

Afslutningsrapport

Højtryksbehandling af mælkeproteiner

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2005-69

Juni 2005



mejeriforeningen

danish dairy board

**Slutrapport for Mejeribrugets
ForskningsFond/FØTEK-
samarbejdsprojektet:**

”Højtryksbehandling af mælkeproteiner”

Projektperiode: 1. januar 2000 til 31. januar 2005

Projektdeltagere:

Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole

Projektleder: Professor Leif H. Skibsted, Fødevarekemi, IFV, KVL

Tlf. 3528 3221, e-mail: ls@kvl.dk

Deltagende forskere: Adjunkt Vibeke Orlien

Lektor Karsten Olsen

Professor Karsten B. Qvist

Ph.D. studerende Jes Chr. Knudsen

JUNI 2005

Sammendrag

Denne rapport beskriver resultaterne af undersøgelser af høje hydrostatiske tryk på mælkeproteiner. Højtryksbehandling er en attraktiv teknologi til at modificere mælkeproteiner uden brug af varme. Høje tryk ændrer proteiners konformation og resulterer i hel eller delvis denaturering med ændrede funktionelle egenskaber til følge. En detaljeret forståelse af effekter af høje tryk på mælkeproteiner er derfor af interesse for mejeriindustrien for at vurdere anvendelser og potentialer i brugen af højtryksteknologi. Undersøgelserne har omhandlet både valleproteiner og kaseiner og tryk op til 600 MPa har været anvendt.

Målinger af overfladetrykket i luft/vand grænsefladen viste, at trykbehandling af valleproteinet β -lactoglobulin fremmede adsorptionen af β -lactoglobulin til luft/vand grænsefladen. Overfladereologiske målinger med dynamisk oscillation viste at den adsorberede film i olie/vand grænsefladen havde en markant øget elasticitet, hvis filmen var stabiliseret af trykbehandlet β -lactoglobulin frem for nativt β -lactoglobulin.

Målinger af pH ved en nyudviklet optisk metode af β -lactoglobulin opløsninger under tryk viste dynamiske ændringer, hvor pH steg ved moderate høje tryk og faldt ved højere tryk. Forsøg med vandige opløsninger med op til 5 mg/ml β -lactoglobulin viste at den maksimale pH-ændring som β -lactoglobulin forårsager under tryk er afhængig af proteinkoncentrationen.

Mælk blev undersøgt under trykbehandling ved måling af turbiditet, og efter trykbehandling ved brug af dynamisk lysspredning. Trykbehandling af mælk mellem 150 MPa og 200 MPa reducerede størrelserne af kaseinmicellerne i mælken. Trykbehandling af mælk mellem 250 MPa og 300 MPa resulterede i en fraktion af kaseinmiceller med mindre størrelser end kaseinmiceller i ubehandlet mælk sammen med en fraktion af kaseinmiceller, der var større end kaseinmiceller i ubehandlet mælk. De store kaseinmiceller var ustabile og dissocierede i nogen grad under lagring af mælk efter trykbehandling. Trykbehandling af mælk ved 400 MPa reducerede størrelserne af kaseinmicellerne yderligere. Målinger af turbiditet i mælk under tryk ved varierende temperatur viste, at dissociationen af kaseinmicellerne blev fremmet ved temperaturer mellem 5°C og 10°C, hvorimod association af kaseinmicellerne blev fremmet ved 40°C.

Målinger af calcium koncentrationen i mælken serumfase blev foretaget med en calcium-ion selektiv elektrode og med atomabsorptionsspektroskopi. Behandling af mælk med tryk i området fra 150 MPa til 400 MPa øgede koncentrationen af frit og kompleksbundet calcium i serumfasen på grund af frigivelse af calcium fra kaseinmicellerne. Under lagring (24 timer) af trykbehandlet mælk ved atmosfærisk tryk blev calcium igen langsomt bundet til kaseinmicellerne.

Rørte syrnede geler blev fremstillet af trykbehandlet mælk og flydeegenskaber samt de viskoelastiske egenskaber af de rørte syrnede geler blev sammenlignet med geler fremstillet af

varmebehandlet mælk. Viskositet og flydegrænse målt under konstant omrøring i de rørte syrnede geler blev gradvist øget ved behandling af mælk med tryk op til 600 MPa. Varmebehandling af mælk ved 90°C i 30 minutter eller trykbehandling af mælk ved 600 MPa i 20 minutter gav lignende viskositet og flydegrænse i de syrnede geler. Målinger af de syrnede geler med dynamisk oscillation med lille amplitude viste, at røregelernes visko-elastiske egenskaber blev gradvist øget ved behandling af mælk med tryk på op til 600 MPa. Det blev videre fundet, at varmebehandling af mælk ved 90°C i 30 minutter eller trykbehandling ved 600 MPa i 20 minutter gav ens visko-elastiske egenskaber i de rørte syrnede geler.

Det kan konkluderes, at høje tryk er en interessant og lovende teknologi, der giver muligheder for i forskellig grad at modificere mælkeproteiners egenskaber og for at forbedre bestemte funktionelle egenskaber af mælkeproteiner. Fremover kan nye typer af mejeriprodukter forventes at blive udviklet på basis af højtryksteknologien.

Abstract

The present work reports results from a study of high hydrostatic pressure effects on milk proteins. High pressure treatment is an attractive technology to modify milk proteins without using heat. High hydrostatic pressure change the conformation of proteins resulting in partly or complete denaturation and further a change in functional properties. A detailed description of the effects of high pressure on milk proteins is of interest to the dairy industry with respect to applications and possibilities of high pressure technology. The study investigated both whey proteins and the caseins and pressure up to 600 MPa were explored.

Surface pressure measurements at the air/water interface showed that pressurization of the whey protein β -lactoglobulin facilitated the adsorption of β -lactoglobulin to the air/water interface. Surface rheological measurements made by small amplitude oscillatory shear showed a marked increase in the interfacial elasticity of the adsorbed layer of pressurized β -lactoglobulin at the oil/water interface compared to that of native β -lactoglobulin.

