

Afslutningsrapport

Forbedring af mælkeproteiners skumdannelse
gennem enzymatisk behandling

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2001-40

Maj 2001



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond for projektet

Forbedring af valleproteiners skumdannelse gennem enzymatisk behandling

Richard Ipsen

Jeanette Otte

Karsten Bruun Qvist

Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet

Mejeriområdet

Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole

Frederiksberg

2001

1. Sammendrag

Det er blevet undersøgt hvorledes forskelle i proteiners struktur påvirker deres egenskaber i luft-vand grænseflader og deres skumegenskaber. Desuden er det nærmere blevet afklaret, hvorledes hydrolyse med en protease fra *Bacillus licheniformis* kan anvendes til forbedring af β -lactoglobulins skumegenskaber.

Projektet har påvist at der er markante forskelle på grænsefladeegenskaberne af forskellige genetiske varianter af mælkeproteiner (β -lactoglobulin A og B samt β -kasein A1 og A2), samt at dette påvirker proteinernes skumegenskaber, hvilket formodentlig hænger sammen med strukturelle forskelligheder mellem de genetiske varianter. Når det gælder β -lactoglobulin, har det vist sig at den mest fleksible variant (A-varianten) faktisk er mest udfoldet i grænsefladen, og at de to varianter adsorberes forskelligt til grænsefladen, muligvis således at A-varianten adsorberes som monomer mens B-varianten adsorberes som dimer, hvorved grænsefladeviskositet og -elasticitet forøges hurtigere og grænsefladen stabiliseres. Dette reflekteres også i skumegenskaberne, hvor B-varianten danner det mest stabile skum, hvorimod A-varianten danner det mest voluminøse skum. Med hensyn til β -kasein, er der markant forskel mellem A1 og A2 varianten, således at A2 varianten danner et grænsefladelag med meget høje værdier for de viskoelastiske egenskaber, men også giver et mere ustabil skum. Denne høje viskoelasticitet gør muligvis grænsefladelaget mere sprødt, hvorved skummet nemmere falder sammen.

I øvrigt har projektet bekræftet, at evnen til at danne et sammenhængende, krydsbundet lag i grænsefladen er meget væsentlig for dannelse af stabile skum, idet β -lactoglobulin, der har mulighed for at danne intermolekulære S-S krydsbindinger i grænsefladen, gav det mest stabile skum. De mere fleksible kaseiner gav derimod voluminøse, men knap så stabile skum.

Det er vist at en begrænset hydrolyse med en protease fra *Bacillus licheniformis* kan forbedre skumdannelsen af β -lactoglobulin, uden at der dog var en klar sammenhæng mellem skumegenskaber og de viskoelastiske egenskaber målt i en luft-vand grænseflade. Den forbedrede skumdannelse kan muligvis skyldes den forøgede molekulære fleksibilitet de opståede peptider besidder i forhold til det intakte protein, men det kan også spille en rolle at de opståede peptider danner aggregater ved udtalt hydrolyse.

2. English summary

The effects of structural differences in proteins on their behaviour at air-water interfaces and on their foaming properties have been investigated. In addition, it has been elucidated how hydrolysis using a specific protease from *Bacillus licheniformis* is useful for improving the foaming properties of β -lactoglobulin.

Marked differences were found in the interfacial properties of different genetic variants of milk proteins (β -lactoglobulin A and B as well as β -casein A1 and A2). The foaming properties were also affected by the structural differences between the genetic variants. In the case of β -lactoglobulin, the most flexible of the variants (the A-variant) was shown to be, in fact, most unfolded at the air-water interface, and the adsorption of the two variants was shown to be different, with the A-variant possibly being adsorbed as a monomer and the B-variant as a dimer. Adsorption as a dimer will more rapidly increase the viscoelastic properties at the interface, thus stabilizing the interfacial layer. This is also reflected in the foaming properties, with the B-variant resulting in the most stable foam, whereas the A-variant give the most voluminous foam. In the case of β -casein, a major difference was found between the A1 and A2 variants. The A2 variant produced an interfacial layer with very high values for the viscoelastic properties, but also resulted in an unstable foam. This foam instability might due to the interfacial layer becoming more sensitive to fracture at high values of the viscoelastic properties.

The project has confirmed that the ability to make a continuous, cross-bonded layer at the interface is important for the production of stable foams, as β -lactoglobulin, which has the ability to form S-S intermolecular bonds at the interface, made the most stable foams. The more flexible caseins, on the other hand, produced voluminous, but less stable foams.

A limited hydrolysis using a specific protease from *Bacillus licheniformis* has been shown to improve the foaming properties of β -lactoglobulin, but no clear relation was found between the foaming properties and the viscoelastic properties measured at the air-water interface. The improved foaming is possibly due to the increased molecular flexibility of the peptides resulting from the hydrolysis compared to the intact protein, but aggregation of the peptides could also play a role.

3. Formål

Projektets overordnede mål har været at beskrive mælkeproteiners egenskaber i luft-vand grænseflader med udgangspunkt i deres struktur.

Det har været hensigten med projektet at etablere en sammenhængende informationskæde fra proteiners og peptiders struktur til deres egenskaber i luft-vand grænseflader (både i sig selv og som skum). Forståelse for, hvad der påvirker mælkeproteiners skumegenskaber og dermed, hvordan de kan styres på et ikke-empirisk grundlag, vil kunne være til stor nytte ved fremstilling og udvikling af mælkeproteinprodukter med særlige anvendelser.

4. Baggrund

Proteiners evne til at danne et stabilt skum er en væsentlig egenskab i en række levnedsmidler (mousse, fromager, iscreme, konfekturer, ekstruderede produkter, bagerivarer). Et proteins evne til at danne skum afhænger af dets grænsefladeegenskaber, og dermed af proteinets struktur og fleksibilitet.

Mælkeproteinerne forekommer i en række genetiske varianter med forskellig primær struktur. Den sekundære og tertiære struktur afhænger af det omgivende miljø, og strukturen kan desuden ændres på en række forskellige måder (kemisk, enzymatisk, fysisk) for at forbedre de funktionelle egenskaber, herunder grænsefladeegenskaberne. Enzymatisk behandling af levnedsmiddelproteiner har flere fordele i forhold til kemiske og fysiske behandlinger: Der kan opnås meget specifikke ændringer og behandlingen kan udføres under meget skånsomme betingelser.

Begrænset proteolyse har vist sig at være anvendelig. Således er valleproteiner mindre overfladeaktive end kaseinerne, primært fordi de, i modsætning til kaseinerne, er globulære, men begrænset hydrolyse af valleprotein kan forbedre overfladegenskaberne ved at danne peptider med relativ stor molekylvægt og med intakte hydrofobe områder (Gauthier et al, 1993). Mutilangi et al (1995) fandt en stigning i overfladehydrofobiciteten af varmebehandlet valleprotein ved hydrolyse med en række forskellige proteaser, og Althouse et al (1995) forøgede såvel overrun som stabilitet af valleproteinskum ved en begrænset hydrolyse. Der er dog stor forskel på, hvor meget de enkelte proteaser er i stand til at forbedre skumegenskaberne, og hvorledes hydrolysegraden indvirker

(Mutilangi et al, 1996). Caessens et al (1997) har hydrolyseret β -kasein og oprenset peptidfraktioner. Hydrofobe peptider, fra den C-terminale del af proteinet, havde forbedrede skumegenskaber i forhold til intakt β -kasein, mens mere hydrofile peptider ikke kunne danne stabilt skum.

En begrænset hydrolyse med en bakteriel protease eksponerer hydrofobe dele af β -lactoglobulin (Otte et al, 1997) og kan således forventes at forbedre valleproteins grænsefladeegenskaber.

