

# Afslutningsrapport

Enzymatisk betinget krydsbinding i mælkeproteiner

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-21

*November 1998*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond  
for projektet

## **Enzymatisk betinget krydsbinding i mælkeproteiner**

Merete Færgemand  
Karsten Bruun Qvist

Mejeri- og Levnedsmiddelinstittet,  
Mejeriområdet,  
Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole,  
Frederiksberg,  
1998.

## Enzymatisk betinget krydsbinding i mælkeproteiner

<b>Projektleder</b>	Professor Karsten B. Qvist Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet, KVL Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C
<b>Medarbejdere</b>	Cand. polyt. Merete Færgemand Laboratorietekniker Betina Schøler Laborant Christina D. Halslev

### Resumé

Vigtige funktionelle egenskaber af proteiner i levnedsmidler indbefatter f.eks. viskositet, geldannelse, vandbinding og emulgeringsegenskaber. I dette arbejde er det fundet, at enzymatisk krydsbinding med enzymet transglutaminase (TGase) påvirker alle de ovennævnte funktionelle egenskaber.

Valleproteiner, i valleprotein isolat (WPI) eller som oprenset  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG), blev ikke krydsbundet væsentligt i deres native tilstand. Hvis proteinerne blev udfoldet, enten kemisk (ved reduktion med dithiothreitol eller cystein) eller fysisk ved alkalisk pH, kunne WPI eller  $\beta$ -LG krydsbindes i høj grad og dette resulterede i geldannelse ved 8-10% protein, pH 7-7.5 og 40°C. Under disse reaktionsbetingelser dannede  $\beta$ -LG finstrengede, transparente geler. Anvendelsen af en  $\text{Ca}^{2+}$  uafhængig TGase var væsentlig for omfattende krydsbinding af  $\beta$ -LG, fordi tilstedeværelsen af kun 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  forsinkede dannelsen af covalente krydsbindinger, idet der dannedes ikke-covalente aggregater, sandsynligvis p.g.a. elektrostatiske interaktioner mellem  $\beta$ -LG og  $\text{Ca}^{2+}$ .

Anvendelsen af enhver af de tre oxidoreductaser peroxidase (POD), laccase eller monoaminoxidase (MAO) kunne inducere krydsbinding af proteinerne i nativt WPI. I modsætning til den TGase-katalyserede krydsbinding, var den oxidoreductase-katalyserede krydsbinding ikke omfattende og påvirkede derfor ikke viskositeten af WPI-opløsningerne i særlig høj grad. De tre oxidoreductaser adskilte sig fra hinanden med hensyn til specificitet over for de enkelte proteiner: Mens POD/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systemet især polymeriserede  $\beta$ -LG, polymeriserede laccase mest  $\alpha$ -lactalbumin, og MAO virkede på begge proteiner. Polymerisering kunne også induceres ikke-enzymatisk med hydrogen peroxid

alene i relativt høje koncentrationer. Den nødvendige dosis af hydrogen peroxid afhang af reaktionsblandingens pH.

Ved olie-vand grænseflader kunne  $\beta$ -LG krydsbindes med TGase uden kemisk udfoldning, hvilket kunne påvises med grænsefladeviskositets-målinger. Både grænseflade-viskositeten og -elasticiteten af både kaseinerne og  $\beta$ -LG øgedes signifikant ved krydsbinding. Kaseinernes grænsefladeviskositet steg ca. 100 gange, mens grænseflade-viskositeten af  $\beta$ -LG blev øget med ca. en faktor 10 i løbet af få timers krydsbinding. Forøgelsen af grænseflade-elasticiteten var mindre end af grænseflade-viskositeten. Det grænseflade-elastiske modul af en adsorberet kaseinat film øgedes omkring 5 gange, mens modulet af en  $\beta$ -LG film øgedes til ca. det dobbelte efter to timers krydsbinding.

Krydsbinding med TGase påvirkede i høj grad emulgeringsegenskaberne af mælke-proteinerne. Omfattende krydsbinding resulterede i mindre stabilitet mod sammenflydning eller flokkulering af både kaseinat- og  $\beta$ -LG-stabiliserede olie-i-vand emulsioner. Dette skyldtes sandsynligvis forringet fleksibilitet af de krydsbundne proteiner. I modsætning til dette blev det vist (med  $\beta$ -LG som emulgator), at mere begrænset krydsbinding øgede emulsionernes stabilitet mod sammenflydning eller flokkulering. Dette tyder på at der findes et optimalt niveau af krydsbinding for opnåelse af stabilitet. Derudover viste forsøg, at selv omfattende krydsbinding kunne øge emulsionernes stabilitet mod flødeafsætning, sandsynligvis p.g.a. ændringer i det adsorberede lag eller i viskositeten af den kontinuerte fase. Yderligere blev især kaseinat-stabiliserede emulsioners stabilitet i 50% ethanol væsentligt forøget efter krydsbinding.

## **Abstract**

Functional properties (of proteins) that are important to food quality include viscosity, gelation, water holding and emulsifying properties. In this study enzymatic cross-linking of milk proteins was found to influence all of the above functional properties of milk proteins.

Whey proteins, in whey protein isolate (WPI) or as purified  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG), were not cross-linked much in their native form. But when unfolded, by chemical reduction (with dithiothreitol or cysteine) or by physical unfolding at alkaline pH, WPI or purified  $\beta$ -LG was able to form gels when incubated with TGase at 8-10% protein, pH 7-7.5, and 40°C. Under these reaction conditions  $\beta$ -LG formed fine stranded translucent gels. It was found that application of a  $\text{Ca}^{2+}$  independent TGase

was essential for extensive cross-linking of  $\beta$ -LG, because the presence of just 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  limited the formation of covalent cross-links, due to the formation of non-covalent aggregates, probably induced by electrostatic interactions between  $\beta$ -LG and  $\text{Ca}^{2+}$ .

By application of any of the three oxidoreductases, peroxidase (POD), laccase or monoamine oxidase (MAO), cross-linking of native whey proteins in WPI could be induced. But as opposed to TGase catalysed cross-linking (of unfolded whey proteins), the oxidoreductase induced cross-linking was not extensive and therefore did not influence the viscosity of whey protein solutions to any great extent. The three oxidoreductases differed in polymerising effect on the individual whey proteins: Whereas POD with hydrogen peroxide mainly polymerised  $\beta$ -LG, laccase primarily acted on  $\alpha$ -lactalbumin and MAO worked on both proteins. Polymerisation could be induced non-enzymatically by the use of hydrogen peroxide alone, the necessary dose of hydrogen peroxide depending on the reaction pH.

At the oil-water interface TGase was able to cross-link  $\beta$ -LG without any chemical unfolding, as indicated by interfacial shear viscosity measurements. The interfacial shear viscosity and interfacial dilatational elasticity of both the caseins and of  $\beta$ -LG at the oil-water interface increased significantly after cross-linking. For the caseins the increase in interfacial shear viscosity was about two orders of magnitude, whereas for  $\beta$ -LG the increase was around 10-fold in a few hours. The increase in interfacial dilatational elasticity upon cross-linking was smaller than that in interfacial shear viscosity for both the caseins in sodium caseinate and for  $\beta$ -LG. The interfacial dilatational elastic modulus increased around 5 times for caseinate and around 2 times for  $\beta$ -LG after cross-linking for 2 hours compared to that of the untreated protein films.

