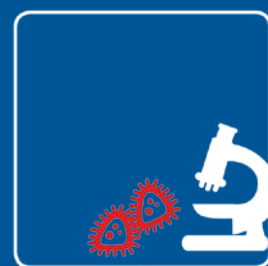


# Mælkens sæsonvariation – betydning for fremstilling af fløde- og gul ost





---

DATO: 17. april 2012

## Slutrapport

### for forsknings- og udviklingsprojekter med tilskud fra Innovationsloven

---

#### 1. Projektitel:

Mælkens sæsonvariation - betydning for fremstilling af fløde- og gul ost

---

#### 2. FødevarerErhvervs j.nr.:

3414-08-02143

---

#### 3. Ansøger (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail):

Forskningsfaglig Konsulent, Pia M. Nissen, Mejeribrugets ForskningsFond, Landbrug & Fødevarer, Agro Food Park 13, DK 8200 Århus N, Tlf. +45 3339 4665, pmn@lf.dk (oprindelig ansøger var Grith Mortensen)

---

#### 4. Deltagende samarbejdsparter (navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):

Institut for Fødevarer, Science and Technology, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, Tlf. +45 8715 6000, Fax: +45 8715 4891, food@au.dk

Institut for Fødevarervidenskab, Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, Tlf. +45 3533 3222, fax: +45 3533 3245, ifv@life.ku.dk

Foss, Slangerupgade 69, Postbox 260, DK-3400 Hillerød, Danmark, Tlf. +45 7010 3370, Fax: +45 7010 3371, info@foss.dk

Arla Foods a.m.b.a., Sønderhøj 14, 8260 Viby J, Danmark, Tlf. +45 8938 1000, Fax +45 8628 1691, Arla har ikke nogen overordnet e-mail men kan kontaktes via hjemmesiden [www.arla.dk](http://www.arla.dk)

Thise Mejeri, Sundsørevej 62, Thise, 7870 Roslev, Tlf. +45 9757 8001, Fax: +45 9757 8122, info@thise.dk

---

Alle relevante oplysninger **skal** fremgå af statusrapporten.

**Slutrapport samt publikationer og artikler mm. fra hele projektperioden sendes i ét eksemplar til:**

FødevarerErhverv

Udviklingsstøttekontoret

Nyropsgade 30

1780 København V

**5. Kontaktpersoner** (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail. For hver deltagende institution er der udpeget én kontaktperson):

Forskningsfaglig Konsulent, Pia M. Nissen, Mejeribrugets ForskningsFond, Landbrug & Fødevarer, Agro Food Park 13, DK 8200 Århus N, Tlf. +45 3339 4665, Fax: +45 8740 5010, pmn@lf.dk

Postdoc og daglig projektleder Kell K. Andersen, Institut for Fødevarer, Science and Technology, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, Tlf. +45 8715 7842, Fax: +45 8715 4891, kell.andersen@agrsci.dk

Professor Rasmus Bro, Institut for Fødevarevidenskab, Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, Tlf. +45 3533 3296, Fax: +45 3533 3245, rb@life.ku.dk

Research Scientist Max Egebo, Foss, Slangerupgade 69, Tlf. +45 7010 3370, Fax: +45 7010 3371, me@foss.dk

Innovation Manager Mette Bakman, Arla Strategic Innovation Centre, Protein Chemistry, Rørdrumvej 2, DK-8220 Brabrand, Tlf. +45 8746 6738, Fax: +45 8746 6688, meba@arlafoods.com

Mejeribestyrer Poul Pedersen, Thise Mejeri, Sundsørevej 62, Thise, 7870 Roslev, Tlf. +45 2020 8004, Fax: +45 9757 8122, poul.pedersen@thise.dk.

**6. Øvrige projektmedarbejdere** (titel, navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):

**AU:**

Forskningsleder Grith Mortensen, Institut for Fødevarer, Science and Technology, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, Tlf. +45 8715 8031, Fax +45 8715 4891, grith.mortensen@agrsci.dk

Seniorforsker Hanne Bertram, Institut for Fødevarer, Science and Technology, Aarhus Universitet, Kirstinebjergvej 10, DK-5792 Årslev, Tlf. +45 8715 8353, fax: +45 8715 4812, HanneC.Bertram@agrsci.dk

Postdoc Ann Louise Worsøe Jørgensen, Institut for Fødevarer, Science and Technology, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, annlouise.joergensen@agrsci.dk

**KU:**

Lektor Thomas Hjort Skov, Institut for Fødevarevidenskab, Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, thsk@life.ku.dk

Adjunkt Evrim Acar, Institut for Fødevarevidenskab, Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, evrim.acarataman@gmail.com

Lektor Giorgio Tomasi, Institut for Fødevarevidenskab, Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, giorgio.tomasi@gmail.com

Ph.d.-studerende Lotte Bøge Sørensen, Institut for Fødevarevidenskab, Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, lottebs@life.ku.dk

**Arla Foods**

Senior Director Lene Vognsen, Arla Strategic Innovation Centre, Process & Packaging, Rørdrumvej 2, DK-8220 Brabrand, Tlf. +45 8746 6733, Fax: +45 8746 6688, lvog@arlafoods.com

Research Scientist Mette Christensen, Arla Strategic Innovation Centre, Protein Chemistry, Rørdrumvej 2, DK-8220 Brabrand, Tlf. +45 8746 6728, Fax: +45 8746 6688, mtnis@arlafoods.com

Research Scientist Julie Johnsen, Arla Strategic Innovation Centre, Process Analytical Technology, Rørdrumvej 2, DK-8220 Brabrand, Tlf. +45 8746 6727, Fax: +45 8746 6688, jljo@arlafoods.com

Innovation Manager John Sørensen, Arla Foods Ingredients, R&D, Analytical Support, Nr. Vium, Sønderupvej 26, DK-6920 Videbæk, Tlf. +45 7217 7847, jos@arlafoods.com

Director Jacob Holm Nielsen, Arla Strategic Innovation Centre, Milk Chemistry & Nutrition, Rørdrumvej 2, DK-8220 Brabrand, Tlf. +45 8938 1681, Fax: +45 8746 6688, jbnis@arlafoods.com

**Thise Mejeri**

Mejeriingeniør Henrik Kanstrup, Sundsørevej 62, Thise, 7870 Roslev, Tlf. +45 4113 9001, Fax +45 9757 8122, henrik.kanstrup@thise.dk

---

**7. Projektets start- og slutdato:**

01-08-2008 til 30-12-2011.

Note: Projektet er forlænget ad to omgange. Først fra 31-07-2011 til 11-11-2011 og dernæst frem til 30-12-11-2011. Forlængelse begrundes med faderorlov taget af hhv. Kell Andersen (AU) og Thomas Hjort Skov (KU).

