

# Afslutningsrapport

Mælkeråvarens proteinprofil – Betydning for mælkens egnethed  
til videre forarbejdning

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2007-89

*April 2007*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

# Mælkeråvarens proteinprofil – betydning for mælkens egnethed til videre forarbejdning

2003 – 2006  
Afslutningsrapport

## Projektkoordinator:

Seniorforsker Lotte Bach Larsen  
Institut for Råvarekvalitet - Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet

## Projektdeltagere:

Laborarietekniker Hanne Søndergaard Møller, Institut for Råvarekvalitet, DJF

Professor Anders H. Karlsson, Institut for Fødevarevidenskab,  
Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer,  
Københavns Universitet

Ph.d.-studerende, Anna Wedholm, SLU, Uppsala, Sverige

Præfekt, Anders Andrén, SLU, Uppsala, Sverige

Forsker Helena Lindmark-Månsson, Svensk Mjök, Lund, Sverige

### **Sammendrag af projektets formål:**

Tilvejebringe ny viden om, hvordan den aktuelle variation i proteinindhold og proteinsammensætning i rå mælk i både Danmark og Sverige udtrykkes i nogle af mælkens teknologiske egenskaber for derigennem at opbygge viden, der kan anvendes til fremtidig produktion af mælk med ønsket proteinindhold og ønsket proteinsammensætning i relation til optimal udnyttelse af mælkeråvaren.

### **Delmål:**

At undersøge den aktuelle variation i indholdet og sammensætningen af proteinet i den rå mælk fra individuelle køer i både Danmark og Sverige gennem analyser af proteinfraktionens sammensætning og egenskaber ved anvendelse af moderne analysemetoder og -teknikker.

At belyse, hvordan denne variation i indhold og sammensætning af individuelle proteiner i mælken påvirker dens teknologiske egenskaber for osteproduktion, bl.a. kvalitet og udbytte af lavfedt-modeloste.

At søge efter molekyllære markører for vigtige procestekniske egenskaber af mælk.

At sammenligne proteinindhold og proteinsammensætning i rå mælk produceret i Danmark og Sverige med henblik på dens teknologiske kvalitet og egnethed til videre forarbejdning.

### **Projektets resultater og konklusion:**

Det er i projektet anvendt proteomics til karakterisering af effekt af variationer i mælkens proteinsammensætning for teknologiske egenskaber ved brug af 2-dimensional (2D)- gelelektroforese-baserede proteinanalyser. Proteomanalyserne kan anvendes til proteinprofilering af forskellige typer af valle (publ. 2), samt til karakterisering af forskelle mellem rå og varmebehandlet mælk (publ. 3). Andre undersøgelser af sammensætningen af de mælkeprøver der blev analyse-ret fra hhv. Danmark og Sverige i projektet, viste enkelte forskelle mellem racer og mellem lande/besætninger, heriblandt et markant højere ureaindhold i de svenske prøver sammenlignet med de danske (publ. 7 og 10). Der blev overraskende observeret problemer med koagulering efter tilsætning af osteløbe i op mod en 1/3 af prøverne. Dårlige koaguleringssegenskaber var associerede med bl.a. en lavere koncentration af  $\kappa$ -kasein, og havde tendens til at resultere i et lavere osteudbytte (publ. 7, 8 og 9). Endvidere var koncentrationerne af  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - og  $\kappa$ -kasein, og af  $\beta$ -laktoglobulin B-varianten positivt associerede med osteudbyttet, hvorimod  $\beta$ -laktoglobulin A havde en negativ effekt. Kaseintal og  $\beta$ -laktoglobulin B var positivt associerede med overgangstallet, dvs. med hvor godt mælkens protein blev overført til ostemassen. Mælkens ostningsegenskaber kan forbedres ved at selektere for eller anvende mælk med høje koncentrationer af  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$  og  $\kappa$ -kasein, med høj andel af  $\kappa$ -kasein i forhold til total kasein, højt kaseintal, samt anvende mælk, der indeholder  $\beta$ -laktoglobulin B-varianten (publ. 10).

Ved 2D-gelbaseret proteomanalyse blev der desuden identificeret en række proteiner til stede i mindre mængder med positive hhv. negative signifikante effekter på overgangstal og vandbinding i lav-fedt modeloste (publ. 1). En anvendelse af disse, som markører for overgangstal og vandbinding, vil dog kræve yderligere dokumentation.

### **Projektets faglige forløb:**

Projektets design med en tæt integration med et svensk søsterprojekt finansieret af svenske midler har vist sig at være en gevinst, da der har været synergieffekter mht. udnyttelse af prøvemateriale, integration af resultater og en lang række fælles publikationer til følge, både nationalt og internationalt.