Measurements of pH in β -lactoglobulin solutions under pressure showed dynamic changes where pH increased at moderate high pressure and a decrease at higher pressures. Experiments with solutions with different β -lactoglobulin concentrations (from 0.25 to 5 mg/ml) showed that the pH-change in solutions of β -lactoglobulin is concentration dependent.

Milk was investigated during pressure treatment by turbidity measurements and after pressure treatment using dynamic light scattering. Pressurization of milk in the range of 150 MPa to 200 MPa reduced the size of the casein micelles in milk. Upon pressurization of milk in the range of 250 MPa to 300 MPa casein micelle sizes markedly smaller than those in untreated milk were observed together with a fraction of markedly larger casein micelles than those in untreated milk. These larger micelles were unstable and dissociated to some extent upon storage of milk after pressurization. Pressurization of milk at 400 MPa further reduced the sizes of the casein micelles. Turbidity measurements of milk under pressure at various temperatures showed that dissociation of casein micelles was favoured at low temperatures from 5°C to 10°C and association of the casein micelles was favoured at 40°C.

Measurements of the calcium concentration in milk serum were conducted with a calcium ion selective electrode and by atomic absorption spectroscopy. Pressurization of milk in the range of 150 MPa to 400 MPa increased the concentration of free Ca^{2+} and complexed calcium in milk serum due to release of calcium from the casein micelles. During storage (24 hours) of pressurized milk at ambient pressure a slow re-binding of calcium to the casein micelles occurred.

Stirred acidified gels were made from pressurized milk and the flow and viscoelastic properties of the stirred acidified gels were compared to gels made from heated milk. Viscosity and yield stress

measured by steady shear in the stirred acidified gels were gradually enhanced by pressurization of milk up to 600 MPa. Heat treatment of milk at 90°C for 30 minutes or high pressure treatment of milk at 600 MPa for 20 minutes resulted in similar viscosity and yield stress in the stirred gels. Small amplitude oscillatory shear measurements revealed that pressurization of milk up to 600 MPa gradually increased viscoelastic properties in the stirred gels. Furthermore, heat treatment of milk at 90°C for 30 minutes or pressurization of milk at 600 MPa for 20 minutes resulted in similar viscoelastic properties in the stirred acidified gels.

In conclusion, high pressure treatment is an interesting and promising technology, which offers possibilities to modify properties of milk proteins to different extents and to improve desirable functional properties of milk proteins. In the future novel types of dairy products are expected to be developed based on high pressure technology.

Liste over publikationer i internationale tidsskrifter med censur

Knudsen, J.C.; Otte, J.; Olsen, K.; Skibsted, L.H. Effect of high hydrostatic pressure on the conformation of β -lactoglobulin A as assessed by proteolytic peptide profiling. *International Dairy Journal* **2002**, *12*, 791-803

Knudsen, J.C.; Lund, M.; Bauer, R.; Qvist, K.B. Interfacial and molecular properties of high-pressure-treated β -lactoglobulin B. *Langmuir* **2004**, *20*, 2409-2415

Olsen, K.; Kristensen, D.; Rasmussen, J.T.; Skibsted, L.H. Comparison of the effect of high pressure and heat on the activity of bovine xanthine oxidase. *Milchwissenschaft* **2004**, *59*, 411-413

Knudsen, J.C.; Karlsson, A.O.; Ipsen, R.; Skibsted, L.H. Rheology of stirred acidified skim milk gels with different particle interactions. **2005a** Indsendt manuskript

Knudsen, J.C.; Øgendal, L.H.; Bauer, R.; Waninge, R.; Qvist, K.B.; Skibsted, L.H. Casein micelle size and structure and calcium distribution in skim milk following high pressure treatment. **2005b** Indsendt manuskript

Orlien, V., Knudsen, J.C.; Bosch, M.C.; Skibsted, L.H. Dynamics of casein micelles in skim milk during and after high pressure treatment. *Food Chemistry* **2005a** Acceptorret til publikation

Orlien, V., Knudsen, J.C.; Pedersen, H.B.; Skibsted, L.H. Whey protein isolate as functional ingredient in high-pressure induced milk gels. *Milchwissenschaft* **2005b** Acceptorret til publikation

Liste over andre publikationer og offentliggørelser

Afhandlinger:

Knudsen, J.C. High pressure effects on milk proteins. **2005**. Ph.D. afhandling

Artikler i tidsskrifter:

Knudsen, J.C.; Olsen, K.; Qvist, K.B; Skibsted, L.H. Højtryksbehandling af mælkeproteiner. *Mælkeritidende* **2003**, *116*, 244-246

Konferencebidrag:

Knudsen, J.C.; Qvist, K.B. Transglutaminase cross-linking of high pressure treated β -lactoglobulin B. Poster præsentation: Quality and Health Aspects of Milk Components 2003, NorFa, Wadahl, Norge.

Knudsen, J.C.; Lund, M.; Qvist, K.B. Interfacial adsorption and film formation of β -lactoglobulin B: Effect of high pressure induced thiol exposure. Poster præsentation: New Functional Ingredients and Foods: Safety, Health and Convenience 2003, LMC, København, Danmark.

Knudsen, J.C.; Waninge, R.; Øgendal, L.H.; Ipsen, R.H.; Skibsted, L.H. Characterization of casein micelles after high pressure treatment of milk. Poster præsentation: Food Colloids 2004, Harrogate, United Kingdom

Knudsen, J.C. Properties of milk after high-pressure-treatment. Mundtlig præsentation: High Pressure Bioscience and Biotechnology 2004, Rio de Janeiro, Brasilien

Orlien, V. Effect of high pressure treatment on casein micelles. Perspective for new types of milk based gels. Mundtlig præsentation. LMC-kongres 2004, København, Danmark

Orlien, V.; Olsen, K.; Skibsted, L. Measuring pH in milk under high pressure. Poster præsentation: Danish Food Science 2005 - from molecule to man, LMC, København, Danmark.