---

## 8. Slutrapport: (maks. 4-6 sider)

### A. Sammendrag af projektets formål og af projektets indhold i henhold til den godkendte projektansøgning:

Der er behov for at få klarlagt årstidsvariationens indflydelse på råvaren og den endelige ostekvalitet, da der er erkendt en stor kvalitetsvariation i mejeriprodukter, ikke mindst i gul ost og flødeost. **Formålet** er at opnå en forståelse af mælks sæsonvariation i relation til den endelige kvalitet af ost ved brug af avancerede omics-teknologier samt traditionelle kemiske, teknologiske og sensoriske målinger. **Hypotesen** er, at der er tale om en kompleks sammenhæng, dvs. at det ikke er en simpel variation i en enkelt eller nogle få komponenter, der afgør den endelige ostekvalitet, hvorfor der er behov for en kombineret anvendelse af moderne analyseteknikker og avancerede kemometriske modeller til beskrivelse af den komplekse sammenhæng. Derfor udvikles og implementeres nye algoritmer, der muliggør fortolkning af resultaterne fra de gennemførte analyser. Herudfra udvikles FT-IR-baserede hurtigmetoder, som vil indgå i mejeriernes fremtidige kvalitetsstyring.

### B. Projektets resultater og konklusion:

#### *Resultater*

Projektet har gennemført indsamling af mælk fra to konventionelle mejerier over en periode på 18 måneder og fra et økologisk mejeri over en periode på ni måneder. I alt 266 mælkeprøver er indsamlet, inkluderende både rå mælk samt protein og fedt standardiseret ostemælk.

I projektet er der udviklet og implementeret metoder til en detaljeret bestemmelse og karakterisering af mælkens indholdsstoffer. Grundet mængden af data og komplekse sammenhænge er automatiserede metoder til håndtering og analyse af data udviklet. Disse metoder har tilsammen muliggjort effektiv uddragning af information fra de mange forskelligartede, instrumentelle metoder, der har været anvendt. I projektet er der udviklet algoritmer, som har sikret reproducerbar håndtering af data og forbehandlet disse, så de repræsenterede data på en måde, der gav mejeriteknologisk mening. Eksempelvis er en hurtigmetode til bestemmelse af relative koncentrationer af fedtsyrer blevet udviklet. Denne metode arbejder direkte på kromatogrammer og udtrækker toparealer for langt flere komponenter end hvad der er muligt med traditionel håndtering af kromatografiske data.

Mælakens sammensætning er analyseret på protein-, fedt-, mineral- og metabolitniveau ved hjælp af de nyudviklede metoder. For alle parametre er der i råvaren påvist sæsonvariation. For mælakens proteiner er der observeret variation i vallefraktionen, hvor forholdet mellem  $\alpha$ -lactalbumin og  $\beta$ -lactoglobulin udviser sæsonvariation. Forholdet mellem  $\alpha$ -lactalbumin og  $\beta$ -lactoglobulin har et maksimum omkring uge ~15 (midt april) og minimum omkring uge 40 (start oktober). Desuden er der tendens til, at glykosylering af  $\kappa$ -kasein også udviser sæsonvariation. Tendensen er, at andelen af  $\kappa$ -kasein, som er glykosyleret, er størst omkring kalenderuge 35-40 og mindst omkring kalenderuge 15-20. Fedtsyresammensætningen varierer hen over sæsonen, og denne variation er størst for økologisk mælk, hvilket forventes primært at skyldes forskelle i fodringen. For både økologisk og konventionel mælk er det eftervist, at mælkefedtet generelt er mere umættet i sommerperioden end i vinterperioden. Variationen i mælakens fedtsyresammensætning har vist sig at have indflydelse på mælkefedtets smeltepunkter, som er relevant for smøreegenskaberne. Undersøgelser af mælkefedtets lav-, mellem- og høj smeltefraktion viser, at der er en tendens til at smeltepunktet for den lavsmeltende- og højtsmeltende fedtfraktion er lavest om sommeren. Analyse af 37 metabolitter i mælken, herunder en række aminosyrer, organiske syrer og en del sukre, viste, en overordnet og

systematisk variation hen over året. Det har dog ikke været muligt at klarlægge betydningen af denne variation. Mineralindholdet i mælk er i høj grad korreleret til proteinkoncentration. Mineralindholdet varierer derfor i rå mælk, mens det ikke har været muligt at påvise sæsonvariation i ostemælk, hvor proteinkoncentrationen er standardiseret.

Mælkens funktionelle egenskaber, herunder koaguleringssegenskaber og syrningsaktivitet er undersøgt som funktion af sæsonen. Projektet har vist, at pH i ostemælken (før justering) har afgørende betydning for mælkens ostningsegenskaber (koaguleringssegenskaber). Ostemælk med høj initial pH giver fastere ostemasse end mælk med lav pH, på trods af at mælken er indstillet til samme pH før måling af koaguleringssegenskaber. Det har ikke været muligt at påvise en decideret årstidsvariation i mælkens koaguleringssegenskaber. Baseret på pH-data har projektet udviklet en prædiktionsmodel til Foss' analytiske udstyr, MilkoScan, som kan bestemme pH i mælk. Denne hurtigmetode til bestemmelse af pH kan integreres i allerede eksisterende analyseudstyr på danske mejerier og kan derfor indgå i den fremtidige kvalitetsstyring. Detaljerne for denne prædiktionsmodel er beskrevet i en applikationsnote, som udgives af Foss.

### *Konklusion*

Overordnet har projektet implementeret og udviklet metoder, som kan karakterisere mælkens sammensætning i en langt højere detaljeringsgrad end tidligere. Desuden er der udviklet værktøjer til håndtering af de store og komplekse data, som nærværende projekt har genereret. Dette har muliggjort en kortlægning af sæsonbetonede variationer i såvel rå mælk som standardiseret ostemælk fra konventionelle og økologiske mejerier. Kortlægningen er værdifuld for en forståelse af de effekter, som mejerierne observerer i osteproduktionen hen over årstiderne. Projektet har desuden udviklet værktøjer, som kan implementeres direkte i de danske mejeriers kvalitetsstyring. Nye interessante observationer er også gjort, som kræver nærmere undersøgelser både på industriel- og universitetsniveau.

### **C. + D. Projektets faglige forløb og samarbejdsrelationer:**

Videnskabelig assistent Ann Louise Worsøe Jørgensen (AU) blev ansat ved projektets start og lavede indledende metodeudvikling. Projektet tog først for alvor fart, da projektleder Kell K. Andersen blev ansat pr. maj 2009. Arbejdsplanen har derfor været længere end forventet. Andre arbejdsplaner er af denne årsag blevet parallelforskydet frem i tiden og koncentreret, således at projektet alt i alt slutter fem måneder efter oprindeligt aftalt slutdato. Heri ligger også faderorlov til hhv. Kell K. Andersen (AU) og Thomas H. Skov (KU), som beskrevet ovenfor.

I projektansøgningen var Thise Mejeri anført som associeret til projektet, men ikke fuldblyndet projektdeltager. Efterfølgende er Thise optaget i projektet som fuld projektpartner, og de juridiske aspekter herved er afklaret i et tillæg til den oprindelige samarbejdsaftale.