En væsentlig del af de danske aktiviteter i samarbejdsprojektet har omhandlet implementering af proteomanalyse som værktøj baseret på 2-dimensionale geler til karakterisering af proteinsammensætningen i mælk. Proteomanalysen har omfattet metodeudvikling i forhold til kørsel og farvning af de 2-dimensionale geler, billedbehandling til kvantificering af proteinspots, massepektrometri til identifikation af proteiner, samt anvendelse af multivariat dataanalyse. Derudover har der været inkluderet en række andre parametre og registreringer til karakterisering af sammenhænge mellem mælkeproduktion (ydelse, avlsindex for ydelse, race, laktationsstadiet, laktationsnummer) og mælkens sammensætning (protein, fedt, kasein, laktose, celletal, urea, kasein-micelstørrelsesfordeling, antallet af frie aminoterminaler/proteolyse, plasminogen og plasminaktiviteter). Et af målene med projektet var at sammenligne resultater for mælkens proteinsammensætning bestemt ved proteomanalyse med tilsvarende resultater fra HPLC-bestemmelse af protein-sammensætningen af skummetmælk. Overordnet har resultatet været, at HPLC-metoden er velegnet til bestemmelse af de proteiner, der er mest af i mælken (kaseinerne samt  $\alpha$ -laktalbumin og  $\beta$ -laktoglobulin), samt de fremherskende genetiske varianter af  $\beta$ -laktoglobulin og  $\kappa$ -kasein, mens proteomanalysen er velegnet til bestemmelse af især "minor" proteiner, men også kan kvantificere "major" proteiner, afhængig af valg af farvningsmetoden. En ulempe ved HPLC-metoden er, at den ikke har kunnet adskille  $\alpha_{S1}$ - og  $\alpha_{S2}$ -kasein, hvorimod den gelbaserede proteomanalyse kan adskille mange forskellige former af proteinerne baseret på ladnings- og masseforskelle (forskellige glykosylerings- og fosforyleringsformer samt genetiske varianter, der giver ophav til ladningsforskelle).

### **Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:**

Projektets erhvervmæssige betydning ligger for det første i udvikling af en metode, der kan anvendes til karakterisering af en lang række mejeriprodukters proteinsammensætning. Hertil kan de masterkort over mælkens forskellige proteiner, der er vist i figur 2 og 3 på side 10, bl.a. anvendes. Der er derfor sket en stor kompetenceopbygning via projektet, samt skabt basis for videre frugtbart samarbejde med svenske forskere inden for mælke kvalitetsområdet.

Der er etableret en unik viden om koblinger mellem mælkeråvarens proteinprofil og forarbejdningsegenskaber gennem anvendelse af samme mælkeprøver til karakterisering af proteinprofilen og til fremstilling af modeloste af mælk udtaget på "ko-niveau". Herved er der sket en kobling mellem individuelle proteiner i individuelle mælkeprøver og teknologiske egenskaber. Den opnåede viden kan anvendes som et af grundlagene for en eventuel fremtidig beslutning om at avle efter  $\beta$ -laktoglobulin B-varianten for derigennem at opnå forbedret osteudbytte og overgangstal på ostemælk.

Projektet har afdækket nye problemstillinger, herunder at en overraskende stor andel af de mælkeprøver, der var udtaget i projektet, viste dårlige koaguleringssegenskaber. Grunden hertil kan være en ændret råvare eller lagringen. En reduceret koaguleringssevne og dannelse af svagt koagel fører til øgede ostningstider samt reduceret osteudbytte, hvilket har en stor betydning for mejeriernes økonomi og dermed også for mælkeproducenterne. I Danmark produceres 355 mio. kg ost årligt, og muligheden for at optimere råvaren enten via den fremtidige avlsstrategi, eller via produktionstilpasninger hos landmændene og på mejerierne har således stor betydning for mejeriernes konkurrenceevne. Denne problemstilling har medført et nyt projekt med det fokus at undersøge mulige årsager til forringelser i koaguleringssegenskaber.

Dette er sket i form af et nyt innovationsprojekt "Ostningsegenskaber – effekt af ydelsesforhold og temperaturforhold inden ostning", der er et samarbejde mellem DJF/Aarhus Universitet, Dansk Kvæg, Arla Foods og Kvæg-brugets Forsøgscenter.

Et andet spin-off af projektet er et nyt forskningsprojekt under programpakken Fødevarer og Sundhed (Wound-healing effects of bioactive components in milk in relation to gastro-intestinal diseases), hvor de 2D-gelbaserede proteomteknikker, massespektrometri og multivariat data-analyse implementeret i nærværende projekt var en vigtig forudsætning for at kunne ansøge om et sådant projekt.

Der har været samarbejde med professor Anders H. Karlsson, Institut for Fødevarevidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer Københavns Universitet, omkring statistisk bearbejdning af data. Der er desuden etableret samarbejde med adjunkt Allan Stensballe, Institut for Kemi, Miljø og Bioteknologi Aalborg Universitet omkring massespektrometriske analyser.

Der har været samarbejde med Arla Foods Innovationscenter i Brabrand, idet der i projektet er blevet analyseret fire forskellige mælkeprøver for proteinprofil med proteom analyse udviklet i projektet. Formålet var at undersøge regionale forskelle i to tankmælksprøver fra Sverige, samt at undersøge forskelle i mælk fra to individuelle køer med forskellige racer (nutidig SDM og "gammel" RDM).

Projektet har været kørt som et fuldt integreret dansk-svensk samarbejde. Det danske projekt er kørt sideløbende med det svenske søsterprojekt, der er finansieret af Stiftelsen Lantbruks-Forskning (Mjölkråvarans proteinsammansättning och dess betydelse för mjölkens användning). Det svenske projekt blev ansøgt af Sveriges Lantbruksuniversitet i Uppsala, og har desuden deltagelse af Svensk Mjök i Lund. De to projekter har haft samme formål, og har hver dækket deres del af forskningsaktiviteterne. Det har bl.a. betydet, at prøvetagningen har været koordineret, at der har været fællesskab omkring data og resultater, at der har været udstationering, samt at der er udarbejdet en lang række fælles publikationer. Der er derved opnået en stor grad af synergi, som også var tanken i ansøgningen. Projekterne har været organiseret således, at den danske forskningsstøtte har støttet de danske aktiviteter, mens svenske forskningspenge har støttet de svenske aktiviteter.

