

Afslutningsrapport

Forbedring af valleproteiners geldannelse
gennem enzymatisk behandling

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1999-29

December 1999



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til Mejeribrugets Forskningsfond for projektet

Forbedring af valleproteiners geldannelse gennem enzymatisk behandling

Richard Ipsen
Karsten Bruun Qvist

Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet
Mejeriområdet
Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole
Frederiksberg
1999

1. Sammendrag

Det har vist sig muligt at fremstille geler, uden termisk behandling, ud fra valleprotein ved hjælp af en særlig protease. Denne protease (BLP) er isoleret fra *Bacillus licheniformis* og er specifik overfor peptid-bindinger, der indeholder glutaminsyre eller asparaginsyre.

Nærværende projekt har vist at BLP er i stand til at danne geler ved temperaturer fra 40-80°C. Den maksimale gel-stivhed blev fundet ved 75 °C. Geler fremstillet ved 50 og 60°C havde en meget åben struktur, mens højere temperaturer gav tættere geler med mindre porer.

Forskellen i geleringsmekanisme mellem ikke-varmebehandlet og varmebehandlet (80°C/30 min.) valleprotein blev belyst ved forsøg med forskellig enzymkoncentration, temperatur og pH. For ikke-varmebehandlet protein giver hydrolysen anledning til, at en blanding af peptider aggregerer til større enheder, der til slut danner et netværk. Både proteolysen og aggregeringen har betydning for geldannelsen. Forsøg med måling af egenviskositeten i opløsninger af β -lactoglobulin tyder således også på at hydrolyse med BLP fører til en hurtig udfoldning af proteinmolekylerne efterfulgt af yderligere spaltning til peptider, der derefter aggregerer. I det varmebehandlede protein, derimod, fjerner hydrolysen primært hydrofile enheder på de termiske aggregater og derved give anledning til, at der opstår hydrofobe områder der kan danne hydrofobe interaktioner til tilsvarende områder på andre aggregater. Herved bliver proteolysen (og ikke aggregeringen) styrende for geleringen. Confocal laser scanning mikroskopi af gelerende valleprotein understøtter disse forskelle i mekanisme.

pH viste sig at have indflydelse på den BLP-inducerede geldannelse, således at graden af proteolyse i gelpunktet var højest ved høj pH. Når pH nærmede sig det isoelektriske punkt, indtrådte geldannelsen ved lavere grad af proteolyse, uanset om valleproteinet havde været varmebehandlet eller ej. Dette skyldes sandsynligvis den reducerede elektrostatiske frastødning mellem enkeltmolekyler eller samlinger af molekyler. Gelstivheden faldt med pH. En tilsvarende virkning blev set ved salttilsætning (NaCl, CaCl₂), der også reducerede den elektrostatiske frastødning og dermed geltiden. De resulterende geler var mere bløde og koagelagtige end geler fremstillet uden salttilsætning

α -lactalbumin dannede geler med BLP meget hurtigere end β -lactoglobulin. De resulterende geler var næsten gennemsigtige og desuden meget stærkere end tilsvarende β -lactoglobulin geler. Blandinger af valleproteiner, derimod, viste sig af have ringere geldannelsesevne end de rene proteiner. Uden tilsætning af Ca²⁺ dannede α -lactalbumin geler med en stivhed på omkring 2500 Pa i 10% opløsninger (6-8 gange mere end β -lactoglobulin) Ved tilsætning af Ca²⁺ forstærkedes gel stivheden, således at der blev opnået geler med en gelstivhed i 10% opløsninger på 20-35.000 Pa (25 °C), højest ved tilsætning af 50-100 mM Calcium. Gelstivheden var maksimal umiddelbart efter hydrolysen ved 50 °C, og faldt så noget da gelerne blev afkølet til 25 °C. Dette tyder på, at elektrostatiske interaktioner spiller en væsentlig rolle for denne geldannelse, f.eks. ved at Ca²⁺ sammenbinder hydrolyseret α -lactalbumin til tynde strenge, der så danner transparente geler. Elektronmikroskopi har således vist at mikrostrukturen i disse geler er karakteriseret ved lange (1-2 μ m) strenge med en konstant diameter på ca. 20 nm.

2. English summary

It is possible, without thermal treatment, to induce gelation in whey protein by using a specific protease isolated from *Bacillus licheniformis* specific towards cleaving of peptide-bonds containing glutamic or aspartic acid.

The present project has shown that BLP is able to induce gelation at temperatures ranging from 40 to 80°C. The maximal gel strength was found at 75 °C. Gels made at 50 or 60 °C exhibited a very open structure, whereas higher temperatures resulted in denser gels with smaller pores.

Differences in the mechanism of gelation between unheated and thermally treated (80 °C/30 min.) whey protein were investigated by experiments at different enzyme concentration, temperature and pH. Hydrolysis of unheated whey protein results in a mixture of peptides that aggregate to larger units and finally comprises a gel network. Proteolysis as well as aggregation has influence on the gelation. Measurements of intrinsic viscosity in solutions of β -lactoglobulin indicate that hydrolysis using BLP results in a fast unfolding of the protein molecules followed by degradation to peptides and aggregation. In the heat-treated protein, however, hydrolysis using BLP progressively shaves off hydrophilic peptide segments from the soluble aggregates present in this substrate, resulting in an increased attraction between individual aggregates, leading to gelation. Proteolysis (and not aggregation) thus controls gelation. Confocal laser scanning microscopy of gelling whey protein supports these implied differences in mechanism.

pH was shown to exert influence on the BLP-induced gelation. The degree of hydrolysis increased with pH and when pH approached the isoelectric point, gelation took place at lower levels of proteolysis, irrespective of whether the whey protein had been thermally treated or not. This is probably caused by the reduced electrostatic repulsion between individual molecules or assemblies of molecules. The gel strength was reduced when the pH decreased. A similar effect was seen when salts (NaCl, CaCl₂) were added, which also reduced the electrostatic repulsion and hence the time of gelation. The resulting gels were softer and more like coagula than gels made without addition of salts.

