

Afslutningsrapport

Styring af fysiske egenskaber i ostemodel på
basis af koncentreret mælk

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2007-84

Februar 2007



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport

Styring af fysiske egenskaber i ostemodel på basis af koncentreret mælk

Projektperiode:

1. december 2001 – 30. september 2006

Projektdeltagere:

Professor Ylva Ardö, Institut for Fødevarevidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Fredriksberg C, tlf. 35 28 31 93, fax 35 28 31 90, ya@kvl.dk

Professor Karsten Bruun Qvist (projektleder: 1. december 2001 - 31. juli 2003)

Professor Petr Dejmek, Livsmedelsteknik, Kemicentrum, Lunds Universitet, Getingevägen 60, Box 124, S-221 00 Lund, tlf. +46 4622 9810, fax +46 46 222 4622, petr.dejmek@livstek.lth.se

Finansieringskilder:

Mejerirationaliseringsfonden, Mejeribrugets ForskningsFond
Innovationsloven, Direktoratet for FødevareErhverv

Sammendrag af projektets formål:

Forskningsmæssigt fokuserede projektet på at kunne styre fysiske egenskaber, konsistens og smelteegenskaber i ost fremstillet af mælk med 15-20 % (w/w) protein, ved styring af koaguleringskinetik, proteinsammensætning (f.eks. valleproteinkoncentration) og kaseinmicellernes fysiske-kemiske egenskaber. Kaseingeler lavet af koncentreret mælk blev benyttet som modelsystem for ost. De fysiske-kemiske egenskaber i kaseingelernes mindste kolloidale byggestener (kaseinmiceller) karakteriseredes ved forskellige pH og NaCl-koncentrationer i koncentreter og sammenlignedes med gelernes tekstur, mikrostruktur og smelteegenskaber efter løbokoagulering. En ny metode baseret på atomic force microscopy (AFM) til at måle mekaniske egenskaber på nano-meter niveau, udvikledes for at måle kaseinpartiklers mekaniske egenskaber samt lokale reologiske egenskaber i ostens proteinnetværk. Projektet forsøgte således at udvikle viden, som kan anvendes i mange sammenhænge både på det osteteknologiske og det måletekniske område.

Anvendelsesmæssigt sigtede projektet på udvikling af en helt ny teknologi og tilhørende videngrundlag for styring og forbedring af konsistens- og smelteegenskaber i ost fremstillet ud fra ultrafiltreret (UF) og mikrofiltreret (MF), koncentreret mælk. MF som koncentreringsmetode er interessant, idet koncentreterne indeholder mindre valleprotein, og dette forventes at give mulighed for forbedring af visse af ostens kvalitetsparametre, i forhold til anvendelse af UF.

Projektets resultater og konklusion:

Oste kan fremstilles af mælk, der er blevet opkoncentreret ved filtreringsprocesser. Resultater fra tidligere projekter har indikeret, at dannelsen af mikrostrukturen i oste lavet fra koncentreret mælk efter løbeinduceret koagulering er af betydning for ostens tekstur [1, 2, 3, 17, 18]. Dannelse af et grovere kaseinnetværk som følge af hurtig løbokoagulering resulterede i hårdere og mere elastiske kaseingeler, når forholdene (pH og saltkoncentrationen) lignende forholdene i Feta, Camembert eller Danbo-oste. For at få en dybere forståelse af, hvordan tekturen i oste lavet fra koncentreret mælk kan varieres og for at forklare resultater fra tidligere projekter, blev de eksperimentelle forsøg i projektet designet til at undersøge kaseinmicellerne i den koncentrerede mælk, både inden og efter koagulering. For at gøre det muligt identificere parametre, der påvirker tekstur og mikrostruktur i gule oste (f.eks. Danbo, Cheddar, Emmental) lavet ud fra mælkekoncentreter, blev fremstillingstrinene (f.eks. koncentreret mælk, syring, løbokoagulering), der giver effekter på gelerne, klart adskilt.

Ved fremstilling af skummetmælkskoncentreter vha. ultrafiltrering (UF) fremkom et koncentrat, som indeholdt både kaseiner og valleproteiner, mens valleproteinkoncentrationen i koncentreteret blev reduceret til 0,1 % (w/w) ved brug af mikrofiltrering (MF) [12]. Koncentreter fra skummetmælk med 18-20 % (w/w) protein og nativt pH 6.5 er generelt meget viskøse og tyktflydende, hvilket gør dem svære at håndtere ved fremstilling af ost. Ved en justering fra nativt pH til pH 5,2-6,2 forandredes kaseinmicellernes struktur i mælkekoncentreterne, og vi fandt en radikal reduktion af viskositeten, der kan benyttes til at simplificere håndteringen og reducere produktionsomkostningerne [5, 6, 14].

En måleteknik baseret på atomic force microscopy (AFM) blev udviklet til at måle enkelte kaseinmicellernes elasticitet i koncentrat [4, 13, 16, 19] og elasticiteten i enkelte kaseinstrukturer i kaseingeler [9]. Dette gjorde det muligt at sammenligne kaseinmicellernes og kaseingelers tekstur. AFM-metoden er vanskelig at udføre, og det var ikke muligt at bestemme enkelte micellers elasticitet, fordi de ved penetration fra AFM-nålen opførte sig som en viskøs dråbe [13]. Det var også umuligt at fiksere kaseinmicellerne på den hydrofobe overflade i AFM-mikroskopet uden at de tabte deres sfæriske form. Desuden forlod enkelte kaseinmolekyler micellerne og dannede et monolag på den hydrofobe overflade [4, 11, 16].

Det var muligt at konkludere, at både variation af pH i intervallet pH 5,2-6,2, NaCl-koncentration og grad af proteinnedbrydelse kan bruges til at variere tekstur og smeltegenskaber for kaseinnetværk i gule oste produceret ud fra koncentreret mælk [8, 10, 12, 15]. Mængden af kolloidalt calciumfosfat (CCP) bundet til kaseinnetværket blev ringere ved syring fra pH 6,2 til pH 5,2, og det medførte, at gellerne blev mindre elastiske, blødere og havde en bedre smelteevne. Denne effekt var særlig udtalt, når pH reduceredes fra pH 5,5 til 5,2 [8, 10, 15]. Et mindre elastisk kaseinnetværk ved lavt pH kunne detekteres med både makroreologiske målemetoder for kaseingeler og med nano-reologiske målemetoder (f.eks. AFM) i kaseingelernes mikrostruktur [9]. Tilsætning af NaCl bidrog positivt til gellernes elasticitet ved pH 5,8-6,2, men gav ikke nogen effekt ved pH 5,2-5,5 [10].