I projektet er der udvalgt færre produktionssteder end beskrevet i ansøgningen for blandt andet at kunne opretholde en tilfredsstillende prøveudtagningsfrekvens. Tidligt i projektet besluttede projektgruppen, anført af Arla Foods, at fokus skulle drejes fra flødeost til gul ost og mozzarella ost, da produktionsstederne oplevede, at problemer med sæsonvariationer var størst her. Det betyder, at antallet af planlagte produktionssteder blev reduceret fra 3-5 (milepæl 3) til tre produktionssteder (Thise Mejeri og Arla mejerierne, Taulov samt Rødkærsbro). I praksis har fokus ikke været på selve slutproduktets (ostens) egenskaber, men derimod på ostemælkens ostningsegenskaber (såsom syrningskurver og koaguleringssegenskaber). På den måde har antallet af prøver kunnet holdes langt højere, end hvad der ellers ville være muligt ud fra budgettet.

Projektet har været meget tværfagligt og der har været en stor andel udveksling af prøvemateriale, resultater og viden mellem de involverede parter. Det eksperimentelle arbejde er udført ved hhv. AU

og Arla Foods og de genererede data er behandlet ved KU, AU og FOSS. Alle parter har været involveret i tolkning af data.

Projektet har haft nære relationer til Lektor Lotte Bach Larsen (AU), som er projektleder for det danske "Milk genomics" initiativ. Ulrik Sundekilde som er ph.d.-studerende og ansat under "Milk Genomics" har anvendt NMR til at studere metabolitter i prøver fra "sæsonvariation". "Milk Genomics" har benyttet en LC-MS-metode udviklet under "sæsonvariation" til at studere proteinprofilen. Desuden har der været etableret samarbejde med Lektor Lars Wiking (AU) med hensyn til at bestemme smeltepunkter af mælkefedt, og Forsker Mette Krøgh Larsen (AU) har deltaget i analyse og tolkning af mælkens fedtsyresammensætning.

Alle parter har opfyldt deres økonomiske tilsagn, og budgetterne er i det store hele overholdt med enkelte forskydninger mellem posterne.

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

Mejerierne har fået sat tal på den indflydelse, som variationer i råvaren (mælken) har på vigtige ostningsprocesser, herunder koagulerings- og syrningsprocessen. Resultaterne vil blive anvendt i mejeriernes fortsatte bestræbelser på at optimere procesøkonomi og produktkvalitet. Endelig har projektet givet oplysninger, der kan anvendes ved markedsføring af differentierede produkter. Et helt nyt eksempel er Thises "Midsommerost", der dog ikke specifikt bygger på resultater fra dette projekt.

Foss har fået mulighed for at teste deres Milkoscan på en række nye områder, og der er i projektet udviklet en prædiktionsmodel til bestemmelse af pH. Denne hurtigmetode til bestemmelse af pH vil indgå i allerede eksisterende Foss udbudspakker til analytisk udstyr på mejerierne og er dermed med til at fastholde Foss' førende position inden for hurtiganalyse af fødevarer.

Der er i projektet ikke fremkommet resultater, der kan patenteres eller opnås eneretsbeskyttelse på. Projektets resultater implementeres på danske mejerier og er med til at sikre mejerbrugets førerposition på det internationale marked for mejeriprodukter. Et stærkt danske mejeribrug sikrer, at der fortsat er danske arbejdspladser i dele af landet, hvor udbuddet af videnarbejdspladser ellers er begrænset.

Det tætte samarbejde mellem universiteterne og de industrielle parter har ført til en væsentligt styrkelse af kompetencer hos alle parter og har givet en øget forståelse for vores forskellige interesser og rammer for aktiviteter. Det har også givet anledning til nye samarbejder, som vil føre til aktiviteter såsom speciale-projektsamarbejde og nye forskningsansøgninger.

Projektet har vist, at proteom- og metabonomanalyser er relevante i forhold til at undersøge kvaliteten af mejeriprodukter. Der er dog potentiale for yderligere karakterisering af mælkens indholdsstoffer, da disse teknikker fortløbende videreudvikles med hensyn til bl.a. øget følsomhed, mere skånsom prøveforberedelse og kortere analysetider.

Flere af projektets metoder og resultater ligger til grund for analyser, som føres videre internt ved AU samt i regi af inSPIRe (platform for forskningsbaseret innovation og problemløsning i fødevarerindustrien). På KU er der kommet endnu mere opmærksomhed på behovet for automatiserede metoder, der kan udtrække værdifuld information fra komplekse data. Sådanne automatiserede metoder betyder, at langt flere kan få gavn af de komplekse data, fordi hver datakilde (NMR, LC-MS, mm) ikke længere kræver højt kvalificeret personale til selve dataanalysen. KU er ligeledes i gang med at udvikle yderligere metoder, der kan finde grupperinger i data og kigger også på, hvordan multivejs-datastrukturer (fx LC-MS og GC-MS) kan håndteres automatisk. De mange

data fra sæsonvariation vil blive anvendt til at optimere multiblokmodeller, der kan kigge på mange blokke af data på een gang. Projektet har givet øget fokus på de udfordringer, der ligger i at udtage og måle prøver over meget lange perioder (år), og denne erfaring vil kunne udnyttes i fremtidige studier.

## **F. Samarbejdsrelationer, forskeruddannelse og engelsk resume:**

**Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)** er en erhvervsdrivende fond, der finansieres af den danske mejeriindustri, og den repræsenterer således hele branchen. MFF igangsætter og koordinerer en række anvendelsesorienterede og grundlagsskabende projekter i tæt samspil mellem danske mejerier og førende vidensinstitutioner. Med de midler, offentlige bevillingshavere og partnerne selv skyder ind i projekterne, er der investeret mere end 500 mio kr. risikovillig kapital i mejeriforskning siden oprettelsen i 1990. MFF har i samme periode iværksat mere end 140 projekter og har således stor erfaring med at igangsætte og lede bl.a. Innovationslovsprojekter samt sikre, at den genererede viden kommer det samlede danske mejeribrug til gavn.

**Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet** forsker i hele kæden fra råvarens sammensætning og kvalitet over forarbejdning til fødevarens sundhedsmæssige værdi, spisekvalitet og forbrugernes præferencer. Institut for Fødevarer har førende kompetencer og ressourcer samt aktive nationale og internationale netværk. Derfor er instituttet i stand til at yde væsentlige bidrag til de globale udfordringer relateret til fødevarer; fødevarerforsyning, fødevarespild, bæredygtig fødevarerproduktion og øget forekomst af livsstilssygdomme. Yderligere fokusområder er fødevarer kvalitet, differentiering af fødevarer og nye, lettilgængelige og sunde fødevarer. De fleste forskningsaktiviteter udføres i samarbejde med industri- eller forskningspartnere, og der er stor fokus på formidling, udvikling, demonstration og implementering af forskningsresultater til fordel for industri og samfund.