Det meste af den eksisterende viden om, hvorledes enzymatisk behandling af mælkeprotein påvirker deres funktionelle egenskaber, herunder skumdannelsen, er fremkommet ved empiriske undersøgelser på mere eller mindre veldefinerede valleprotein-præparater. De anvendte præparater har haft meget forskellig sammensætning og renhedsgrad, og resultaterne kan derfor dårligt sammenholdes med undersøgelser af de inducerede ændringer i proteinernes struktur. Desuden findes der ikke for nuværende en samlet forståelse for, hvorledes mælkeproteiners struktur, og specifikke ændringer af denne struktur, påvirker deres egenskaber i luft-vand grænseflader og hvorledes dette kan kædes sammen med deres evne til at danne og stabilisere skum.

5. Resultater:

5.0 Anvendte præparater og metoder

Native, oprensede mælkeproteiner, deres genetiske varianter samt specifikke enzymatiske modifikationer af mælkeproteiner er blevet undersøgt for at klarlægge, hvorledes strukturelle ændringer påvirker mælkeproteinernes egenskaber i luft/væske grænseflader (skum).

De enkelte proteiner er oprenset i laboratoriet, for valleproteinernes vedkommende som beskrevet i Kristiansen et al (1998). Kaseinerne blev oprenset fra mælk med kendt genetisk sammensætning (opsamlet fra Sveriges Landbrugsuniversitet, Uppsala) Fraktionering af kasein blev foretaget efter en metode meget lig den der blev anvendt af Cayot et al (1992). Renheden af de fremstillede fraktioner blev undersøgt ved hjælp af kapillar elektroforese og resultaterne for de anvendte præparater er opsummeret i Tabel 1.

Tabel 1: Sammensætning af de anvendte, oprensede protein præparater

Primært protein	Indhold (%)			
	Protein ¹	Heraf den primære proteintype ²	Tørstof	Aske
β -kasein A1	87	79	93,8	3,2
β -kasein A2	93	61	99,4	4
α_{s1} -kasein (en blanding af B og C varianter)	91	79	99,8	5,8
κ -kasein (en blanding af A og E varianter)	54	55	95,8	1,2
β -lactoglobulin A	96	> 95	96,8	1,6
β -lactoglobulin B	96	> 95	93,5	1,9
α -lactalbumin	94	> 95	96,8	2

¹ Kjeldahl

² % af normaliseret areal fra kapillar elektroforese

En væsentlig del af projektet har været at få udviklet reproducerbare metoder til karakterisering af mælkeproteinernes adfærd i grænseflader og i skum. Således er der i løbet af projektet udviklet metoder til analyse af grænsefladetryk under sammentrykning af et deponeret monolag af protein

(Langmuir trug i mini-størrelse) og en metode til analyse af mælkeproteiners viskoelastiske egenskaber i en luft-vand grænseflade ved hjælp af oscillation af en de Noüy ring placeret i grænsefladen (CIR-100 grænseflade-reometer). Desuden er det lykkedes at udvikle en følsom metode til skumegenskaber, således at små mængder (1 mL, 0,5% opløsninger) rene proteiner kan analyseres for skumvolumen og skumstabilitet.

Begrænset hydrolyse med proteasen BLP blev udført ved 37 °C og pH 7,5. Hydrolysen blev stoppet efter 30 min, 1 time, 4 timer og 24 timer ved at afkøle prøverne med isvand og prøverne blev frosset ned til senere analyse.

5.1 Naturligt forekommende genetiske varianter af mælkeproteiner

Egenskaber i grænseflader og skum af forskellige genetiske varianter af mælkeproteiner er blevet undersøgt. Rene præparater af β -lactoglobulin (genetiske varianter A og B), α -lactalbumin, α_{s1} -kasein, β -kasein (genetiske varianter A1 og A2) samt κ -kasein blev anvendt. Der blev udført grænsefladereometri og målinger i Langmuir trug (Π -A isotermer) foruden målinger af skumegenskaberne. De opnåede resultater repræsenterer, os bekendt, de første direkte sammenligninger mellem en række forskellige mælkeproteiners (inkl. genetiske varianter) grænsefladeegenskaber og deres skumdannelse. Da de anvendte protein-præparater har en høj grad af renhed og er det er muligt at drage sammenligninger mellem proteinernes struktur og deres egenskaber i luft/vand grænseflader og videre til deres skumningsegenskaber.

Alle forsøg blev udført ved pH 7,0 med forskellige koncentrationer afhængigt af målemetoden. Målinger i Langmuir-truget blev udført på deponerede overflader med en koncentration fastsat til at være noget under koncentrationen for et monomolekylært lag (protein-afhængigt). Grænsefladereologi blev udført i 0,01% opløsninger og skumegenskaberne i 1 % opløsninger (1,5 mL).

Figur 1 viser resultater af målinger i luft-vand grænsefladen (Langmuir-trug). Figuren læses fra højre mod venstre, og viser hvorledes grænsefladetrykket (Π) ændrer sig når et udspremt monolag af protein trykkes sammen. Dette sker ved at to bevægelige barrierer i Langmuir-truget bevæger sig med en fastsat hastighed mod midten af truget. I starten (ved relativ høje værdier for areal/molekyle)

Tabel 2: Areal/molekyle i monolag af protein for de anvendte proteiner.

Primært protein	Areal/molekyle i monolag ¹ (Å ²)
β-kasein A1	3390
β-kasein A2	3180
α _{s1} -kasein (en blanding af B og C varianter)	3120
κ-kasein (en blanding af A og E varianter)	Kunne ikke bestemmes
β-lactoglobulin A	2180
β-lactoglobulin B	1200
α-lactalbumin	960

¹Fundet ved lineær regression som skæringspunktet mellem den første, flade del af kurven og den sidste stejle del.

De mere strukturerede proteiner (valleproteinerne, α-lactalbumin og β-lactoglobulin) optager mindre plads i grænsefladen end tilfældet er for de mere fleksible og ustrukturerede kaseiner (Figur 1a og Tabel 2), hvilket også var forventet. α-lactalbumin optog mindre plads i grænsefladen end β-lactoglobulin (Figur 1b og Tabel 2), sandsynligvis fordi dette molekyle (med 4 –S-S- broer, mod β-lactoglobulin's 2) ikke udfoldes i samme grad. Der blev ikke fundet væsentlige forskelle mellem de genetiske varianter af β-kasein (A1 og A2). Disse to genetiske varianter adskiller sig kun ved at histidin (A1) er udskiftet med prolin (A2) i position 67, hvilket således må antages ikke at have nogen større betydning for graden af udfoldning i luft-vand grænseflader under de undersøgte betingelser. β-lactoglobulin A og B, derimod, udviste nogen forskel, idet B-varianten var mindst udfoldet i grænsefladen. Dette er i overensstemmelse med, at B-varianten er den mest varmostabile og mindst fleksible (Boye et al, 1997) og kan forventes at kræve mere energi til udfoldning. Primærstrukturen af de to varianter af β-lactoglobulin varierer ved at B varianten har glycin (position 67) og alanin (position 118) i stedet for glycin og valin. Position 118 kan forventes at være af stor betydning for fleksibiliteten, idet den ene S-S bro i molekylet er lige i nærheden (den går fra cystein 106 til 119).

er Π stort set konstant, idet udsprede koncentration er mindre, end det der kræves for et monolag. Π stiger så stejlt ved den værdi, der svarer til at den udsprede mængde protein udgør et monolag. Tabel 2 viser de omtrentlige værdier for, hvor meget de forskellige proteiner fylder (areal/molekyle) når der er et monolag af protein i grænsefladen.