Studenterprojekter i forbindelse med projektet:

Bachelorprojekter:

Brejnholt, S.M.; Jensen, B.F. Inaktivering af xanthinoxidase ved hjælp af varme og højtryk. **2000**

Scherrebeck, H. Karakterisering af β -lactalbumins calciumbinding. **2003**

Pedersen, H.B. Højtryksbehandling af mælk. Nye geler af skummetmælk. **2005**

Olsen, K.C. Varmeinduceret aggregering og gelering af valleprotein isolat undersøgt ved kemometrisk analyse af dynamisk lysspredning og lavfelts kernemagnetisk resonans. **2005**

Nielsen, M.T. Effekten af temperatur og pH på mælks turbiditet under høje hydrostatiske tryk. **2005**

3-points opgave:

Munk, M.B. Optiske calciumindikatorer til spektrofotometrisk måling af Ca i mælk under høje hydrostatiske tryk. **2005**

Udvekslingsstuderende:

Bosch, M.C. Effect of high pressure treatment on casein micelles in skim milk. **2003** .Erasmus-studerende fra Universitat de Girona, Spanien.

Indholdsfortegnelse	Side
Sammendrag	i
Abstract	iii
Liste over publikationer i internationale tidsskrifter med censur	v
Liste over andre publikationer og offentliggørelser	vi
Indholdsfortegnelse	viii
1 Baggrund og formål	1
2 Resultater	1
2.1 Højtrykseffekter på overfladeegenskaber af β -lactoglobulin	1
2.2 Højtrykseffekter på pH i mælkeproteinopløsninger	5
2.3 Højtrykseffekter på størrelsen af kaseinmiceller i mælk	6
2.4 Højtrykseffekter på calciums binding til kaseinmiceller i mælk	8
2.5 Reologiske egenskaber af syrnede geler fremstillet af højtryksbehandlet mælk	9
2.6 Reologiske egenskaber af neutrale geler fremstillet af højtryksbehandlet mælk	10
3 Konklusioner	11

1 Baggrund og formål

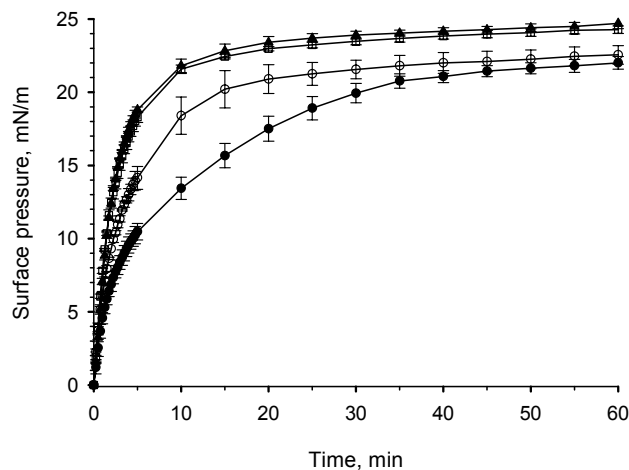
Modificering af mælk med høje tryk er en skånsom teknologi der giver mulighed for at inaktivere mikroorganismer og bakteriofager og samtidig bevare aromastoffer og vitaminer. Brug af højtryk er derfor et attraktivt alternativ til traditionel varmebehandling af mælk. Høje tryk giver desuden mulighed for generelt at modificere proteiners struktur, hvilket er relevant for både valleproteiner og kaseiner i mange sammenhænge indenfor mejeriteknologi. Ændring af mælkeproteiners struktur giver især mulighed for at modificere mælkeproteinernes funktionelle egenskaber såsom evne til geldannelse og vandbinding, evne til stabilisering af skum og evne til at stabilisere emulsioner.

Projektets formål var at tilvejebringe en detaljeret beskrivelse af trykeffekter på mælkeproteiner, baseret på spektroskopiske og reologiske undersøgelser for at give baggrund for anvendelser af højtryksmodificerede mælkeproteiner. For kaseiner blev størrelsesfordeling samt mineralsammensætning undersøgt med henblik på fremstilling af nye typer geler. Højtrykseffekter på mælkeproteiner blev undersøgt både under tryk og efter trykbehandling. Førstnævnte for at karakterisere transiente ændringer og sidtnævnte for at karakterisere de mere eller mindre permanente ændringer af mælkeproteiner som følge af trykbehandling.

2 Resultater

2.1 Højtrykseffekter på overfladeegenskaber af β -lactoglobulin

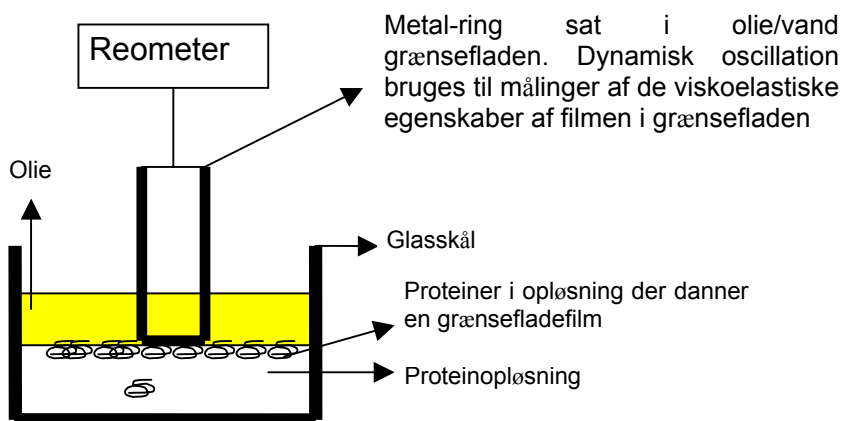
Opløsninger med valleproteinet β -lactoglobulin blev trykbehandlet ved 150 MPa, 200 MPa eller 400 MPa og grænsefladeegenskaberne af det trykbehandlede protein blev undersøgt. Adsorptionen af β -lactoglobulin til luft/vand grænsefladen blev undersøgt ved målinger af overfladetryk (figur 1).



Figur 1. Udvikling i luft/vand overfladetryk af 0,01 mg/mL β -lactoglobulin opløsninger ved pH 7. Nativt β -lactoglobulin (●) and β -lactoglobulin behandlet med tryk på 150 MPa (○), 200 MPa (□), 400 MPa (▲). Fra Knudsen et al., 2004.