**Institut for Fødevarevidenskab, KU-SCIENCE (IFV)** forsker og tilbyder universitetsuddannelser inden for fødevarer. IFV har en anvendelsesorienteret og erhvervsrettet tilgang til fødevarer. Vi bringer vores viden i spil, så den kan blive til størst mulig gavn for det danske såvel som det internationale samfund. IFV består af fem faggrupper, Fødevarekemi, Fødevaremikrobiologi, Kvalitet og Teknologi, Mejeriteknologi og Sensorisk videnskab. Institutet uddanner blandt andet kandidater i fødevarevidenskab, mejerividenskab, gastronomi og proces-analytisk teknologi.

**Arla Foods** er en dansk-svensk andelsejet mejerivirksomhed med primære hjemmemarkeder i Danmark, Sverige Tyskland og England. Arla Foods fremstiller og sælger alle typer mejeriprodukter og mælkebaserede ingredienser på relevante markeder i Europa, USA, Mellemøsten og Asien. Arla Foods amba gennemfører forsknings- og innovationsaktiviteter inden for alle typer mejeriprodukter og mælkebaserede ingredienser fordelt på tre innovationscentre i Danmark og Sverige. Det sker både egenhændigt og i samarbejde med danske og udenlandske vidensinstitutioner og leverandører.

**Thise Mejeri** blev grundlagt i 1988 i et samarbejde mellem en mejerist og en mindre gruppe økologiske mælkeproducenter. Og linjen for mejeriets drift har fra begyndelsen været helt klar: Kompromisløs økologisk kvalitet. Thise Mejeri har i dag en stærk position på det danske marked med et bredt sortiment af standard- og specialprodukter kombineret med en stadig strøm af produktnyheder. Thise producerer således hele produktpaletten af mejeriprodukter fra frisk mælk til langtidslagrede gourmetoste. Endelig har Thise Mejeri fokus på råvarekvaliteten og på at mælk fra forskellige kvægracer skal anvendes til specifikke formål. Godt 80% af mejeriets produktion afsættes i Danmark, hvor Coop Danmark er den største kunde. De resterende 20 % eksporteres. Thise Mejeri har et fintmasket netværk og samarbejdsrelationer både nationalt og internationalt til leverandører, kunder, øvrig industri og vidensinstitutioner.



**FOSS** udvikler og producerer analytisk udstyr, der forbedrer kundernes effektivitet, produktkvalitet og profit. FOSS er ledende inden for dedikerede analytiske løsninger til agroindustrien, fødevarerindustrien, samt den kemiske og farmaceutiske industri. FOSS har et udbygget nationalt og internationalt netværk og generer således 98 % af forretningen uden for Danmarks grænser.

### **Forskeruddannelse**

Projektet har bidraget til forskeruddannelse af ph.d.-studerende Lotte Bøge Sørensen, KU og Ulrik Sundekilde, AU samt postdoc Kell K. Andersen, AU og adjunkt Evrim Acar, KU.

### **English Summary**

#### *Project purpose*

It is well documented that the quality of many dairy products is influenced by seasonal changes in the milk. The effect is especially distinct for products such as yellow cheeses and cream cheeses. There is thus a need to clarify the effects of seasonal variations in milk on the final quality of cheese. The **purpose** of the project is to use traditional chemical analyses and advanced omics-technologies to characterize variations in milk and correlate these to the quality of cheese. The **hypothesis** is that that not only a few but many parameters in the milk influence the final quality of cheese. The complexity of the system therefore requires modern and advanced analytical tools in the form of chemometric models to describe the complex correlations. The project will therefore develop and implement new algorithms that can handle data from various analytical techniques. Based on the results, FT-IR fast methods will be developed and implemented in the quality control at the dairies.

#### *Results*

During the project, milk was sampled from two conventional dairies over a period of 18 months and from one organic dairy over 9 months. In all, 266 milk samples have been collected including both raw milk and standardized cheese milk.

The project has developed and implemented instrumental methods for a detailed characterization of the constituents in milk. Automated methods for analysis of large amounts of data have been developed. Combined, these methods permit effective extraction of information from the array of the different methods used. Algorithms developed in the project have ensured reproducible handling and treatment of complex data such that output is presented in a meaningful way. E.g. a fast method for determination of relative concentrations of fatty acids has been developed. The method extracts peak areas directly from chromatograms for at much larger number of components compared to how traditional chromatographic data is handled.

The milk composition has been analyzed at protein, fat, mineral and metabolite level using the newly developed methods. Seasonal variations were observed for all the parameters investigated. In the protein fraction, variations in whey was observed, where the ratio between  $\alpha$ -lactalbum and  $\beta$ -lactoglobulin displayed seasonal variation. The amount of  $\alpha$ -lactalbumin out of the total amount of whey protein reaches a maximum around week 14 (mid April) and a minimum around week 40 (start October). In the casein fraction, there is a tendency that the amount of  $\kappa$ -casein which is glycosylated also displays seasonal variation. For all three dairies, there is a tendency that the fraction of glycosylated  $\kappa$ -casein reaches its minimum around week 15-20 and its maximum around week 35-40.

Seasonal effect was observed in the fatty acid composition in milk from both conventional and organic dairies. For both organic and conventional milk, the milk fat has a higher fraction of unsaturated fat during summer, while the fraction of saturated fat is increased during winter. The effect of season is most distinct in the organic milk. Variations in the fatty acid composition were found to influence the melting temperatures of milk fat, which is relevant for spreadability of butter.

Investigations of the low, mid and high melting fractions show that there is a tendency that the melting point for the low and the high melting fractions are lowest during summer. Analysis of 37 metabolites in milk, including some amino acids, organic acids and sugars, reveals seasonal variation. The significance of this finding has, however, not been determined.

The functional properties of milk including coagulation and acidification properties have been investigated as a function of season. The project has shown that pH in protein standardized cheese milk (prior to adjustment to pH 6.5) is the primary factor describing variations in the milk coagulation properties. Cheese milk with high pH gives firmer cheese coagulum compared to milk with a low pH. Variations in milk pH were not correlated to season, therefore coagulation properties could not be related to season either. Due to the importance of pH for coagulation properties of milk, a prediction model for the Foss Milkoscan has been developed. This fast method for determination of pH will be integrated into existing dairy analytical equipment in Danish dairies and can therefore be used in future quality control. The details of this prediction model are described in an application note which will be published by Foss.

#### *Conclusion:*

In all, the project has implemented and developed methods that can characterize the composition of milk at a much more detailed level than what was previously possible. In addition tools have been developed to handle the large amounts of data, which the current project has generated. This permits mapping of seasonal variations in raw milk and standardized cheese milk from both conventional and organic dairies. The seasonal observations mapped in this project are of high value for an understanding of the effects of season which are experienced by the Danish dairies. The project has developed tools which can be directly implemented in the quality control at the Danish dairies. New and interesting observations have been made which call for further investigations at both university and industrial level.

