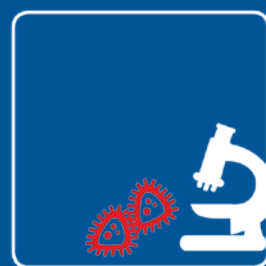


SLUTRAPPORT

NR. 2010-102

# Skånsom procesteknologi til fremstilling af mælkebaserede specialingredienser





---

**DATO: Januar 2010**

## **Slutrapport**

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

---

**1. Projekttitle: Skånsom procesteknologi til fremstilling af mælkebaserede specialingredienser**

---

**2. FødevareErhvervs j.nr.: 3414-04-00986-02**

---

**3. Ansøger** (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail): Mejeribrugets ForskningsFond, Mejeriforeningen, Frederiks Allé 22, DK-8000 Århus C, Tlf.: 8731 2000, Fax.: 8731 2001  
E-mail: [kts@mejeri.dk](mailto:kts@mejeri.dk)

---

**4. Deltagende samarbejdsparter** (navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):  
Mejeribrugets ForskningsFond, Mejeriforeningen, Frederiks Allé 22, DK-8000 Århus C, Tlf.: 8731 2000, Fax.: 8731 2001, E-mail: [kts@mejeri.dk](mailto:kts@mejeri.dk)

Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Institut for Fødevarevidenskab, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Tlf.: 3533 3221, Fax.: 3533 3344, E-mail: [ls@life.ku.dk](mailto:ls@life.ku.dk)

Arla Foods amba, Skanderborgvej 277, DK-8260 Viby J, Tlf.: 8938 1000, Fax.: 8628 1691, E-mail: [hans.bertelsen@arlafoods.com](mailto:hans.bertelsen@arlafoods.com)

---

---

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

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

FødevareErhverv  
Udviklingsstøttekontoret  
Nyropsgade 30  
1780 København V

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

Projektleder og professor Leif H. Skibsted, Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevarekemi, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Tlf.: 3533 3221, Fax.: 3533 3344, E-mail: [ls@life.ku.dk](mailto:ls@life.ku.dk)

Afdelingschef Hans Bertelsen, Arla Foods Ingredients, Global Ingredients R&D, Nr. Vium, DK-6920 Videbæk. Tlf.: 7217 7730, Fax.: 8628 1691, E-mail: [hans.bertelsen@arlafoods.com](mailto:hans.bertelsen@arlafoods.com)

Afdelingschef Kim Tram Sørensen, Mejeribrugets ForskningsFond, Mejeriforeningen, Frederiks Allé 22, DK-8000 Århus C, Tlf.: 8731 2062, Fax.: 8731 2001, E-mail: [kts@mejeri.dk](mailto:kts@mejeri.dk)

---

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

Professor Ylva Ardö, Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Institut for Fødevarevidenskab, Mejeriteknologi, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Tlf.: 3533 3193, Fax.: 3533 3190, E-mail: [ya@life.ku.dk](mailto:ya@life.ku.dk)

Post doc. Marianne Kaaber Thomsen, Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevarekemi, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C.

Laborant Pia Skjødt Pedersen, Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Institut for Fødevarevidenskab, Mejeriteknologi, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Tlf.: 3533 3187, Fax.: 3533 3190, E-mail: [psp@life.ku.dk](mailto:psp@life.ku.dk)

Lektor Jes C. Knudsen, Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Institut for Fødevarevidenskab, Mejeriteknologi, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Tlf.: 3533 3144, Fax.: 3533 3190, E-mail: [jes@life.ku.dk](mailto:jes@life.ku.dk)

---

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

Start: 1. maj 2005

Slut: 28. februar 2009

---

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

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

At tilvejebringe viden om varme og høje tryks effekt på mælkeproteiners funktionelle egenskaber, og dermed etablere et grundlag for udvikling af nye eller forbedrede fødevaringredienser. Projektet skal undersøge denaturerings- og aggregeringskinetik for kommercielle mælkeprotein fraktioner samt ved fysisk/kemiske målinger fastlægge effekter på proteiners funktionelle egenskaber. Med henblik på produktudvikling valideres forsøg i pilotskala.

### B. Projektets resultater og konklusion:

Kort sammendrag af projektets hovedresultater og konklusioner med henvisning til publikationer.

Overordnet har projektet dokumenteret at en kontrolleret procesbehandling markant kan forbedre mælkeproteiners funktionelle egenskaber som ingrediens i fødevarer. Resultaterne fra projektet synes lovende i forhold til at anvende procesbehandling til på kontrolleret måde at danne aggregater af mælke- og valleproteiner, der ved tilsætning som ingrediens giver mulighed for at øge viskositet og cremethed i fødevarer som supper, saucer, dressinger, mayonnaise, yoghurt samt andre syrnede mælkeprodukter, særligt de fedtfattige varianter. I mejeribrugets egen produktudvikling kan procesbehandling simpelt anvendes til at modificere proteiner og dermed give nye egenskaber samt give mulighed for at justere på egenskaber, i de fødevarer og applikationer hvori mælke- og valleproteiner tilsættes som ingrediens.