BLP induced gelation in α -lactalbumin much faster than in β -lactoglobulin. The resulting gels were almost transparent and much stronger than equivalent β -lactoglobulin gels. Mixtures of whey protein, however, exhibited reduced gelation ability compared with the pure proteins. When no Ca²⁺ was added, hydrolysis of α -lactalbumin resulted in gels with a stiffness of about 2500 Pa in 10% solutions (6-8 times more than β -lactoglobulin). When Ca²⁺ was added, the gel stiffness was increased, resulting in gels with a stiffness in 10% solutions of 20-35.000 Pa (25 °C), with a maximum at a level of 50-100 mM calcium added. The gel stiffness was maximal immediately after hydrolysis at 50 °C, and then it decreased somewhat when the gels were cooled down to 25 °C, indicating that electrostatic interactions could play an important role, i.e. hydrolysed α -lactalbumin could possibly be bonded together by Ca²⁺ in a fine-stranded network. Electronmicroscopy of these gels have thus shown that the microstructure is dominated by long (1-2 μ m) strands with a diameter of approx. 20 nm.

3. Formål

Formålet med projektet har været at belyse, hvorledes proteolyse af valleprotein med et enzym med en særlig specificitet, i samspil med andre faktorer påvirker valleproteins geldannelse, samt strukturen af de opnåede geler. Hensigten har været at opnå en øget forståelse for samspillet mellem struktur og funktionalitet i geler, samt at skabe mulighed for en bedre udnyttelse af valleproteinernes evne til geldannelse.

4. Baggrund

Valleprotein har en høj næringsværdi og gode funktionelle egenskaber, hvilket danner grundlaget for en omfattende industriel produktion af valleprotein koncentrat og isolater. Valleproteins evne til at danne gel ved opvarmning udnyttes bl.a. i kød- og bageriindustrien.

For at kunne skræddersy valleproteins funktionalitet i relation til en given anvendelse er der en række muligheder for at modificere proteinet:

Kemisk modifikation har været studeret ret intensivt og har potentiale til at ændre stort set alle de funktionelle egenskaber. Anvendelse i levnedsmidler er imidlertid betænkeligt ud fra en ernærings- og sikkerhedsmæssig vurdering.

Fysisk modifikation kan ske ved hjælp af varme og tryk. Det er velkendt, at valleprotein kan bringes

til at gelere ved termisk behandling, og at forhold som calciumtilsætning, pH og ionstyrke har indflydelse på denne proces. Ved at kontrollere disse faktorer er det bl.a. muligt at fremstille koldgelerende valleproteinprodukter. Højt tryk kan også anvendes til at inducere geldannelse i valleprotein.

Enzymatisk modifikation af valleprotein kan påvirke de funktionelle egenskaber enten ved krydsbindingsreaktioner, ved spaltning (proteolyse) eller ved modifikation af aminosyresidekæder. Krydsbinding ved hjælp af transglutaminase kan f.eks., anvendes til forbedring af syrnede mælkeprodukters koagelegenskaber. Virkningen af proteolyse på den termiske geldannelse af valleprotein har hidtil kun været meget lidt undersøgt, men tidligere undersøgelser på Institut for Mejeriforskning viste at det er muligt at fremstille geler ved hjælp af en særlig protease. Denne protease (BLP) er isoleret fra *Bacillus licheniformis* og er en serin protease, der er specifik overfor peptid-bindinger, der indeholder glutaminsyre eller asparaginsyre. BLP inducerede geler var op til ti gange stærkere end geler fremstillet uden enzym, og der kunne iagttages betydelige ændringer i mikrostrukturen.

Det har derfor været et væsentligt mål i det nærværende projekt at afklare, hvorledes proteolysen med BLP i samspil med en række andre faktorer (pH, varmebehandlingsintensitet, calciumtilsætning) regulerer valleproteins geldannelse.

5. Resultater:

5.1 Mekanisme for den enzymatiske geldannelse og varmebehandlingens indflydelse

Forsøg med samtidig anvendelse af BLP og varme blev foretaget med β -lactoglobulin og valleproteinisolat (WPI) ved forskellige proteinkoncentrationer (7-20%) og temperaturer (40-80 °C). BLP er i stand til at danne geler ved 40 °C, og at der blev opnået en maksimal gelstivhed ved 75 °C. Kontrolprøver med denatureret BLP tilsat dannede ikke gel ved temperaturer under 60 °C, men de dannede geler var stivere ved 75 og muligvis 80 °C. Strukturen af de dannede geler blev undersøgt med transmission-elektron-mikroskopi (TEM) og geler fremstillet ved 50 og 60 °C havde en meget åben struktur, mens højere temperaturer gav tættere geler med mindre porer [6,9,12].

Ovenstående resultater blev sammenholdt med målinger af hydrolysen og resultaterne pegede på, at mekanismen for den enzym-inducerede gelering var den samme ved 40-60 °C, hvor β -lactoglobulin primært er på nativ form. Her er det sandsynligvis mængden af dannede peptider med evne til at danne aggregater, der styrer gelernes struktur og stivhed. Når temperaturen er 70 °C og derover ændres mekanismen, og geldannelsen følger samme mønster, som hvis der tilsættes BLP til varmebehandlet valleprotein. Dannelsen af gelen sker hurtigt ved disse temperaturer, sandsynligvis fordi der dannes termiske aggregater og der er forøget aggregeringshastighed ved høje temperaturer. Til gengæld har disse geler ikke nødvendigvis den største stivhed.

Forskellen i mekanisme mellem ikke-varmebehandlet og varmebehandlet (80 °C/30 min.) valleprotein er yderligere blevet belyst ved forsøg med varmebehandlet og ikke-varmebehandlet valleprotein isolat [3]. Forsøg ved forskellig enzymkoncentration (*Figur 1*), temperatur og pH har illustreret, at for ikke-varmebehandlet WPI er det ikke kun proteolysen, der er af betydning for geldannelsen, men der er en hastighedsbegrænsende aggregeringsfase, der ikke er tilstede når der anvendes varmebehandlet (denatureret) valleprotein. En forøgelse af temperaturen for hydrolyse fra 40 to 60 °C havde ingen signifikant indflydelse på graden af proteolyse ved geldannelse for ikke-varmebehandlet WPI (30-31% målt som frigivne peptider [3], *Figur 2*). Dette er i overensstemmelse med, at aggregeringen er det hastighedsbegrænsende trin i dette tilfælde. I varmebehandlet WPI, derimod, førte en øget temperatur under hydrolysen til en mindre proteolyse ved geldannelse (fra ca. 24% frigivne peptider ved 40 °C til 16% ved 60 °C). Dette skyldes sandsynligvis at der eksponeres hydrofobe områder ved denatureringen, og at hydrofobe interaktioner spiller en væsentlig rolle ved den enzym inducerede geldannelse af valleprotein.

