er afgørende for deres virkemåde i fermenterede mejeriprodukter. Dette har stor værdi fremover i arbejdet med at udvikle bedre, mere effektive ingredienser specielt til lavfedtholdige produkter.

Projektet har desuden afklaret hvor væsentlig samspillet er mellem tilsatte mikropartikler og resten af mælkens komponenter (valleprotein, kaseinmiceller, fedtkugler) og blandt vist hvor central homogeniseringen er, idet der herved, afhængigt af mikropartiklernes egenskaber, dannes proteinaggater der kraftigt påvirker det fermenterede produkts slutkvalitet.

Der er desuden i forbindelse med projektet udarbejdet en række analysemetoder der kan finde anvendelse i andre sammenhænge og på andre projekter.

Projektets relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter:

I forlængelse af dette projekt er der indsendt en ny ansøgning til Mejeribruggets ForskningsFond i samarbejde med Arla Foods Ingredients og DTU.

Det ansøgte projekt har fokus på at undersøge hvorledes aggregerede valleprotein ingredienser med forskellige overfladeegenskaber reagerer med mælkens kasein og fedtkugler ved fremstilling af mejeriprodukter, at kvantificerer størrelsen og karakteren af disse interaktioner samt at klarlægge hvorledes de undersøgte interaktioner påvirker slutkvaliteten af produktet, med særlig fokus på syrnede mejeriprodukter.