Varmebehandling af 5 g/L  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C i 30 min og 69 °C i 45 min blev foretaget. Behandlingen resulterede i dannelse af proteinaggregater, dog i moderat koncentration og mængde (~5 %) i forhold til hovedparten af molekylerne, der havde molekylvægt svarende til nativt  $\beta$ -lactoglobulin efter den nævnte varmebehandling. Aggregaterne havde en molvægt på 2500 til 10 000 kg/mol og en gyrationsradius på 25-40 nm. Moderat varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin, forud for emulgering, øgede viskositeten af emulsionerne markant (200 gange) i forhold til viskositeten af emulsionerne stabiliseret af nativt  $\beta$ -lactoglobulin [Knudsen et al., 2008].

Emulsioner blev også fremstillet med en række forskellige olieindhold, og således relevante for at undersøge effekten af mælkeproteiner som ingrediens i lavfedtholdige produkter samt i produkter hvor fedtindholdet ikke er reduceret. Moderat varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C forhindrer flødeafsætning i koncentrerede emulsioner, sandsynligvis fordi at aggregater på overfladen af oliedråberne forøger oliedråbeinteraktionerne. Længere tids varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C er nødvendig for at forhindre flødeafsætning i emulsioner med reduceret olieindhold [Knudsen og Skibsted, 2009].

Valleproteiner, ubehandlede og varmemodificerede, blev undersøgt som ingrediens i lavfedt spreads (vand i olie emulsioner). Valleproteinet var af typen WPI (PSMD 449, Nutrilac leveret fra Arla Foods Ingredients, Nr. Vium, Danmark). Varmebehandling af valleproteiner i vandig opløsning ved 80 °C i 5 min., forud for fremstilling af spreads, resulterede i mindre vanddråber på omkring 2-3  $\mu$ m sammenlignet med vanddråbestørrelsen på omkring 10  $\mu$ m i spreads stabiliseret af WPI, der var varmebehandlet ved 74 °C i 5 min [Møller, 2007; Thygesen, 2007].

Undersøgelser af kasein miceller i trykbehandlet skummetmælk er foretaget. Trykbehandlingen blev foretaget ved henholdsvis 150 MPa, 200 MPa, 300 MPa og 400 MPa. Strukturen af kasein

miceller i den trykbehandlede mælk blev fastlagt med cryo transmissions elektron mikroskopi. Desuden blev den frie calcium ion koncentration målt i trykbehandlet mælk ved brug af en calcium ion selektiv elektrode [Knudsen og Skibsted, 2010]. Trykbehandling frigav calcium fra kaseinmicellerne og øgede dermed koncentrationen af frit calcium i serumfasen. Calcium bliver dog igen langsomt bundet til kaseinmicellerne under lagring (24 timer) af trykbehandlet mælk ved atmosfærisk tryk, således at de trykbehandlede kasein miceller indeholder calcium i næsten samme mængde som kasein miceller i ubehandlet mælk. Trykbehandling er en effektiv måde, og den eneste, til at modificere på kasein micellers størrelse ved mælkenes neutrale pH. Nye teksturer i oste skønnes at kunne frembringes ved fremstilling af oste fra kasein miceller i trykbehandlet mælk.

Målinger af pH i mælkeproteinopløsninger under (*in-situ*) højtryksbehandling er foretaget og det blev fundet at pH falder under højtryksbehandling [Olsen et al., 2008].

Samspejlet mellem valleproteiner og antioxidanter, der naturligt findes i chokolade, vanilje og jordbær, blev undersøgt i forhold til den fotooxidative stabilitet i mælkeprodukter, der indeholder disse antioxidanter [Graversen, 2006]. Dette blev gjort *in vitro*, ved brug af model systemer, der indeholdte de udvalgte fenoler (vanillin, (+)-catechin og *p*-coumarsyre) samt valleproteinerne  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) og bovint serum albumin (BSA). (+)-Catechin inhiberede lipidperoxidationen via en mekanisme, der kendetegner primære antioxidanter, mens vanillin og *p*-coumarsyre forsinkede oxidationen som sekundære antioxidanter.

### C. Projektets faglige forløb:

Gennemgang af projektets forløb og opnåede resultater samt en vurdering af resultaterne i forhold til de oprindeligt opstillede projektplan og milepæle.