Grænsefladernes mekaniske egenskaber udviste endnu mere markante forskelle. Ved den anvendte koncentration skilte β -lactoglobulin B sig ud fra de andre valleproteiner ved at såvel grænsefladeviskositeten som -elasticiteten steg meget kraftigt efter ca. 3 timer (Figur 2). β -lactoglobulin kan danne intermolekylære S-S-broer, idet molekylet har en fri -SH-gruppe, og kan dermed danne et mekanisk stærkt, krydsbundet grænsefladelag. B-varianten er mindre udfoldet i grænsefladen (se ovenfor), og har desuden en mere udpræget tendens til at danne dimere, hvilket giver mulighed for en højere koncentration i grænsefladen og dermed forøget viskositet, som også iagttaget af Euston et al (1999).

Det andet valleprotein, α -lactalbumin, udviste en lang induktionsperiode(> 5 timer) inden der blev opbygget et grænsefladelag med målbare mekaniske egenskaber, i overensstemmelse med, at dette protein ikke er i stand til umiddelbart at udfoldes i grænsefladen, samt at der ikke er frie SH-grupper til stede til dannelse af intermolekylære S-S-broer.

Der blev også fundet bemærkelsesværdige forskelle mellem de 2 genetiske varianter af β -kasein (Figur 3). A2-varianten dannede meget hurtigt et mekanisk stærkt grænsefladelag, men de reologiske egenskaber begyndte at falde og har minimum efter ca. 30 min. Fænomenet er ikke ukendt (Girardet et al, 2000) og er også blevet iagttaget for andre proteiner (BSA, ovalbumin). Det kan skyldes diffusion til og fra bulk-fasen eller omlejring mellem det absorberede primære protein-lag og yderligere lag af protein (multi-lag). Årsagen kunne dog også være at det anvendte præparat indeholder overfladeaktive urenheder, der udkonkurrerer β -kaseinet ved grænseflade uden selv at kunne opbygge et sammenhængende grænsefladelag (Williams & Prins, 1996). Kapillar elektroforese viste ikke nogen markant forskel mellem typen af urenheder i de to anvendte præparater, men som det ses af Tabel 1, er indholdet af den primære protein type noget lavere (61% mod 79%) i det anvendte præparat med β -kasein A2, og dette kan betyde at de forekommende urenheder kan få en større betydning.

Den anden undersøgte genetiske variant af β -kasein, A1, udviste en stort set jævn stigning i de mekaniske egenskaber over hele måleperioden (20 timer), og nåede ikke op i nærheden af samme niveau som A2 varianten. Girardet et al (2000), som bemærkede den samme udvikling i de mekaniske egenskaber i en olie-vand grænseflade stabiliseret med β -kasein, anvendte blandingsmælk af ukendt genetisk sammensætning til deres forsøg. Vores forsøg har således påvist meget store forskelle i den opførelse de to genetiske varianter af β -kasein udviser i forhold til

opbygning af mekaniske egenskaber i grænsefladen, men vi kan ikke på nuværende tidspunkt forklare denne opførsel. Det skal dog bemærkes, at A2 varianten indeholder en prolin mere end A1 varianten, og dermed har et ekstra knæk i sin struktur.

α_{s1} -kasein opførte sig stort set ligesom A1 varianten af β -kasein, mens det anvendte præparat af κ -kasein ikke var i stand til at opbygge en grænseflade med nogen mekanisk stabilitet. Det anvendte præparat indeholdt mange uopløselige aggregater, hvorfor der kun kan forventes en ringe adsorption til grænsefladen

β -lactoglobulin (begge genetiske varianter) dannede det mest stabile skum af samtlige undersøgte mælkeproteiner (Figur 4), hvilket henføres til dette proteins evne til at danne S-S krydsbindinger i grænsefladen. A-varianten dannede mere skum end B-varianten, i tråd med, at A-varianten er den mest fleksible af de to. Til gengæld faldt skum dannet af A-varianten noget hurtigere sammen end det af B-varianten, hvilket passer med at B-varianten danner et mekanisk stærkere lag i grænsefladen, muligvis på grund af adsorption på dimer form (jf. ovenfor). α -lactalbumin var ikke i stand til at danne et stabilt skum, hvilket understreger vigtigheden af, at et skumstabiliserende protein dels kan udfolde i grænsefladen, dels kan danne stabiliserende interaktioner.

Der var også tydelige forskelle mellem de to varianter af β -kasein, således at A1 dannede et mere stabilt og voluminøst skum end A2 varianten. A1 varianten er den mest udfoldede af de to i grænsefladen (Figur 1), og den bedre fleksibilitet kan forklare det forøgede volumen, mens den dårligere stabilitet måske skyldes at A2 varianten danner et grænsefladelag der ganske vist har et højt elastisk modul, men måske også er sprødt, hvorved skumboblerne nemmere ødelægges. α_{s1} -kasein er en udmærket skumdanner, faktisk bedre end β -kasein, hvilket passer med at dette protein har grænsefladeegenskaber, der minder meget om A1 varianten af β -kasein.

Skumegenskaberne af de undersøgte proteiner udviste således en sammenhæng med grænsefladeegenskaberne og proteinernes struktur, som opsummeret i Tabel 3.

Tabel 3: Relation mellem grænsefladeegenskaber, skumdannelse og struktur for de undersøgte proteiner.

Protein	Genetisk variant	Areal/molekyle i grænseflade	Viskoelastiske egenskaber i grænsefladen	Skumegenskaber	Relation til struktur
β -lactoglobulin	A	Mindre end α -og β -kasein men mest af vallepoteinerne	Langsom jævn stigning.	Voluminøst skum, ikke helt så stabilt som skum af B varianten.	Den mest fleksible β -lactoglobulin variant, og dermed den mest udfoldede i grænsefladen, derfor et voluminøst skum. Adsorberes ssv. som monomer, hvorfor grænsefladeegenskaberne ikke stiger så kraftigt som for B-varianten (lavere koncentration).
α -lactalbumin	B	Mindre end A	Kraftig stigning efter ca. 3 timer.	Knap som voluminøst som A, men mere stabilt.	Mindre fleksibel (mindre udfoldet). Adsorberes som dimer (stærkt grænsefladelag, stabilt skum).
α_{S1} -kasein		Mindre end β -lactoglobulin	Langsom stigning efter ca. 7 timer	Et voluminøst men meget ustabil skum.	Dårlig udfoldning, men et mindre molekyle end β -lactoglobulin, hvorfor der ses en tilsvarende voluminositet. Ingen mulighed for S-S bindinger, derfor et ustabil skum.
β -kasein	A1	Lidt mindre end β -kasein A2	Som β -kasein A1	Voluminøst og relativt stabilt skum	Fleksibelt molekyle, ujævn ladningsfordeling, hvilket medfører gode grænsefladeegenskaber og et godt skum.
β -kasein	A2	Mest af alle mælkeproteinerne	Stigning efter 1-2 timer, derefter næsten jævnt niveau	Voluminøst og relativt stabilt skum.	Fleksibelt molekyle, ujævn ladningsfordeling, hvilket medfører gode grænsefladeegenskaber og et godt skum.
β -kasein	A2	Lidt mindre end A1	Starter på højt niveau, falder, for så igen at stige, hvorefter niveauet falder svagt.	Ikke særlig voluminøst, og ustabil skum.	En prolin mere, dvs et ekstra knæk i strukturen. Betyder muligvis at der kan ske reorganisering og/eller desorption i grænsefladen, hvorfor der dannes et ustabil skum.
κ -kasein		? (Meget lidt)	Stigning først efter 14-16 timer	Meget dårlig skumdanner	Mange uopløselige aggregater i præparatet – derfor ringe adsorption til grænsefladen.

5.2 Forsøg med begrænset hydrolyse af β -lactoglobulin

Der er, som nævnt i afsnit 3, indicier for, at en begrænset hydrolyse med en bakteriel protease kan forbedre valleproteins grænsefladeegenskaber. Vi har derfor udført en række forsøg med denne protease (BLP, isoleret fra *Bacillus licheniformis*), og β -lactoglobulin (A-varianten, β -Lg A).