Der er i den svenske del af projektet tilknyttet et ph.d.-forløb ved uddannelse af ph.d.-studerende Anna Wedholm, SLU. Anna Wedholm var på forskningsophold ved Institut for Råvarekvalitet i en 4-ugers periode i oktober 2005, samt i en 6-ugers periode i januar-februar 2006. Projektleder Lotte Bach Larsen er pr. 1. januar 2006 tiltrådt som medvejleder for Anna Wedholm.

## ***Et resume på engelsk***

The protein profile of raw and pasteurized milk samples at individual cow level was related to the cheese-making properties. This was carried out by characterization of the protein composition of the milk samples by proteomics and by HPLC based techniques, and manufacture of low-fat model cheeses from the same individual samples in parallel. The milk samples were obtained from two different herds, one in Denmark comprising SDM cows, and one in Sweden consisting of the two Swedish races, SRB and SLB. For proteomic profiling of the milk samples, a 2-dimensional gel electrophoresis based method was implemented, and used in connection with mass spectrometry and multivariate statistics.

Concentrations of the major milk proteins in approximately 140 individual milk samples were determined by HPLC, and furthermore, concentrations of minor milk proteins were determined by 2D-gel based proteomics, in addition to a range of other parameters measured in the milk samples. Concentration of total protein, total casein,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein were significantly higher in SRB milk compared with SLB milk. Concentrations of  $\alpha$ -lactalbumin and calcium were significantly higher in SDM milk than in SLB milk. The concentration of urea was higher in SLB than in SDM milk, and was suggested to reflect differences in feeding regimes between the investigated Swedish and Danish herds.

A surprisingly high fraction, more than 30 %, of the milk samples had poor coagulation properties. Poorly and non-coagulating samples were associated with a low concentration of  $\kappa$ -casein and a low proportion of  $\kappa$ -casein in relation to total casein. The concentrations of  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein, and of  $\beta$ -laktoglobulin B-variant were found to be significant for the cheese yield, while the casein number and  $\beta$ -laktoglobulin B concentrations positively affected the transition number. The cheese making properties could be improved by selecting milk with high concentrations of  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein, a high casein number and a fraction of  $\kappa$ -casein in relation to total casein, and milk that contains  $\beta$ -laktoglobulin B.

Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry in combination with multivariate data analysis was used to study the effect of variations in milk protein composition on the protein transition number and water holding capacity of low fat model cheeses. Mass spectrometry identified a range of proteins with significant effects on these traits. Of the identified caseins, several minor variants of  $\alpha_{S2}$ -casein had positive impacts on the transition number, and a fragment of  $\beta$ -casein had a positive impact on the water holding capacity. Several whey proteins with significant influence on the water holding capacity were identified. However, the individual effect of each identified protein on the analyzed cheese quality variables was relatively low. Therefore, further studies of the contributions of different proteins are needed for further understanding and prediction of cheese yield and quality.

## Liste over publikationer mm.:

### Publikationsliste

1. Wedholm, A., Møller, H. S., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A. H., Andersson, R., Andrén, A. & Larsen, L. B. (2007). Effect of milk protein composition on cheese yield and quality as determined by proteomics and multivariate data analysis (manuskript under udarbejdelse).
2. Larsen, L. B., Wedholm, A., Møller, H. S., Lindmark-Månsson, H. & Andrén, A. (2007). Proteomic profiling of different types of whey by two-dimensional gel electrophoresis (manuskript under udarbejdelse).
3. Larsen, L. B., Wedholm, A., Møller, H. S., Lindmark-Månsson, H., Andrén, A. (2007). Application of proteomics for the characterisation protein composition of raw and heat treated milk (manuskript under udarbejdelse).
4. Wedholm, A., Møller, H. S., Lindmark-Månsson, H., Rasmussen, M. D., Andrén, A. & Larsen, L. B. (2007). Identification of peptides in milk as a result of proteolysis at different levels of somatic cell counts using LC MALDI spotting and MS/MS detection. *Journal of Dairy Research*, accepted for publication.
5. Larsen, L. B., Wedholm, A., Møller, H. S., Andrén, A. and Lindmark-Månsson, H. (2007). Proteomic study of regressions between milk yield and whey protein composition. *Journal of Animal and Feed Sciences*, in press.
6. Larsen, L. B., Wedholm, A., Møller, H. S., Andrén, A. and Lindmark-Månsson, H. (2007). Proteomic study of regressions between milk yield and whey protein composition. Poster og mundtligt indlæg ved The International Skjervold symposium on milk quality, 26.-27. October 2006, Oslo, Norway.
7. Larsen, L. B. Mælkens proteinsammensætning og osteudbytte. *Ny KvægForskning* nr. 4, august 2006.
8. Larsen, L. B. Dårligt koagulerende mælk giver lavere osteudbytte. *Ny KvægForskning* nr. 2, april 2006.
9. Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A. & Andrén, A. (2006). Effect of Protein Composition on the Cheese Making Properties of Milk from Individual Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 3296-3305.
10. Wedholm, A., Hallén, E., Larsen, L. B., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A. H. & Allmere, T. (2006). Comparison of milk protein composition in a Swedish and a Danish dairy herd using reversed phase HPLC. *ACTA Agricultura Scandinavia Section A, Animal Science*, 56, 8-15.
11. Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Månsson, H., Andersson, R. & Allmere, T. (2005). Importance of milk protein composition for the quality and yield of low fat model cheeses. *NorFA conference on "Milk products and components in health and disease", 20-23. august 2005, Den Blå Lagune, Island*, s. 33.