#### Fase 1 og 2. Fysisk/kemisk karakterisering samt kinetiske og mekanistiske studier af mælkeproteinmodificering

Varmebehandling af 5 g/L  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C i 30 min og 69 °C i 45 min blev foretaget. Behandlingen resulterede i dannelse af proteinaggregater, dog i moderat koncentration og mængde (~5 %) i forhold til hovedparten af molekylerne, der havde molekylvægt svarende til nativt  $\beta$ -lactoglobulin efter den nævnte varmebehandling (Figur 1). Aggregaterne er blevet karakteriseret ved at foretage statistisk lysspredning efter gelfiltreringskromatografi. Dette giver et estimat for molvægten samt diameter for de forskellige species. Aggregaterne havde en molvægt på 2500 til 10 000 kg/mol og en gyrationsradius på 25-40 nm [Knudsen et al., 2008]. Undersøgelser af funktionelle egenskaber blev foretaget på en olie i vand emulsion (60 % olie og 40 % vandfase med 5g/L protein) stabiliseret af  $\beta$ -lactoglobulin (Figur 2). De undersøgte parametre omfattede mængden af protein adsorberet til oliedråber, reologiske egenskaber af emulsionen samt emulsionens oliedråbestørrelsesfordeling og mikrostruktur. Emulsionsprøver blev fremstillet ved brug af en højtrykshomogenisator.

Moderat varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C i 30 min eller 69 °C i 45 min gav omtrent samme proteinadsorption til oliedråbernes overflade i forbindelse med efterfølgende emulgering sammenlignet med proteinadsorptionen til oliedråbernes overflade ved emulgering med nativt  $\beta$ -lactoglobulin. Moderat varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin, forud for emulgering, øgede viskositeten af emulsionerne markant (200 gange) i forhold til viskositeten af emulsionerne stabiliseret af nativt  $\beta$ -lactoglobulin (Figur 3). Tilsvarende blev der fundet en markant øgning i flydegrænse (10 gange), samt elastisk og viskøst modul (200 gange) i emulsioner stabiliseret med varmebehandlet  $\beta$ -lactoglobulin. Mekanismen bag disse ændringer i protein stabiliserede oliedråbers stabilitet og reologi i vandkontinuerlige emulsioner kunne forklares ved at aggregeret protein omkring oliedråberne øger interaktionerne mellem oliedråberne (Figur 3). Varmeaggregeret  $\beta$ -lactoglobulin synes at adsorbere til oliedråbeoverfladen i emulsionerne i

tilsvarende grad som nativt  $\beta$ -lactoglobulin.

Emulsioner blev også fremstillet med en række forskellige olieindhold, og således relevante for at undersøge effekten af mælkeproteiner som ingrediens i lavfedtholdige produkter samt i produkter hvor fedtindholdet ikke er reduceret. Resultaterne viser at varmeaggregeret  $\beta$ -lactoglobulin øger viskositeten 10 - 50 gange i fedtreducerede emulsioner sammenlignet med viskositeten i emulsioner hvor nativt  $\beta$ -lactoglobulin er tilsat som ingrediens. Resultaterne viser også at flødeafsætningen i olie i vand emulsioner stabiliseret af  $\beta$ -lactoglobulin foregår med en konstant hastighed. Denne hastighed falder ved stigende olie volumenfraktioner i olie i vand emulsioner. Moderat varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C forhindrer flødeafsætning i koncentrerede emulsioner, sandsynligvis fordi at aggregater på overfladen af oliedråberne forøger oliedråbeinteraktionerne. Længere tids varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C er nødvendig for at forhindre flødeafsætning i emulsioner med reduceret olieindhold.

Valleproteiner, ubehandlede og varmemodificerede, blev undersøgt som ingrediens i lavfedt spreads (vand i olie emulsioner). Valleproteinet var af typen WPI (PSMD 449, Nutrilac leveret fra Arla Foods Ingredients, Nr. Vium, Danmark). Spreads, der bestod af vand, smørolie og valleprotein i et vand/olie forhold på 40%/60%, tilsvarende lavfedt Kærgården, blev fremstillet med en skrabevarmeveksler, hvori krystalleringen af olien foregår. Vanddråbefordeling i spreads blev undersøgt med puls felt gradient NMR (PFG-NMR) og confocal laser scanning mikroskopi. Materialeegenskaber af spreads blev målt med small amplitude oscillatory shear reologi og de fremstillede spreads blev vurderet sensorisk. Varmebehandling af valleprotein i vandig opløsning ved 80 °C i 5 min., forud for fremstilling af spreads, resulterede i mindre vanddråber på omkring 2-3  $\mu$ m sammenlignet med vanddråbestørrelsen på omkring 10  $\mu$ m i spreads stabiliseret af WPI, der var varmebehandlet ved 74 °C i 5 min. Ved sensorisk bedømmelse af spreads blev det fundet at frit vand i større grad blev observeret i spreads fremstillet med lav intensitet varmebehandling WPI og i mindre grad i spreads fremstillet med høj intensitet varmebehandling af WPI. De reologiske målinger viste at de fremstillede spreads havde et højere elastisk modul (~10 gange højere) sammenlignet med Kærgården med tilsvarende vand/olie indhold. Kølingen ved krystallisationen, under fremstillingen af spreads, kunne have været kraftigere. Herved ville mindre hårde krystaller blive dannet og en mere blød og smørbar tekstur opnået.