Der er desuden lavet en række billeder af geldannelsen ved hjælp af confocal laser scanning mikroskopi (CSLM), og disse billeder viser (*Figur 3*) at det varmebehandlede protein danner en tæt aggregeret struktur umiddelbart efter gelpunktet, hvorimod det ikke-varmebehandlede præparat udviser en vis aggregeringstid inden gelstrukturen er færdigdannet.

Disse resultater kan sammenfattes i en teori om, hvorledes BLP indvirker på valleprotein med geldannelse til følge :

For ikke-varmebehandlet protein giver hydrolysen anledning til, at en blanding af peptider aggregerer til større enheder der til slut danner et netværk. Både proteolysen og aggregeringen har betydning for geldannelsen. Forsøg med måling af egenviskositeten (intrinsic viscosity)[2,10] i opløsninger af β -lactoglobulin tyder således også på at hydrolyse med BLP fører til en hurtig udfoldning af proteinmolekylerne efterfulgt af yderligere spaltning til peptider, der derefter aggregerer.

I det varmebehandlede protein, derimod, sker der sandsynligvis det, at hydrolysen primært fjerner hydrofile enheder på de termiske aggregater og derved give anledning til at der opstår hydrofobe områder der kan danne hydrofobe interaktioner til tilsvarende områder på andre aggregater. Herved bliver proteolysen (og ikke aggregeringen) styrende for geleringen.

5.2 pH og salttilsætningens betydning for geldannelsen med BLP

pH havde indflydelse på den BLP-inducerede geldannelse af WPI således at graden af proteolyse i gelpunktet var højest ved høj pH [3]. Når pH nærmede sig det isoelektriske punkt, indtrådte geldannelsen ved lavere grad af proteolyse, uanset om WPI havde været varmebehandlet eller ej. Dette skyldes sandsynligvis den reducerede elektrostatiske frastødning mellem enkeltmolekyler eller samlinger af molekyler. Denatureret, uhydrolyseret WPI dannede en gel når pH blev justeret til under 6,2, og geleringstiden steg med pH for disse opløsninger, hvilket tyder på at proteinernes ladning har en afgørende rolle [7]. Gelstivheden faldt med pH.

Tilsætning af NaCl førte til gelering ved lavere grader af proteolyse end i WPI opløsninger uden salt. I opløsninger med 10 mM NaCl tilsat var der ca. 14% frigivne peptider tilstede ved geldannelsen, mod ca. 30% i en opløsning uden salt [3,4], idet tilsætning af salt forårsager en reduktion af den elektrostatiske frastødning. En reduktion i geltiden blev også set ved tilsætning af CaCl₂, således faldt den fra 84 min. til 9 min ved 15mM CaCl₂ [4]. CaCl₂ havde ingen indflydelse på hydrolysen med BLP og virkningen må derfor henføres til reduktion af den elektrostatiske frastødning, som ved tilsætning af NaCl. Geler fremstillet med salttilsætning var blødere og mere koagelagtige end geler fremstillet uden salttilsætning.

5.3 Hydrolyse af blandinger af vallepotein (α -lactalbumin β -lactoglobulin)

For at undersøge, hvorledes de enkelte vallepoteiner reagerede på hydrolyse med BLP blev blandinger af α -lactalbumin (a-La) og β -lactoglobulin (b-Lg) fremstillet med forskelligt blandingsforhold (0%, 33%, 66% og 100% a-La) og undersøgt med hensyn til hydrolyse (dannelse af peptider og polymerer ud fra de oprindelige proteiner) og geldannelse. a-La har kun ringe indflydelse på BLP's hydrolyse af b-Lg, mens der er en tydelig inhibering af a-La's hydrolyse når der er tilsat b-Lg, muligvis på grund af kompetitiv inhibering [11].

Det anvendte a-La var et præparat, der er blevet fremstillet på KVL ved en proces hvor pH bringes ned under 4,6 og temperaturen holdes under 50 °C. Dette præparat indeholder kun meget lidt Ca, og a-La befinder sig på en mere fleksibel form (apo-form) end hvis der er Ca tilstede, der fastholder proteinet i en mere ordnet form (holo-form). Denne a-La viste sig at være i stand til at danne geler med BLP meget hurtigere end ved anvendelse af ren b-Lg (*Figur 4*). De resulterende geler var desuden meget stærkere end tilsvarende b-Lg geler [11]. Blandingerne af vallepoteiner, derimod, viste sig af have ringere geldannelsesevne end de rene proteiner. Faktisk kunne opløsningen med 66% a-La slet ikke danne en målbar gel, muligvis fordi der her dannes aggregater tidligt under hydrolysen, hvilket nedsætter geldannelsesevnen.

Tilsætninger af Ca²⁺ til det Ca-fri præparat inden hydrolysen forøger gelstivheden markant, med en øvre grænse på 50-100 mM Ca²⁺ tilsat. Uden tilsætning af Ca²⁺ danner a-La ved 50 °C geler med en stivhed på omkring 2500 Pa i 10% opløsninger, hvilket er 6-8 gange mere end b-Lg fremstillet på samme måde. Ved tilsætning af Ca²⁺ forstærkes gel stivheden, således at der opnås transparente

geler med en gelstivhed i 10% opløsninger på 20-35.000 Pa (25 °C), højest ved tilsætning af 50-100 mM calcium (*Figur 5*). Gelstivheden er maksimal lige efter hydrolysen ved 50 °C og falder så noget når gelerne afkøles til 25 °C, hvilket kunne tyde på, at elektrostatiske interaktioner spiller en væsentlig rolle, dvs. at hydrolyseret α -lactalbumin kan tænkes bindes sammen af Ca^{2+} og således danner finstrengede geler. Transmissions elektronmikroskopi har således vist at mikrostrukturen i disse geler er karakteriseret ved lange (1-2 μm) strenger med en konstant diameter på ca. 20 nm (*Figur 6*). En specialestuderende vil snart påbegynde undersøgelser af peptidmønstret fra hydrolyseret α -lactalbumin.