#### **G. Redegørelse for projektets perspektiver:**

Projektet har indirekte styrket virksomhedernes konkurrenceevne, men det forventes ikke, at der inden for den nærmeste tidshorizont fremkommer produkter, som kan anvendes kommercielt.

#### **H. Projektets økonomiske forløb:**

I projektperioden har AU flyttet midler fra 2010 til 2011. Dette begrundes med, at projektet indsamlede mælkeprøver til og med december 2010, og det var ikke muligt at analysere alle prøverne inden udgangen af 2010. Midler til dækning af materialer og TAP blev derfor flyttet fra 2010 til 2011. Budgetændring blev godkendt af Fødevareerhverv i brev af 30. november 2011. Budgetændringerne har for projektets helhed været udgiftsneutrale. Alle parter har opfyldt deres økonomiske forpligtigelser.

#### **I. Liste over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet:**

##### *TV-indslag*

Portrætudsendelse om Forskningscenter Foulum

Sendt første gang i "Mokka" (<http://www.tvmidtvest.dk>) den 27. januar 2011 kl. 20.00

Journalist Kirstine Stensig Kristensen interview af postdoc og projektleder Kell K. Andersen samt laboratoriefuldægtig Gitte Hald Kristiansen omkring "sæsonvariation"-projektet.

##### *Præsentationer ved konferencer og seminarer*

Mælkens sæsonvariation – Betydning for fremstilling af fløde- og gul ost.

*Andersen KK*

Mejeriforskningens Dag, den 17. marts 2011, Hotel Legoland, Billund, Danmark.

Coclustering.

*Bro R*

Præsenteret på 12th Scandinavian Symposium on Chemometrics, den 7.-10. juni 2011, Billund

Seasonal variation in Milk.

*Andersen KK*

"It's all about Milk" seminar afholdt af Arla Foods, den 15. september 2011, Viby J, Danmark.

*Posterpræsentationer*

Predicting Coagulation Properties of Milk with Seasonal Variations by Mid-infrared Spectroscopy.

*Lyndgaard LB, Andersen KK, Christensen M, Acar E, Egebo M & Bro R*

Præsenteret på 12th Scandinavian Symposium on Chemometrics, den 7.-10. juni 2011, Billund, Danmark.

Foss har ligeledes præsenteret den til IDF World Dairy Summit 2011, den 15.-19. oktober 2011, Parma, Italien.

Effects of Seasonal Variation in Milk Composition on the Quality of Cheese.

*Andersen, K, Nielsen, J, Larsen, L, Frederiksen, P, Bertram, H, Vognsen, L, Bakman, M, Johnsen, J, Sørensen, J, Egebo, M & Bro, R.*

NORDOST Symposium: Health aspects of cheese. den 6-8. oktober 2009, Drøbak, Norge.

*Artikler – peer review*

Composition and effect of blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows.

*Frederiksen PD, Andersen KK, Hammershøj M, Poulsen HD, Sørensen J, Bakman M, Qvist KB & Larsen LB.*

Journal of Dairy Science, 2011, 94, 4787-4799.

*Planlagte artikler*

An automated method for baseline correction, peak finding and peak grouping of chromatographic data.

*Johnsen LG, Skov T, Houlberg U & Bro R*

Indsendes til Analyst.

Seasonal variation in the crystallization behavior of milk fat.

*Andersen KK, Wiking L, Kaufman N, Mortensen G & Larsen M*

Indsendes til Journal of Dairy Science.

A perspective on seasonal variation in milk.

Indsendes til Journal of Dairy Science.

Betydning af sæsonvariation i mælk.

Indsendes til Mælkeritidende.

*Anden formidling:*

Når mælken driller.

*Nissen PM*

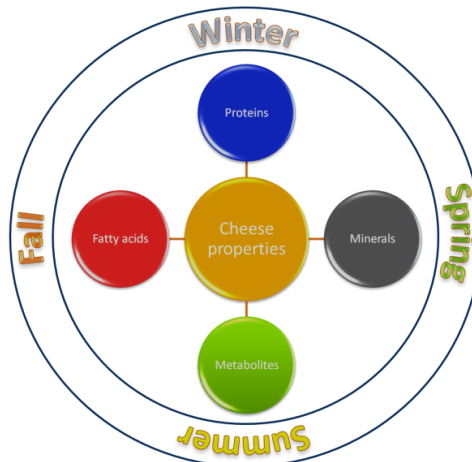
Mejeri, 2010, nr. 10, 1. oktober, s. 10

Artikel omhandlende "sæsonvariation"-projektet på baggrund af interview med projektleder Kell K. Andersen.

## J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater (maks. 5 A4-sider):

### Projektdesign

I projektet er der indsamlet rå mælk og ostemælk fra et økologisk og to konventionelle mejerier. Rå mælk er indsamlet for at få indblik i den naturlige variation i mælken, mens ostemælken, som er standardiseret mht. protein- og fedtindhold eller protein/fedt forhold, er indsamlet for at få indblik i mælken, som i praksis anvendes til fremstilling af ost. Mælk fra konventionelle mejerier er indsamlet i perioden juni 2009 til december 2010, mens økologisk mælk er indsamlet fra marts 2010 til december 2010. I alt er 266 mælkeprøver indsamlet, inkluderende både rå mælk og standardiseret ostemælk.



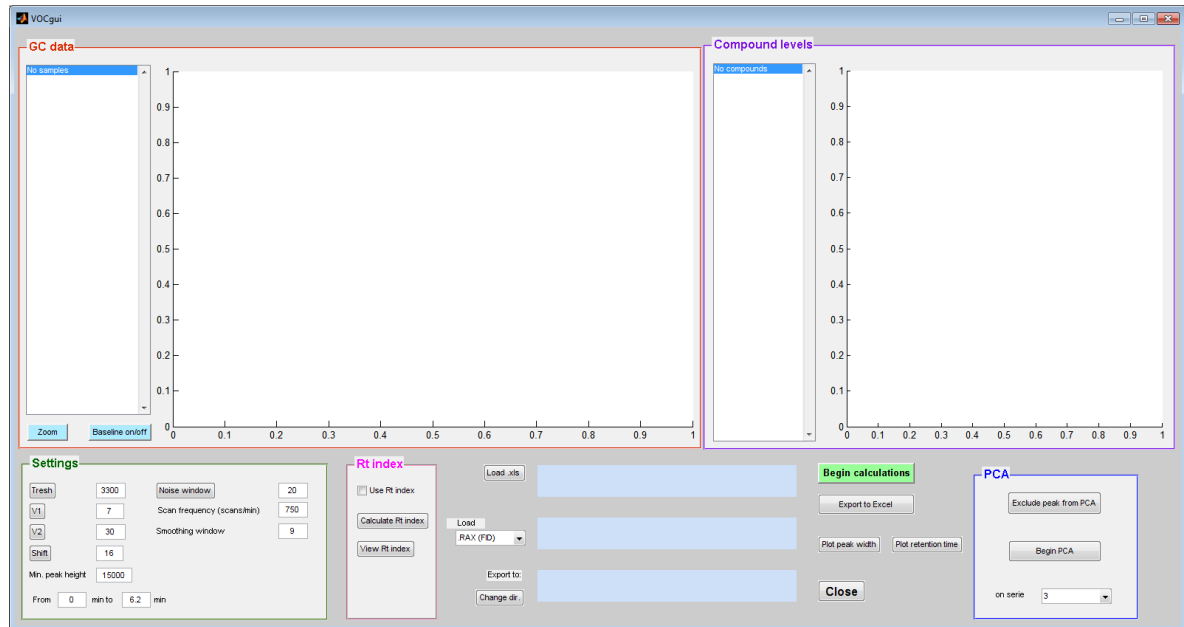
**Figur 1.** Illustration af projektets overordnede analysedesign. Mælkens ostningsegenskaber afgøres bl.a. af mælkens indholdsstoffer herunder proteiner, fedt, mineraler og metabolitter. Disse indholdsstoffer varierer hen over de fire årstider og påvirker mælkens ostningsegenskaber.