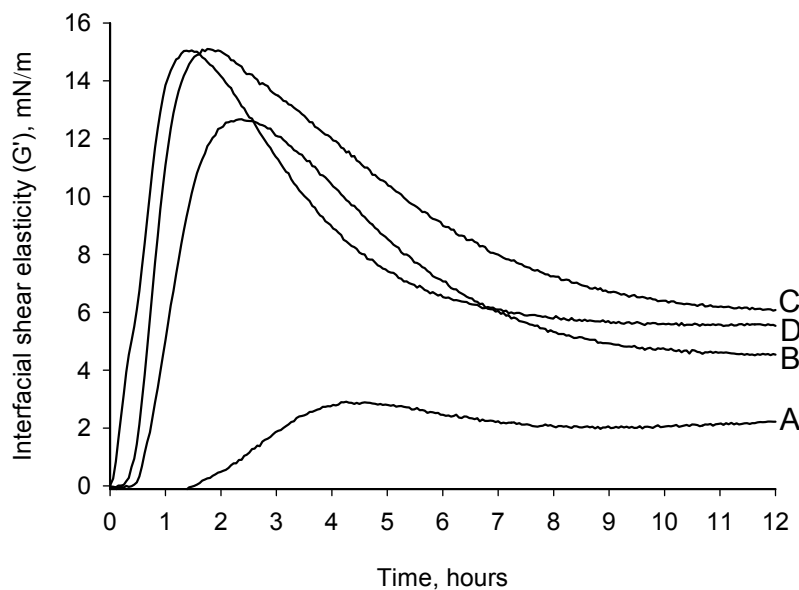
Proteiner er overfladeaktive stoffer som diffunderer til grænseflader og dermed sænker overfladespændingen. Proteinets sænkning af overfladespændingen over tid kan også udtrykkes som en stigning i grænsefladetryk over tid, som det ses i figur 1. Forsøgene med β -lactoglobulin viste at trykbehandling af β -lactoglobulin øger proteinets adsorption til en luft/vand grænseflade, både med hensyn til hastigheden af adsorptionen samt mængden af protein der adsorberes i grænsefladen. Det manifesterer sig ved, at både stigningshastigheden samt slutniveauet af grænsefladetrykket er højere for trykbehandlet β -lactoglobulin sammenlignet med ubehandlet β -lactoglobulin (figur 1).

Proteiner i grænseflader danner et tyndt lag eller en proteinfilm (tykkelsen af filmen er nogen få nanometer). Reologiske egenskaber af en sådan grænsefladeproteinfilm og udviklingen af styrken i filmen over tid kan kvantificeres med et grænsefladereometer. En skematisk tegning af et grænsefladereometer er vist i figur 2.



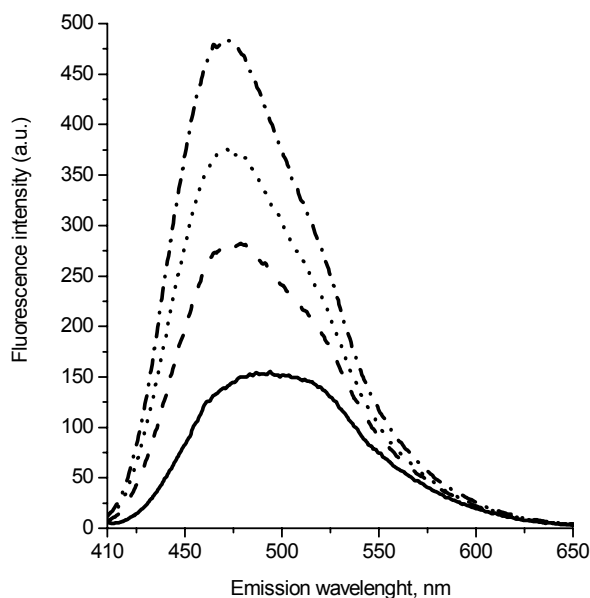
Figur 2. Skematisk tegning af et grænsefladereometer.

Ved anvendelse af et grænsefladereometer blev β -lactoglobulins viskoelastiske egenskaber i olie/vand grænsefladen bestemt (figur 3). Modifikation af β -lactoglobulin ved højtryk resulterede i en markant øgning af det elastiske modul af filmen med adsorberet β -lactoglobulin i olie/vand grænsefladen, både med hensyn til hvor hurtigt filmstyrken udviklede sig og ligeledes med hensyn til niveauet (figur 3).



Figur 3. Dynamisk reologi i olie/vand grænsefladen. Den vandige fase var tilsat nativt β -lactoglobulin (A) eller β -lactoglobulin trykbehandlet ved 150 MPa (B), 200 MPa (C) eller 400 MPa (D) i 20 min ved 20°C. Proteinet blev tilsat til vandfasen til tiden 0, pH i vandfasen var 7,0 og koncentrationen af β -lactoglobulin var 0,01 mg/mL. Fra Knudsen et al., 2004.

For at få yderligere oplysninger om, hvordan tryk påvirkede β -lactoglobulin og hvilke molekulære egenskaber, der i særlig grad har betydning for at forbedre β -lactoglobulins overfladeegenskaber blev en række molekulære egenskaber såsom oligomerisering, eksponering af thiolere fra proteinets indre tiloverfladen samt overfladehydrofobicitet af trykbehandlet β -lactoglobulin undersøgt [Knudsen et al., 2004]. β -lactoglobulins overfladehydrofobicitet efter forskellige trykbehandlinger er vist i figur 4.



Figur 4. ANS fluorescens-emissionsspektre af nativt β -lactoglobulin (—) og efter højtryksbehandling af β -lactoglobulin ved 150 MPa (- -), 200 MPa (- · -) and 400 MPa (···). Koncentrationen af β -lactoglobulin og ANS var henholdsvis 2 μ M og 100 μ M. Øget fluorescensintensitet viser at hydrofobiciteten øger med stigende tryk. Fra Knudsen et al., 2004.