12. Wedholm, A., Larsen, L.B., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A.H., Allmere, T. (2004). Cheese making Properties of milk from individual cows of Swedish and Danish dairy breeds. Poster og abstract til Livsmedelsforskardagarna 2004, 22.-23. november 2004, Göteborg, Sverige.
14. Larsen, L. B., Bendixen, E., Karlsson, A. H., Søndergaard, M. W., Allmere, T., Wedholm, A. & Lindmark-Månsson, H. (2004). Mælkeråvarens proteinprofil – betydning for mælkenes egnethed til videre forarbejdning. *Mælkeritidende*, 23. januar, 31-35.
15. Larsen, L. B., Søndergaard, M. W., Søndergaard, H. M. & Bendixen, E. (2004). Proteome Analysis of Proteins in Rennet Whey and Casein Coagulum. Poster og abstract til IDF Symposium on Cheese Ripening, Characterization & Technology, Prag, Tjekkiet, 21.-25. marts 2004.
16. Wedholm, A., Allmere, T., Andrén, A., Lundén, A., Larsen, L. B. & Lindmark-Månsson, H. (2004). Comparison of Cheese making Properties of Milk from Individual Swedish and Danish dairy breeds. Poster og abstract til IDF Symposium on Cheese Ripening, Characterization & Technology, Prag, Tjekkiet, 21.-25. marts 2004.
17. Allmere, T., Wedholm, A., Månsson, H. L., Aldén, G., Larsen, L. B., Bendixen, E., Karlsson, A. & Søndergaard, M. W. (2003). Betydelsen av mjölkens proteinsammensætning för mejeriprodukternas kvalitet. *Forskning Special, Svensk Mjök*, 13. november, 1-2.
18. Larsen, L. B. (2003). Hvad betyder mælkenes proteinsammensætning for videre forarbejdning? *Ny KvægForskning*, maj 2003.



## Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater:

Udvælgelse af forsøgsmateriale, indsamling, fraktionering og distribuering af mælkeprøver. Der blev gennemført i alt 5 planlagte prøveudtagninger. Resultater fra første prøveudtagning er ikke medtaget pga. problemer med køletransporten mellem landene. Ved hver prøveudtagning blev der udvalgt, efter en screening af et større dyremateriale, 15 SDM køer med et så stort som muligt spænd i det totale proteinindhold fra forsøgsbesætningen i Foulum. Sideløbende blev der i det svenske samarbejdsprojekt udtaget mælkeprøver med varierende proteinindhold fra 15 SRB og 15 SLB fra forsøgsbesætningen i Ultuna. Efter lavpasteurisering blev der i Sverige fremstillet modeloste af typen lavfedt Præst-ost, i alt 45 oste, og der blev bestemt osteudbytte og vandindhold i ostene. For videre analyse af mælakens proteinsammensætning blev mælkeprøverne separeret i valle og kaseinfraktion ved at tilsætte chymosin. Begge landes prøver blev analyseret i begge lande med de analysemetoder, der var henlagt til Danmark, respektivt Sverige.

### **Karakterisering af proteinfraktionen i rå mælk**

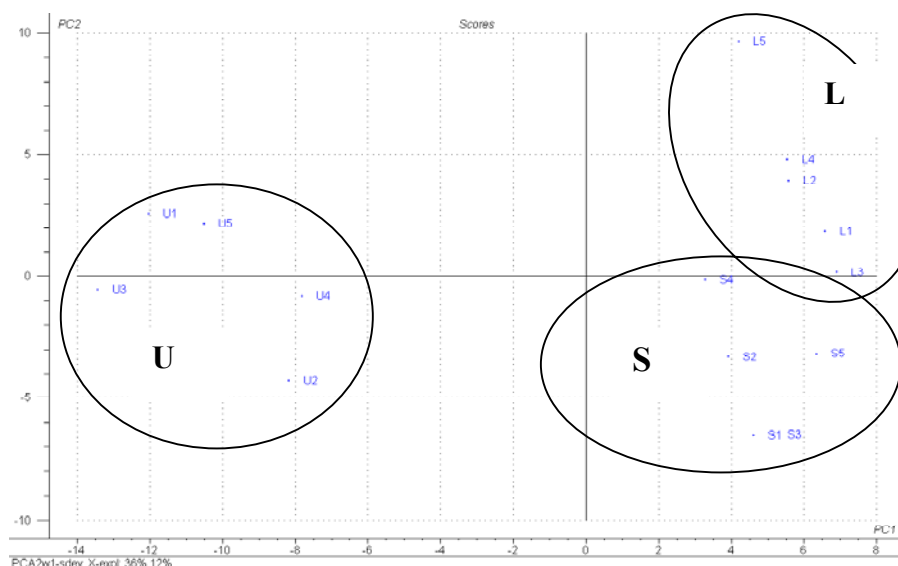
De beskrevne udtagne mælkeprøver har dannet basis for undersøgelserne i projektet. Den overordnede sammensætning af den rå mælk blev undersøgt i relation til race og besætning (publ. 10), og desuden blev proteinsammensætningen bestemt ved HPLC-analyse (publ. 10), og ved proteomanalyse af rå mælk (publ. 1, 2, 3 og 5).