### Dataanalyse

Projektet har krævet udvikling af en lang række forskellige dataanalytiske metoder til at håndtere de mange forskellige typer af målinger. I projektet er der blandt andet udviklet følgende:

- Udvikling og sammenligning af nye metoder til automatisk integrering af kromatografiske GC-FID data. En sådan metode kan fuld- eller semi-fuldautomatisk håndtere basislinievibrationer, retentionstidsskift, normalisering og overlappende toppe. Fremfor nuværende middelmådige og tidskrævende metoder er der udviklet en teknik, som virker fuldautomatisk på fedtsyreanalyser og giver langt mere information end gængse metoder. Den nye metode rummer en del nye teknikker til at bestemme basisliniestøj; automatisk identificering af toppe og kvantificering af disse.
- Grafisk interface til kromatografisk analyse. Der er udviklet en grafisk brugerflade, som gør det muligt at lave kromatografisk dataanalyse i et brugervenligt miljø. Programmet er stadig under udvikling, men vil blive gjort tilgængeligt på internettet i løbet af et halvt år.
- En ny metode til at udtrække features fra syrningskurver. Der er udviklet en automatisk metode til at udtrække relevante features fra syrningskurver. Metoden anvendes pt. af Arla Foods.
- Der er udviklet visualiseringsværktøjer til kvalitetssikring af komplekse data. For en lang række af de informationskilder, der har været arbejdet med, har der været store problemer med stabiliteten af data. I visse tilfælde har usikkerheden i målingerne langt oversteget de relevante analytiske variationer. Der er arbejdet meget med visualisering, forståelse og korrektion af data i forhold til variationer såsom drift og kolonnealdning.
- Regressionsmodeller er blevet rigt anvendt sammen med mere eksplorative metoder til at finde og forstå sammenhænge i data.
- En ny metode til såkaldt co-clustering er blevet udviklet. Denne tillader at lede efter de mest

karakteristiske variable i et datasæt. Fremfor at søge at beskrive alle variationer, som i en klassisk multivariat analyse, og fremfor at søge efter enkeltstående variable, så kombinerer denne model disse to metoder og leder efter *latente* multivariate fænomener i deres mest basale form. På den måde kan man opnå en model, som er multivariat, og som afspejler såkaldte fingeraftryk i data, men som gør det på en måde, der stadig er fortolkelig, selv når der er mange variable.



**Figur 2.** Eksempel på brugerinterface til kromatografisk analyse. Eksemplet viser første udgave.

## Karakterisering af mælkens sammensætning

### Protein

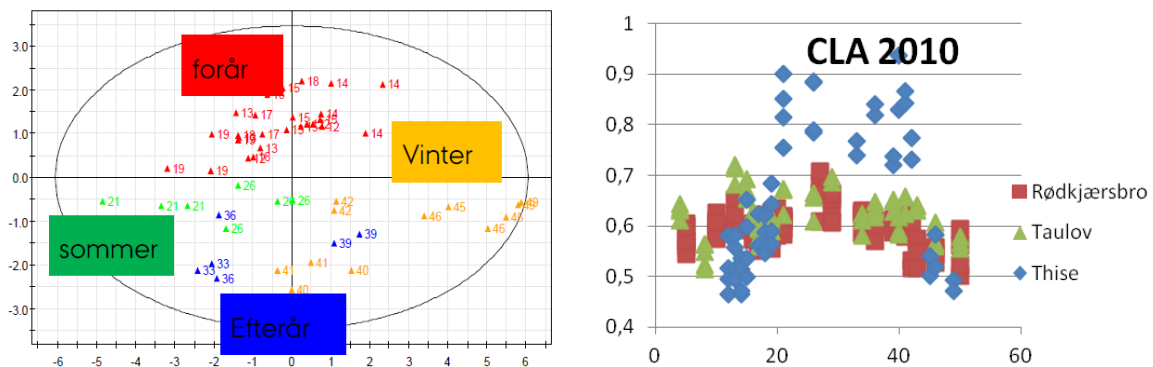
I projektet er en LC-MS metode til analyse af mælkens proteinfraktion implementeret og videreudviklet. Metoden har givet indsigt i fordelingen af de enkelte proteiner, bestemmelse af genetiske varianter af de enkelte proteiner, samt hvordan proteinerne er modificeret mht. glykosylering og fosforylering.

Resultaterne indikerer, at variation i fosforyleringen af mælkens proteiner har betydning for mælkens ostningsegenskaber (koguleringsegenskaber). Mælk fra enkelte køer, som udviste gode ostningsegenskaber indeholdt en større andel af proteiner ( $\alpha_1$ - og  $\alpha_2$ -kasein), som var fosforyleret i mindre grad end mælk, som udviste dårlige ostningsegenskaber. Disse resultater indikerer, at ikke kun genetiske varianter og fordelingen af proteiner har indflydelse på mælkens ostningsegenskaber, men at også modifikationer af de enkelte proteiner har betydning for mælkens ostningsegenskaber. En detaljeret beskrivelse af resultaterne er rapporteret i Frederiksen et al., 2011 (se ovenfor).

Tidligere rapporter har vist, at kaseintallet udviser sæsonvariation (Månsson et al., 2003). Nærværende projekt har dog ikke observeret sæsonbetinget variation i kaseintallet. Andre variationer i mælkens proteinprofil er derimod klarlagt. Fordeling mellem valleproteinerne  $\alpha$ -lactalbumin og  $\beta$ -lactoglobulin, som er de primære valleproteiner i mælk, udviser sæsonvariation. Forholdet mellem  $\alpha$ -lactalbumin og  $\beta$ -lactoglobulin udviste et maksimum omkring uge ~15 (midt april) og minimum omkring uge 40 (start oktober). Et nyligt studie af sæsonvariation af hollandsk mælk viser samme tendens, omend  $\alpha$ -lactalbumins maksimum og minimum observeres i hhv. juni og november, altså en forskydning på en 1 til 2 måneder (Heck et al., 2009). Der er desuden fundet sæson- samt mejerivariation i andelen af  $\kappa$ -kasein, som er glykosyleret. Andelen af  $\kappa$ -kasein, som er glykosyleret, er størst i mælk fra Thise Mejeri og mindst i mælk fra Taulov Mejeri. Der er desuden en tendens til at andelen af  $\kappa$ -kasein, som er glykosyleret, er størst omkring kalenderuge 35-40 og mindst omkring kalenderuge 15-20.