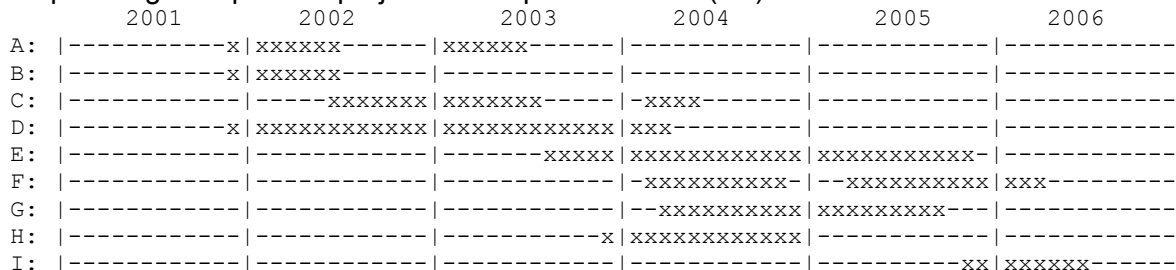
Kaseingeler fra både MF- og UF-koncentrater havde generelt en lav smelteevne [8, 20]. De blev mindre elastiske ved stigning af temperaturen fra 10 til 60 °C men elasticiteten øgedes atter ved temperaturer > 60 °C. Valleproteiner denaturerer ved T > 60 °C og er ansvarlige for stigning i UF-gellernes elasticitet ved høje temperaturer, men også MF-geler bliver mere elastiske ved T > 60 °C. Tilsætning af NaCl i gellerne mindskede stigningen i gellernes elasticitet ved høje temperaturer og kan bruges til at forbedre smelteevnen i gellerne [8]. Kaseinnedbrydning under lagring og et lavt pH i intervallet pH 5,2-6,3 resulterede i en lav elasticitet ved alle temperaturer og gav en bedre smelteevne [20].

Mikrostrukturen i kaseingeler lavet fra koncentreret skummetmælk adskilte sig fra mikrostrukturen i geler lavet fra ukoncentreret skummetmælk [7]. En lav diffusionshastighed i koncentrater, tidlig dannelse af et løst sammenhængende netværk ved løbekoagulering og en høj kaseinkoncentration resulterede i et tættere kaseinnetværk, der er bygget op af mindre kaseinstrukturer i geler lavet af koncentreret frem for af ukoncentreret skummetmælk. Det sker heller ikke den samme grad af omdannelser (rearrangements) i kaseinnetværk i timerne efter løbekoagulering i geler fra koncentreret mælk, som er faldet for ukoncentreret mælk. Forandringer i mikrostrukturen er også meget små i tidsrummet 1 til 61 døgn efter løbekoagulering, hvilket gør, at geler fra den koncentrerede skummetmælk er stabile og ikke viser tendens til synerese.

Projektets resultater og konklusioner viser betydningen af produktionsparametre, hvis man ønsker at forandre de fysiske egenskaber i kaseinnetværket i mejeriprodukter lavet fra mælkekoncentrater. Kaseinnetværket ændres yderligere, når en fedt-/oliefase tilføres [20, 21]. Resultaterne er af betydning for udvikling af nye typer af osteprodukter lavet fra mælkekoncentrater og er vigtige for at forstå de fysiske egenskaber i kaseinfraktionen i oste lavet af ukoncentreret mælk med traditionelle produktionsmetoder.

Projektets faglige forløb:

Den oprindelige tidsplan for projektet var opdelt i 9 faser (A-I) som beskrevet i nedenstående diagram.



Gennemgang af projektets forløb i forhold til de oprindeligt opstillede projektplan og milepæle.

Fase A: Procesbetingelser ved mikrofiltrering blev fastlagt.

Formålet med fase A var at optimere driftsbetingelserne for at maksimere koncentreringsgrad i både UF og MF. For MF var det vigtigt med minimering af valleproteintilbageholdelse.

Fase B: Modelsystemer blev udvalgt

Der blev udvalgt flere sæt af samhörørende værdier for pH og NaCl-koncentration, som reflekterer betingelserne i den unge ost for forskellige typer af oste. Det tilstræbes at udføre eksperimenter på en sådan måde, at effekt af kaseinmicellernes tilstand og koaguleringskinetik kan vurderes separat.

Fase C: Metoder til karakterisering af kaseinmicellernes egenskaber blev udviklet

Eksisterende metoder for måling af micellernes mineralindhold blev tilpasset. Anvendelse af P-NMR blev undersøgt, men var ikke muligt at bruge for geler. Nano-reologi blev forsøgt som en mulighed for at måle på enkelte kaseinmicellernes mekaniske egenskaber.

Fase D: Måling af lokale reologiske egenskaber ('nano-reologi')

Der udvikledes en metode til at måle nano-reologi på løbegeler af kasein. Nano-reologi er som en relativt ny visuel teknik en tilpasning af atomic force microscopy, som oprindeligt blev udviklet til stive materialer. I den såkaldte tapping mode kan det lokale respons opdeles i tiltrækning og frastødning mellem instrumentets sensor og materialet, og desuden i et elastisk og et viskøst bidrag fra materialet. Det var endvidere hensigten at udvikle en forståelse af forholdet mellem de rumlige inhomogeniteter i gelestrukturen, således som de optræder ved mikroskopi, og de lokale reologiske egenskaber. Det var i oplægget kun muligt at studere gelegenskaber med AFM på mikroniveau.

Fase E: Proteolyse, tekstur og smelteegenskaber i MF-ostemodell blev sammenlignet med UF-ostemodell

Proteolyse (N-fraktionering, HPLC og/eller CE) og smelteegenskaber i MF-ostemodell belystes og sammenlignedes med tilsvarende UF-ostemodell. Effekt af forøgelse af valleproteinindhold på proteolyse og smelteegenskaber i MF-modellen blev undersøgt. Det blev vist, at behandlingen af mælken ved koncentrationen påvirkede proteolysen mere end tilstedeværelsen af valleproteiner, og at nedbrydningen ikke var mindre hæmmet i MF-mælk end i UF-mælk.