5.4 Anvendelse i levnedsmidler

Direkte tilsætning af enzym til yoghurtmælken, enten før eller efter mælkens varmebehandling har vist sig ikke at være nogen god ide. Nedbrydning af kasein forårsagede udfældning ved syring, og der blev dannet et slimet bundfald. Valleproteinisolat, hydrolyseret i forskellig grad med BLP, blev tilsat til yoghurt. Resultaterne viste en forøget viskositet ved tilsætning af hydrolyseret vallepulver, hvis tilsætningen sker efter varmebehandlingen. Tilsættes valleproteinet inden varmebehandlingen er der ingen effekt, og hydrolyse i 3 timer formindsker faktisk yoghurtens viskositet. Der er således ikke noget der tyder på, at BLP kan forbedre konsistens og stabilitet i yoghurt, og den enzymatisk inducerede geldannelse skal snarere finde anvendelse i neutrale levnedsmidler, jf. ovenstående resultater om pH's indflydelse (afsnit 3.2).

5.5 Samlet konklusion

Projektet har afklaret mekanismen for den enzym-induceret geldannelse af valleprotein og har kortlagt virkningen af varmebehandling under og inden hydrolysen samt pH og salttilsætning har på denne geldannelse. Det er desuden påvist at α -lactalbumin er i stand til at danne meget stærke og transparente og finstrengede geler ved enzymatisk hydrolyse og tilsætning af calcium. Tilsætning af hydrolyseret valleprotein til yoghurt har dog ikke vist sig at kunne nævneværdigt forbedre konsistens og stabilitet.

6. Publikationer

6.1 Internationale tidsskrifter

1. Ipsen, R.H., Otte, J. & Schumacher, E. 1997. *Controlled stress rheometry compared with Formagraph measurements for characterization of the enzyme induced gelation of whey proteins at various pH*. Annual Transactions of the Nordic Rheology Society, 5:48-50
2. Ipsen, R.H. & Qvist, K. B. 1998. *The intrinsic viscosity of β -lactoglobulin during proteolysis as the initial step of enzyme induced gelation* Annual Transactions of the Nordic Rheology Society, 6:75-77.
3. Ipsen, R., Otte, J., Lomholt, S.B., & Qvist, K.B. 1999: *Standardized reaction times used to describe the mechanism of enzyme-induced gelation in whey protein systems*, J. Dairy. Res. *Accepted*
4. Otte, J., Schumacher, E., Ipsen, R., Ju, Z.Y. & Qvist, K.B. 1999 *Protease-induced gelation of unheated and heated whey proteins: Effects of pH, temperature, and concentrations of protein, enzyme and salts*. International Dairy Journal *Accepted*

6.2 Posters på kongresser mv.

5. Ipsen, R.H., 1997. *Enzymatisk induceret geldannelse af valleprotein - et reologisk studie*. Poster på Levnedsmiddeldagene, Danmarks Tekniske Universitet, 30-31/1 1997.
6. Ipsen, R. 1997 *Gelation induced by limited hydrolysis of whey protein isolates and β -actoglobulin: the effect of temperature on the rheology of the gelation process*. Præsenteret på 'Prospects for new applications of whey proteins', MADGELAS Workshop, Lund, 29-30/9, 1997
7. Ipsen, R., Otte, J., Schumacher, E. & Qvist, K.B 1997 *Controlled stress rheometry compared with Formagraph measurements for characterization of the enzyme induced gelation of whey proteins at various pH*. Præsenteret på Mejeriforskningsdagen, Århus, 7/11-1997.
8. Schumacher, E., Otte, J., Ipsen, R. & Qvist, K.B. 1997 *Protease-induced gelation of whey proteins: Effects of temperature and addition of salts*. Præsenteret på Mejeriforskningsdagen, Århus, 7/11-1997.
9. Ipsen, R., Otte, J., & Dominguez, E. 1998 *Influence of temperature on the enzyme induced gelation of β -lactoglobulin*. Poster præsenteret på Food Emulsions and Foams, Sevilla, Spanien, 16-18/3 1998.
10. Richard Ipsen & Karsten B. Qvist 1998 *The intrinsic viscosity of partially hydrolysed β -lactoglobulin* Poster præsenteret på 25th International Dairy Congress, Århus, 21-24 sept. 1998.
11. Ipsen, R., Bülow-Olsen, K., Otte, J. & Qvist, K.B. 1999 *Enzyme induced gelation of mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin*. Præsenteret ved Levnedsmiddelkongres 1999, 28-29/1 1999.

6.3 Faglige artikler

12. Ipsen, R.H., Otte, J. & Qvist, K.B. 1998 Forbedring af valleproteiners geldannelse gennem enzymatisk behandling *Mælkeritidende*, 111(13/14): 336-337.

6.4 Mødeindlæg

Ipsen, R.: Characterization of the enzyme induced gelation of whey protein isolate and beta-lactoglobulin: Temperature, protein concentration and E/S ratio. Indlæg på 'Milk proteins: Structure and functional properties', NorFa sponsored workshop, Kaunas, 10-11/11 1997.

Ipsen, R.: Valleproteins geldannelse ved enzymtilsætning: Processen og dens mulige anvendelser. Foredrag på Temadag om levnedmidlers tekstur og konsistens, Kolding, 2/12 1997.

Ipsen, R.: Controlled strain and controlled stress measurements on a sample of INRA β -lactoglobulin B, MADGELAS Workshop on Gelation of Whey Proteins, København, 29-31/3 1998.

Ipsen, R.: Rheology and microstructure of enzyme induced whey protein isolate and β -lactoglobulin gels, NorFA sponsored workshop on Milk Proteins – Structure and Functional Properties, Naantali, Finland, 28-30/11 1998.

Ipsen, R., Otte, J., Qvist, K.B.: Protease induced gelation of proteins from whey and other sources, Food Systems Functionality, Chicago, 28-30/7 1999.

7. Forskeruddannelse

Elena Dominguez, *Technologia y Biochimia de los Alimentos*, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Spanien, har i forbindelse med sit ph.d. studie været på studieophold på KVL i 3 Mdr. fra august til oktober 1997.