Cross-linking of the milk proteins with TGase also strongly affected their emulsifying properties. At a rather extensive level of cross-linking, the stability towards coalescence or strong flocculation of both caseinate and  $\beta$ -LG stabilised oil-in-water emulsions decreased significantly, probably due to lost flexibility of the cross-linked proteins. As opposed to this it was shown, using  $\beta$ -LG as the emulsifier, that more limited cross-linking could improve the stability towards coalescence or strong flocculation of enzymatically cross-linked emulsions. Furthermore, extensive cross-linking of milk protein stabilised oil-in-water emulsions improved the creaming stability of the oil-in-water emulsions. Also the ethanol stability, especially of caseinate stabilised emulsions, was greatly improved after cross-linking.

Thus, TGase seems an interesting enzymatic tool for enhancing texture in milk protein based foods and for controlling the stability/instability of milk protein stabilised O/W emulsions.

## **Formål**

Det har været projektets formål at undersøge under hvilke betingelser mælkeproteiner kunne krydsbindes v.h.a. enzymatiske metoder samt hvilke ændringer i mælkeproteiners funktionelle egenskaber enzymatisk betinget krydsbinding giver anledning til.

## **Baggrund**

Industriel udnyttelse af enzymatisk modifikation af mælkeproteiner begrænser sig i dag til hydrolyse. Problemet med hydrolytisk modifikation er muligheden for udvikling af bitre peptider, som påvirker smagen i en uønsket sensorisk retning. Det vil derfor være ønskeligt med andre specifikke enzymatiske metoder til ændring af proteiners funktionalitet. Enzymatisk krydsbinding er en potentiel metode til ændring af proteiners funktionelle egenskaber uden dannelsen af bitre peptider.

Enzymatisk krydsbinding kan udføres med enzymet transglutaminase (EC 2.3.2.13) (TGase), som katalyserer dannelsen af covalente bindinger mellem peptid-bundet glutamin og peptid-bundet lysin. Fra vores egne resultater fra Føtek 1 projektet *Transglutaminase*, samt fra litteraturen, er det kendt at kaseinerne i vandig opløsning er gode substrater for krydsbinding med TGase og at krydsbinding kan medføre store ændringer i kaseinernes funktionelle egenskaber. Derimod tyder de få resultater, som findes i litteraturen på, at de globulære valleproteiner er dårlige substrater for TGase. Det blev derfor et væsentligt mål for projektet at undersøge under hvilke reaktionsbetingelser især valleproteinerne kunne krydsbindes samt hvilke ændringer i funktionelle egenskaber krydsbindingen ville medføre.

## **Resultater**

### **Reaktionsbetingelser for krydsbinding af valleproteiner med transglutaminase**

Vores forsøg på krydsbinding af valleproteinerne i valleprotein isolat (WPI) med en mikrobiel  $\text{Ca}^{2+}$  uafhængig TGase bekræftede forsøg udført med animalske TGase i at de native valleproteiner er dårlige substrater for TGase (Figur 1). Især  $\beta$ -lactoglobulin blev ikke krydsbundet, mens  $\alpha$ -lactalbumin blev krydsbundet i begrænset omfang. Den ringe reaktivitet af  $\beta$ -lactoglobulin med

TGase må tilskrives dels molekylets kompakte globulære form og dels beliggenheden af de, ifølge litteraturen, to reaktive glutamin rester (Gln155, Gln159) i c-terminalen, hvor tilstedeværelsen af disulfidbroen fra Cys106-Cys160 sandsynligvis sterisk forhindrer at krydsbinding kan finde sted.

Hvis disulfidbindingerne i  $\beta$ -lactoglobulin reduceres, f.eks. v.h.a. dithiothreitol (DTT), bliver  $\beta$ -lactoglobulin meget reaktivt med TGase. Figur 2 viser, hvordan mængden af nativt  $\beta$ -lactoglobulin aftager hurtigt som følge af krydsbinding, når proteinet inkuberes med TGase under tilstedeværelse af DTT. Efter 3 timers krydsbinding er ca. 90% af  $\beta$ -lactoglobulin krydsbundet. Samtidig ses en vækst i produkter af højere molvægt (polymerer) dannet ved intermolekylær krydsbinding af  $\beta$ -lactoglobulin molekyler. Den omfattende krydsbinding af  $\beta$ -lactoglobulin med TGase er ikke set tidligere ved anvendelsen af animalske TGase på reduceret  $\beta$ -lactoglobulin. Alle kendte animalske TGaser er afhængige af  $\text{Ca}^{2+}$  for at udvise krydsbindingsaktivitet, og adskiller sig altså på dette punkt fra den mikrobielle TGase, vi anvendte. Inkubering af  $\beta$ -lactoglobulin med mikrobiel TGase samt med eller uden  $\text{Ca}^{2+}$  tilstede viste, at krydsbindingen af  $\beta$ -lactoglobulin forsinkes betydeligt, når  $\text{Ca}^{2+}$  er tilstede. Turbiditetsmålinger og mikroskopi viste at tilstedeværelsen af  $\text{Ca}^{2+}$  inducerer dannelsen af ikke-covalente aggregater, sandsynligvis gennem elektrostatiske interaktioner mellem  $\text{Ca}^{2+}$  og det negativt ladede  $\beta$ -lactoglobulin. Dannelsen af disse aggregater påvirker åbenbart tilgængeligheden af reaktive sites i  $\beta$ -lactoglobulin for TGase. Så for at opnå en betydelig krydsbinding af reduceret  $\beta$ -lactoglobulin, er det nødvendigt at lade reaktionen foregå ved lavt  $\text{Ca}^{2+}$  niveau; vores forsøg viste at 5 mM var nok til at inhibere TGases aktivitet på  $\beta$ -lactoglobulin.

DTT er giftigt og derfor er reduktion af  $\beta$ -lactoglobulin med DTT ikke relevant for levnedsmidler. Vi har derfor undersøgt, hvordan  $\beta$ -lactoglobulin v.h.a. andre metoder kan udfoldes nok til at være reaktivt med TGase. En mulighed, vi fandt var at substituere DTT med et andet reduktionsmiddel, cystein, som i en koncentration på 40 mM var i stand til at reducere disulfidbindingerne i  $\beta$ -lactoglobulin nok til at krydsbinding kunne foregå. En anden mulighed er at lade krydsbindingen foregå ved alkalisk pH, idet  $\beta$ -lactoglobulin begynder at folde sig ud ved pH på over 8. Den anvendte TGase havde pH optimum ved pH 8. Ved pH 8 observerede vi ingen krydsbinding, når  $\beta$ -lactoglobulin blev inkuberet med TGase uden reduktionsmiddel. Ved pH 8.5 og 9.0 derimod blev  $\beta$ -lactoglobulin krydsbundet med TGase uden reduktionsmiddel (Figur 3). Således sker der tilsyneladende nok udfoldning af  $\beta$ -lactoglobulin ved pH over 8.5 til at molekylet kan krydsbindes med mikrobiel  $\text{Ca}^{2+}$  uafhængig TGase.