Fase F: Muligheder for at styre konsistens og smelteegenskaber i støbt MF-ostemodell blev undersøgt

For de udvalgte MF-modelsystemer undersøgtes, i hvilket omfang den unge modelosts reologiske egenskaber, mikrostruktur og smelteegenskaber (hvor det er relevant) kan styres gennem styring af aggregeringskinetikken og kaseinmicellernes fysiske-kemiske egenskaber. Resultaterne gav et billede af, hvor stor diversitet der kan opnås mht. fysiske egenskaber, og udgør derved en teknologisk platform for efterligning af eksisterende ostetyper med den nye teknologi og for udvikling af nye produkter.

Fase G: Sammenhænge mellem lokale reologiske egenskaber (nano-reologi), netværksstruktur og makroskopisk reologi blev undersøgt

Den udviklede nano-reologiteknik anvendtes sammen med information om ostematrixens struktur og data fra makroskopisk reologi til at undersøge sammenhænge mellem lokale reologiske egenskaber i ostematrixen, matrixens struktur og makroskopisk reologi (f.eks. Instron).

Fase H: Ændringer i lokale reologiske egenskaber som følge af proteolyse (modning)

Denne fase blev ikke gennemført som planlagt pga. store indkøringsproblemer med AFM-teknikken. Ved hjælp af nano-reologi og proteinkemisk undersøgelse af proteolyse under lagring (HPLC og/eller CE) blev det undersøgt, hvorledes proteinstrengenes mekaniske egenskaber påvirkes af proteolyse.

Fase I: Det blev udarbejdet flere afhandlinger og publikationer

2 ph.d.-afhandlinger, 1 specialrapport, 13 videnskabelige artikler (10 er publiceret, 3 abstrakt til konferencer og 2 tidsskriftsartikler) var resultatet af fase I (se desuden publikationslisten).

Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:

Da projektet må anses for at være grundlagsskabende forskning, er der ikke forventninger om specifikt udviklede produkter i forbindelse med projektet. Imidlertid forventes det, at resultater fra projektet vil kunne bruges ved styring af fysiske egenskaber i ost fra koncentreret og konventionel mælk samt kundskab om fysiske egenskaber i koncentrerede kaseinsystemer (f.eks. flødeost). Endvidere kan nye produkter (f.eks. snackprodukter, osteprodukter til madlavning) udvikles fra koncentreret mælk, også til nye markeder. Videnskabeligt er den ny viden om koagulering og gelering af koncentreret mælk af stor betydning.

Modellen, der blev udviklet, kan bruges til at studere, hvordan forskellige vegetabiliske olier fungerer i et kaseinnetværk, og derved gives muligheder for udvikling af høj kvalitets mejeriprodukter indeholdende vegetabilisk fedt.

Projektet gav flere muligheder til interessant samarbejde. Faggruppen for Mejeriteknologi IFV, LIFE-KU samarbejdede i projektet med Lunds Universitet (Professorerne Petr Dejmek og Marie Paulsson), University of Wisconsin-Madison, USA (professor S. Gunasekaran), Institute of Food Research, UK (Patrick Gunning). For at få øget kundskab til atomic force mikroskopi (AFM) blev også Alan D. Brem og M. Rayner på Lunds Universitet inddraget. Preben Kønigsfeldt fra APV i Silkeborg deltog ved levering af udstyr til mikrofiltrering. Videre deltog Dr. Katrin Schrader fra Bundesanstalt für Milchforschung (Kiel, Tyskland) ved elektronmikroskopering af kaseinmiceller og Jana Trckova (Department of Dairy and Fat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, Tjekkiet) ved AFM- mikroskopering.

Ph.d.-studerende Anders Ola Karlsson har under sit studium været opholdet under 4 måneder på University of Wisconsin – Madison (USA) for at udføre forsøg. Disse forsøg blev udført i samarbejde med Prof. Sundaram Gunasekaran, som er medforfatter på en af projektets publikationer.

Ph.d.-studerende Kristina Helstad har under sit arbejde i perioder af projektet samarbejdet med Patrick Gunning (Institute of Food Research, England) og Alan D. Bream (Lund Universitet) for at få øget kendskab til atomic force mikroskopi (AFM).

Summary in English

Cheese can be produced from concentrated milk as an alternative to being manufactured from unconcentrated milk using traditional methods. The concentration of the milk can occur through membrane filtration, which reduces the water content, and according to the membrane pore sizes also the content of other milk components (e.g. whey proteins and minerals). By using milk concentrates in cheese manufacture, whey proteins can be incorporated into the cheese, thereby increasing the cheese yield. The main part of the whey proteins is otherwise lost in the whey during traditional cheese making. The presence of whey proteins in cheese has the potential to affect the texture, functionality and enzymatic breakdown of caseins during cheese ripening.

Results from earlier projects, evaluated and published during this project, showed that the texture and microstructure of casein gels made from concentrated milk was influenced by the coagulation rate of the concentrated milk [1, 2, 3, 17, 18]. A fast coagulation of the milk resulted in a coarse gel microstructure and stronger and more elastic gels when conditions (pH and NaCl concentration) were similar to those found in Feta, Camembert or Danbo cheeses. The experiments of the present project were designed to obtain deeper understanding about parameters influencing the texture of cheeses made from concentrated milk and in order to explain previous results. The experiments involved investigations of both physico-chemical properties of casein micelles (i.e. the smallest building blocks in the gels) before coagulation, and properties of casein gels after coagulation. Processing steps (e.g. filtration, acidification, coagulation) were clearly separated from each other to be able to identify parameters that influence texture and microstructure in fresh and stored casein gels.

Concentrated skim milk was obtained through ultra- or microfiltration. Concentrates obtained by ultrafiltration (UF) contained both casein and a significant amount of whey proteins (3.2 %, w/w) while the whey protein concentration could be reduced in the skim milk concentrates by microfiltration (MF) to 0.1 % (w/w) of whey protein [12]. Skim milk concentrates with 18-20 % (w/w) and pH 6.5 were very viscous and this complicates the processing of the concentrate into cheese [5, 14]. By decreasing the pH from 6.5 to the interval pH 5.2-6.2, the microstructure of the casein micelles in the concentrate changed and the viscosity was radically reduced [5, 6, 14]. Thus, adjustment of the pH can be used to ease the handling of the skim milk concentrates and reduce processing costs.