Ved udfoldning og eksponering af hydrofobe dele af proteiner øges graden af ANS, der bindes til proteinoverfladen, og det giver en stigning i fluorescensintensiteten af opløsningen. Resultaterne viste en gradvis stigning i β -lactoglobulins overfladehydrofobicitet ved stigende trykbehandling (figur 4). Fra forsøgenes resultater blev det konkluderet at β -lactoglobulins øgede overfladehydrofobicitet induceret ved højtryksbehandling forbedrede overfladeegenskaber af trykbehandlet β -lactoglobulin i olie/vand grænsefladen sammenlignet med overfladeegenskaberne af ubehandlet β -lactoglobulin [Knudsen et al., 2004]. Derimod synes andre effekter såsom øget thiol eksponering at have mindre betydning for β -lactoglobulins evne til at danne en stærkt elastisk film i olie/vand grænsefladen.

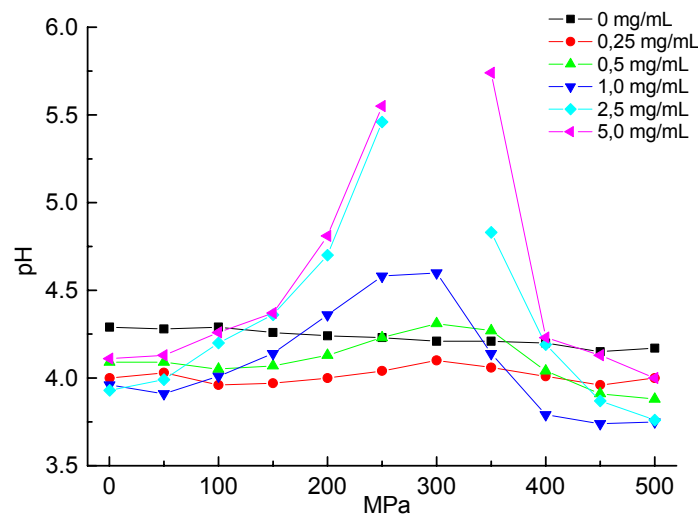
Målinger af fluorescensintensitet af β -lactoglobulin under højtryksbehandling ved forskellige temperaturer viste at der var størst effekt af trykbehandling ved 37 °C sammenlignet med trykbehandlinger udført ved 25 °C og 5 °C. Højtryksbehandling i kombination med varmebehandling er således en måde til at øge effekten af højtryk med henblik på at opnå en specifik og gradvis proteinmodificering og ændring af valleproteiners funktionelle egenskaber.

2.2 Højtrykseffekter på pH i mælkeproteinopløsninger

I projektet indgik udvikling af et højtryksspektrofotometer designet til at måle på opløsninger under høje tryk (*in-situ*). Systemet består af en optisk celle, der kan sættes under tryk samt lyskilde og detektor, og derved kan absorptionsspektre (ved bølgelængder i UV og synligt område) af opløsninger optages. Højtryksspektrofotometeret er udstyret med en kuvette med variabel lysvej, der gav mulighed for uden fortynding at foretage målinger på koncentrerede og turbide opløsninger hvilket er relevant for studier af mælkeproteiner, både kaseiner og valleproteiner, dissociering samt associering og geldannelse under høje tryk. Termostatering af højtryksspektrofotometeret gav yderligere mulighed for forsøg ved varierende temperatur, og den kombinerede effekt af tryk og temperatur på mælkens kaseinmiceller blev undersøgt [Orlien et al., 2005a].

For at bidrage til forståelsen af højtrykseffekter på mælk, med henblik på styring af mælkeproteinaggregering og geldannelse som er stærkt pH-følsomme, blev der i projektet foretaget målinger af pH i mælkeproteinopløsninger under tryk. Dette blev målt ved brug af forskellige pH indikatorer.

Undersøgelserne af lysabsorptionen af pH-indikatoren α -naphtylrød (og af neutralrød) i vand ved forskellige pH-værdier udsat for tryk op til 500 MPa viste, at α -naphtylrød er trykresistent. Det vil sige at denne indikator ændrer ikke optiske egenskaber ved stigende tryk og er derfor velegnet til at følge pH ved stigende tryk. Undersøgelserne af lysabsorptionen af pH-indikatoren α -naphtylrød (og neutralrød) i buffersystemerne eddikesyre, ravsyre, phosphorsyre og imidazol samt β -lactoglobulin i vand ved forskellige pH-værdier udsat for tryk op til 500 MPa viser en effekt på absorptionsspektrene som funktion af tryk. Dermed kunne ændringen i dissociationskonstanten (ΔpK_a) for buffersystemerne beregnes som funktion af tryk. Det blev fundet, at pK_a faldt for eddikesyrebufferen og phosphatbufferen som funktion af tryk, hvilket betyder, at syredissociationen favoriseres af stigende tryk. Derimod forblev pK_a konstant for ravsyrebufferen og imidazolbufferen. Disse resultater er i overensstemmelse med litteraturen og verificerer dermed metoden som blev udviklet som del af projektet i et specialdesignet højtryksspektrofotometer. Forsøg med vandige opløsninger med op til 5 mg/ml β -lactoglobulin viste, at den maksimale pH-ændring som β -lactoglobulin gennemgår under tryk er afhængig af proteinkoncentrationen (figur 5).

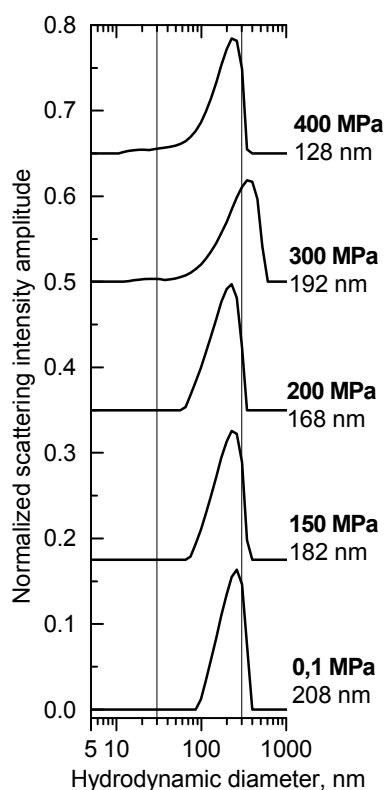


Figur 5. pH profil af β -lactoglobulin i vand under tryk.

pH stiger op til 1,5 pH-enhed omkring 300 MPa, når koncentrationen af β -lactoglobulin er omkring 3,6 mg/mL mælk svarende til forekomsten i mælk (figur 5). Denne stigning udlignes stort set, når trykpåvirkningen øges til 500 MPa. Mælkeproteinopløsningers (β -lactoglobulin) pH synes således at vise dynamiske ændringer, hvor pH stiger ved moderat høje tryk og falder ved højere tryk. Foreløbige pH målinger (*in-situ*) på mælk indikerer, at pH stiger svagt under tryk. Med mere viden om pH i mælkeproteinopløsninger under tryk kan disse resultater bruges til at forudsige stabilitet af mælkeproteinopløsninger og deres calciumbinding. Ligeledes kan trykeffekter på mælkeproteiner nu delvis forklares som et resultat af midlertidige pH-ændringer under trykbehandling. Denne viden kan udnyttes i design af nye mejeriteknologiske processer.