Samspelet mellem valleproteiner og antioxidanter, der naturligt findes i chokolade, vanilje og jordbær, blev undersøgt i forhold til den fotooxidative stabilitet i mælkeprodukter, der indeholder disse antioxidanter [Graversen, 2006]. Dette blev gjort *in vitro*, ved brug af model systemer, der indeholdte de udvalgte fenoler (vanillin, (+)-catechin og *p*-coumarsyre) samt valleproteinerne  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) og bovint serum albumin (BSA). Associations konstanterne og de specifikke bindings kapaciteter blev bestemt, ved brug af en capillary elektroforese- frontal analyse (CE-FA) metode, der blev optimeret til dette formål. Der blev observeret binding af alle tre fenoliske antioxidanter til BSA, men kun vanillin viste binding til BLG. Resultaterne indikerer tilstedeværelsen af to typer bindingssteder for (+)-catechin og *p*-coumarsyre på BSA, mens der kun antydes en type bindingssted for vanillin på BSA. Resultaterne indikerer ligeledes tilstedeværelsen af to typer bindingssteder for vanillin på BLG. Den højeste associations konstant blev fundet for *p*-coumarsyre bundet til BSA, mens den højeste bindingskapacitet blev fundet for vanillin bundet til BSA. (+)-Catechin inhiberede lipidperoxidationen via en mekanisme, der kendetegner primære antioxidanter, mens vanillin og *p*-coumarsyre forsinkede oxidationen som sekundære antioxidanter.

Målinger af pH i mælkeproteinopløsninger under (*in-situ*) højtryksbehandling er foretaget, og det blev fundet at pH falder under højtryksbehandling [Olsen et al., 2008].

Undersøgelser af kasein miceller i trykbehandlet skummetmælk er foretaget. Skummetmælken bestod af rekonstitueret skummetmælkspulver. Trykbehandlingen blev foretaget ved henholdsvis

150 MPa, 200 MPa, 300 MPa og 400 MPa. Strukturen af kasein miceller i den trykbehandlede mælk blev fastlagt med cryo transmissionselektron mikroskopi. Desuden blev den frie calcium ion koncentration målt i trykbehandlet mælk ved brug af en calcium ion selektiv elektrode. Resultaterne viser at en fraktion af kasein micellerne i trykbehandlet mælk dissocierer til monomere kaseiner, som efter endt trykbehandling aggregerer til små miceller, der er mindre end kasein micellerne i ubehandlet mælk. Ved moderat høje tryk på omkring 300 MPa øges fraktionen af kasein miceller, der dissocierer til monomere kaseiner, og som efter endt trykbehandling aggregerer til små miceller. Men desuden adsorberer en fraktion af de monomere kaseiner til store kasein miceller, som er større end kasein micellerne i ubehandlet mælk (Figur 4). Strukturen og størrelserne af kaseinmicellerne var mere eller mindre uændrede ved lagring af mælk efter trykbehandling, målt med cryo transmissions elektron mikroskopi, henholdsvis 2 timer og 20 timer efter højtryksbehandling. Calcium bundet til kaseinmiceller blev indirekte målt ved at måle calcium koncentrationen i mælken serumfase med en calcium-ion selektiv elektrode. Trykbehandling af mælk ved 150 MPa, 200 MPa, 300 MPa og 400 MPa frigav calcium fra kaseinmicellerne og øgede dermed koncentrationen af frit calcium i serumfasen. Calcium bliver dog igen langsomt bundet til kaseinmicellerne under lagring (24 timer) af trykbehandlet mælk ved atmosfærisk tryk, således at de trykbehandlede kasein miceller indeholder calcium i næsten samme mængde som kasein miceller i ubehandlet mælk. Trykbehandling er en effektiv måde, og den eneste, til at modificere på kasein micellers størrelse ved mælkenes neutrale pH. Nye teksturer i oste skønnes at kunne frembringes ved fremstilling af oste fra kasein miceller i trykbehandlet mælk.