Observerede forskelle mellem SLB og SRB vil især kunne tilskrives forskelle i fodring og management på de to forsøgsgårde, da de to Holstein-racer fra hhv. Sverige og Danmark genetisk set er meget ens. Forskelle mellem SRB og SLB vil derimod kunne tilskrives forskelle mellem svensk Holstein og den røde, svenske race, da de var fodret og opstaldet samme sted. Sammenligning af mælk fra SDM og SLB viste, at koncentrationen af  $\alpha$ -laktalbumin og af calcium var højere i SDM-mælk end i SLB-mælk. Der var derimod ikke signifikant forskel på indholdet af de andre proteiner mellem de to undersøgte besætninger. Forskellen i calcium-indholdet er interessant, både ud fra et ernæringsmæssigt og fra et mejerimæssigt synspunkt, da calcium er et af mælakens vigtigste mineraler og desuden påvirker ostningsprocessen. Desuden var koncentrationen af urea generelt højere i prøverne af svensk mælk sammenlignet med de danske prøver, og var for SLB 5,56 mM mod 3,62 mM i SDM-prøverne. Dette menes at afspejle forskelle i fodringen mellem den danske og svenske besætning (publ. 10). Ureaindholdet har ligeledes betydning for mælakens forarbejdningsegenskaber.

Analyserne viste videre, at koncentrationen af total protein og total kasein, samt af  $\beta$ -kasein og  $\kappa$ -kasein var signifikant højere i SRB-mælk end i SLB-mælk. Yderligere undersøgelser viste, at  $\kappa$ -kasein-koncentrationen var højere i mælk fra køer med  $\kappa$ -kasein AB genotypen end med AA-genotypen. Da frekvensen af  $\kappa$ -kasein AB-genotypen var højere i SRB end i SLB menes dette at være årsagen til den højere  $\kappa$ -kasein-koncentration i SRB. Fedtprocenten var højere i SRB end i SLB, mens koncentrationen af laktose var højere i SLB sammenlignet med SRB (publ. 9 og 10). Disse undersøgelser dannede derefter basis for yderligere karakteriseringer af sammenhænge mellem mælakens proteinsammensætning og forarbejdningsparametre som osteudbytte og vandindhold.

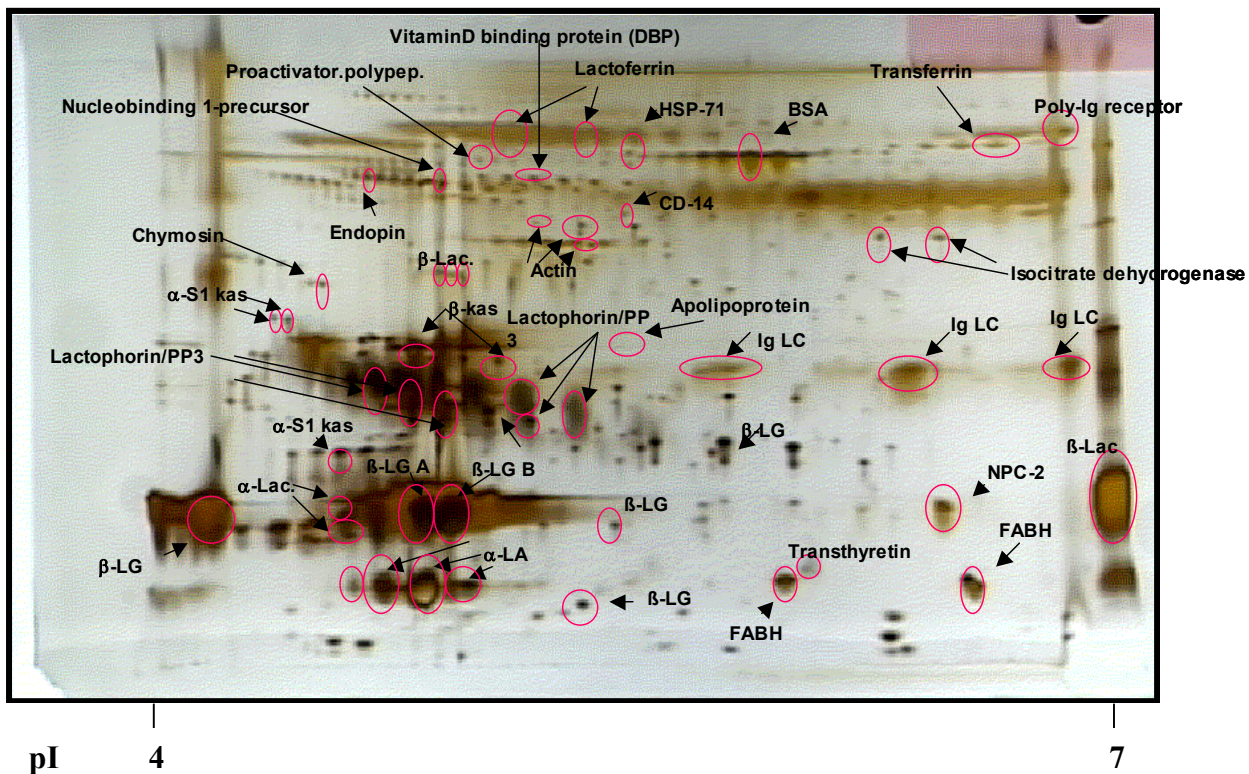
Implementeringen af proteomanalyse på mælk omfattede først en undersøgelse af, om det var muligt at analysere både valle og kasein i en og samme 2-dimensionelle gel, dvs. på "skummetmælksniveau". Da kaseinerne er meget dominerende mængdemæssigt set, og har meget ens pI og molekylmasse ville de skygge for kvantificeringen af valleproteinerne, og derfor blev det, efter indledende undersøgelser, vurderet bedre at separere valle- og kaseinfraktion, og analysere disse hver for sig på separate geler. Forskellige fraktioneringsmetoder blev derefter undersøgt: ultracentrifugering (U), løbefældning (L) og syrefældning (S). Resultatet i form af en PCA-analyse på valleproteinerne er vist i figur 1 (publ. 2). Prøverne er alle fra samme prøve (tankmælk), men fældet separat (gentagelser) (figur 1).