Based on atomic force microscopy (AFM), a technique was developed to estimate the elasticity of single casein micelles [4, 13, 16, 19] and the elasticity of single strands of casein in casein gel networks [9]. Thus, AFM would make it possible to compare the texture of casein networks with the building blocks (i.e. casein micelles) from which they are built. The techniques of AMF are complicated to perform and it was not possible to determine the elasticity of single casein micelles because they behave like viscous droplets when penetrated by the tip of the AFM microscope [13]. Fixation of casein micelles on a hydrophobic surface in the AFM-microscope also affected the spherical structure of the micelles and it could not be avoided that single casein molecules diffused from the micelles and formed a mono-layer on the hydrophobic surface [4, 11, 16].

It was possible to see effects of pH (i.e. in the interval 5.2-6.2), NaCl concentration and extent of protein degradation (i.e. proteolysis) on texture and melting properties of casein networks made from concentrated skim milk [8, 10, 12, 15]. The amount of colloidal calcium phosphate (CCP) bound to the casein network decreases when pH is lowered from pH 6.2 to 5.2, and this results in less elastic and softer gels, which show more extensive flowability after melting. Those effects are especially clear when pH drops from 5.5 to 5.2 [8, 10, 15]. The lower elasticity of casein networks of pH 5.2 compared to pH 6.1 could also be detected on a nano-rheological scale by AFM [9]. Presence of NaCl in casein gels positively contributes to the elasticity of the gels between pH 5.8 and 6.2, but there is no effect at pH 5.2-5.5 [10].

The flowability of casein gels after melting is generally low [8, 20]. The gels became less elastic when the temperature increased from 10 to 60 °C but increased again when the temperature increased from 60 to 80 °C. Whey proteins denatured at temperatures above 60 °C and this contributes to the increased elasticity of gels at T>60 °C. Presence of NaCl in gels reduces the increase in elasticity of gels at T>60 °C and can be used to improve the melting performance of cheese [8]. Extensive proteolysis of caseins in casein gels of pH 5.2-6.3 results in less elastic gels at all temperatures and improves the flowability of gels after melting [20].

The microstructures in gels made from concentrated and unconcentrated skim milk is significantly different [7]. During rennet-induced coagulation, the low diffusion rates and the creation of a loose network at an early stage in the viscous skim milk concentrate hindered the creation of large strands and aggregates of casein in the microstructure of concentrated skim milk compared to observations in unconcentrated skim milk. The changes in the gel microstructure (i.e. rearrangements) were also small within the hours after coagulation in the gels made from concentrated skim milk compared to gels of unconcentrated skim milk. The changes of the gel microstructure were also very small in the period 1 to 61 days after coagulation of concentrated skim milk and the gels were stable and did not show tendency for syneresis. The microstructure of casein gels did not change between gels of different pH or concentrations of NaCl although the textural properties could be radically different [10]. The experimental studies of this project explain the importance of production parameters for the physical properties of the casein network in dairy products made from renneted skim milk concentrate. The casein network can be combined with a fraction of fat to further change the physical properties of the dairy product [20, 21]. The results are important for development of new type of cheese products made from concentrated milk and are useful to increase the understanding of the physical properties of the casein fraction in cheese made with traditional methods from unconcentrated milk.

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

Videnskabelige, internationale artikler

1. Euston, S.R., Piska, I., Wium, H. & Qvist, K.B. (2002). Controlling the structure and rheological properties of model cheese systems. *The Australian Journal of Dairy Technology*, **57 (2)**, 145-152.
2. Wium, H., Euston, S.R. & Qvist, K.B. (2002). Structure-texture relationships in model cheeses. *The Australian Journal of Dairy Technology*, **57 (2)**, 97.
3. Wium, H., Pedersen, P.S. & Qvist, K. B. (2003). Effect of coagulation conditions on the microstructure and the large deformation properties on fat-free feta cheese made from ultrafiltered milk. *Food hydrocolloids*, **17**, 287-296.
4. Helstad, K.M., Bream, A.D., Trckova, J., Paulsson, M. & Dejmek, P. (2004). Nanorheological properties of casein, Published in *Food Emulsions and Foams*, E. Dickinson (Ed.), Royal Society of Chemistry, London, England, pp. 218-229.
5. Karlsson, A.O., Ipsen, R., Schrader, K. & Ardö, Y. (2005). Influence of physical properties of casein on the rheology of ultrafiltrated skim milk concentrate. *Journal of Dairy Science*, **88**, 3784-3797.
6. Karlsson, A.O., Ipsen, R. & Ardö, Y. Observations of casein micelles in skim milk concentrate by transmission electron microscopy. *LWT - Food Science and Technology* (under udgivelse).
7. Karlsson, A.O., Ipsen, R. & Ardö, Y. Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of concentrated skim milk. *International Dairy Journal* (under udgivelse).
8. Karlsson, A.O., Ipsen, R., Gunasekaran, S. & Ardö, Y. (2006) Rheological properties at cooking temperatures of rennet induced casein gels from ultrafiltrated skim milk. *Proceedings of the 4th International Symposium on Food Rheology and Structure*, februar 2006, Zurich, Schweiz, s. 155-159.
9. Helstad, K., Gunning, P., Karlsson, A.O., Ardö, Y. & Dejmek, P. (2006) Nanorheology of rennet gels from casein concentrate at pH 5.2 and 6.1. *Proceedings of the 4th International Symposium on Food Rheology and Structure*, februar 2006, Zurich, Schweiz, s. 167-171.
10. Karlsson, A.O., Ipsen, R. & Ardö, Y. Influence of pH and NaCl on rheology of rennet induced casein gels made from concentrated skim milk. *International Dairy Journal* (accepteret).
11. Helstad, K.M., Paulsson, M. & Dejmek, P. An atomic force microscope study of thin layers from whole casein and β -casein solutions adsorbed on graphite (indsendt).
12. Karlsson, A.O., Ipsen, R. & Ardö, Y. Primary proteolysis and rheological properties in concentrated milk systems with added whey protein (manuskript).
13. Helstad, K.M., Rayner, M., Paulsson, M. & Dejmek, P. Liquid droplet-like behaviour of whole casein aggregates adsorbed on graphite studied by nano-indentation in AFM (manuskript).