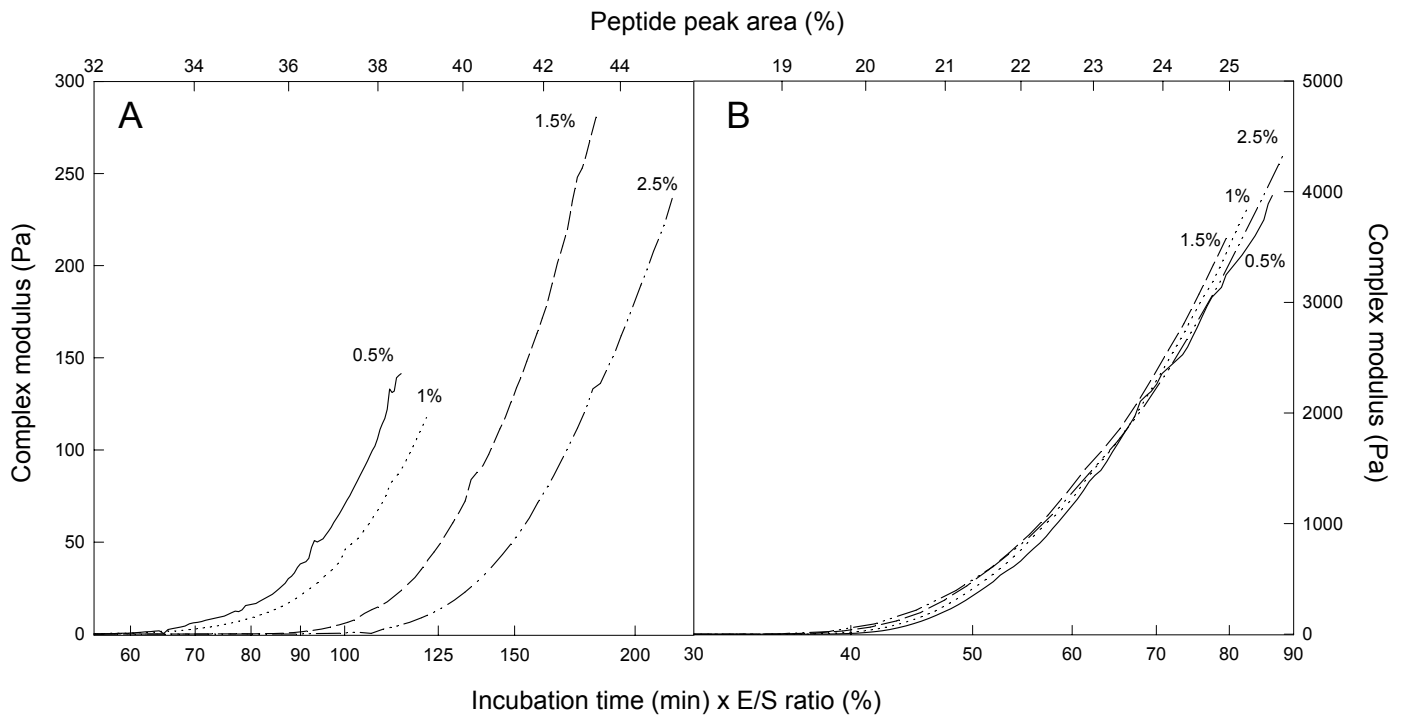
Desuden har Eva Schumacher, Department of Food Technology, Rheinische Friederich-Wilhelms University of Bonn, Tyskland været tilknyttet projektet i forbindelse med et ERASMUS-financieret studieophold. Karen Bülow-Olsen og Henrik Kristensen har som del i levnedsmiddel-studiet ved KVL udarbejdet bachelor-projekter med relation til projektet.

8. Samarbejdsrelationer

I forbindelse med projektet har der været deltagelse i et nordisk, NorFA sponsoreret netværk (Milk Proteins – Structure and Functional Properties), samt i et EU financieret netværk om valleproteiners gelling (MADGELAS, Whey Protein Gelation). Dette sidste netværk har resulteret i to artikler på basis af analyser af kommercielle valleproteinprodukter (Holt, C., McPhail, D., Nevison, I., Nylander, T., Otte, J., Ipsen, R.H., Bauer, R., Øgendal, L., Olieman, K., de Kruif, K., Léonil, J., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.L., Pérez, M.D., Puyol, P., Calvo, M., Bury, S.M., Kontopidis, G., McNae, I., Sawyer, L., Ragona, L., Zetta, L., Molinari, H., Klarenbeek, B., Jonkman, M.J., Moulin, J. & Chatterton, D. 1999 *Apparent chemical composition of nine commercial or semi-commercial whey protein concentrates, isolates and fractions*. *Int. J. Food Sci. & Tech.*, 34:543-556.