En anden måde proteiner kan udfoldes, er hvis de eksponeres til en olie-vand (eller luft-vand) grænseflade. Proteiner er overfladeaktive, dvs. de adsorberer spontant til grænsefladen og dette kan medføre udfoldning. Ved grænsefladeviskositets-målinger, som vi udførte ved University of Leeds, kunne vi vise at  $\beta$ -lactoglobulin krydsbindes ved en olie-vand grænseflade ved pH 7.0 uden reduktionsmiddel. Figur 4 viser, hvordan grænsefladeviskositeten af en adsorberet  $\beta$ -lactoglobulin film kan øges mere end 5 gange ved krydsbinding med mikrobiel TGase. Dette viser, at  $\beta$ -lactoglobulin udfoldes nok ved grænsefladen til at eksponere sine reaktive glutamin- og lysin-rester til TGase.

### **Polymerisering af valleproteiner med oxidoreductaser**

Idet det fra starten af projektet var klart at native valleproteiner er dårlige substrater for TGase, indgik det i projektet at undersøge om andre enzymer var i stand til at inducere krydsbinding og polymerisering af valleproteinerne. Oxidation af proteiner har været anført som en metode til at inducere polymerisering af proteiner; f.eks. er der påvist en polymeriserende effekt af oxidoreductasen peroxidase på visse proteiner. Enzymatisk oxidation er en mindre specifik metode til krydsbinding af proteiner end TGase katalyseret, idet adskillige aminosyrer kan påvirkes af oxidation; f.eks. tyrosin, tryptophan og cystein. Polymerisering er ikke den primære reaktion for oxidoreductaser på proteiner – de primære produkter af oxidation er f.eks. reaktive quinoner (oxideret tyrosin) eller aldehyder (dannet ved oxidative deamidering af lysin). Disse primære oxidationsprodukter er højreaktive og kan reagere videre med hinanden eller angribe andre aminosyrerester.

Inkubering af WPI med en mikrobiel peroxidase og  $H_2O_2$  resulterede i dannelse af polymerer (Figur 5), hvilket blev påvist med SE-FPLC. Vi fandt at en vis koncentration af  $H_2O_2$  var nødvendig for at enzymet kunne fungere; vi fandt ingen polymerisering ved en lavere koncentration end 50 mM. Dette er kvalitativt i overensstemmelse med enzymets specificitet, idet peroxidase er specifikt for  $H_2O_2$  som hydrogen acceptor i oxidationsprocessen. Ved høje koncentrationer af  $H_2O_2$  blev oxidationen overvejende ikke-enzymatisk, og enzymet var tilsyneladende mindre aktivt. Det samme var tilfældet ved højere pH end 7.0. Ved pH 8.0 fandt nogen ikke-enzymatisk aggregering sted, sandsynligvis fordi  $\beta$ -lactoglobulin delvist udfoldes ved alkalisk pH. Det er interessant at især  $\beta$ -lactoglobulin blev oxideret af peroxidase/ $H_2O_2$ , mens  $\alpha$ -lactalbumin tilsyneladende ikke blev påvirket.



En anden oxidoreductase, der blev undersøgt for polymeriserings-aktivitet på WPI var laccase. Laccase er specifik for diphenoler, og det er derfor nødvendigt at tilsætte en lavmolekylær diphenol (i vores tilfælde chlorogensyre, som findes i f.eks. solsikker) for at initiere polymeriseringsreaktionerne. Figur 6 viser at WPI, under tilstedeværelsen af chlorogensyre, kunne polymeriseres i nogen grad af laccase. Chromatogrammet i Figur 6H viser at der blev dannet en bred fordeling af oligo/polymerer af chlorogensyre og oligo/polymerer af især  $\alpha$ -lactalbumin, mens  $\beta$ -lactoglobulin tilsyneladende ikke blev oxideret væsentligt af laccase.

Det er væsentligt at nævne at ingen af de oxidoreductaser, der blev testet i projektet, var i stand til – ved oxidation af WPI - at danne polymerer med ligeså høj molekylvægt, som de, der blev dannet ved TGase katalyseret krydsbinding af udfoldet valleprotein.

## **Funktionelle egenskaber**

### **Geldannelse**

Geldannelsen af valleproteiner med TGase blev undersøgt. Ved inkubering af WPI med TGase kunne geldannelse observeres ved 8-10% protein efter 1-2 timers reaktionstid ved 40°C. Geldannelsen af  $\beta$ -lactoglobulin blev fulgt v.h.a. viskometri (Figur 7). Efter tilsætning af TGase til en opløsning af reduceret  $\beta$ -lactoglobulin kunne en jævnt stigende viskositet måles. Efter ca. 100 min reaktion sås en kraftig stigning i viskositeten, hvilket indikerede at geldannelse fandt sted. I overensstemmelse med den langsommere krydsbinding af  $\beta$ -lactoglobulin under tilstedeværelse af  $\text{Ca}^{2+}$ , steg viskositeten langsommere, når  $\text{Ca}^{2+}$  var tilstede, og den dannede gel var svagere end uden  $\text{Ca}^{2+}$ . Undersøgelser af mikrostrukturen af gelerne viste, at uden  $\text{Ca}^{2+}$  dannedes en finstrenget gel, mens  $\text{Ca}^{2+}$  inducerede dannelsen af ikke covalente aggregater, således at den dannede gel blev en aggregat-type gel.

Det blev også forsøgt at inducere geldannelse med de forskellige oxidoreductaser, som blev afprøvet i projektet. Selvom substrat protein koncentrationen i WPI opløsninger blev øget til 20%, sås ingen geldannelse under anvendelse af oxidoreductaserne. Selv på viskositeten efter 24 timers inkubering af 5% WPI med oxidoreductaser, sås kun en ringe effekt; faktisk gav kun peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systemet en signifikant effekt, som dog på ingen måde var at sammenligne med geldannelsesevnen af TGase på udfoldet WPI. Den ringe effekt af oxidoreductaserne på

viskositet/geldannelse af WPI, skyldes sandsynligvis at der ved enzymatisk oxidation tilsyneladende ikke dannes så højmolekylære polymerer, som med TGase.