Publicerede abstrakts til konferencer

14. Karlsson, A.O., Ipsen, R. & Ardö, Y. (2004) Rheological Behaviour of Skim Milk Concentrates at Different pH. *Abstract in Annual Transactions of the Nordic Rheology Society*, 12, s. 219.
15. Karlsson, A.O., Ipsen, R. & Ardö, Y. (2005) Rheology and microstructure of rennet gels from concentrated skim milk without visible syneresis. *Poster, LMC congress*, marts 2005, Lyngby.
16. Helstad, K., Trckova, J., Paulsson, M., Ardö, Y. & Dejmek, P. (2005) Nonaorheological properties of casein micelles. *Poster, LMC congress*, marts 2005, Lyngby.

Tidsskriftsartikler

17. Qvist, K.B.; Euston, S.R. & Wium, H. (2003). Regulering af den primære proteinaggregering og -struktur i forbindelse med fremstilling af ost af koncentreret mælk. *Mælkeritidende*, **15**, 336-339.
18. Qvist, K.B., Wium, H. & Dejmek, P. (2003). Styring af fysiske egenskaber i ostemodell på basis af koncentreret mælk. *Mælkeritidende*, **3**, 68-71.

Ph.d.-afhandlinger

19. Helstad, K. (2006). Nanorheological Studies of Casein. *Ph.d.-afhandling*, Lund Universitet, Lund, Sverige.
20. Karlsson, A.O. (2006). Controlling physical properties of rennet-induced casein gels made from concentrated skim milk. *Ph.d.-afhandling*, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, København.

Speciale

21. Hauert, C. (2006). Functional properties of rennet-induced casein gels made from microfiltrated skim milk and different vegetable fats. *Speciale*, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, København.

Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater:

Resultater fra et tidligere projekt viste, at ved pH og NaCl-niveauer i oste af Feta, Camembert og Danbo-type, påvirkede koaguleringshastigheden (reguleret ved løbekoncentrationen og temperaturen) tekstur og mikrostruktur i kaseingeler lavet af ultrafiltreret (UF) skummetmælk. En hurtig koagulering ved brug af en høj løbekoncentration og højere temperatur i intervallet 25 til 35°C resulterede i en grovere mikrostruktur i gelerne og hårdere og mere elastiske geler.

Koncentreret mælk

Første opgave i projektets praktiske del var at fastlægge procesbetingelser for ultrafiltrering (UF) og mikrofiltrering (MF) i forbindelse med produktion af koncentrat med høj kaseinkoncentration (15-20%, w/w) og karakterisering af koncentraterne. Ved UF var det muligt at fremstille skummetmælkskoncentrat med op til 19,5% (w/w) kasein og 3,8% (w/w) valleprotein. Ved MF var det muligt at opnå den samme høje kaseinkoncentration, men samtidigt reducere valleproteinkoncentrationen til 0,1% (w/w) i det endelige skummetmælkskoncentrat. Ved denne høje proteinkoncentration og 30 °C er koncentraterne meget tyktflydende og viskøse, hvilket forhindrer produktion af løbegeler uden store mængder inkorporeret luft. Beregninger og mikroskopering viste også, at kaseinmicellerne i koncentraterne var meget tæt pakkede, hvilket forklarede den høje viskositet. Efter syrning af koncentrat med glucono- δ -lakton (GDL) fra nativt pH 6,5 til pH 5,2-6,2 reduceredes koncentraternes viskositet betydeligt. Måling af UF-koncentraternes viskositet og elasticitet viste også at en tilsætning af NaCl resulterede i en tydelig stigning i viskositet og elasticitet.

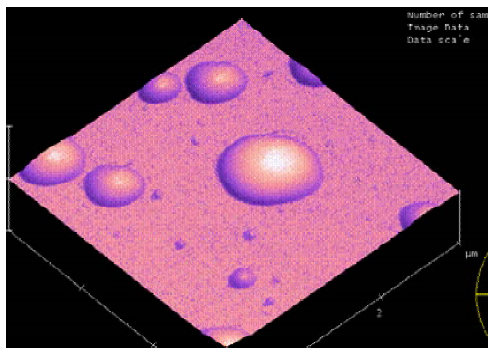
Mængden af kolloidalt kalciumfosfat (CCP) bundet til kaseinmicellerne bidrager til kaseinmicellernes struktur og til kaseingelernes elasticitet. CCP blev bestemt vha. atomabsorptionspektroskopi, og ved syrning af skummetmælkskoncentrat mindskedes mængden af CCP bundet til kaseinmicellerne. Det blev forsøgt at måle opløsning af CCP under syrning med hjælp af P-NMR. Det var imidlertid ikke muligt at opnå kvalitative NMR-spektra for at kvantificere fosfatkoncentrationen i den koncentrerede skummetmælk under syrning.

Atomic force mikroskopi (AFM) metode for kaseinmiceller i koncentreret mælk og kaseingeler

Det blev forsøgt, med atomic force mikroskopi (AFM), at karakterisere enkelte kaseinmicellers teksturegenskaber for senere at sammenligne disse med kaseingelers teksturegenskaber. Det var svært at udvikle en metode til at fikser kaseinmicellerne inden analyse i AFM-mikroskopet. Koncentrat af skummetmælk blev fortyndet i buffer (pH 7,0), inden kaseinmicellerne blev fikseret ved eksponering til en hydrofob overflade i en væskecelle. Kaseinmicellerne blev visualiserede i AFM-mikroskopet, ved at en lille nål (diameter 40 nm) berørte kaseinernes overflade, og de topografiske data blev omdannet til et tredimensionelt billede (Fig. 1). Kaseinmicellerne blev mere halvsfæriske efter fiksering til den hydrofobe overflade. Enkelte kaseinmolekyler til stede i mælken diffunderede også fra kaseinmicellerne til den hydrofobe overflade og dannede et monolag. Det blev fundet, at det sandsynligvis for størstedelens vedkommende var β -kaseiner der dannede monolaget. Fra penetrations-eksperiment med AFM-nålen på kaseinmiceller genereredes kompressionskurver. Det blev forsøgt at applicere forskellige modeller på kompressionskurverne for at beregne kaseinmicellernes elastiske egenskaber. Ved penetration med AFM-nålen opførte kaseinmicellerne sig mere som en viskøs dråbe end som en elastisk struktur, hvilket gjorde at det ikke var muligt at bestemme kaseinmicellernes elasticitet. Det blev forsøgt at mindske pH i de fikserede kaseinmicellers omgivelser, men det gjorde micellerne meget skøre, og de gik i stykker ved penetration med nålen.