### Fedt

I mælkens fedtfraktion er der klarlagt betydelige sæsonforskelle. Som tidligere rapporteret i andre studier omhandlende sæsonvariation så er koncentrationen af fedt størst i vinterperioden og mindst omkring sommer. Forskellen i fedtprocenten er op mod 0,4 % hvilket er større end variationen på 0,2 %, som ses for proteinkoncentrationen. Størrelsen af fedtkugler er analyseret på den økologiske mælk fra Thise Mejeri. Den gennemsnitlige fedtkuglestørrelse er 4,0  $\mu\text{m}$  i sommermånederne og 4,5  $\mu\text{m}$  i vintermånederne, og fedtkuglestørrelsen følger dermed samme tendens som fedtprocenten. Denne observation er baseret på et begrænset datasæt på 18 mælkeprøver, men er interessant, da tidligere studier har vist, at fedtkuglestørrelsen har indflydelse på ostningsegenskaber (Michalski et al., 2004). Fedtsyresammensætningen er forskellig i mælken fra de tre mejerier og udviser desuden sæsonvariation. I den konventionelle og økologiske mælk observeres, at de indeholder en større andel af umættet fedt i sommerperioden end i vintermånederne. Variationerne i fedtsyresammensætningen er størst for den økologiske mælk, hvor der specielt omkring forår og efterår forekommer hurtige ændringer i fedtsyresammensætningen. Effekten er illustreret i figur 3, hvor sæsonvariation er vist for fedtsyren CLA (konjugeret linolsyre, C18:2 c9tr11) i mælk fra de tre deltagende mejerier. Variationen er størst for den økologiske mælk, hvor koncentrationen af CLA næsten er dobbelt så høj i sommerperioden som i vinterperioden.



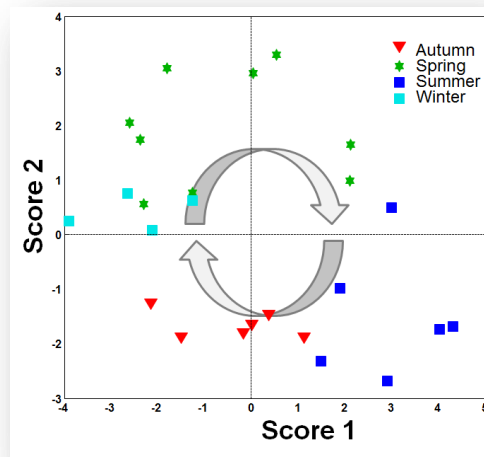
**Figur 3.** Eksempler på sæsonvariation i fedtsyresammensætningen. Til venstre ses en global analyse af alle analyserede fedtsyrer. PCA scoreplot viser, at prøverne grupperer sig efter årstid, hvilket indikerer, at der er variation i fedtsyresammensætningen henover året. Til højre er årstidsvariationen for fedtsyren CLA vist. Figuren viser, at der er årstidsvariation i mælken fra alle mejerier, men at variationen er mindst i mælken fra de konventionelle mejerier, mens den største variation ses i den økologiske mælk.

Variation i mælkens fedtsyresammensætning har betydning for fedtets smelteegenskaber, som er relevant i forhold til smøregenskaber. Undersøgelser af mælkefedtets lav-, mellem- og høj smeltefraktion viser, at der er en tendens til, at smeltepunktet for den lavtsmeltende og højt smeltende fedtfraktion er lavest om sommeren. Resultater omhandlende mælkens fedtsyresammensætning og effekt på smeltepunkter vil blive indsendt til et peer-review tidsskrift i andet kvartal 2012 (se ovenfor).

### Metabolitter

Projektet har anvendt højfelt-NMR og GC-MS til analyse af en række metabolitter i mælk. Projektet har desværre ikke formået at lave en global karakterisering, hvor størstedelen af alle metabolitter i mælken er inddraget. Erfaringer draget i nærværende projekt viser, at der stilles meget høje krav til prøveforberedelse og instrumentopsætning samt vedligeholdelse for at opnå reproducerbare og repeterbare data. Dette var specielt gældende for analyse af metabolitter bestemt ved GC-MS. Det er projektgruppens vurdering, at en global analyse af metabolitter i mælk vil kræve flere ressourcer, end der har været til rådighed i nærværende projekt. Analyse af omkring 40 organiske syrer, aminosyrer og sukre, herunder en række som er udvalgt på baggrund af tidligere studier, har dog påvist sæsonvariation på metabolitniveau, se figur 4. Ophav og betydningen af

denne variation er dog ikke klarlagt.



**Figur 4.** Scoreplot af model (coclustering) af 37 metabolitter. Data kommer fra 25 ostemælksprøver fra Taulov. Der ses en meget tydelig sæsonvariation i disse to første komponenter, og det kan dermed konkluderes, at sæsonvariation er den primære variationskilde i disse data.

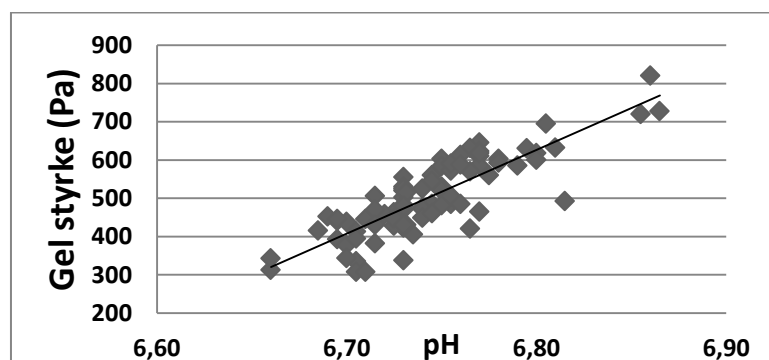
### Mineraler

Mængden af mineralerne Ca, Mg og P er kvantificeret i rå mælk og i standardiseret ostemælk. Desuden er forholdet mellem mineraler som hhv. er frit i serum eller bundet til mælkenes kaseinmiceller bestemt. I rå mælk er mængden af mineral positivt korreleret til proteinprocenten. Koncentration af mineral er derfor mindst i sommerperioden og højest omkring vinter. Der er dog ikke observeret signifikante ændringer i koncentrationen af mineraler i standardiseret ostemælk. Der er desuden ikke fundet sæsonvariation i forholdet mellem frie og bundne mineraler.