### **Grænseflade egenskaber**

Proteiner er grænseflade aktive, og deres evne til at stabilisere emulsioner udnyttes i mange levnedsmidler, i særdeleshed mejeriprodukter. De reologiske egenskaber af en adsorberet protein film anses for væsentlige for stabilisering af emulsioner med det pågældende protein. Vi har karakteriseret de grænseflade reologiske egenskaber af mælkeproteiner krydsbundet med TGase. Som allerede vist resulterer inkubering af  $\beta$ -lactoglobulin ved en olie-vand grænseflade i signifikant øget grænseflade viskositet af den adsorberede film. Også kaseinerne kan krydsbindes effektivt ved en olie-vand grænseflade. Grænseflade viskositeten af Na-kaseinat er meget lav i forhold til grænseflade viskositeten af globulære proteiner; vi målte den til at være ca.  $4 \text{ mN}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$  ved  $40^\circ\text{C}$ . Ved krydsbinding med TGase øges grænseflade viskositeten af kaseinat mere end 100 gange (Figur 8). Hastigheden af grænseflade viskositets stigningen og det ”endelige” niveau for grænseflade viskositeten efter krydsbinding afhang af enzym doseringen. Ved moderat til høje enzym doseringer sås et karakteristisk forløb af grænseflade viskositeten som funktion af krydsbindingstid: mens der sås en meget hurtigt stigning i grænseflade viskositeten, sås der også et efterfølgende fald, hvorefter grænseflade viskositeten stabiliserede sig på et vist niveau (Figur 8). En mulig forklaring på dette er, at der meget hurtigt dannes et meget krydsbundet netværk i den adsorberede film, som derfor bliver sprød og knækker. Dette brud i filmen medfører et fald i grænseflade viskositeten. Den langsomme efterfølgende opbygning/stabilisering af viskositeten, kan skyldes at nyt kaseinat fra den vandige fase adsorberes og/eller at filmen igen krydsbindes.

Supplerende grænseflade elasticitets målinger viste, at også elasticiteten af både  $\beta$ -lactoglobulin og kaseinat film øges signifikant efter krydsbinding.

### **Emulsionsstabilitet**

Stabiliteten af protein stabiliserede olie-i-vand emulsioner, især mod sammenflydning, afhænger af egenskaberne af det adsorberede protein lag – i særdeleshed de reologiske egenskaber. Vi undersøgte stabiliteten af emulsioner med krydsbundet kaseinat eller  $\beta$ -lactoglobulin i emulsioner, hvor proteinet enten blev krydsbundet før eller efter emulgering. Når kaseinat blev krydsbundet i vandig opløsning før homogenisering med 20% olie, viste dråbestørrelses-målinger at dets emulgeringsevne blev forringet, effekten sås dog kun ved lave protein koncentrationer (under 1%).

Også stabiliteten mod sammenflydning eller flokkulering, ved lave protein koncentrationer, blev forringet i forhold til stabiliteten af emulsioner med ikke-krydsbundet kaseinat. For  $\beta$ -lactoglobulin var der ingen væsentlig effekt af krydsbinding før emulgering, idet proteinet formodentligt ikke blev krydsbundet væsentligt (forsøgene blev udført uden reduktionsmiddel). Når proteinerne blev krydsbundet efter emulgering, var der en effekt af krydsbinding for både kaseinat og  $\beta$ -lactoglobulin. Figur 9 viser at krydsbinding forringede stabiliteten af både kaseinat- og  $\beta$ -lactoglobulin stabiliserede emulsioner ved lave protein koncentrationer. Den forringede stabilitet af emulsioner med krydsbundet protein var lidt overraskende i forhold til den store effekt af krydsbinding på de grænseflade reologiske egenskaber. Det er dog muligt at proteinerne efter den omfattende krydsbinding, de har været udsat for (2 timer) er blevet så ufleksible, at de ikke længere kan beskytte grænsefladen under de fluktuationer, der forekommer p.g.a. Brownske bevægelser. For at teste om mindre krydsbinding ville give bedre stabilitet udførte vi forsøg med  $\beta$ -lactoglobulin som emulgator, hvor TGase katalyseret krydsbinding kun fandt sted i 15 hhv. 60 min, hvorefter enzymet blev inhiberet med  $\text{NH}_4\text{Cl}$  og stabiliteten sammenlignet med de ikke-krydsbundne emulsioners. Figur 10 viser at stabiliteten af de begrænset-krydsbundne emulsioner var bedre end stabiliteten af de ikke-krydsbundne emulsioner. Vi må således slutte at begrænset krydsbinding kan øge stabiliteten af mælkeprotein stabiliserede olie-i-vand emulsioner mod sammenflydning/flokkulering, mens omfattende krydsbinding forringer stabiliteten, sandsynligvis p.g.a. brud i grænseflade filmen ved høj krydsbindingsgrad (som de grænseflade reologiske målinger indikerede) eller simpelthen fordi proteinerne bliver for ufleksible.

En anden stabilitet, der blev undersøgt, var stabilitet mod flødeafsætning. Resultaterne fra disse forsøg viste, at selv når emulsionerne blev krydsbundet i høj grad, medførte det bedre stabilitet mod flødeafsætning. En mulighed forklaring på den bedre stabilitet mod flødeafsætning er at viskositeten af den kontinuerte fase muligvis øges. En anden mulighed er at der bliver krydsbundet mere protein til de enkelte dråbeoverflader, hvilket vil mindske massefylde forskellen mellem den disperse og kontinuerte fase; dette vil reducere flødeafsætningen.

Den sidste type stabilitet, vi undersøgte for emulsionerne, var stabiliteten i ethanol. Denne kan være af betydning for stabiliteten af creme likører. Uden krydsbinding var især de Na-kaseinat stabiliserede emulsioner meget ustabile i 50% ethanol. Krydsbinding øgede i høj grad stabiliteten af både kaseinat- og  $\beta$ -lactoglobulin stabiliserede olie-i-vand emulsioner i ethanol (Figur 11). Sandsynligvis fordi det mere elastiske grænseflade lag, efter krydsbinding, øger modstanden mod transport af olie ud af de enkelte olie dråber.

## Konklusion

Projektet har vist at enzymatisk krydsbinding af både kaseiner og valleproteiner ændrer deres funktionelle egenskaber væsentligt.

Valleproteiner krydsbindes ikke signifikant af TGase i deres native form. Men efter (delvis) udfoldning, hvilket især er absolut påkrævet for  $\beta$ -lactoglobulin, er valleproteinerne gode substrater for TGase. V.h.a. en mikrobiel  $\text{Ca}^{2+}$  uafhængig TGase var vi i stand til at krydsbinde ca. 90% af  $\beta$ -lactoglobulin (i en 8% protein opløsning) efter 3 timers inkubering ved 40°C. Krydsbindingen resulterede i dannelsen af højmolekylære proteinpolymerer. Den omfattende polymerisering af  $\beta$ -lactoglobulin medførte viskositetsforøgelse og geldannelse ved en protein koncentration på 8%. Udfoldning af valleproteinerne kunne foretages på flere måder; kemisk v.h.a DTT eller cystein, eller fysisk ved at lade krydsbindingen foregå ved alkalisk pH eller ved en olie-vand grænseflade.