Det var muligt at udføre penetrationer med en AFM-nål på kaseingeler i AFM-mikroskopets væskecelle og beregne et elasticitetsmodul for gelerne. Valg af størrelse af den brugte AFM-nål var af stor betydning for resultaterne.

Ved brug af en lille nål (diameter 40 nm), varierede resultaterne meget for den lille nål kunne nu ramme både enkelte kaseinstrukturer eller væskelommer i gelernes mikro-struktur. Ved brug af en større AFM-nål (6800 nm) blev data mere reproducerbare for nålen ramte ikke en væskelomme uden også at ramme kaseinstrukturer.



Figur 1. Topografisk NanoScope billede optaget i et AFM-mikroskop af kaseinmiceller på en hydrofob grafitoverflade i en væskecelle. Den største kaseinmicelles diameter er 970 nm.

Proteolyse i koncentrat og geler

Primær proteolyse af kaseiner sker primært som følge af enzymaktivitet fra plasmin (endogent mælke-enzym) og løbeenzym (f.eks. chymosin) under lagring af faste oste. Siden UF-mælk blev præsenteret som et alternativ til konventionel mælk i osteproduktion, er der blevet rapporteret lavere proteolyse af kaseiner i UF-oste. Dette har mange gange skyldtes, at valleproteinerne, der bliver inkorporeret i UF-oste, inhiberer plasmins og løbeenzymets proteolytiske aktivitet. Ved undersøgelse af kaseinnedbrydningen i UF- og MF-koncentrater under lagring blev det fundet, at reduktionen i plasminaktivitet sandsynligvis primært beror på inaktivering af enzymet ved en lang og intensiv mekanisk behandling ved filtrering.

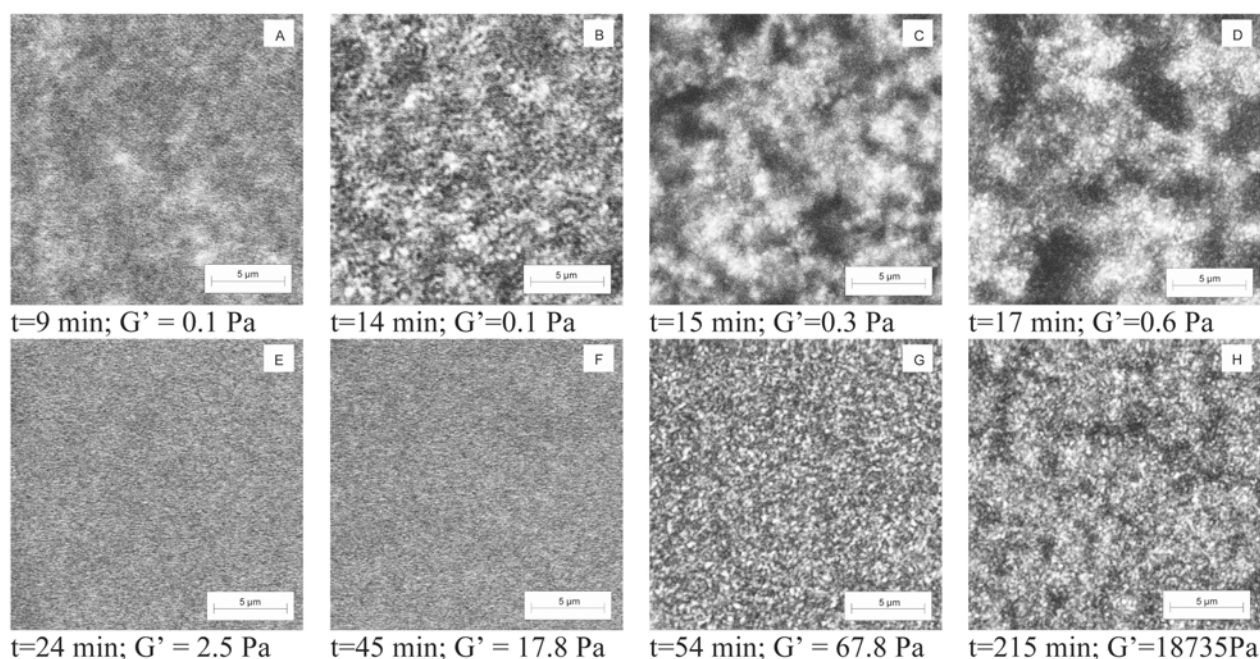
Enzymatisk nedbrydelse af kaseiner i geler fra koncentreret MF-skummetmælk under lagring blev undersøgt ved separation af proteiner og peptider med hjælp af kapillarelektroforese og HPLC. Undersøgelserne viste, at kaseinnedbrydelsen fra både plasmin- og chymosinaktivitet under lagring (61 dage) generelt var langsom. Ved tilsætning af valleprotein til skummetmælkskoncentratet inden løbe-koagulering kunne effekten af valleproteiner på kaseinnedbrydningen blive undersøgt. Nedbrydningen af α_{S1} -kasein og β -kasein fra chymosin blev ringere ved stigende valleproteinkoncentration i gelerne. Også nedbrydning af β -kasein fra plasmin blev i nogen grad reduceret ved stigende valleprotein-koncentration i kaseingelerne.

Koagulering af koncentreret mælk

Ved fremstilling af kaseingeler udvalgte koncentrater af skummetmælk med fire pH niveauer (6,2, 5,8, 5,5 og 5,2) justeret ved tilsætning af glucono- δ -lakton (GDL) i kombination med tre NaCl koncentrationer (0, 1,75 og 3,50%, w/w). Tilsætning af GDL og NaCl skete 24 timer inden løbe-koagulering, for at koagulering skulle finde sted, når pH var indstillet og mineralbalancen mellem kaseinmicellerne og mælkens serumfase var i ligevægt efter syring. De fire pH-niveauer og NaCl-koncentrationerne blev valgt for at give en god spredning i pH og NaCl-intervaller relevant for gule oste. Syring og koagulering foregik altid ved 30°C.

Forløbet under løbe-koaguleringen af ukoncentreret og koncentreret skummetmælk blev undersøgt ved hjælp af HPLC-analyse af glukomacropetid efter enzymatisk hydrolyse af κ -kasein, mikrostruktur ved hjælp af konfokal laser scanning mikroskopi (CLSM) og tekstur med hjælp af small amplitude oscillatory reologi (SAOR). Ved SAOR var det også muligt at bestemme geldannelsestidspunktet efter løbetilsætning som tiden, når det elastiske modul (G') bliver større end det viskøse modul (G''). Ved løbe-koagulering sker aggregering af kaseinmicellerne, når tilstrækkeligt meget κ -kasein på kaseinmicellernes overflade er blevet hydrolyseret af løbeenzymet.