#### **D. For samarbejdsprojekter med flere projektparter redegøres yderligere for:**

- samarbejdsrelationer mellem projektpartnere nationalt og eventuelt internationalt, herunder koordinering til andre projekter:

### **Fase 3. Validering af laboratorieforsøg ved pilotskalaforsøg.**

I samarbejde med Arla Foods Global Ingredients R&D, Nr. Vium, Bente Østergaard Mikkelsen, Hans Bertelsen og Mette Møller Andersen er der udført forsøg med højtryksbehandling af valleproteiner (WPI) ved en række forskellige tryk og proteinkoncentrationer. Internt i regi af Arla Foods Global Ingredients R&D er de trykbehandlede valleproteiner testet som ingrediens i forskellige applikationer og de molekylære egenskaber af de trykbehandlede valleproteiner er fastlagt.

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

- Resultaternes praktiske og/eller videnskabelige betydning samt hvilke nye problemstillinger projektet måtte have afdækket herunder relationer til andre/fremtidige projekter:

Projektets resultater kan danne grundlag for mejeribrugets egen produktudvikling. Procesbehandling er en simpel måde til at modificere proteiner og projektet har vist at modificering af proteiner giver nye egenskaber eller mulighed for at justere på egenskaber, i fødevarer og applikationer hvori mælke- og valleproteiner tilsættes som ingrediens.

#### **F. For forskningsprojekter suppleres med:**

Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer til offentlige og private forskningsmiljøer, erhverv m.m.:

I projektet har der i forbindelse med anvendelse af cryo-transmissions elektron mikroskopi været et samarbejde med mikroskopienheden på Lund Universitet, Kemi Centrum, PO Box 124, Lund Universitet, S-221 00 Lund, Sverige.

I forbindelse med anvendelse af lysspredning til bestemmelse af størrelser af partikler i opløsning har der været samarbejde med lektor Lars H. Øgandal fra faggruppen for Biofysik, Institut for Grundvidenskab og Miljø, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, DK-1871 Frederiksberg C

Forskeruddannelse:

Speciale/master projekt 45 ECTS: Heidi B. Graversen. Interactions among bovine whey proteins and phenolic antioxidants: Complexation constant and antioxidant ability – **2006**

Speciale/master projekt 30 ECTS: Louise Knutsson. The effect on the casein micelle size and plasmin activity when using a microfluidizer for homogenizing skim milk – **2006**

Bachelor projekt 18 ECTS: Kirsten Kastberg Møller. Stability and Rheological Properties of Oil-in Water emulsions Stabilized with heat modified whey proteins – **2006**

Bachelor projekt 18 ECTS: Jesper Thøgersen. Funktionalitet af mikropartikuleret valleprotein i syrnede mælkegeler – **2006**

Projektrapport 15 ECTS: Kirsten Kastberg Møller. Production of Reduced Fat Blended Spreads by Scraped Surface Heat Exchanger Technology – **2007**

Projektrapport 15 ECTS: Jonas Thygesen. Production of 60% Dairy Spread on Scraped Surface Heat Exchangers – **2007**

- Et resume på engelsk (maks. 1 A4-side).

Effects of substituting native  $\beta$ -lactoglobulin with heat-treated  $\beta$ -lactoglobulin as emulsifier in oil in water emulsions were investigated. The emulsions were prepared with 60 % oil and 40 % water phase containing 5 g/L  $\beta$ -lactoglobulin. Native  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -lactoglobulin heated at 69 °C for 30 and 45 min, respectively, in aqueous solution at pH 7.0 were compared. Molar mass determination of the species formed upon heating were made. Adsorption of heated and native  $\beta$ -lactoglobulin to oil droplet surfaces was found to be rather similar while the rheological properties of the emulsions stabilized by heated  $\beta$ -lactoglobulin and the emulsions stabilized by native  $\beta$ -lactoglobulin were remarkably different. A 200-fold increase in the zero-shear viscosity and elastic modulus and a 10-fold increase in yield stress were observed when emulsions were stabilized by heat-modified  $\beta$ -lactoglobulin instead of native  $\beta$ -lactoglobulin. Aggregates with a radius of gyration in the range from 25 to 40 nm, formed by heating of  $\beta$ -lactoglobulin, seem to increase oil droplet interactions. Small quantities of emulsifier substituted with aggregates have a major impact on the rheology of oil in water emulsions that consist of rather closely packed oil droplets. Aggregates in larger concentrations may be used to increase viscosity and viscoelastic properties of emulsions with an oil content lower than 60 %. The perspective, regarding food grade emulsions, is the possibility to enhance viscosity and viscoelasticity of low fat products. Furthermore, creaming of  $\beta$ -lactoglobulin



stabilized emulsions with oil content from 40 % to 65 % was found to occur with a constant rate, dependent on the oil content, and creaming could be prevented by using heat treatment of  $\beta$ -lactoglobulin at 69 °C prior to emulsification.