Der blev brugt kapillar elektroforese til karakterisering af hydrolysen. Figur 5 viser resultaterne for hydrolyse af β -Lg A til forskellig tid. Det blev beregnet, at fra 19 til 86% af det oprindelige β -Lg A var nedbrudt efter hydrolyse fra 30 min. til 24 timer.

Skumegenskaberne af de hydrolyserede prøver er vist i Figur 6. Det ses, at alle de hydrolyserede prøver havde et højere overrun (skumvolumen) lige efter fremstilling end det intakte β -Lg A. Den mest skånsomt hydrolyserede prøve (19% nedbrydning af β -Lg A), havde det højeste overrun. Dette skum var dog også det, der havde den dårligste stabilitet. Forøget hydrolysegrad gave bedre skumstabilitet, mest tydeligt for den mest hydrolyserede prøve (86% nedbrydning af β -Lg A).

De reologiske egenskaber i grænsefladen er vist i figur 7, hvoraf det fremgår at en begrænset hydrolyse (19-26% nedbrydning af β -Lg A) førte til en højere viskositet i grænsefladen umiddelbart efter at målingen påbegyndte (Figur 7A). Dette kan skyldes, at hydrolyse med BLP forårsager eksponering af hydrofobe områder på proteinet (Otte et al, 1997), hvorved der kan opnås en bedre affinitet og en hurtigere adsorption til grænsefladen. En mere udstrakt hydrolyse førte imidlertid til en meget langsommere begyndende stigning i grænseflade-viskositeten, og en lavere maksimumværdi. Det skal dog bemærkes at den prøve, der var hydrolyseret til 46% nedbrydning af β -Lg A, fortsatte med at stige i hele måleperioden (12 timer). Tendenserne for udvikling af det elastiske modul i grænsefladen (Figur 7B) lignede den ovenfor beskrevne udvikling for viskositeten i grænsefladen.

Både viskositet og elastisk modul i grænsefladen passerede gennem et maksimum for de fleste prøver. Dette er i overensstemmelse med, hvad andre har fundet (Krägel et al, 1995; Wüstneck et al, 1996) og antyder at proteinets adsorption til grænsefladen bliver fulgt af omlejring og/eller desorption. Den stejle stigning i starten kan henføres til at peptiderne adsorberes, udfoldes og danner et sammenhængende lag i grænsefladen. Dette vil føre til et stigende grænsefladetryk, hvorved en ændring i grænsefladens sammensætning kan forventes og nogen peptider vil kunne

erstattes af andre, der har bedre evne til at øge grænsefladetrykket. Det anvendte præparat indeholdt dog 0,17% lipider, og det er muligt at overfladeaktivt materiale (såsom frie fedtsyrer) har været tilstede og ved at konkurrere om adsorptionen har medvirket til faldet i grænseflade-viskositet og – elasticitet. De prøver der kun var hydrolyseret lidt (19-25% nedbrydning af β -Lg A) havde en lidt hurtigere stigning i de viskoelastiske egenskaber i grænsefladen, sammenlignet med intakt β -Lg A. Dette kunne skyldes den anførte eksponering af hydrofobe dele af proteinet, men førte ikke til dannelse af et grænsefladelag med forøget mekanisk styrke. Yderligere hydrolyse førte til et fald i stigningstakten for de viskoelastiske egenskaber, sandsynligvis fordi der her var en række peptider med lav molekylvægt tilstede. Sådanne små peptider har en mindre elastisk respons end intakt protein, og har færre muligheder for interaktioner. Til gengæld vil deres tilstedeværelse medføre en hurtigere ændring af grænsefladespændingen, hvorved der dannes mindre skumbobler. Dette kan være forklaringen på det forøgede overrun vi observerede for alle de hydrolyserede prøver.

Vores resultater viser klart, at en hurtig stigning i de viskoelastiske egenskaber i en luft-vand grænseflade, eller en høj maksimumværdi for disse egenskaber, ikke nødvendigvis fører til dannelse af et stabilt skum. Der er da også stor forskel på at måle i et stillestående system (grænseflade egenskaber) og i et system der bliver kraftig mekanisk bearbejdet (skumegenskaber). Der kan dog forventes en vis sammenhæng, idet skumstabilitet bl.a. afhænger af brud på det proteinlag der omslutter den enkelte luftbobbel, samt af diffusion og den deraf følgende ændring i størrelsen af skumboblerne. For de intakte proteiner (afsnit 5.1), hvor de anvendte systemer var meget homogene er der da også fundet tydeligere sammenhænge, end ved hydrolyse, hvor det er et meget blandet system der opstår som resultat af enzymets indvirkning på proteinet. Vi har dog vist, at hydrolyse kan forøge et proteinskums stabilitet, og dette kan muligvis skyldes den forøgede molekylære fleksibilitet de opståede peptider besidder i forhold til det intakte protein. Muligvis kan det også spille en rolle at de opståede peptider danner aggregater ved lang tids hydrolyse (Figur 5). Fremtidige studier bør suppleres med målinger af skumstrukturens ændring over tid, for også at inddrage den indvirkning skumstrukturen har på stabiliteten.

5.3 Samlet konklusion

Projektet har vist at der er markante forskelle på grænsefladeegenskaberne af forskellige genetiske varianter af mælkeproteiner (β -lactoglobulin A og B samt β -kasein A1 og A2), og at dette påvirker

proteinernes skumegenskaber. Dette kan muligvis henføres til strukturelle forskelligheder mellem de genetiske varianter. Desuden er det vist at en begrænset hydrolyse med en protease fra *Bacillus licheniformis* kan forbedre skumdannelsen, uden at der dog var en klar sammenhæng mellem skumegenskaber og de viskoelastiske egenskaber målt i en luft-vand grænseflade.

Projektet har påbegyndt arbejdet med at afklare sammenhængen mellem mælkeproteiner struktur, deres egenskaber i grænseflader og deres opførsel i mere kommercielt relevante systemer (skum), men er kun nået et stykke af vejen. Specielt skal det fremhæves at fremtidig forskning på dette område også bør omfatte undersøgelser af ændringer i skumstruktur over tid.

Referencer:

- Althouse, P.J., Dinakar, P., & Kilara, A. 1995 Screening of proteolytic enzymes to enhance foaming of whey protein isolates. *Journal of Food Science* **60** 1110-1112
- Boye, J.I., Ma, C-Y., Ismail, A., Harwalkar, V.R. & Kalab M. 1997 Molecular and Microstructural Studies of Thermal Denaturation and Gelation of β -Lactoglobulins A and B *J. Agric. Food Chem.* **45** 1608-1618
- Caessens, P.W.J.R., Gruppen, H., Visser, S., van Aken, G.A. & Voragen, A.G.J. 1997 Plasmin hydrolysis of beta-casein: foaming and emulsifying properties of the fractionated hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **45** 2935-2941
- Cayot, P., Courthaudon, J.L. & Lorient, D. 1992 Purification of alfa-S-casein, beta-casein and kappa-casein by batchwise ion-exchange separation, *Journal of Dairy Research* **59** (4) 551-556
- Euston, S.R., Hirst, R.L. & Hill, J.P. 1999 The emulsifying properties of β -lactoglobulin genetic variants A, B and C *Colloids and Surfaces B* **12** 193-202
- Gauthier, S.F., Paquin, P., Pouliot, Y., & Turgeon, S. 1993 Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science* **76** 321-328
- Girardet, J.M., Debomy, L., Courthaudon, J-L., Miclo, L., Humbert, G. & Gaillard, J-L. 2000 Viscoelastic properties of oil-water interfaces covered by bovine β -casein tryptic peptides *Journal of Dairy Science* **83** 2410-2421
- Kristiansen, K.R., Otte, J., Ipsen, R. and Qvist, K.B. 1998. *Large scale preparation of β -lactoglobulin A and B by ultrafiltration and ion exchange chromatography.* *Int. Dairy J.* 8 (2): 113-118.
- Krägel, J., Wüstneck, R., Clark, D., Wilde, P., Miller, R. 1995 Dynamic surface tension shear rheology studies of mixed β -lactoglobulin/Tween 20 systems *Colloids and Surfaces A* **98** 127-135.
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., and Kilara, A. 1995 Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. *Journal of Food Science* **60** 1104-1109
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., and Kilara, A. 1996 Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science* **61** 270-274 & 303
- Otte, J., Lomholt, S.B., Ipsen, R., Stapelfeldt, H., Bukrinsky, J.T., and Qvist, K.B. 1997 Aggregate formation during hydrolysis of beta-lactoglobulin with a Glu and Asp specific protease from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** 4889-4896
- Williams, A. & Prins, A. 1996 Comparison of the dilatational behaviour of adsorbed milk proteins at the air-water and oil-water interfaces, *Colloids and Surfaces A* **114** 267-275.