I koncentreret skummetmælk blev gel-dannelsestidspunktet målt til at ske når en lavere andel (20 %) af κ -kasein er blevet hydrolyseret end i ukoncentreret skummetmælk (50 %). Det vær også muligt at observere at kaseinstrukturerne er mindre i den koncentrerede skummetmælk ved geldannelsestidspunktet (Fig. 2F) end i den ukoncentrerede skummetmælk (Fig. 2C). Dette skyldes en lavere diffusionshastighed og tidlig dannelse af et løst, sammenhængende kaseinnetværk inden koaguleringstidspunktet i det viskøse koncentrat. Den høje proteinkoncentrationen i geler lavet fra koncentreret mælk giver efter koaguleringstidspunktet hurtigt et stærkt og elastisk gelnetværk, der ikke med den samme hastighed og til den samme grad gennemgår mikrostrukturelle omdannelser (rearrangements), som er tilfældet for et gelnetværk dannet ud fra ukoncentreret skummetmælk (Fig. 2). Også under lagring (61 dage) af geler fra koncentreret skummet-mælk sker meget få omdannelser i kaseinnetværkets struktur, og gelerne er meget stabile oven for synerese.

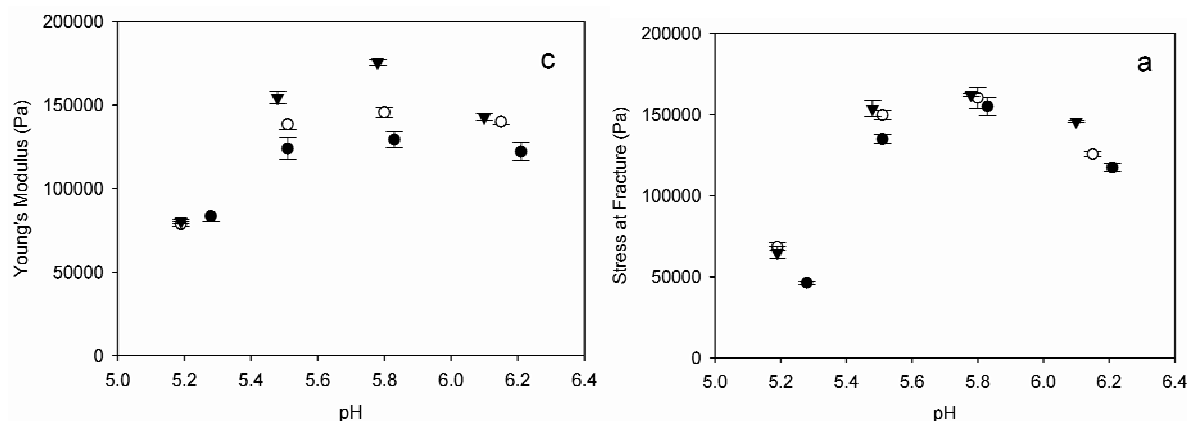


Figur 2. Mikrostruktur af ukoncentreret skummetmælk (A-D) og UF-koncentreret skummetmælk (E-H) under løbekoagulering. Proteinerne var farvede med Rodamin B og er indikeret med hvid farve på CLSM-mikrograferne. Den elastiske modul (G') blev målt med SAOR og geldannelsestidspunktet var 16 minutter for ukoncentreret skummetmælk (2,8%, w/w, kasein) og 44 minutter for koncentreret skummetmælk (19,8%, w/w, kasein) ved brug af den samme løbekoncentration.

Kaseingelernes fysiske egenskaber

UF-kaseingelernes elasticitet og brudgenskaber 48 timer efter løbetilsætning blev karakteriseret ved måling af uniaksial kompression. Gelernes elasticitet (G') var uforandret i pH-intervallet 5,5-6,2 (Fig. 3). Ved tilsætning af NaCl i det samme pH-interval øgedes gelernes elasticitet og var højest ved pH 5,8. Gelernes brudstyrke er mere påvirket af pH i intervallet pH 5,5 - 6,2 men ikke ret meget af NaCl-koncentrationen. Ved pH 5,2 udviser gelerne både en signifikant lavere elasticitet og brudstyrke end ved pH 5,5-6,2. Resultaterne fra UF-kaseingelernes tekstur er i god overensstemmelse med de rapporterede teksturmålinger på kaseingeler lavet fra ukoncentreret skummetmælk. En forklaring på reduktion i både elasticitet og brudstyrke fra pH 5,5 til 5,2 er, at en mindre mængde CCP er bundet til kaseinnetværket ved pH 5,2 end ved 5,5.

Forskel i gellers mikrostruktur har mange gange blevet brugt til at forklare forskel i gellers fysiske egenskaber. Der findes imidlertid ikke nogen universelle regler om at et groft netværk giver en mere elastisk eller hård gel. Ved undersøgelse af mikrostrukturen i UF-kaseingeler med CLSM var det umuligt at se forskel på gellernes mikrostruktur, når pH og NaCl-koncentrationen blev varieret på den samme måde som for gellerne i Fig. 2. Heller ikke billedanalyse af CLSM mikrografer og beregninger af strukturenes størrelse kunne påvise nogen forskel i UF-kaseingellernes mikrostruktur ved ændring af pH eller NaCl-koncentrationen. Dette betyder, at de faktorer, der påvirkes af forandring i pH og NaCl-koncentrationen og giver de tekstuelle forskelle, ikke er synlige i mikrometer-skala og mikroskopiske teknikker med større opløsning er derfor nødvendige.



Figur 3. Elasticitet (Young's modulus, A) og brudstyrke (Stress at fracture, B) beregnet fra kompressionskurver for kaseingeler lavet af koncentreret skummetmælk (19,8%, w/w, kasein) ved forskellige pH og 0 (●), 1,75 (○) eller 3,50 (▼) % (w/w) NaCl. Målingerne blev udført ved 20 °C.