Milk was processed with high hydrostatic pressure in order to modify the casein micelles. Images that showed the casein micelle structure in untreated and pressure treated skim milk were obtained by using cryo transmission electron microscopy (cryo-TEM). Pressurization of milk at moderately high pressure in the range from 150 MPa to 300 MPa favoured formation of a large number of small micelles that coexisted with a fraction of large micelles, which appeared perfectly spherical with smooth and well defined surfaces, features which are suggested to originate from secondary adsorption of caseins. Pressurization of milk at 400 MPa favoured formation of smaller casein assemblies with sizes between 30 nm to 100 nm. Measurements of free calcium concentration [ $\text{Ca}^{2+}$ ] showed that calcium was bound to casein micelles after pressurization of milk. Furthermore, the electron microscopy images indicated that the substructure was similar for pressure modified casein micelles and casein micelles in untreated milk.

High pressure treatment was found to induce marked changes in pH, measured under pressure (*in-situ*), of the whey protein beta-lactoglobulin dependent on the working pressure and pH changes has been identified as important for milk protein. For  $\beta$ -lactoglobulin in an unbuffered solution at neutral pH, pressure up 500 MPa decreased pH to various levels depending on the concentration of protein probably due to electrostriction around the charged amino acid residues upon denaturation [Olsen et al., 2008].

The interactions between bovine whey proteins and antioxidants found in chocolate, vanilla and strawberry is considered to affect the oxidative stability of milk products. *In vitro* studies, using model systems, with selected phenolic compounds (vanillin, (+)-catechin, and *p*-coumaric acid) along with the whey proteins  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) and bovine serum albumin (BSA) were made. The association constants and specific binding capacities were determined using a capillary electrophoresis-frontal analysis (CE-FA) method, which was optimized for the specific purpose. Binding was observed of all three phenolic antioxidants to BSA, but only vanillin showed binding to BLG. Two classes of binding sites were indicated for (+)-catechin and *p*-coumaric acid on BSA, while only one class of binding sites were indicated for vanillin on BSA. Two classes of binding sites were also indicated for vanillin on BLG. The highest association constant (strongest binding) was found for *p*-coumaric acid bound to BSA, while the highest binding capacity was found for vanillin bound to BSA. (+)-Catechin inhibited lipid peroxidation via a primary antioxidant mechanism, while vanillin and *p*-coumaric retarded the lipid peroxidation via a secondary antioxidant mechanism.

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

Danske mejerier eksporterer funktionelle mælkeproteiner som ingredienser til fødevarer, og projektet har givet et grundlag for at vurdere virkninger af procesbehandling med varme eller høje tryk på udvalgte mælkeproteinfraktioner. Resultaterne viser, at modifikation af mælkebaserede ingredienser ved hjælp af varmebehandling kan anvendes til at styre fødevarers viskositet og tekstur. Resultaterne fra projektet synes lovende i forhold til at anvende varmebehandling til på kontrolleret måde at danne aggregater af mælke- og valleproteiner, der ved tilsætning som ingrediens giver mulighed for at øge viskositet og cremethed i fødevarer som supper, saucer, dressinger, mayonnaise, yoghurt samt andre syrnede mælkeprodukter, særligt de fedtfattige varianter. Resultaterne i projektet dokumenterer at en kontrolleret procesbehandling markant kan forbedre mælkeproteiners funktionelle egenskaber som ingrediens i fødevarer. I mejeribrugets egen produktudvikling kan procesbehandling simpelt anvendes til at modificere proteiner og dermed give nye egenskaber, samt give mulighed for at justere på egenskaber, i de fødevarer og applikationer hvori mælke- og valleproteiner tilsættes som ingrediens.

## H. Projektets økonomiske forløb:

Der har ikke været nævneværdige afvigelser i forhold til det i ansøgningen opstillede budget og alle parter har opfyldt deres økonomiske forpligtigelser. Udgiftposterne i projektet har været passende i forhold til budgettet, der således er opfyldt tilfredsstillende.

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

Artikler i internationale tidsskrifter med censur:

Knudsen, J.C.; Skibsted, L.H. High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry* **2010**, publiceret online: doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.017

Knudsen, J.C.; Øgendal, L.H.; Skibsted, L.H. Droplet surface properties and rheology of concentrated oil in water emulsions stabilized by heat modified  $\beta$ -lactoglobulin B. *Langmuir* **2008**, *24*, 2603-2610

Knudsen, J.C.; Skibsted, L.H. Creaming of concentrated oil in water emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin. **2009**, manuscript in preparation.