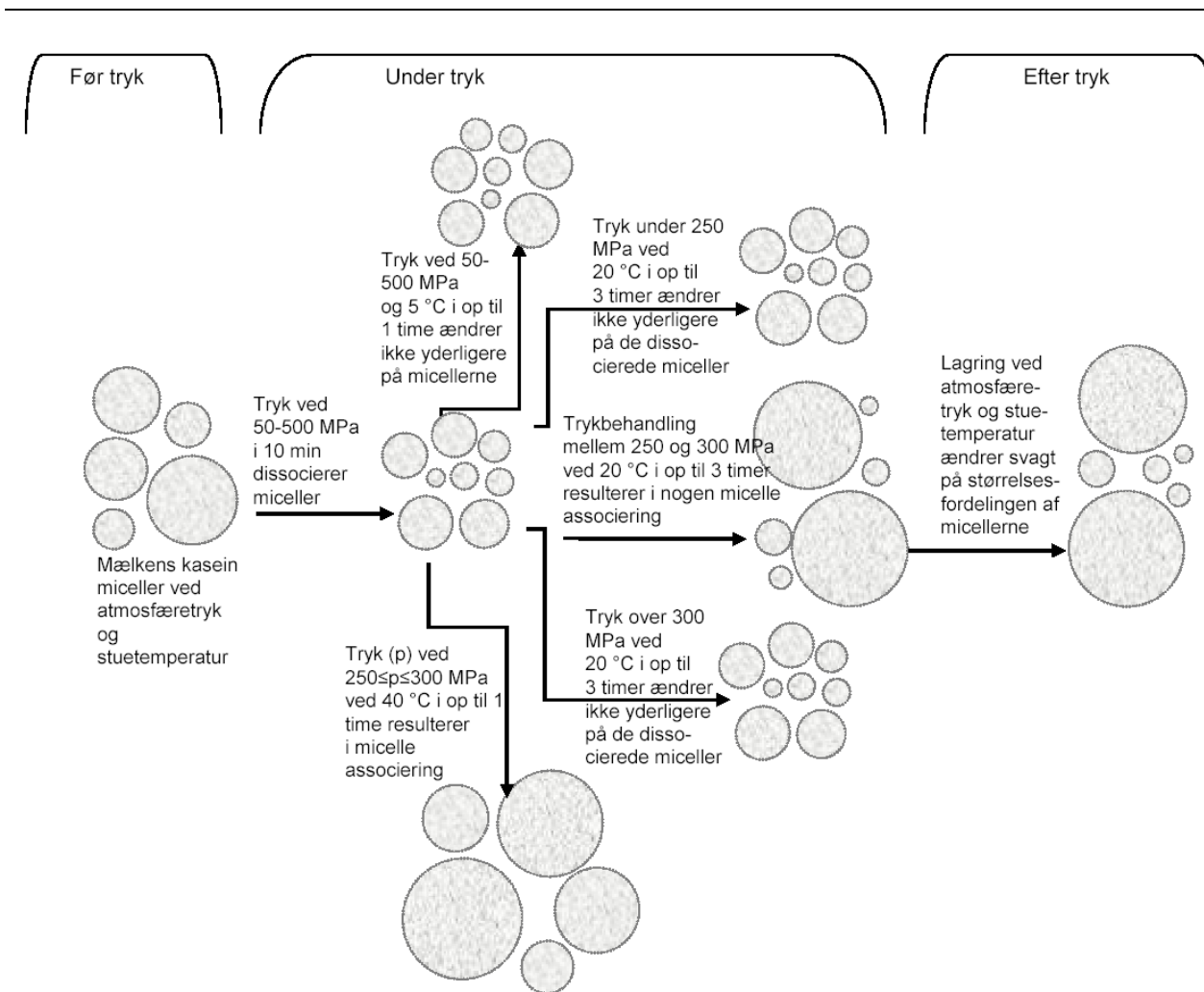
2.3 Højtrykseffekter på størrelsen af kaseinmiceller i mælk

Effekten af høje tryk på kaseinmiceller i mælk blev også undersøgt i projektet [Knudsen et al., 2005b; Orlien et al., 2005a]. Kaseinerne er de proteiner, der danner protein-netværk i ost og deres geldannelse er afgørende for mange mejeriprodukters egenskaber og kvalitet. Figur 6 viser størrelsesfordelingen af kaseinmiceller som er afgørende for blandt andet geldannelse i mælk efter højtryksbehandling.



Figur 6. Størrelsesfordeling af kaseinmiceller i ubehandlet skummetmælk (0,1 MPa) og efter trykbehandling af skummetmælk ved 150 MPa, 200 MPa, 300 MPa og 400 MPa i 20 min. Ud for hver størrelsesfordeling er z-middelværdien af kaseinmicellernes hydrodynamiske diameter (i nanometer) angivet. Målingerne er foretaget med dynamisk lysspredning. Fra Knudsen et al., 2005b.

Forsøgene viste, at behandling af mælk med tryk op til 200 MPa resulterer i en reduktion i kaseinmicellernes størrelse. Trykbehandling af mælk ved 300 MPa viste, at en del af kaseinmicellerne aggregerer, og en fraktion af større kaseinmiceller end dem der oprindeligt er til stede i den ubehandlede mælk blev observeret (figur 6).