Figur 1 viser, at den ultracentrifugerede valle er mere forskellig fra hhv. valle fra løbefældet eller syrefældet mælk, der indbyrdes ligner hinanden mere. Baseret på disse indledende undersøgelser blev det besluttet at basere separationen på løbefældning. Dermed ville separationerne af mælken til proteomanalyserne også være med samme princip, som blev anvendt til fremstillingen af modeloste.



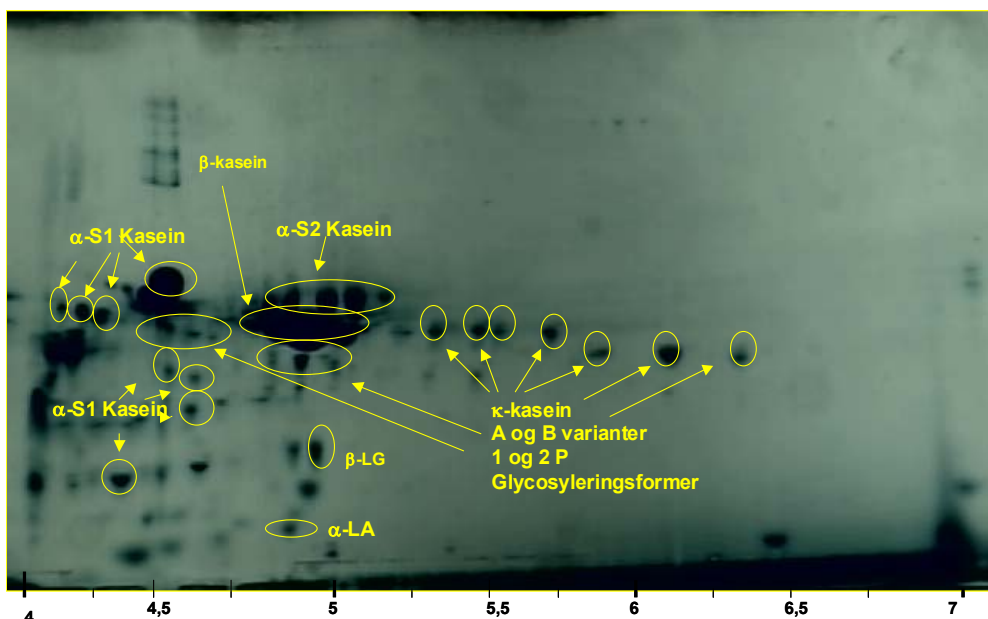
**Figur 1.** PCA analyse af proteinprofilen af forskellige typer af valle. U, ultracentrifugeret; L, valle fra løbefældet mælk; S, valle fra syrefældet mælk. Tallene angiver gentagelser af samme prøve (publ. 2).

De videre proteomstudier omfattede fremstilling af et såkaldt masterkort over proteinerne i løbefældet valle. Der blev implementeret nogle nye typer af 2D-geler, der dækkede et bredt spektrum af de aktuelle molekylmasser, som valleproteinerne repræsenterer. Det blev desuden valgt at fokusere på et pI på 4-7, der dækker en stor del af valleproteinerne. Masterkortet vist i figur 2 er et resultat af de samlede undersøgelser i projektet i relation til massespektrometrisk identificering af proteiner i sød valle efter sølvfarvning, og er baseret på MALDI-TOF MS eller MS/MS identifikationer via "peptide mass fingerprinting" (PMF) (publ. 1 og 2).



**Figur 2.** Masterkort over proteinprofilen i sød valle på en 8-16 % 2-dimensionel gel, og med pI 4-7 (publ. 2).

Der er ligeledes arbejdet med implementering af en proteomics-baseret metode til karakterisering af mælkens kaseinfraktion. Separation af kaseinerne baseret på en 2-D gelseparation lignende den for valleproteiner, men med Coomassie blue farvning, er vist i figur 3.