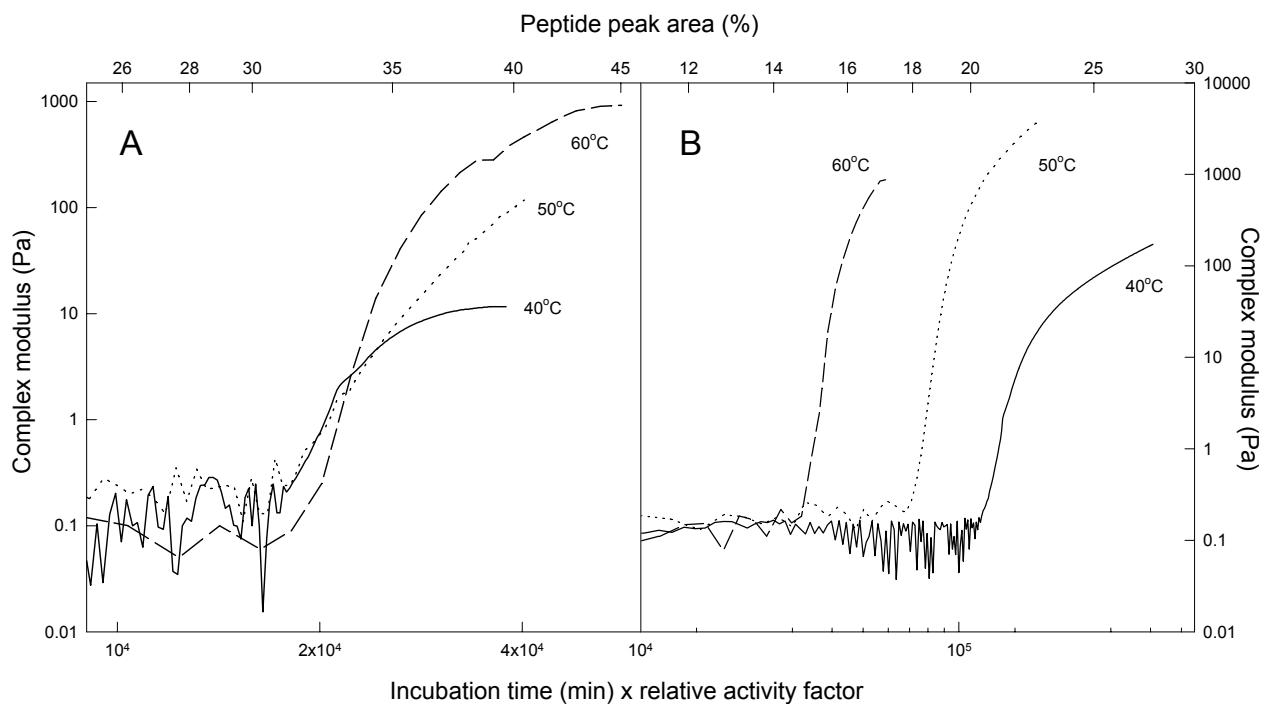
Holt, C., McPhail, D., Nylander, T., Otte, J., Ipsen, R.H., Bauer, R., Øgendal, L., Olieman, K., de Kruif, K., Léonil, J., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.L., Pérez, M.D., Puyol, P., Calvo, M., Bury, S.M., Kontopidis, G., McNae, I., Sawyer, L., Ragona, L., Zetta, L., Molinari, H., Klarenbeek, B., Jonkman, M.J., Moulin, J. & Chatterton, D. 1999 *Some physico-chemical properties of nine commercial or semi-commercial whey protein concentrates, isolates and fractions*. Int. J. Food Sci. & Tech., 34:587-601).

MD Foods Ingredients har medvirket ved fremskaffelse af en række af de anvendte valleproteinprodukter. NOVO Nordisk har leveret det anvendte enzym (BLP) og Celilia Elofsson, Kemicentrum, Lunds Universitet har medvirket i forbindelse med afprøvning af udstyr.



Figur 1. Gelstyrken (Complex modulus) som funktion af den standardiserede reaktionstid (inkuberingstid x enzym/substrat (E/S) forhold) for ikke-varmebehandlede (A) og varmebehandlede (B) opløsninger (90 g/L) af valleproteinisolat (WPI) hydrolyseret ved 50 °C ved anvendelse af forskelligt E/S forhold. *Fra reference 3.*

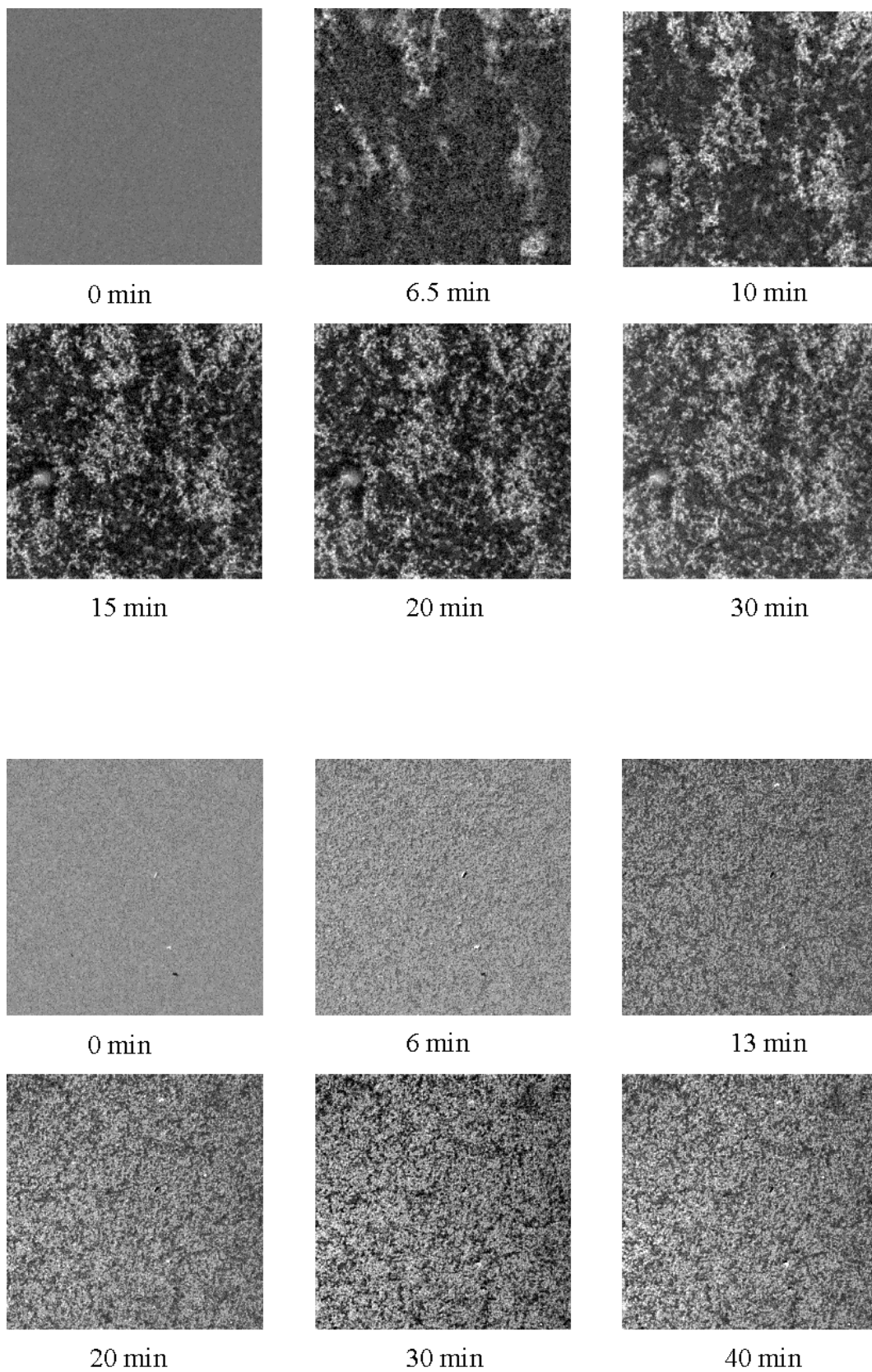
Figuren illustrerer, at for varmebehandlet WPI sker geldannelsen ved den samme grad af proteolyse, mens dette ikke er tilfældet når det anvendes ikke-varmebehandlet WPI, idet aggregeringen af de frigivne peptider her spiller en rolle.