Valleproteinerne i WPI kunne også polymeriseres ved enzymatisk oxidation via anvendelsen af forskellige oxidoreductaser. En mikrobiel peroxidase (med  $\text{H}_2\text{O}_2$  som hydrogen acceptor i oxidationsprocessen) inducerede især polymerisering af  $\beta$ -lactoglobulin, mens  $\alpha$ -lactalbumin tilsyneladende ikke var reaktiv med peroxidase. Enzymet laccase inducerede specielt krydsbinding af  $\alpha$ -lactalbumin, men kun under tilstedeværelse af en lavmolekylær diphenol-donor.  $\beta$ -lactoglobulin var åbenbart ikke reaktivt med laccase. Oxidoreductasen monoaminoxidase kunne inducere delvis krydsbinding af både  $\beta$ -lactoglobulin og  $\alpha$ -lactalbumin. Fælles for alle de testede oxidoreductaser var, at de krydsbindingsprodukter, der dannedes ved enzymatisk oxidation var mindre end de højmolekylære produkter, der dannedes ved TGase katalyseret krydsbinding af udfoldede valleproteiner. Dette resulterede i en langt mindre effekt af enzymatisk oxidation, end af krydsbinding med TGase, på viskositet og geldannelse.

De grænsefladereologiske egenskaber af både kaseiner/kaseinat og  $\beta$ -lactoglobulin ændredes signifikant ved TGase katalyseret krydsbinding. Ved en olie-vand grænseflade kunne  $\beta$ -lactoglobulin krydsbindes uden brug af reduktionsmiddel, og denne krydsbinding resulterede i en 5-gange forøgelse af grænseflade viskositeten. Krydsbinding af kaseinat ved en olie-vand grænseflade resulterede i en over 100-ganges forøgelse af grænseflade viskositeten, hvilket indikerede at kaseinerne – også ved en grænseflade – krydsbindes i høj grad. Kompressions/ekspansionsmålinger på grænseflader viste at også elasticiteten af både kaseinat og  $\beta$ -lactoglobulin blev signifikant øget efter krydsbinding.

Lagrings-stabiliteten af mælkeprotein stabiliserede olie-i-vand emulsioner blev også påvirket af krydsbinding. Omfattende krydsbinding medførte ringere stabilitet af dråbestørrelsen i emulsioner, mens begrænset krydsbinding medførte bedre stabilitet af  $\beta$ -lactoglobulin stabiliserede emulsioner ved lave protein koncentrationer. Ved høje protein koncentrationer (1% for kaseinat, 3-5% for  $\beta$ -lactoglobulin) ændrede krydsbinding ikke dråbestørrelses-stabiliteten af de mælkeprotein stabiliserede emulsioner. Effekten af krydsbinding på emulsionernes sammenflydnings- eller flokkulerings-stabilitet kunne sammenkædes med effekten af krydsbinding på de grænseflade-reologiske egenskaber. Mens begrænset krydsbinding gav anledning til kraftig forøget grænseflade viskositet, gav mere omfattende krydsbinding anledning til et efterfølgende fald i grænsefladeviskositeten, som sandsynligvis skyldes at protein filmen bliver brudt. Brud på grænseflade filmen medfører sandsynligvis dårligere emulsionsstabilitet.

Flødeafsætning blev, ved både høje og lave proteinkoncentrationer, forsinket efter krydsbinding, både for kaseinat- og  $\beta$ -lactoglobulin stabiliserede olie-i-vand emulsioner. Desuden blev emulsionernes ethanol følsomhed reduceret efter krydsbinding, idet dråbestørrelsen ikke ændredes så hurtigt i krydsbundne emulsioner, som i de ikke-krydsbundne emulsioner, i 50% ethanol.

Projektet har således vist at enzymatisk krydsbinding med TGase har potentiale som en metode til at ændre struktur og tekstur af mælkeprotein baserede produkter. Yderligere indikerer resultaterne at enzymatisk krydsbinding kan anvendes til at kontrollere stabilitet/instabilitet af mælkeprotein stabiliserede olie-i-vand emulsioner.

## Publikationer

### I internationale tidsskrifter med referee

- Færgemand, M.; Otte, J. and Qvist, K.B. (1998) Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase, *International Dairy Journal* (In press).
- Færgemand, M.; Murray, B.S.; Dickinson, E. and Qvist, K.B. (1998) Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase, *International Dairy Journal* (In press).
- Færgemand, M. and Murray, BS (1998) Interfacial dilatation properties of milk proteins cross-linked by transglutaminase, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 884-890.
- Færgemand, M.; Otte, J. and Qvist, K.B. (1998) Cross-linking of whey proteins by enzymatic oxidation, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1326-1333.
- Færgemand, M.; Murray, B.S. and Dickinson, E. (1997) Cross-linking of milk proteins with transglutaminase at the oil-water interface, *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2514-2519.
- Færgemand, M.; Otte, J. and Qvist, K.B. (1997) Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca<sup>2+</sup>-independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*, *Food Hydrocolloids* **11**, 19-25.
- Færgemand, M. and Qvist, K.B. (1997) Transglutaminase: Effect on Rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel, *Food Hydrocolloids* **11**, 287-292.

### Foredrag ved internationale kongresser/konferencer

- Færgemand, M. and Qvist, K.B. (1998) Functional properties of enzymatically cross-linked milk proteins - Cross-linking of  $\beta$ -lactoglobulin, Structure and Functionality of food Products, Mragowo, Poland, 18-20. May 1998.
- Murray, B.S.; Færgemand, M; Trottereau, M. and Ventura, A. (1998) Comparison of the dynamic behaviour of protein films at the air-water and oil-water interfaces, Food Emulsions and Foams, Sevilla, Spain, 16-18. March 1998.
- Færgemand, M.; Murray, B.S. and Dickinson, E. (1997) Cross-linking of adsorbed casein films by transglutaminase, Hannah Symposium Casein and Caseinates - Structures, Interactions, Networks. Ayr, Scotland, 21-23. May 1997.

- *Færgemand, M.* (1996) Enzymatic cross-linking of whey proteins by a  $\text{Ca}^{2+}$  independent transglutaminase, Milk Proteins - Structure and Functional Properties, Lund, Sweden, 11-12. Nov. 1996.
- *Færgemand, M.* (1996) Functional properties of enzymatically cross-linked acid skim milk gels, Milk Proteins - Structure and Function. Wadahl, Norway, 6-8 March 1996.
- *Færgemand, M.* (1996) Effekt af krydsbinding med transglutaminase på funktionelle egenskaber af syrnede mælkegeler, LMC congress, Lyngby, Danmark, 24-25. Jan. 1996.
- *Færgemand, M. and Qvist, K.B.* (1995) Transglutaminase: Effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel, Symposium on Industrial Proteins: Modifications for new Applications, Noordwijkerhout, Holland, 4-5. Dec. 1995.