### Ostningsegenskaber

#### Koaguleringsegenskaber

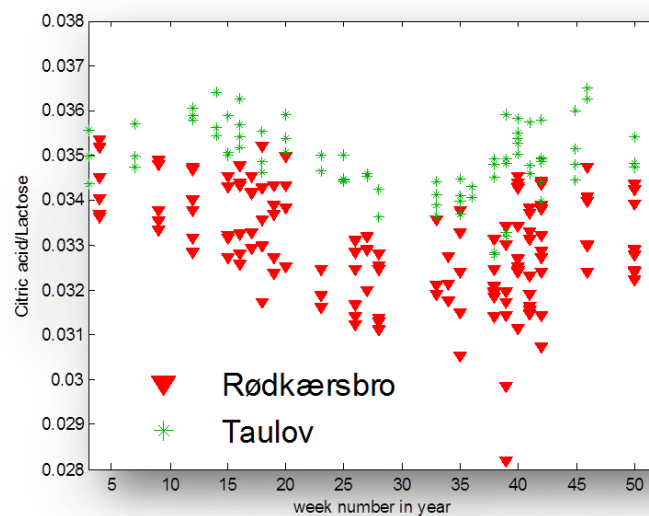
Data registreret på den indsamlede mælk er sammenholdt med ostemælkenes koaguleringsegenskaber (ostningsegenskaber). Overraskende viste pH sig at være den faktor, som var mest afgørende for mælkenes koaguleringsegenskaber. Mælk med høj pH udviste bedre koaguleringsegenskaber end mælk med lav pH. Høj pH resulterede i fastere ostemasse, se figur 5. Variationen i pH var ikke sæsonbetonet så lav/høj pH, og dermed også koaguleringsegenskaber, kunne derfor ikke henføres til bestemte årstider. Baseret på betydningen af pH for ostningsegenskaberne er der i projektet udviklet en FT-IR baseret hurtigmetode til bestemmelse af pH. Denne hurtigmetode til bestemmelse af pH kan integreres i allerede eksisterende analyseudstyr (Milkoscan fra Foss) på danske mejerier og kan derfor indgå i den fremtidige kvalitetsstyring. Detaljerne for denne prædiktionsmodel er beskrevet i en applikationsnote fra Foss.



**Figur 5.** Effekt af pH på gelstyrke. Figuren viser, at ostemælk med høj pH giver en mere fast ostemasse end mælk med lavt pH.

### Syrningsaktivitet

Det var forventet, at indholdet af metabolitter, herunder organiske syrer, aminosyrer og sukre, kunne have betydning for syrningen. Det var imidlertid ikke muligt at påvise, at metabolitsammensætningen påvirker syring ud fra de givne data. En del af forklaringen på det manglende resultat kan ligge i instrumentelle og samplingproblemer. Antallet af kvantificerede metabolitter har ikke været optimalt og antallet af målte prøver har ikke gjort det muligt at påvise mere subtile sammenhænge. Baseret på kvantificering af metabolitter er følgende interessante iagttagelse dog gjort. Forholdet mellem citrat og laktose har en distinkt sæsonvariation og er mindst omkring uge 30-35 og højst i vinterperioden, se figur 6. De bagvedliggende forklaringer på dette fænomen mangler og bør afklares på et senere tidspunkt.



**Figur 6.** Forholdet mellem citronsyre og laktose plottet over uger henover året for henholdsvis Rødkærsbro (rød) og Taulov (grøn) mælkeprøver for ostemælk.

### Opsummering/Sammendrag

Der er i dette projekt opnået mange resultater af både praktisk og teoretisk betydning for forståelsen af sæsonvariationens indvirkning på ostekvalitet. Adskillige fund har ført til nye måder at måle og registrere kvalitet på mejerierne.

Projektet har vist, hvordan avancerede metoder som kromatografi (GC eller LC) koblet til massespektroskopi (MS) kan benyttes til at karakterisere sæsonbetonede variationer i mælken indholdsstoffer. Automatisering af signalbehandlingen gør det praktisk muligt at drage nytte af de store informationsmængder, som sådanne metoder bibringer.

I projektets løbetid er der indsamlet 266 mælkeprøver, inkluderende rå mælk og standardiseret ostemælk fra såvel økologisk som konventionelle mejerier. Projektets materialegrundlag er derfor relativt lille i forhold til sammenlignelige studier fra andre lande, hvor der typisk er indsamlet omkring 1000 prøver pr. år (Heck et al., 2009). Nærværende projekt har dog formået at lave vigtige iagttagelser, herunder at pH har stor betydning for mælkenes koaguleringssegenskaber, idet høj pH i ostemælk giver bedre koaguleringssegenskaber end ostemælk med lav pH. Projektet har derfor udviklet en hurtigmetode til bestemmelse af pH, som kan indgå direkte i de danske mejeriers kvalitetsstyring.

Grundet antallet af samlede prøver og fordi pH har været den altoverskyggende faktor, som har relateret sig til mælkenes ostningsegenskaber, har det kun i mindre grad været muligt at korrelere ændringer i mælken sammensætning (protein, fedt, metabolitter og mineraler) til mælkenes



ostningsegenskaber. Projektet har dog formået at vise en række tendenser, som vil blive undersøgt nærmere i eksisterende initiativer, som har relationer til nærværende projekt. Herunder kan der nævnes, at betydningen af glykosylering og forforylering af mælkens proteiner og effekten på mælkens ostningsegenskaber vil blive undersøgt nærmere. Studier af metabolitter påviser også sæsonvariation, men det har ikke været muligt at korrelere denne til en effekt på mælkens ostningsegenskaber. Yderligere metodeudvikling vil muliggøre bestemmelse af et større antal metabolitter, hvilket forventes at kunne give et bedre indblik i betydningen af disse ændringer samt effekten på mælkens ostningsegenskaber.

Projekter af så tværfaglig karakter som dette kræver et usædvanlig tæt samarbejde mellem de involverede grupper for at kunne opnå maksimalt udbytte. For at kunne arbejde *eksplorativt*; altså uden predefinerede, specifikke biologiske hypoteser, må man anvende særdeles store datasæt for at få den nødvendige statistiske styrke til at kunne gøre signifikante fund. Antallet af prøver i nærværende projekt har i virkeligheden været lavt i forhold til, hvad man ideelt kunne ønske sig. Økonomiske hensyn har dog vejet ind i beslutningen om det endelige antal prøver. En anden effekt af store prøvestørrelser er, at man må foretage kemiske analyser over meget lange perioder og det er ganske få laboratorier, der har den nødvendige ekspertise til at kunne måle 'untargeted' over lange perioder på reproducerbar vis.

#### **Citerede artikler**

- Heck, J. M. L., H. J. F. van Valenberg, J. Dijkstra, and A. C. M. van Hooijdonk. 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science* 92(10):4745-4755.
- Michalski, M. C., B. Camier, V. Briard, N. Leconte, J. Y. Gassi, H. Gougedranche, F. Michel, and J. Fauquant. 2004. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and functional properties of Emmental cheese. *Lait* 84(4):343-358.
-