Wüstneck, R., Krägel, J., Miller, R., Clark, D., Wilde, P. 1996 The adsorption of surface-active complexes between β -casein, β -lactoglobulin and ionic surfactants and their shear rheological behaviour *Colloids and Surfaces A* **114** 255-265.

6. Publikationer

6.1 Internationale tidsskrifter

Ipsen, R., Otte, J., Sharma, R., Nielsen, A. Hansen L.G. & Qvist K.B. 2001 *Effect of limited hydrolysis on interfacial and foaming properties of β -lactoglobulin A* *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **21 (1-3)** 173-178; *in press*.

Desuden er en artikel om intakte proteiners grænsefladeegenskaber og skumdannelse under udarbejdelse.

6.2 Posters på kongresser mv.

Ipsen, R., Hansen, L.G., Otte, J. & Qvist K.B. 2000 *Understanding how milk proteins behave at the air-water interface: Interfacial rheometry*. Poster præsenteret ved Levnedsmiddelkongressen, DTU, Lyngby, 26-27/1 2000.

Ipsen, R., Otte, J. & Qvist K.B. 2000 *Rheology of intact and partially hydrolysed β -lactoglobulin at the air-water interface*. Poster præsenteret ved Food Colloids, Potsdam, 2-5/4 2000.

6.3 Faglige artikler

Mælkeproteiner og skum – artikel til *Mælkeritidende*; Under udarbejdelse.

6.4 Mødeindlæg

Richard Ipsen, Jeanette Otte & Karsten Bruun Qvist 2000 *Surface rheology of selected intact and hydrolysed milk proteins at the air-water interface* Foredrag ved NorFA sponsored workshop on Milk Proteins – Structure and Functional Properties, Wadahl, Norge, 30/3-1/4 2000.

7. Forskeruddannelse

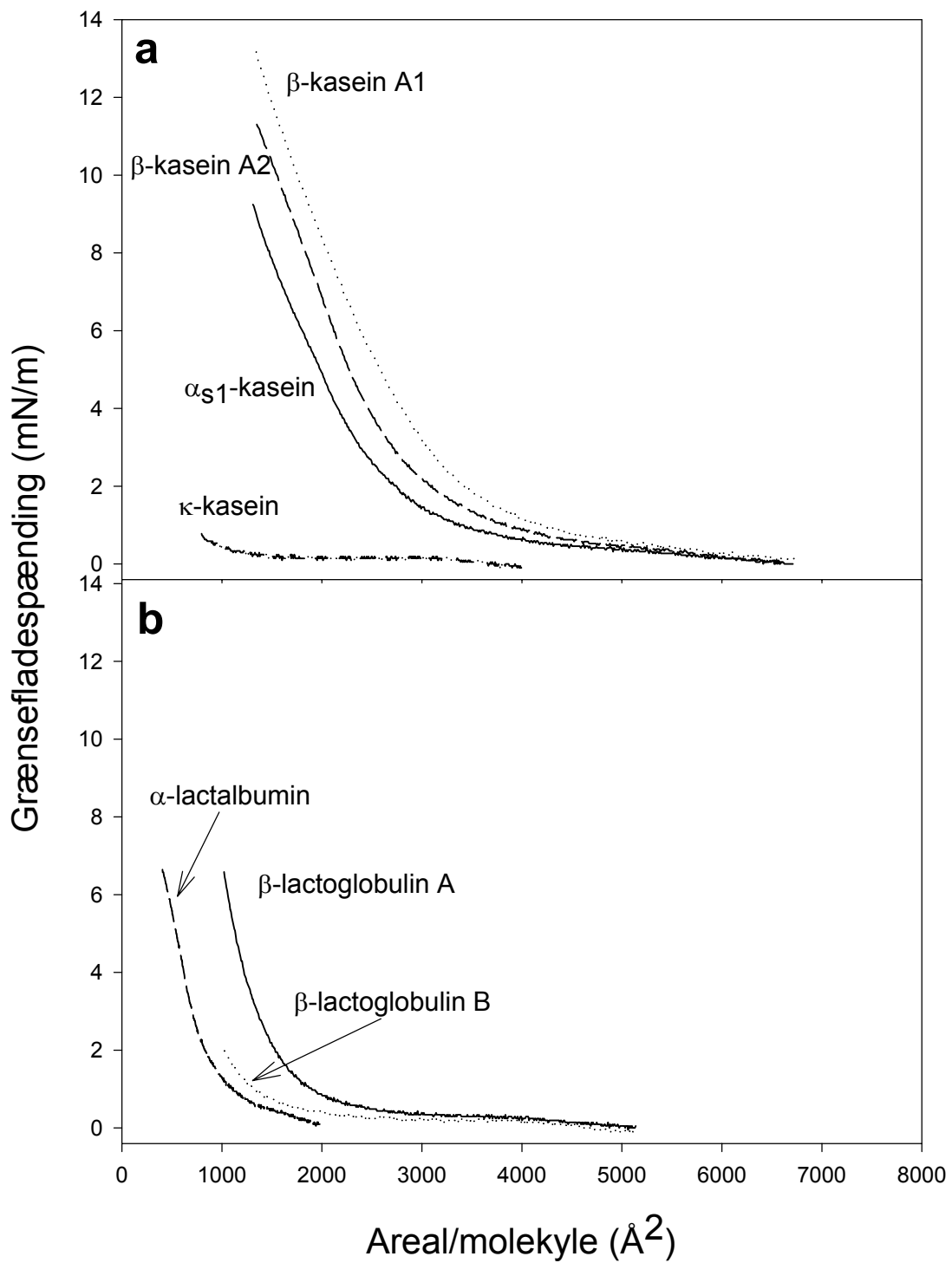
Der har ikke været forskeruddannelse i forbindelse med projektet.