Figur 7. Ændringer af kasein miceller under og efter højtryksbehandling af skummetmælk ved forskellige tryk (p) og temperaturer. Størrelsesforholdet af kasein micellerne i figuren er baseret på resultater fra målinger af mælks turbiditet under tryk (*in situ*) og fra målinger med dynamisk lysspredning af skummetmælk efter trykbehandling. Fra Orlien et al., 2005a.

Denne aggregering af mælken kaseinmiceller ved trykbehandling mellem 250 MPa og 300 MPa blev yderligere forstærket, når trykbehandlingen blev udført ved 40 °C frem for 20 °C. Yderligere blev den trykinducerede dissociation af kaseinmiceller forstærket ved lave temperaturer (5 °C) [Orlien et al., 2005a]. Figur 7 giver en oversigt, der viser hvorledes størrelserne af kasein micellerne ændrer sig under og efter trykbehandling af skummetmælk ved en række forskellige temperaturer og tryk. Trykbehandling af mælk og samtidig variation i temperaturen synes således at være perspektivrig med henblik på at kunne øge effekten af højtryk på kaseinmiceller for at opnå bestemte størrelsesfordelinger.

2.4 Højtrykseffekter på calciums binding til mælkeproteiner

I en forsimplet beskrivelse er mælk en overmættet opløsning af calciumphosphat. Mælkeproteinerne og især kaseinerne binder calciumioner og dette proteinbundne ”organiske” calcium i form af calciumphosphat nanoclusters bundet gennem phosphoryleret serin til kaseinerne udgør den ene hovedfraktion af calcium i mælk. Den anden hovedfraktion består af ”uorganisk” calcium i mælkens serumfase, hvor calcium er bundet i ”uorganiske” komplekser og komplekser af små organiske molekyler som lactat og citrat.

Højtryksbehandling af skummetmælk flyttede calcium fra proteinbinding til serumfasen, en fordeling, der kun langsomt reverterede mod ligevægtsfordelingen (tabel 1).

Tabel 1: Total calcium-koncentration i serum fra mælk målt med atomabsorptionsspektroskopi efter højtryksbehandling af mælk. Mælken blev ultracentrifugeret umiddelbart efter eller 24 timer efter trykbehandling. Calcium-koncentrationen blev målt i supernatanten efter ultracentrifugering af mælk ved 218 000 g i en time. Fra Knudsen et al., 2005b.

Højtryksbehandling (MPa)	Calcium-koncentration i serum (mM)	Calcium-koncentration i serum 24 timer efter højtryksbehandling (mM)	Total calcium- koncentration i mælk (mM)
0,1	9,54	-	31,2
150	13,3	11,2	-
200	14,4	12,3	-
300	13,6	12,1	-
400	13,4	11,1	-

Højtryksbehandling øgede den totale calcium-koncentration i mælkens serum fra omkring 9,5 mM i ubehandlet mælk til omkring 14 mM efter trykbehandling ved 200 MPa og omkring 13,5 mM efter trykbehandling ved 300 MPa og 400 MPa (tabel 1). Calcium-koncentrationen i mælkens serum faldt svagt efter trykbehandling og efter 24 timer var serum calcium-koncentrationen mellem 11 mM and 12 mM i alle de trykbehandlede prøver (tabel 1). Samlet viste resultaterne, at behandling af mælk med moderate høje tryk på 150 MPa påvirkede kaseinmicellernes calciumbinding og effekten blev svagt forstærket ved behandling med tryk på op til 200 MPa. En sådan kontrolleret overførsel af calcium mellem mælkens calcium pools bør kunne udnyttes til design af ernæringsforbedrede mejeriprodukter.

I projektet blev det også søgt at kvantificere calciums binding til valleproteiner under trykbehandling (*in-situ*) ved anvendelse af europium, der giver et skift i luminiscens ved binding til proteiner. Det blev fundet at europium i meget svag grad bindes til valleproteiner. Derfor blev det opgivet at foretage videre målinger med denne probe.

2.5 Reologiske egenskaber af syrnede geler fremstillet af højtryksbehandlet mælk

Det er velkendt, at varmebehandling af mælk (~ 10 min ved 90 °C) denaturerer valleproteinerne β -lactoglobulin og α -lactalbumin. Herved øges disse valleproteiners interaktioner med mælkens kaseinmiceller, hvilket resulterer i øget viskositet og vandbinding i syrnede produkter fremstillet ud fra varmebehandlet mælk. I dette projekt blev det undersøgt, hvordan højtryksbehandling af mælk påvirkede reologien af rørte syrnede mælkegeler fremstillet ud fra trykbehandlet mælk [Knudsen et al., 2005a]. Røregeler blev fremstillet af trykbehandlet mælk og flydeegenskaber samt røregelernes visko-elastiske egenskaber blev sammenlignet med geler fremstillet af varmebehandlet mælk. Viskositet og flydegrænse målt under konstant omrøring i de rørte syrnede geler blev gradvist øget ved behandling af mælk med tryk op til 600 MPa. Varmebehandling af mælk ved 90 °C i 30 minutter eller trykbehandling af mælk ved 600 MPa i 20 minutter gav samme viskositet og flydegrænse i de syrnede røregeler. Målinger af de syrnede geler med dynamisk oscillation med lille amplitude viste, at røregelernes visko-elastiske egenskaber blev gradvist øget ved behandling af mælk med tryk på op til 600 MPa. Det blev videre fundet, at varmebehandling af mælk ved 90°C i 30 minutter eller trykbehandling ved 600 MPa i 20 minutter gav ens visko-elastiske egenskaber i de syrnede røregeler. Disse resultater kan udnyttes til at fremstille yoghurttyper hvor varmebehandling ved lavere temperaturer giver mere frisk smag.