**Figur 3.** Masterkort over chymosinfældede kaseiner på en 8-16 % 2-dimensionel gel, og med pI 4-7 (publ. 1 og 3).

For at undersøge variationer i mælkens proteinsammensætning i forhold til koens mælkeydelse er data fra proteom analyse af valle og kasein fra rå mælk blevet analyseret ved multivariat statistisk analyse gennem kobling med ydelsesdata (publ. 5). Proteomdatamaterialet var fra undersøgelser af proteinfraktionen i ubehandlet mælk, hvor proteinsammensætningen i valle- og kaseinprøver fra alle SDM-dyrene i projektet blev analyseret på individniveau ved 2-dimensional gelelektroforese. Valle og kasein blev fremstillet ved tilsætning af osteløbe til skummetmælksprøver fra de individuelle køer. Forskelle i proteinsammensætning på de forskellige geler blev analyseret ved billedbehandling af sølvfarvede geler. Værdierne for spotvolumen blev efterfølgende analyseret ved multivariat statistisk analyse. Der er udført regressionsanalyser (PLS-1), hvor der blev undersøgt for variationer i proteinsammensætningen i forhold til en kontinuert Y-variabel (ydelse). Der blev udpeget en række proteiner i vallefraktionen, der var signifikant opregulerede ved stigende ydelse (publ. 5). De signifikante proteiner omfattede FABP (fatty acid binding protein), apolipoprotein A1 (ApoA1), laktoferrin og endopin (se figur 2). Disse resultater viste, at flere valleproteiner var positivt associeret med mælkeproduktion, dvs. deres koncentration steg med stigende ydelse, heraf to, der er involveret i optag og transport af fedtsyrer (FABP og ApoA1). Stigningen i nogle af disse valleproteiner med stigende ydelse kunne være en del af forklaringen bag det observerede fald i mælkens kaseintal som observeret i undersøgelser udført af svensk mælk gennem en 30-års periode; fald som blev tilskrevet en stigning i mælkens valleproteinindhold gennem perioden (en problemstilling, der var beskrevet i ansøgningen).

Der er desuden i projektet arbejdet med udvikling af en LC-baseret proteomics-metode, hvor udløbet fra HPLC-separerede peptider spottes direkte på target til MALDI-TOF MS eller tandem MS-analyse (publ. 4). Denne metode blev i studiet anvendt til identifikation af peptider til stede i mælk med forskelligt celletal. Formålet var derigennem at kunne pege, på hvilke spaltninger og nedbrydninger der var sket med kaseinet, og derved videre at kunne pege på de proteaser, der var ansvarlige for nedbrydningen. Publikationen er et resultat af et studieophold af ph.d.-studerende Anna Wedhold på DJF i vinteren 2006.

### ***Karakterisering af varmebehandlet mælk***

Et af projektets mål var at undersøge anvendeligheden af proteomanalyse til karakterisering af varmeinducerede ændringer i mælkens proteinfraktion. Da en del af de ændringer, der introduceres efter varmebehandling, inkluderer dannelse af disulfidbroer, blev der arbejdet med at analysere ureducerede prøver ved proteomanalysen. Dette skete ved at udelade reduktionsmiddel fra analysens forskellige faser. Der blev derefter udvalgt 6 prøver af mælk fra SDM, alle med højt proteinindhold og god kvalitet mht. celletal til proteomanalyse af ureducerede prøver af hhv. valle og kaseinfraktion fra rå og lavpasteuriseret mælk. Alle gelerne blev farvet med Coomassie brilliant blue, og proteinspots kvantificeret ved billedbehandling. Datamateriale fra denne undersøgelse er blevet videre analyseret ved multivariat statistik (D-PLS) af intensiteterne af de enkelte proteiner i hhv. valle og kaseinfraktion for at besvare, om lavpasteurisering (72°C, 30 s) inducerede ændringer i hhv. valleprotein eller kaseinfraktionen, der kan måles ved proteomteknikken (publ. 3).

Undersøgelserne viste, at der var signifikante forskelle i kaseinfraktionen isoleret fra rå eller varmebehandlet skummetmælk. Der var derimod ikke signifikante forskelle i valleproteinsammensætningen før og efter lavpasteurisering. Det kan forekomme overraskende, men skyldes sandsynligvis, at de komplekser, som valleproteinerne indgår i efter varmebehandling, er for store til at blive analyseret under de valgte betingelser. Det er dog meget muligt, at man vil kunne anvende metoden til at karakterisere ændringer i valleproteinsammensætningen efter hårdere varmebehandling, der forventes at give større forskelle i proteinfordelingen (publ. 3).

De kaseinspots, der var signifikant forskellige mellem rå og varmebehandlet inkluderede 5 forskellige proteinspots. De 3 af dem var positivt associeret med varmebehandling, dvs. deres intensitet var højere i kasein fældet fra varmebehandlet mælk. Ved MALDI-TOF MS fandtes disse 3 positivt associerede proteinspots at indeholde  $\alpha_{S1}$ -kasein. Da molekylmassen for de 3 spots lå langt over den for almindelig  $\alpha_{S1}$ -kasein, indikerede det, at de nævnte spots indeholdt  $\alpha_{S1}$ -kasein i kompleks (ikke disulfid-bundet, da  $\alpha_{S1}$ -kasein ikke indeholder cysteiner) med andre proteiner. Det kunne være en type af laktolerede former eller Maillard produkter. Den fjerde af disse spots var lavere i varmebehandlet kasein, og lå ligeledes på en position, hvor vi tidligere har identificeret  $\alpha_{S1}$ -kasein, men på en position med et væsentligt lavere pI end den fremherskende moderform af  $\alpha_{S1}$ -kasein molekylet. Det specielle for denne  $\alpha_{S1}$ -form er ikke identificeret. Det forekommer sandsynligt, at denne specielle  $\alpha_{S1}$ -kasein form var lavere i varmebehandlet mælk som resultat af, at den indgik i dannelsen af nogle af de større varmeinducerede komplekser. Den femte og sidste af de fundne signifikant forskellige spots var  $\alpha_{S2}$ -kasein dimeren, hvis indhold faldt i kaseinfraktionen efter varmebehandling (publ. 3).