8. Samarbejdsrelationer

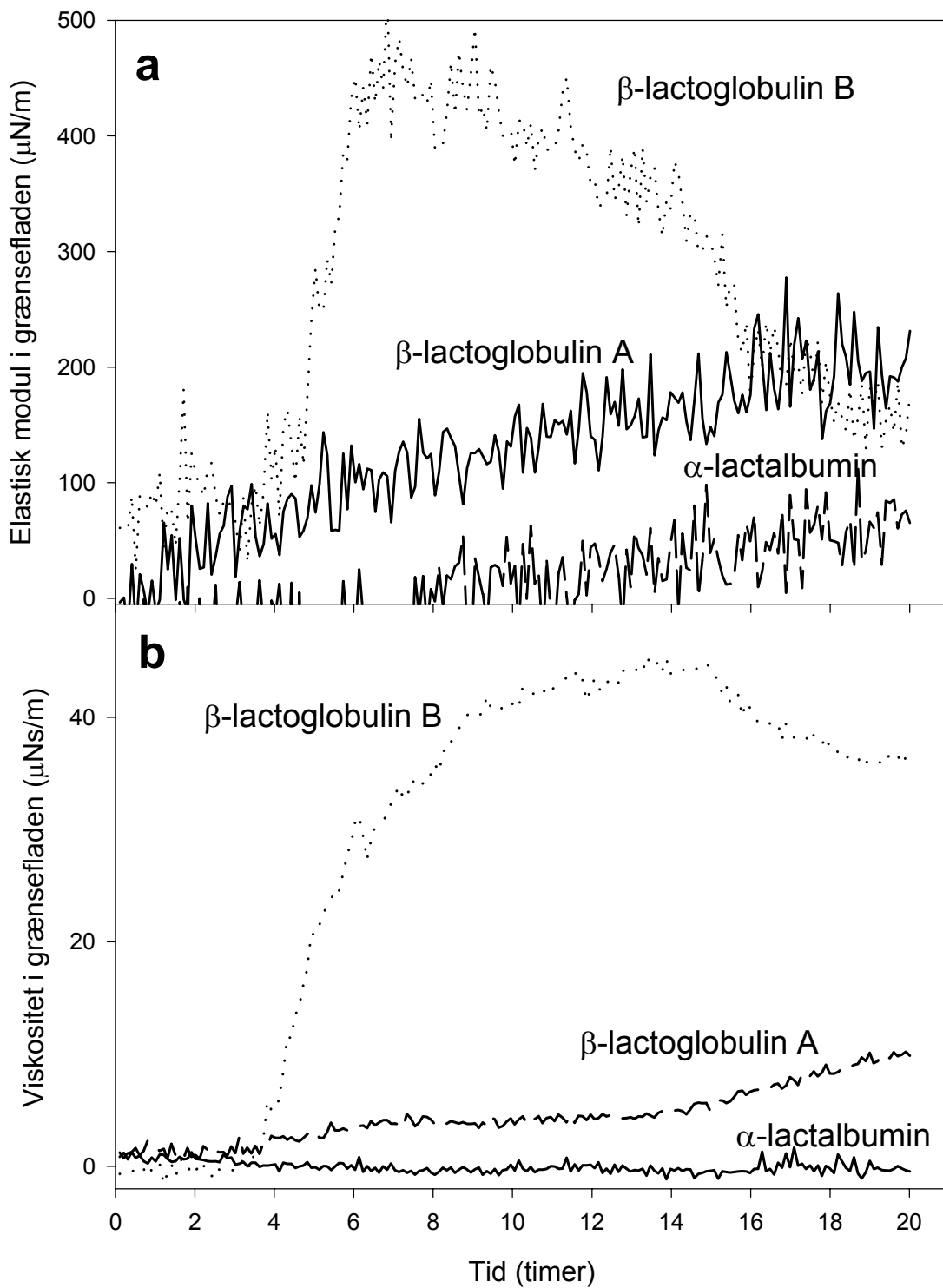
I forbindelse med projektet har der været deltagelse i et nordisk, NorFA sponsoreret netværk (Milk Proteins – Structure and Functional Properties).

NOVO Nordisk har leveret det anvendte enzym (BLP).

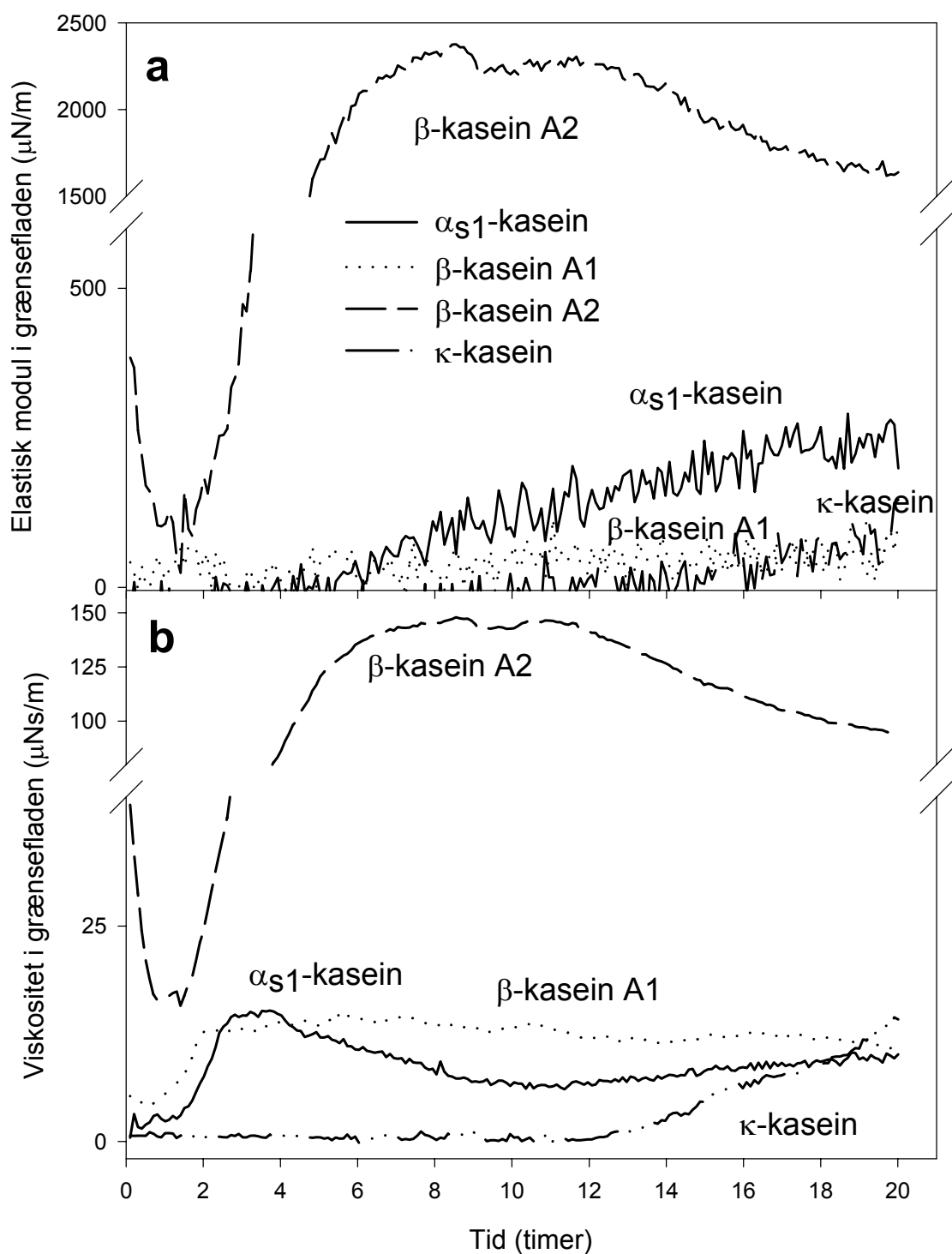
Professor Anders Andrén og Dr. Toomas Allmere, Sveriges Landbrugsuniversitet, Uppsala, har medvirket i forbindelse med fremskaffelse af mælk med forskellige genetiske varianter af kasein.