#### **Posters ved internationale kongresser/konferencer**

- *Færgemand, M. and Qvist, K.B.* (1998) Emulsifying properties of enzymatically cross-linked  $\beta$ -lactoglobulin, IDF Congress, Århus, Denmark, 21-23. Sept. 1998.
- *Færgemand, M. and Qvist, K.B.* (1998) Emulsifying properties of enzymatically cross-linked milk proteins, Food Emulsions and Foams, Sevilla, Spain, 16-18. March 1998.
- *Færgemand, M. and Qvist, K.B.* (1997) Rheological and Structural properties of enzymatically cross-linked emulsion gels, 1<sup>st</sup> International Symposium on Food Rheology and Structure, Zürich. 16-18. March 1997.
- *Færgemand, M. og Qvist, K.B.* (1996) Transglutaminase: Effect on Rheological Properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel, Danish Biotechnology Conference, Vejle, Denmark, 23-24 May 1996.
- *Færgemand, M., Otte, J.O. og Qvist, K.B.* (1996) Enzymatic cross-linking of whey proteins by a  $\text{Ca}^{2+}$  independent microbial transglutaminase, Food Colloids - proteins, lipids and polysaccharides, Ystad, Sweden, 24-26 April 1996.

#### **Andre foredrag**

- *Færgemand, M.* (1996) Enzymatic Cross-linking of Food Proteins, foredrag ved LEVS møde "Food Proteins the many possibilities", Århus, Denmark, 14. November 1996.

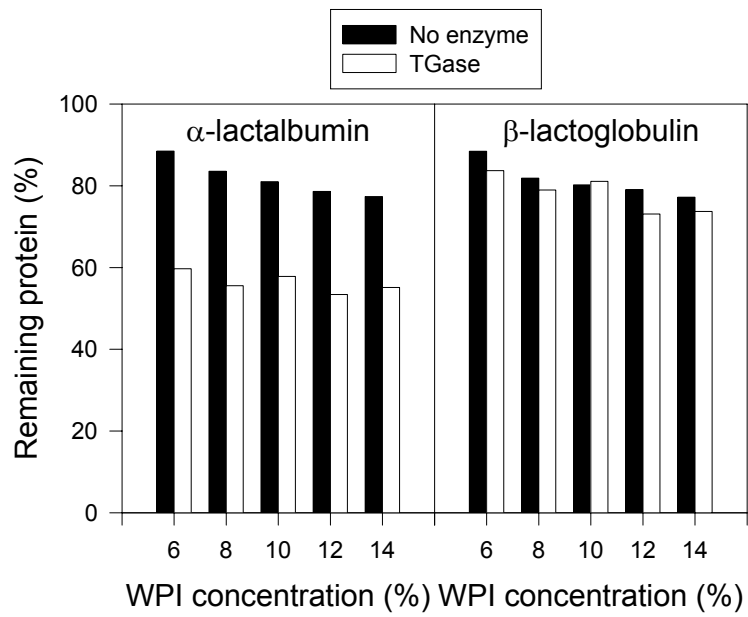
### **Projekt opgaver udført under projektet**

- Ulla Jørgensen & Mette V. Sørensen (1997) Transglutaminase behandlet skæreyoghurt, bachelor projekt.

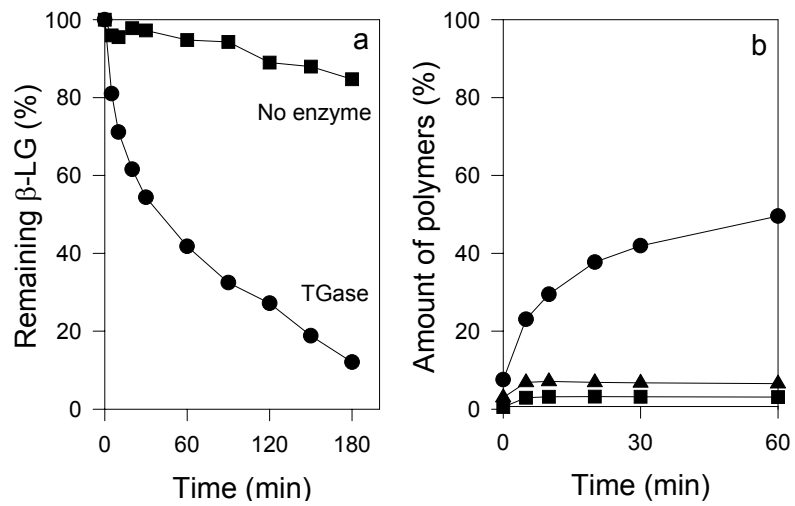
### **Ph.D. afhandling**

- Færgemand, M. (1998) Enzymatic cross-linking of milk proteins – effect on functional properties.

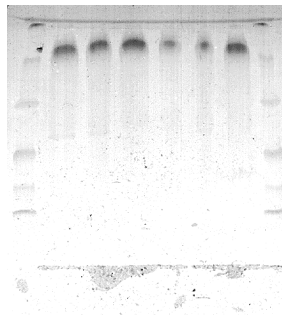




**Figur 1.** Resterende  $\alpha$ -lactalbumin og  $\beta$ -lactoglobulin, i forhold til de oprindelige mængder, efter inkubering af WPI opløsninger med eller uden 30 U/g TGase ved pH 7.0 og 40°C i 60 min. Målt v.h.a. SE-HPLC under ikke-reducerende forhold.

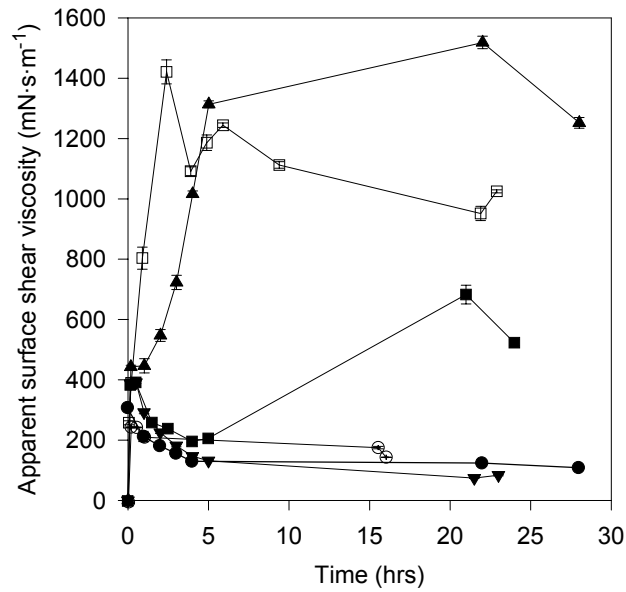


**Figur 2.** (a) Resterende  $\beta$ -lactoglobulin (procent i forhold til den oprindelige koncentration) efter inkubering af en 8%  $\beta$ -lactoglobulin opløsning med (●) eller uden (■) 10U/g TGase ved 40°C og pH 7.5 med 20 mM DTT. (b) Dannelse af polymer produkter ● Produkter med en gennemsnitlig masse ( $M_w$ ) på 54 kDa, ■  $M_w \approx 104$  kDa, ▲  $M_w \approx 310$  kDa.  $M_w$  blev estimeret fra standardkurver.