Faglige artikler i nationale tidsskrifter:

Knudsen, J.C.; Skibsted, L.H. Valleproteiner som funktionelle ingredienser. *Dansk Kemi* **2008**, *89*, nr. 11, 51-53

Knudsen, J.C.; Skibsted, L.H. Mælkeproteiner som funktionelle ingredienser i fødevarer. *LMFK-bladet* **2008**, *4*, 52-55

Knudsen, J.C.; Ardö, Y.; Skibsted, L.H. Skånsom procesteknologi til fremstilling af mælkeproteinbaserede specialingredienser. *Mælkeritidende* **2006**, *119*, 235-237

Mundtlige præsentationer eller poster præsentationer ved kongresser, symposier og lignende:

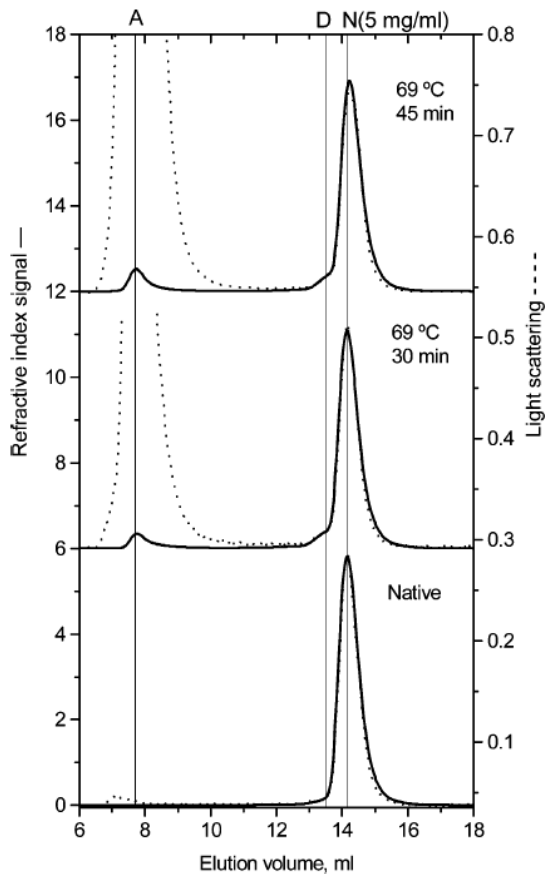
Knudsen, J.C.; Skibsted, L.H. Creaming and rheology of concentrated oil in water emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin. Oral presentation: Conference on Dairy structures – Health and Functionality. 25th. – 27th. March **2009**, Wadahl, Norway. Organized with financial support from Nordisk Forskeruddanningsakademi (NordForsk) within The NordForsk Network on Milk Science and Health Aspects.

Olsen, K.; Skibsted, L.H.; Orlien, V. Measuring pH in milk under high pressure. Oral presentation: IDF/INRA 1st International Symposium on Minerals & Dairy Products. October 1-3, **2008**, Saint-Malo, France

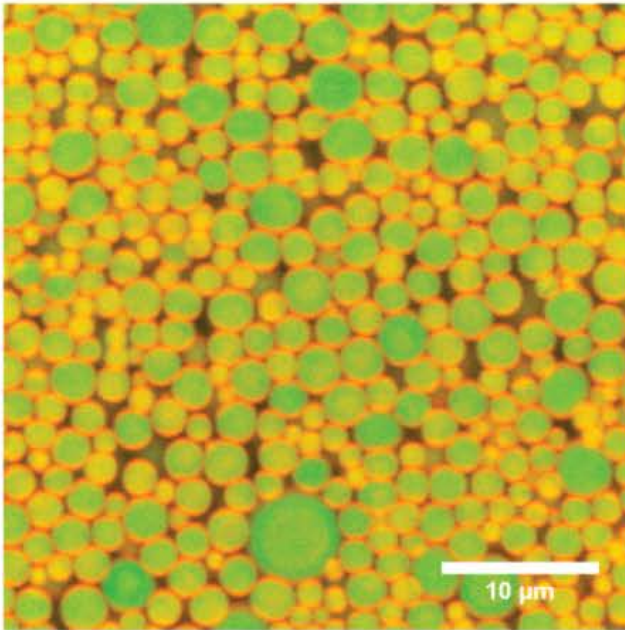
Knudsen, J.K.; Øgendal, L.H.; Skibsted, L.H. Gentle process technology for the production of milk protein-based special ingredients. Poster presentation at the 1st Arla Foods research seminar, 6. december **2007**, Århus, Denmark.