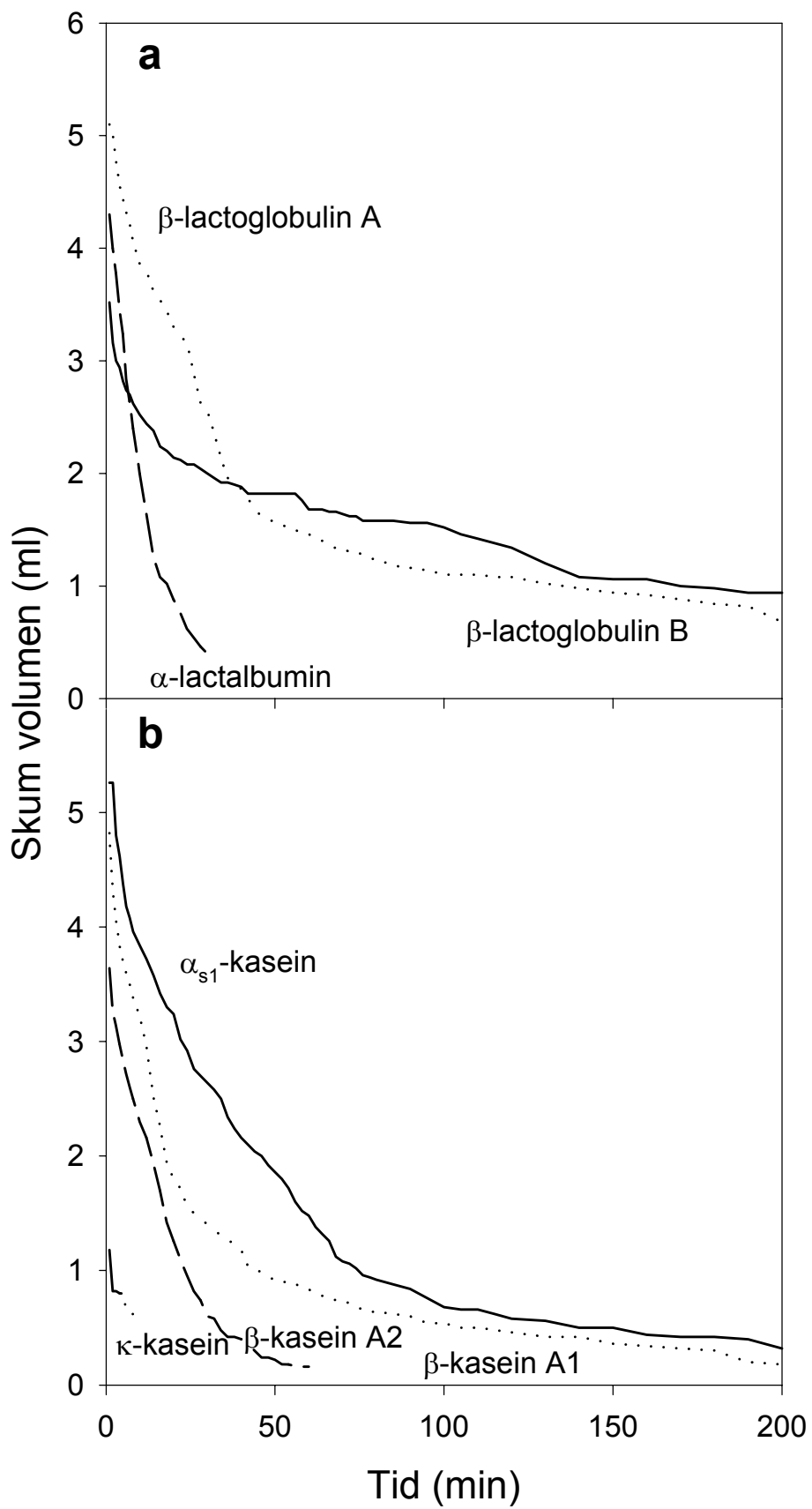
Figur 1: Π -A isotermer (Langmuir-trug) for oprensede mælkeproteiner. **a**: kaseiner **b**: valleproteiner.



Figur 2: Reologiske egenskaber i luft-vand grænseflader for oprensede valleproteiner. **a**: Elastisk modul i grænsefladen **b**: grænsefladeviskositet

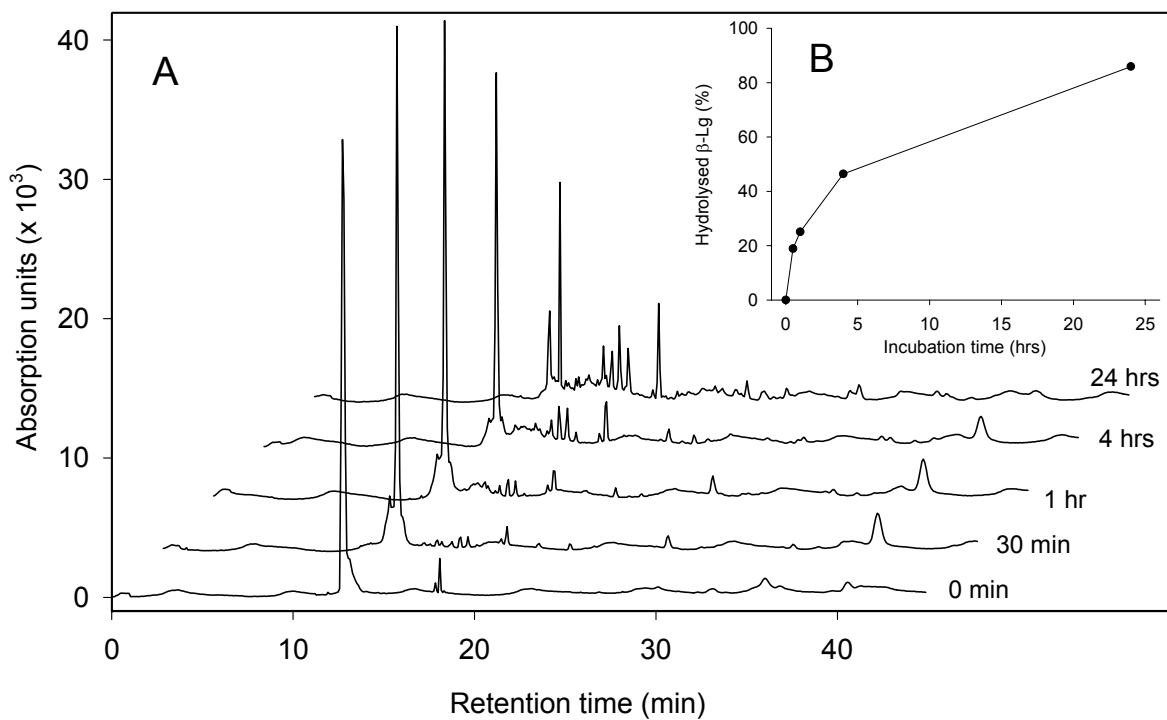


Figur 3: Reologiske egenskaber i luft-vand grænseflader for oprensedede kaseiner. **a**: Elastisk modul i grænsefladen **b**: grænsefladeviskositet