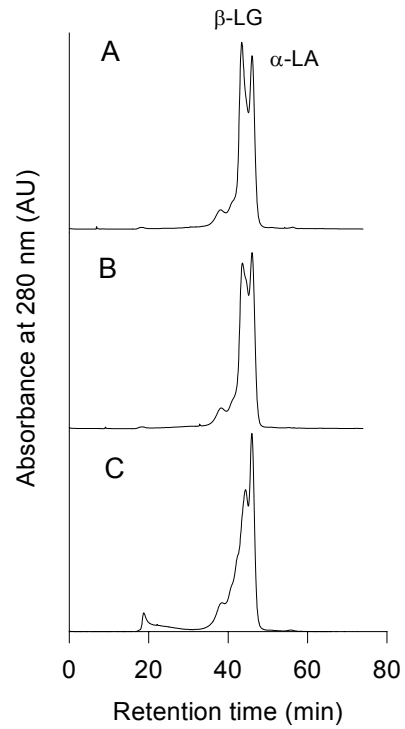


1 2 3 4 5 6 7 8

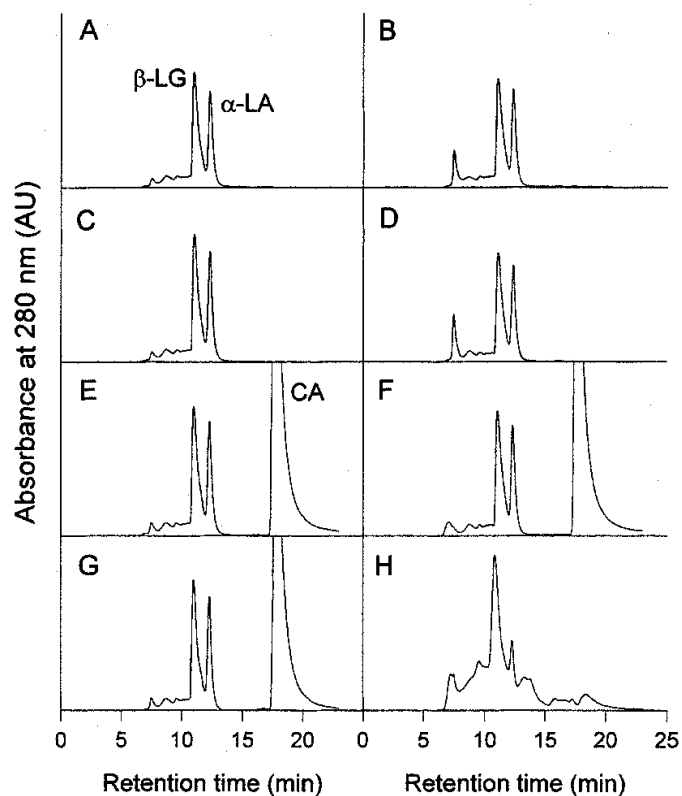
**Figur 3.** SDS-PAGE gels af en 8%  $\beta$ -lactoglobulin opløsning inkuberet ved 40°C med eller uden 10U/g TGase uden reduktionsmiddel i 240 min ved forskellige pH værdier. Bane 1 og 8 er  $M_w$ -standarder; fra toppen:  $\alpha$ -lactalbumin (14.400 Da), soybean trypsin inhibitor (20.100 Da), carbonic anhydrase (30.000 Da), ovalbumin (43.000 Da), bovine serum albumin (67.000 Da), phosphorylase b (94.000 Da). Bane 2. 0 min med TGase ved pH 8.0. Bane 3. 240 min med TGase ved pH 8.0. Bane 4. 240 min inkubering uden enzym ved pH 8.0. Bane 5. 240 min med TGase ved pH 8.5. Bane 6. 240 min med TGase ved pH 9.0. Bane 7. 240 min inkubering uden enzym ved pH 9.0.



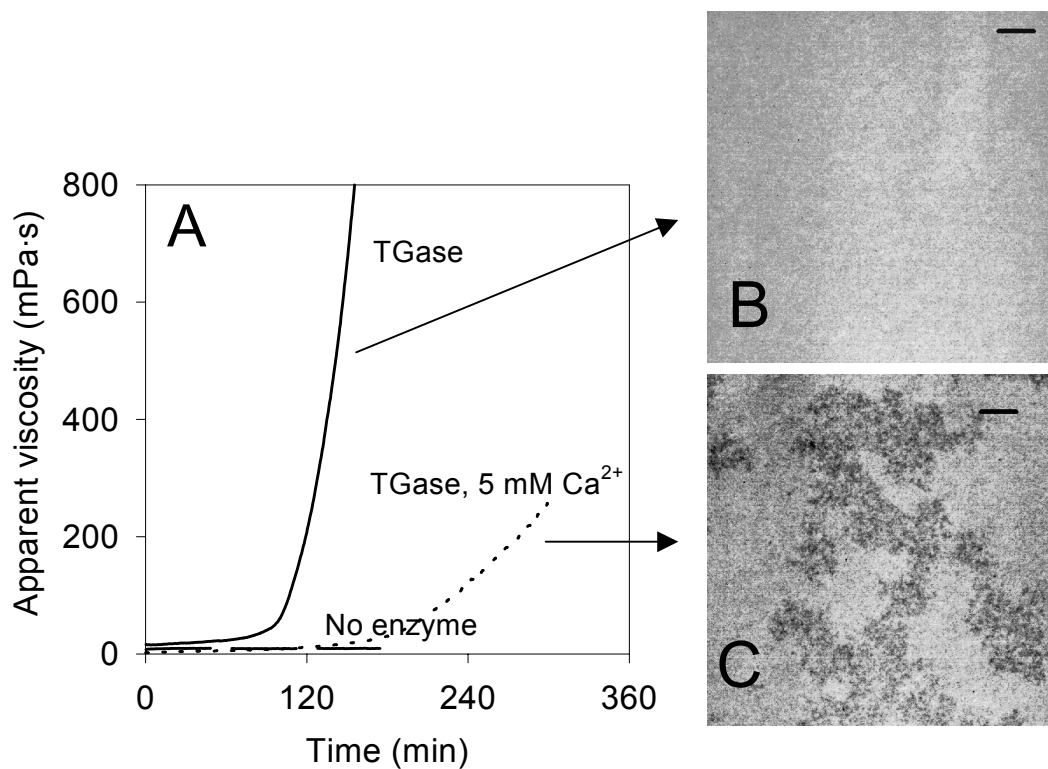
**Figur 4.** . Indflydelse af krydsbinding med TGase på grænseflade viskositeten (målt ved  $0.0013 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) af en adsorberet  $\beta$ -lactoglobulin film ved en *n*-tetradecane-vand grænseflade ( $10^{-3} \%$  protein, pH 7,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ved forskellige enzymer doser: ○ Uden enzym ; ▼ 0.2 U/g; ■ 2 U/g; ▲ 20 U/g; □ 200 U/g; ● Inaktiveret TGase (20 U/g).