Skibsted, L.H. Gentle process technology for the production of milk protein-based special ingredients. Oral presentation: Arla Foods Corporate Research Day, 25 October 2007, Hotel Munkebjerg, Vejle, Denmark

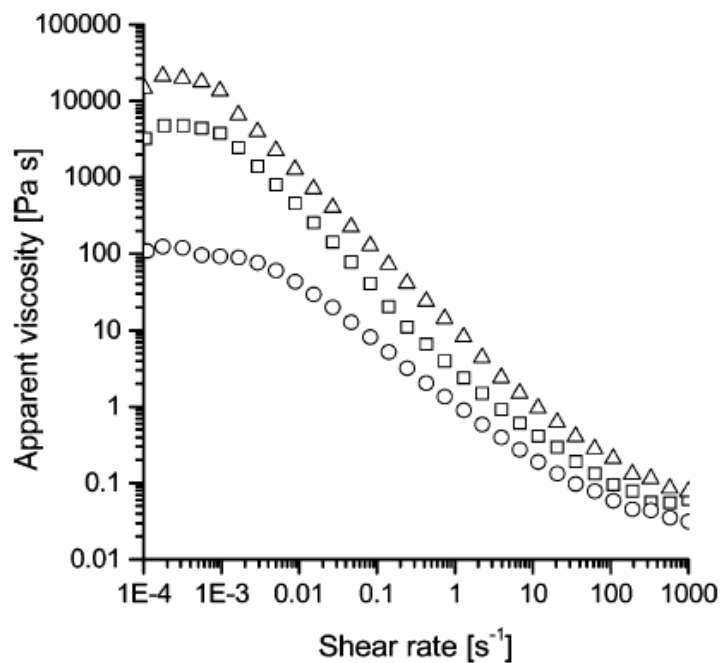
**J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater (maks. 5 A4-sider):**



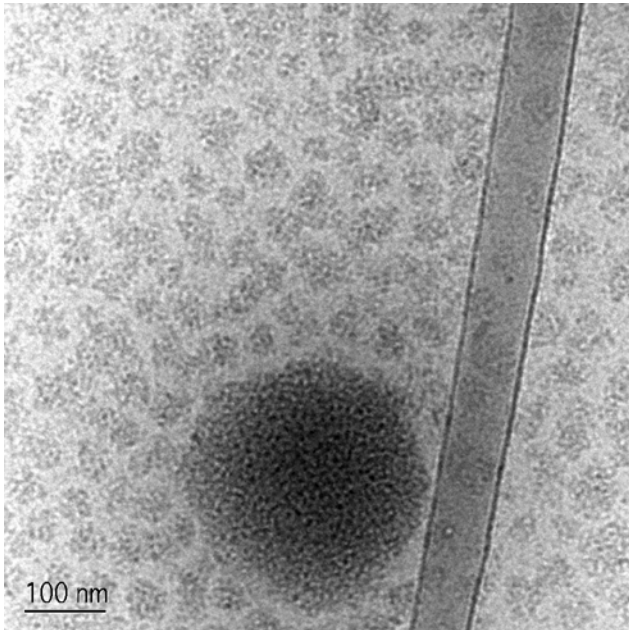
Figur 1. Varmebehandling af 5 g/L  $\beta$ -lactoglobulin ved 69 °C i 30 min og 69 °C i 45 min. Proteinaggregater er dannet, dog i moderat koncentration og mængde (~5 %) i forhold til hovedparten af molekylerne, der har molekylvægt svarende til nativt  $\beta$ -lactoglobulin. Aggregaterne er blevet karakteriseret ved at foretage statistisk lysspredning efter gelfiltreringskromatograf [fra Knudsen et al., 2008].



Figur 2. Olie i vand emulsion (60 % olie og 40 % vandfase med 5g/L protein) stabiliseret af  $\beta$ -lactoglobulin. Fedt og protein er farvet med fluorescerende prober og fremstår henholdsvis grønt og rødt [fra Knudsen et al., 2008].



Figur 3. Olie i vand emulsion (60 % olie og 40 % vandfase med 5g/L protein) stabiliseret af  $\beta$ -lactoglobulin. Viskositeten er plottet som funktion af omrøringshastigheden (shear rate). Viskositeten er vist for emulsioner stabiliseret af 5 g/L  $\beta$ -lactoglobulin varmebehandlet ved 69 °C i 45 min ( $\nabla$ ) eller 69 °C i 30 min ( $\square$ ) eller nativt  $\beta$ -lactoglobulin ( $\circ$ ). Moderat varmebehandling af  $\beta$ -lactoglobulin, forud for emulgering, øgede viskositeten af emulsionerne markant (200 gange) i forhold til viskositeten af emulsionerne stabiliseret af nativt  $\beta$ -lactoglobulin [fra Knudsen et al., 2008].



Figur 4. Cryo transmissions elektron mikroskopi foretaget 20 timer efter højtryksbehandling af skummetmælk på 300 MPa. Ved moderat høje tryk på omkring 300 MPa øges fraktionen af kasein miceller, der dissocierer til monomere kaseiner, og som efter endt trykbehandling aggregerer til små miceller. Men desuden adsorberer en fraktion af de monomere kaseiner til store kasein miceller, som er større end kasein micellerne i ubehandlet mælk [fra Knudsen og Skibsted, 2010].

---

**9. Underskrifter og dato** (suppleret med navn, titel og institution/virksomhed i blokbogstaver):

\_\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_