2.6 Reologiske egenskaber af neutrale geler fremstillet af højtryksbehandlet mælk

Projektet omhandlede også en karakterisering af neutrale geler fremstillet af højtryksbehandlet mælk [Orlien et al., 2005b]. Trykbehandling af mælk alene inducerer ingen geldannelse, men ved trykbehandling af mælk med tilsætning af 10 eller 15 % valleproteinisolat (WPI) blev der dannet geler. Reologiske målinger med dynamisk oscillation blev brugt til at karakterisere visko-elastiske egenskaber i disse neutrale mælke- og valleproteingeler. Højtryksbehandling (200 MPa i 15 minutter) af mælk tilsat 15 % valleproteinisolat resulterede i dannelse af neutrale geler. Trykbehandling i området fra 400 MPa til 600 MPa gav en yderligere stigning i gelstivheden, og både de elastiske og viskøse egenskaber i gelerne steg. Trykbehandling i området fra 400 MPa til 600 MPa blev fundet at resultere i geldannelse af mælk tilsat 10 % valleproteinisolat og gelstivheden steg yderligere, når mælken blev tilsat 15 % valleproteinisolat. Gelernes reologiske egenskaber var stabile og lagring af gelerne ved 5 °C i op til 5 dage efter trykbehandlingen gav ingen væsentlig ændring i gelernes visko-elastiske egenskaber. Geler fremstillet af valleprotein opløst i mælk havde et fire gange højere elastisk modul i forhold til geler fremstillet af valleprotein opløst i vand ved sammenlignelige tryk og

holdetider. Trykbehandling ved 600 MPa i 15 minutter og en valleproteinkoncentration på 15 % var nødvendig for at få opløsninger af valleproteiner i vand til at gelere.

Neutrale mælkegeler fremstillet ved trykbehandling i området fra 300 MPa til 400 MPa havde samme styrke og stivhed som en varme-induceret mælkegel fremstillet ved en varmebehandling på 80 °C i 10 minutter. Mælken havde i begge tilfælde øget valleproteinindhold (tilsat 15 % valleproteinisolat).

Farvemålinger på skummetmælksgelerne viste, at disse geler havde samme hvide farve som skummetmælk, hvorimod trykbehandlet skummetmælk er mere transparent sammenlignet med ubehandlet skummetmælk. Kaseinmicellerne i trykbehandlet skummetmælk er dissocierede og reduceret i størrelse, hvilket resulterer i at mælken bliver mere transparent. Men ved dannelse af en trykinduceret skummetmælks-gel inkorporeres kaseinmicellerne i et netværk, hvilket ændrer partikelstørrelsen af kaseinmicellerne, og disse trykinducerede skummetmælksgeler får samme hvide farve som ubehandlet skummetmælk.

Resultaterne viser samlet, at neutrale mælkegeler kan fremstilles ved trykbehandling alene [Orlien et al., 2005b]. Trykbehandling af mælk og valleproteinblandinger i kombination med varmebehandling synes at være en interessant alternativ metode til at fremstille neutrale mælkegeler og forsøg med flere variationer af proteinkoncentration, temperatur og tryk er planlagt med henblik på at karakterisere egenskaberne af disse geler og designe nye typer af dessertprodukter.

3 Konklusioner

Samlet har projektet vist, at høje hydrostatiske tryk kan anvendes til en specifik og kontrolleret modificering af mælkens proteiner, og det gælder både kaseinmiceller og valleproteiner. Især er det nyt, at disse ændringer er blevet beskrevet kvantitativt, hvilket fremmer en fremtidig udnyttelse i produktudvikling. Både for geldannelse og for kaseinmicellernes størrelsesfordeling er der således identificeret relativt snævre tryk-intervaller, hvor effekten er størst.

Målinger af overfladetrykket i luft/vand grænsefladen viste, at trykbehandling af β -lactoglobulin (fra 150 MPa til 400 MPa) fremmer adsorptionen af β -lactoglobulin til luft/vand grænsefladen. Overfladereologiske målinger viste, at den adsorbere film i olie/vand grænsefladen havde en markant øget elasticitet for film stabiliseret af trykbehandlet β -lactoglobulin (fra 150 MPa til 400 MPa) i stedet for nativt β -lactoglobulin. β -lactoglobulins øgede overfladehydrophobicitet induceret ved højtryksbehandling blev identificeret som årsag til de forbedrede overfladeegenskaber af trykbehandlet β -lactoglobulin i olie/vand grænsefladen sammenlignet med overfladeegenskaberne af ubehandlet β -lactoglobulin.

Målinger af pH i β -lactoglobulin opløsninger under tryk viste dynamiske ændringer, hvor pH steg ved moderat høje tryk og faldt ved højere tryk. Denne viden lægger op til specifikke ændringer af funktionelle egenskaber gennem tryk-induceret pH-ændring.

Højtryksbehandling af skummetmælk blev vist at flytte calcium fra proteinbinding til serumfasen, en fordeling der kun langsomt reverterede mod ligevægtsfordelingen. En sådan pertubering af calcium fordelingen er interessant i forbindelse med forbedring af ernæringsmæssige egenskaber af mejeriprodukter.

Trykbehandling af mælk mellem 150 MPa og 200 MPa blev vist at reducere størrelserne af kaseinmicellerne i mælken. Trykbehandling af mælk mellem 250 MPa og 300 MPa resulterede i en fraktion af kaseinmiceller med mindre størrelser end kaseinmiceller i ubehandlet mælk og en fraktion af kaseinmiceller større end kaseinmiceller i ubehandlet mælk. Aggregeringen af mælkens kaseinmiceller ved trykbehandling mellem 200 MPa og 300 MPa blev yderligere forstærket, når trykbehandlingen blev udført ved 40 °C frem for 20 °C. Yderligere blev den trykinducerede dissociation af kaseinmiceller forstærket ved lave temperaturer (5 °C).

Trykbehandling af mælk alene inducerer ingen geldannelse, men ved trykbehandling af mælk med tilsætning af 10 eller 15 % valleproteinisolat (WPI) blev der dannet neutrale geler, som kan danne grundlag for nye desserttyper.

Modificering af mælkeproteiner med høje tryk og samtidig variation i temperaturen synes at være perspektivrigt med henblik på at kunne øge effekten af højtryk på mælkeproteiner. Med trykbehandling af mælk er det muligt at opnå bestemte størrelsesfordelinger af kaseinmiceller og trykbehandling af valleproteiner kan anvendes til specifik og gradvis proteinmodificering og ændring af funktionelle egenskaber. Videre forsøg for at fastlægge effekten af kombinationer af varme og trykbehandling på mælkeproteiner er igangsat.