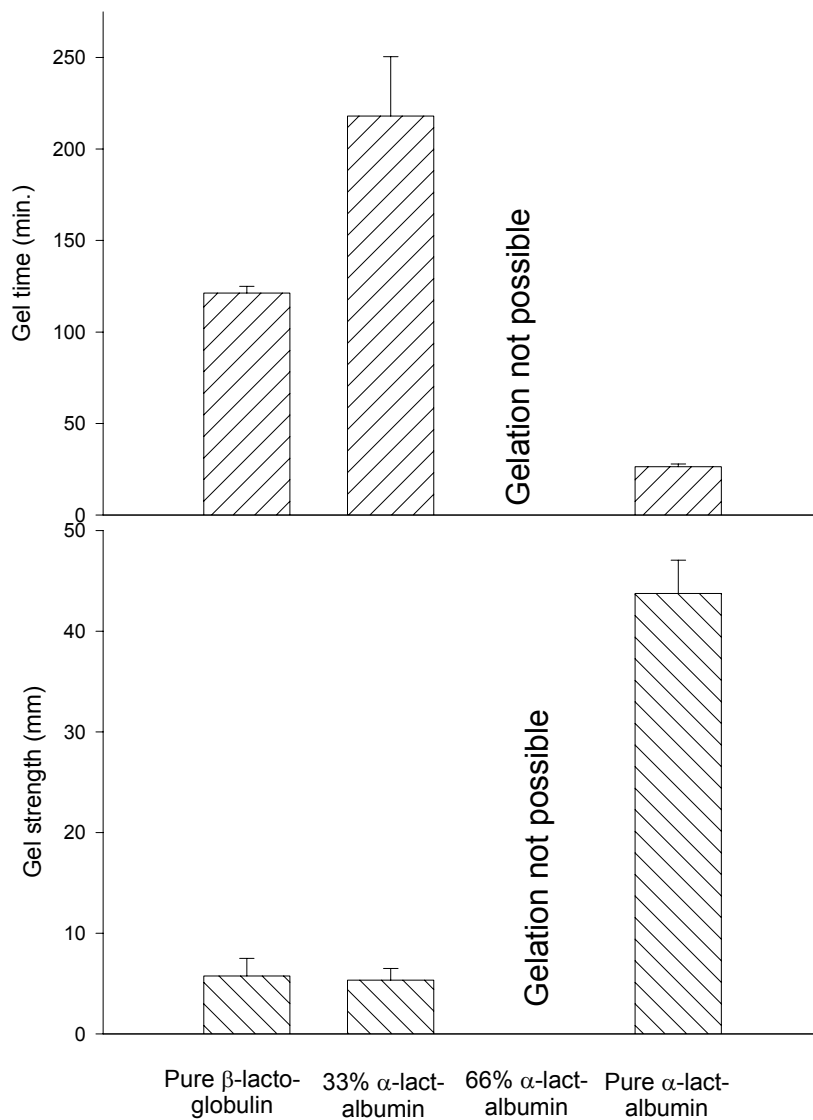
Figur 2. Gelstyrken (Complex modulus) i opløsninger (90 g/L) af ikke-varmebehandlet (A) og varmebehandlet (B) valleproteinisolat (WPI) som funktion af den standardiserede reaktionstid (inkuberingstid x relativ aktivitets faktor), der afspejler graden af proteolyse (peptide peak area).

Fra reference 3.

Figuren illustrerer, at for ikke-varmebehandlet WPI sker geldannelsen ved den samme grad af proteolyse, uafhængigt af den anvendte temperatur, hvilket tyder på at det er aggregeringsfasen, der er det hastighedsbestemmende trin, mens temperaturafhængigheden når der anvendes varmebehandlet WPI sandsynligvis hænger sammen med den forøgende mængde eksponerede hydrofobe områder.