Alt i alt konkluderes det, at denne proteometode kan anvendes til at undersøge varmeinducerede ændringer proteinsammensætningen i valle- og kaseinfraktion, men er ikke anvendelig til at undersøge dannelsen og karakteren af større varmeinducerede komplekser, da disse ikke forventes at kunne trænge ind i strippen til 1. dimension, og dermed ikke analyseres.

### ***Undersøgelse af mælkens teknologiske egenskaber***

Der blev under udførelsen af projektet observeret en overraskende stor andel af prøverne, der ikke kunne koagulere (publ. 8 og 9). Disse koaguleringsproblemer blev observeret både i forbindelse med fremstilling af sød valle og løbefældet kaseinfraktion fra rå og fra pasteuriseret mælk mhp. fraktionering inden proteomanalyse, men blev også observeret under fremstillingen af modelostene, hvor der tillige var tilsat mælkesyrebakterier. Mere end 30 % af alle udtagne prøver (SDM, SRB, SLB) havde enten dårlige koaguleringssegenskaber eller koagulerede slet ikke. Prøver blev kategoriseret som dårligt koagulerende, hvis de ikke var koaguleret inden 15 min. efter løbetilsætning ( $G'_{15} < 15$  Pa), men dog inden 30 min., og samtidig havde et løst koagel. Disse mælkeprøver var associerede med et lavt  $\kappa$ -kasein indhold og var desuden mere hyppig blandt førstegangslaktationskøer (publ. 9). Der blev observeret en tendens til et lavere osteudbytte (g ost per 100 g ostemælk) for den dårligt koagulerende mælk sammenlignet med den godt koagulerende. Med hensyn til betydningen af proteinsammensætningen for osteudbyttet viste undersøgelserne, at  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - og  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -laktoglobulin B-koncentrationerne i udgangsmælken var positivt associerede med osteudbyttet, udtrykt både som g ost per 100 g ostemælk og som g tørstof i osten per 100 g ostemælk. Med hensyn til effekt på overgangstal (her beregnet som g tørstof i ost per 100 g protein i udgangsmælken) fandtes kaseintallet og  $\beta$ -laktoglobulin B at have en signifikant, positiv effekt, mens mælk fra køer med  $\beta$ -laktoglobulin A genotypen havde en negativ effekt (publ. 9).

For yderligere at karakterisere sammenhænge mellem variationer i mælkens proteinsammensætning og teknologiske egenskaber ved brug af proteomanalyse er der blevet kørt 2D-geler af sød valle hhv. løbefældet kasein fra skummetmælk fra 43 SDM køer, i alt 2 x 43 2D-geler. Da der i projektet blev fremstillet modeloste af de samme mælkeprøver, kan relationer mellem proteinsammensætning og teknologiske egenskaber som osteudbytte, overgangstal og vandindhold undersøges. De 2-dimensionale geler blev sølvfarvet, og proteinspots blev kvantificeret ved billedanalyse. Resultaterne fra billedbehandlingen blev anvendt til at undersøge effekten af proteinsammensætning (X-data) på overgangstal og vandindhold (Y-data) ved PLS1 regressionsanalyser. Derved kunne udpeges proteinspots, der var hhv. signifikant positivt eller negativt associerede med de anvendte regressionsparametre.

Via disse undersøgelser er en række spots i hhv. sød valle og kaseinkoagel, der var signifikante i relation til overgangstal og vandbinding af lavfedt-oste, peget ud ved proteomanalyse og identificeret ved massespektrometri, herunder bl.a. i samarbejde med Allan Stensballe, Aalborg Universitet (publ. 1). Af de identificerede kaseiner var der flere varianter af  $\alpha_{S2}$ -kasein med positiv effekt på overgangstallet, og et fragment fra  $\beta$ -kasein med positiv effekt på ostenes vandindhold. Der var desuden flere valleproteiner med effekt på vandindhold i ost. Effekterne af hver enkelt proteinspot på de målte ostningsparametre var imidlertid relativt små, og en anvendelse af en eller flere af de nævnte signifikante proteiner som markører for egenskaber vil kræve yderligere undersøgelser.

Der blev desuden i efteråret 2005 analyseret 4 mælkeprøver fra Arla i forbindelse med undersøgelse af proteinsammensætningen af mælk i relation til regionale forskelle (Øland/svensk tankmælk) og i relation til race (gammel dansk RDM race/dansk tankmælk) ved brug af proteomteknikken, der er implementeret i dette projekt.

### ***Statistisk databehandling og publicering***

Der er udført statistisk databehandling med både univariate og multivariate metoder. Disse resultater er beskrevet under de enkelte faser. De publikationer, der er et resultat af projektet (14), samt de tre publikationer, der er under udarbejdelse, fremgår af publikationslisten.