Det var muligt ved hjælp af en lille AFM-nål at udføre penetrationer i gellernes overflade og beregne UF-kaseingellernes elasticitet målt på mikroniveau. AFM-målingerne krævede meget god prøvepræparation og valget af nålestørrelse var afgørende for resultaterne og deres reproducerbarhed, som beskrevet ovenfor. Kaseinstrukturerne i UF-kaseingellerne blev ud fra CLSM-mikrograferne estimeret til at have en størrelse på 0,2-5,0 µm. Ved brug af en lille nål (diameter 40 nm) er den målte elasticitet afhængig af, hvor nålen penetrerer på gelens overflade, og det er p.t. ikke muligt at undersøge om nålen rammer gelnetværket eller en serumfyldt væskelomme. Med en større nål (diameter 6,8 µm) blev penetrationskurverne og data for elasticitet mere reproducerbare. Elasticiteten målt for geler ved pH 6,1 og pH 5,2 i AFM stemte godt overens med de værdier for elasticitet målt ved hjælp af uniaksial kompression.

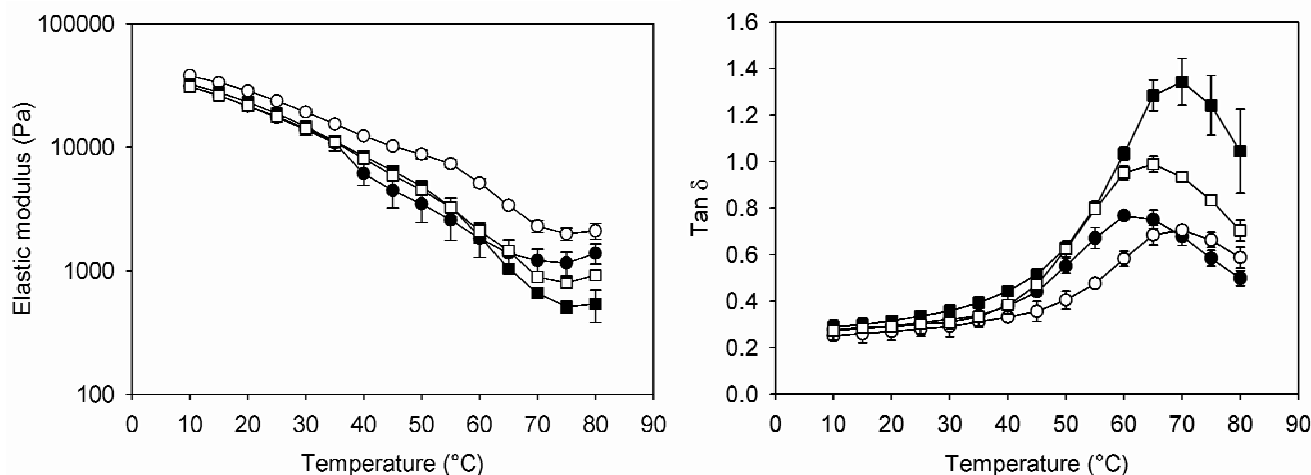
Smelteegenskaber i kaseingeler fra koncentreret skummetmælk

Fysiske egenskaber i både fedt- og proteinfraktionerne påvirker en osts smelteevne. Undersøgelse af smelteevne i kaseingeler fra koncentreret skummetmælk giver således ikke kun informationer om smelteevnen i oste fra koncentreret mælk, men også om hvordan proteinfraktionen i oste skal designes for at opnå en optimal smelteevne i traditionel ost.

Smelteevnen i kaseingeler fra MF- og UF-koncentreret skummetmælk undersøgte med SAOR og uniaksial creep test. Ved stigende temperatur fra 10 til 70 °C ses en generel reduktion af kaseingellernes elasticitet (G'), og de viskøse egenskaber i relation til de elastiske egenskaber ($\tan \delta$) stiger (Fig. 4). Lav elasticitet og en høj fasevinkel ($\tan \delta$) har vist sig at korrelere fint med en god smelteevne i oste. Ved stigning af temperaturen over 70 °C øges elasticiteten, og fasevinkelen formindskes, hvilket ikke er til gavn for gellernes smelteevne. Stigningen i elasticitet over 70 °C kunne til dels skyldes denaturering af valleproteiner, der giver et mere elastisk proteinnetværk.

Dette var tydeligt, da elasticiteten ikke øgedes i samme grad, når kaseingelerne var lavet af MF-skummetmælkskoncentrat. Elasticiteten i kaseingeler lavet af UF-skummetmælk øgedes også, når opvarmningstiden ved 60 °C øgedes fra 5 til 30 minutter, idet denaturering af valleproteiner er en tids- og temperaturpåvirket reaktion. Imidlertid øger elasticiteten også ved opvarmning over 70 °C for geler med meget lav valleproteinkoncentration (0,1%, w/w). Dette tyder på, at der sker forandringer i kaseinnetværket som følge af opvarmning. Det fremgår således tydeligt ved observation af kaseingelernes mikrostruktur, at kaseinnetværket trækker sig sammen, og at der dannes serumfyldte porer som følge af opvarmning.

Geler med pH 5,2 er ikke kun mindre elastiske end geler ved pH 5,5-6,2 ved stuetemperatur (20 °C, Fig. 2) men også ved alle temperaturer (10-80 °C, Fig. 4A). Dette betyder, at et lavt pH (5,2) giver kaseingeler med en bedre smelteevne, hvilket også blev vist med hjælp af uniaksial creep testmålinger på geler opvarmet til mellem 50 og 80 °C. Tilsætning af NaCl til gelerne giver mere elastiske geler med en lavere fasevinkel ($\tan \delta$), også ved høje temperaturer. Imidlertid kan tilsætning af NaCl bruges til at udskyde stivning af kaseingelerne til højere temperaturer ved opvarmning, da fasevinklen først mindskes ved 70 °C og ikke ved 60 °C, som den gør for geler uden NaCl. Proteolytisk nedbrydning af kaseinet gør, at gelerne bliver blødere og mindre elastiske ved alle temperaturerne, og det bidrager til en bedre smelteevne.



Figur 4. Reologiske egenskaber målt med SAOR og givet som elastisk modul (G' , A) og fasevinklen ($\tan \delta$, B) ved forskellige temperaturer for UF-kaseingeler; pH 5,8 og 0% NaCl (●), pH 5,8 og 3,50% NaCl (○) og pH 5,2 og 0% NaCl (■) 2 dage efter løbetilsætning og pH 5,8 og 0% NaCl 30 dage (13 °C) efter løbetilsætning (□).