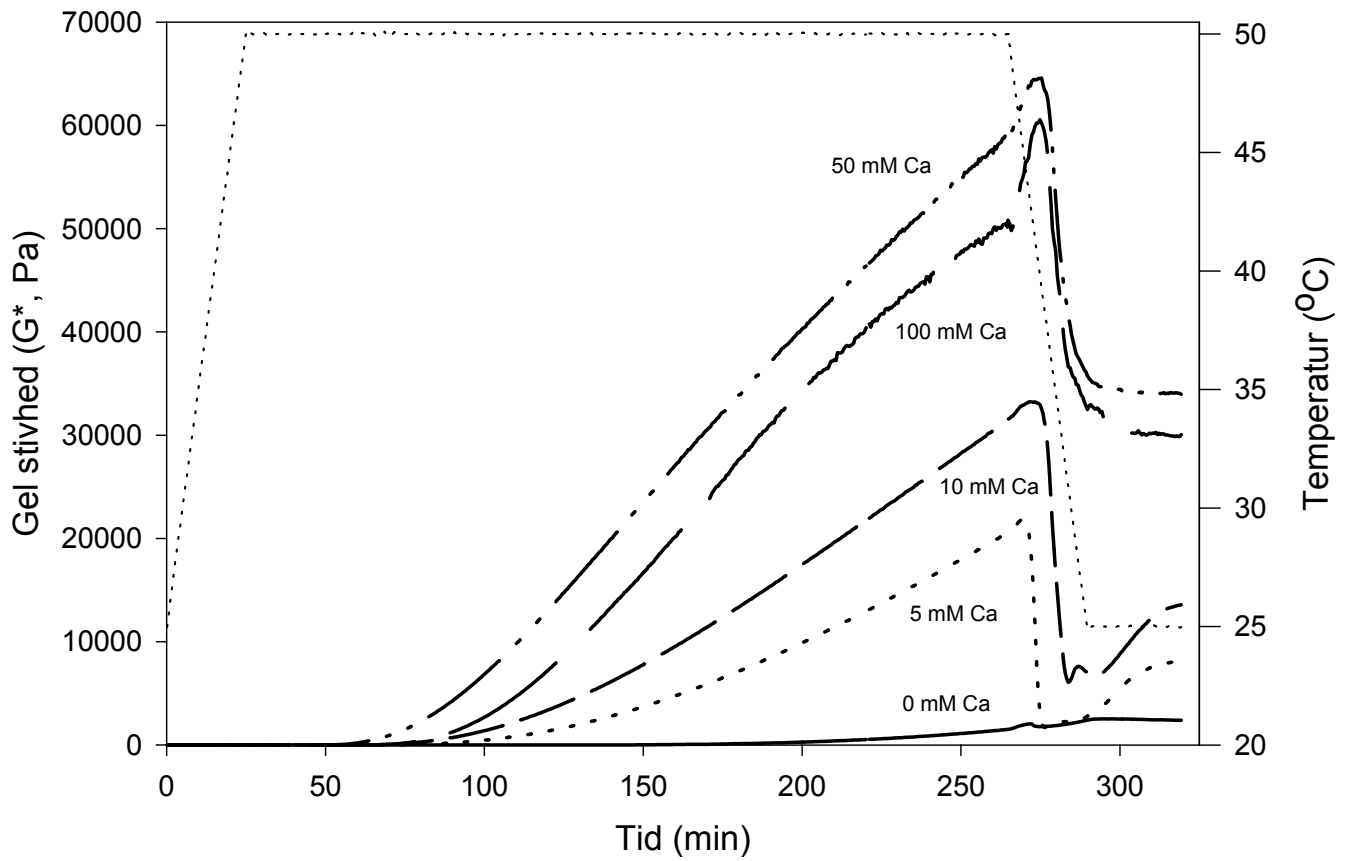


Figur 3. Billeder taget med confocal laser scanning mikroskopi af geldannelsen i ikke-varmebehandlet (de øverste 6 billeder) og varmebehandlet (de nederste 6 billeder) β -lactoglobulin.

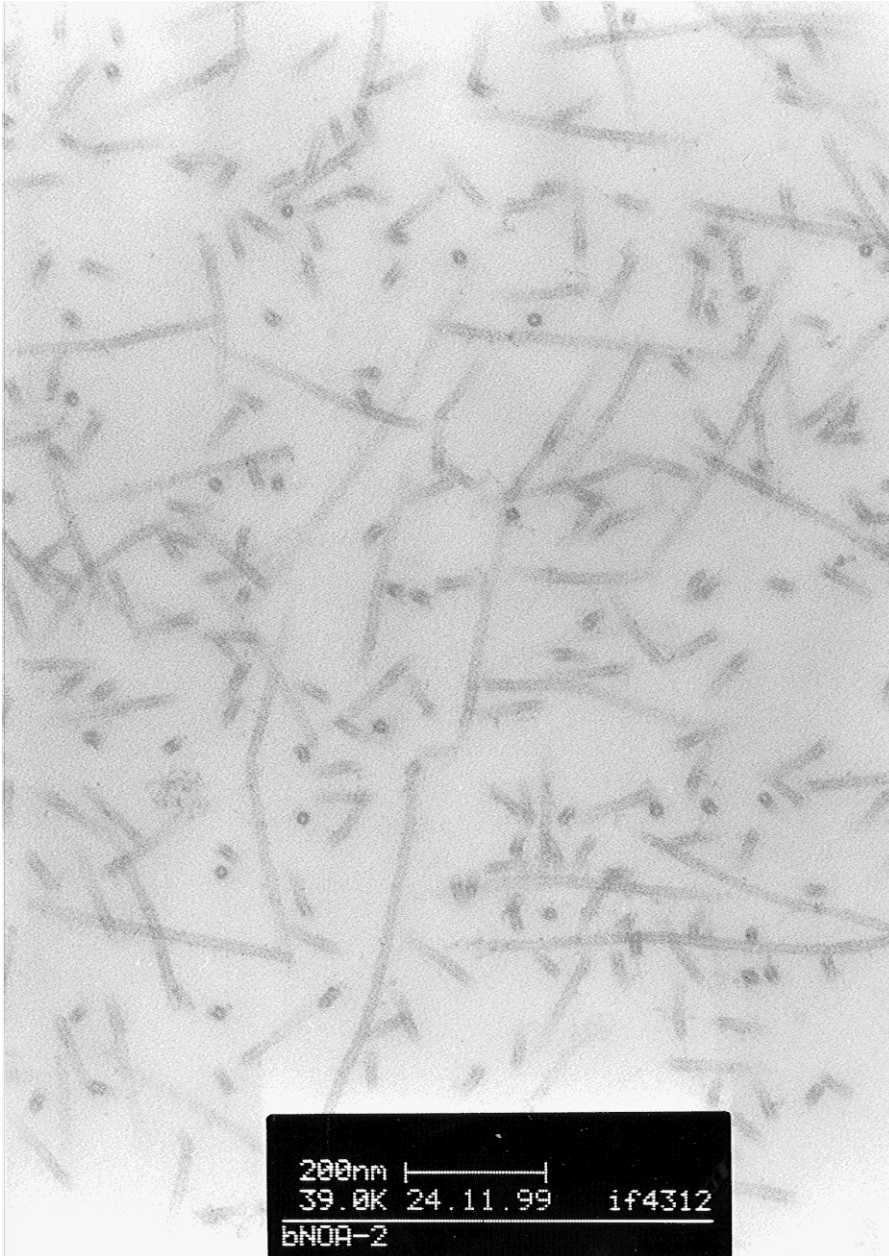


Figur 4: Gelegenskaber for β -lactoglobulin, α -lactalbumin og blandinger med 33 or 66% α -lactalbumin. Geling skete ved 50 °C, pH 7,5 under anvendelse af BLP og en koncentration på 10mL/L.

Figur 5: Gel stivheden i BLP inducerede geler fremstillet ud fra α -lactalbumin med forskellig



tilsætning af calcium. Temperatur profilen (25-50-25 $^{\circ}\text{C}$) er angivet ved den prikkede, tynde linie.



Figur 6. Transmission elektronmikroskopi billede af en gel fremstillet ud fra α -lactalbumin med 5mM tilsætning af calcium. De mørke partier angiver proteinstrengene.