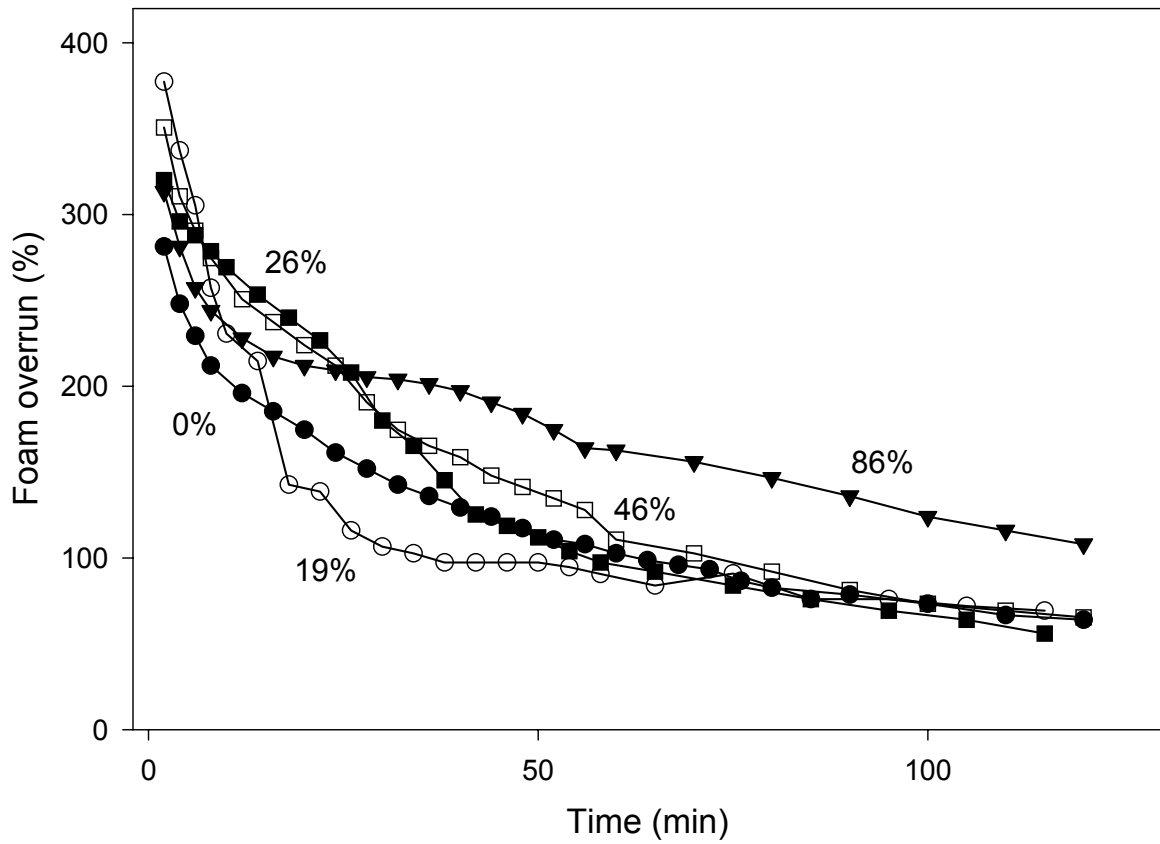


Figur

Skumvolumen for oprensede mælkeproteiner. **a**: kaseiner **b**: valleproteiner.

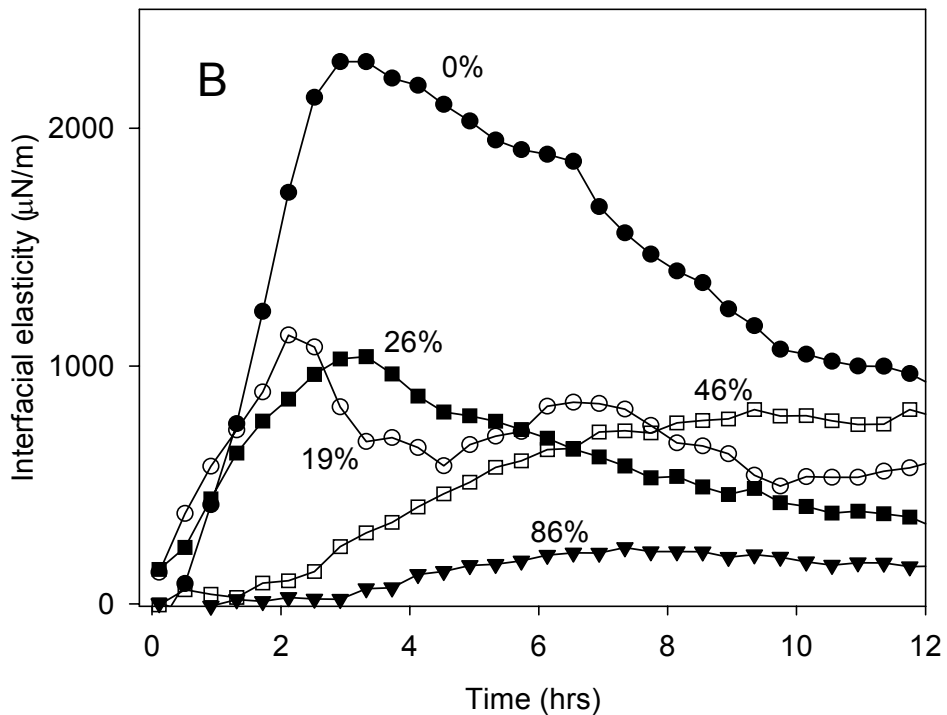
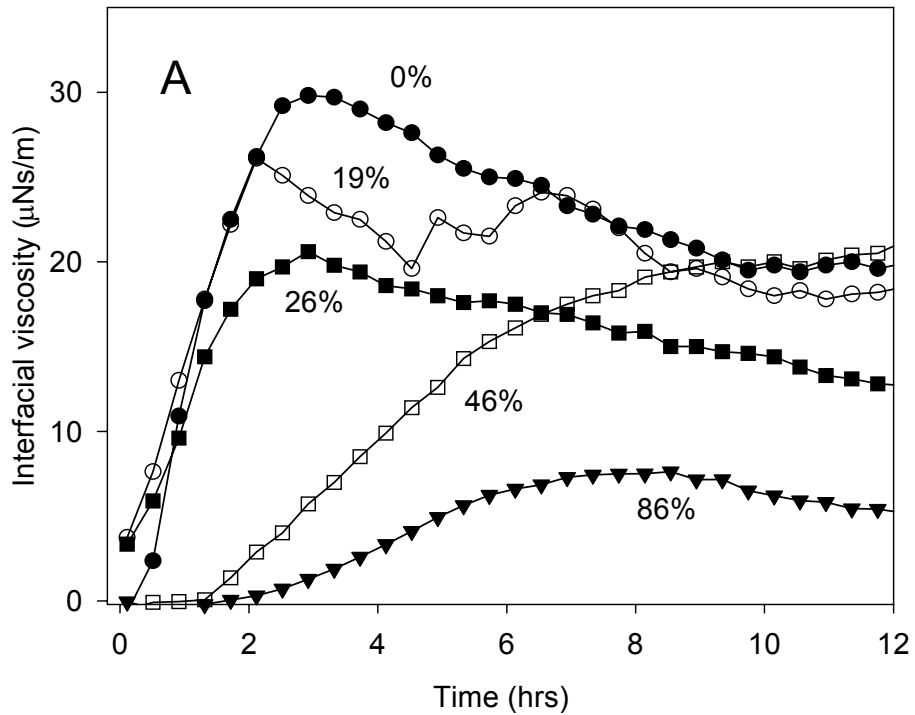


Figur 5: Kapillar elektroforese (A) og nedbrydning (%) af β -Lg A (B) i opløsninger (10 mg/mL) af β -Lg A inkuberet ved 37°C pH 7.5 med protease fra *Bacillus licheniformis* (enzym/substrat forhold 0.01) i varierende tid.



Figur 6: Overrun (skumvolumen) ved henstand for skum dannet af 0,5% β -Lg opløsninger hydrolyseret med protease fra *Bacillus licheniformis* (enzym/substrat forhold 0,01, 37 °C, pH 7,5) i forskellig grad.

● 0% hydrolyse ○ 19% hydrolyse ■ 25% hydrolyse □ 46% hydrolyse ▼ 86% hydrolyse



Figur

7:

Viskositet (A) og elastisk modul (B) i grænsefladen for 0,001% β -Lg A opløsninger hydrolyseret med protease fra *Bacillus licheniformis* (enzym/substrat forhold 0,01, 37 °C, pH 7,5) i forskellig grad.

● 0% hydrolyse ○ 19% hydrolyse ■ 25% hydrolyse □ 46% hydrolyse ▼ 86% hydrolyse