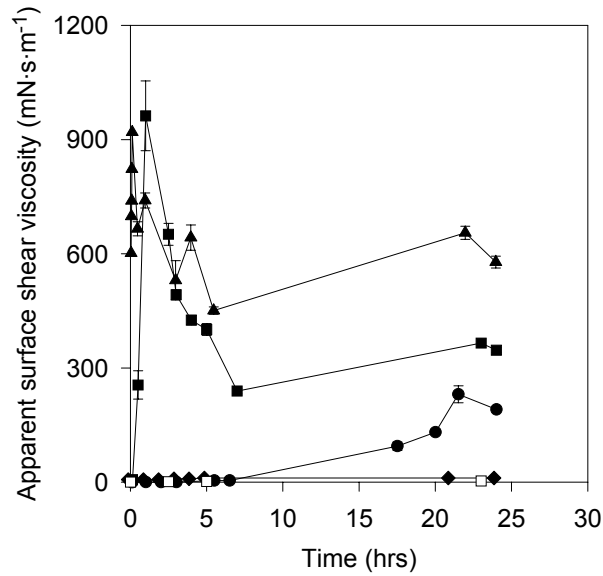
**Figur 5.** SE-FPLC af 10% WPI opløsninger i Tris buffer ved pH 7.0 og 40°C med 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Efter 0 min med 0.002% mikrobiel peroxidase. (B) Efter 24 timer uden mikrobiel peroxidase. (C) Efter 24 timer med 0.002% mikrobiel peroxidase. Placeringen af toppene for  $\beta$ -lactoglobulin og  $\alpha$ -lactalbumin er indikeret.



**Figur 6.** SE-HPLC af 10% WPI opløsninger i Tris buffer ved pH 7.0 og 40°C. (A) Efter 0 min. (B) Efter 24 hrs. (C) Efter 0 min med 0.004% laccase. (D) Efter 24 timer med 0.004% laccase. (E) Efter 0 min med 25 mM chlorogensyre. (F) Efter 24 timer med 25 mM chlorogensyre. (G) Efter 0 min med 0.004% laccase og 25 mM chlorogensyre. (H) Efter 24 timer med 0.004% laccase og 25 mM chlorogensyre. Placeringen af toppene for  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin og chlorogensyre (CA) er indikeret.

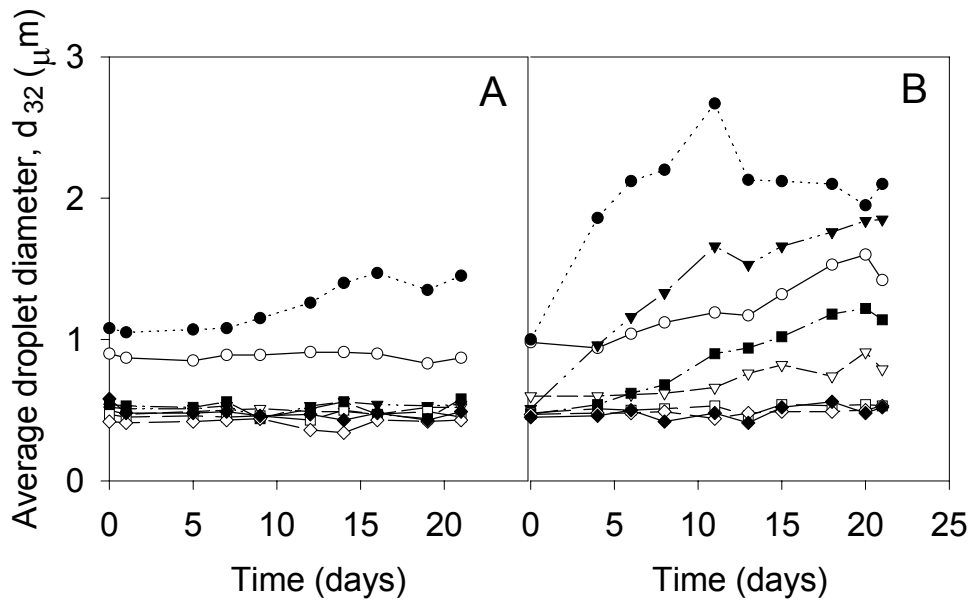


**Figur 7.** A. Tilsyneladende viskositet ved  $36.1 \text{ s}^{-1}$  af 8%  $\beta$ -lactoglobulin opløsninger (Tris buffer, pH 7.5, 20 mM DTT,  $40^\circ\text{C}$ ) inkuberet med eller uden 10 U/g TGase samt med eller uden 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . B. Mikrostruktur af 8%  $\beta$ -lactoglobulin gel efter 240 minutters inkubering med 10 U/g TGase uden  $\text{Ca}^{2+}$ . C. Mikrostruktur af 8%  $\beta$ -lactoglobulin gel efter 240 minutters inkubering med 10 U/g TGase under tilstedeværelse af 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Billederne er taget med transmissions elektron mikroskopi. Målestokken er 500 nm.

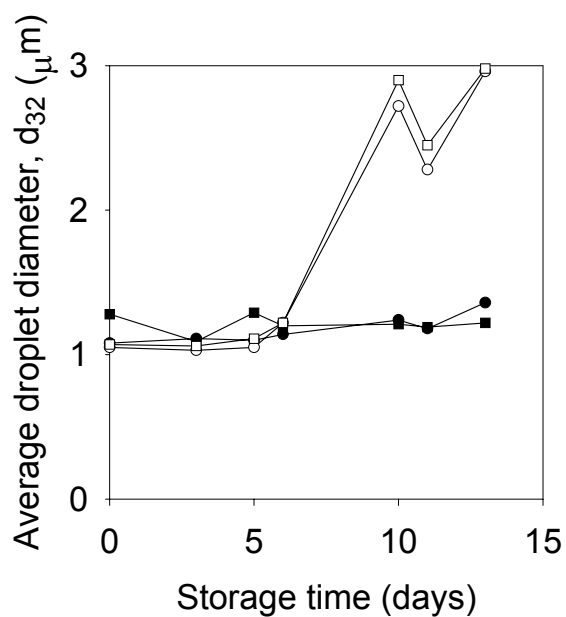


**Figur 8.** Indflydelse af TGase på grænseflade viskositeten af adsorberede Na-kaseinat film (protein koncentration, i opløsning,  $10^{-3}$  %, pH 7, 40 °C). Den tilsyneladende grænsefladeviskositet ved 0.0013 rad/s er plottet mod tiden ved forskellige enzym doser: □ Uden enzym; ◆ 0.2 U/g; ● 2 U/g; ■ 20 U/g; ▲ 200 U/g. Standard afvigelsen på fem på hinanden følgende aflæsninger er angivet for hvert målepunkt.





**Figur 9.** Gennemsnitlig dråbediameter som funktion af lagringstid af olie-i-vand emulsioner, som blev krydsbundet i 2 timer ved 40°C med 10 U/g TGase efter emulgering. (A) Na kaseinat stabiliserede emulsioner. (B)  $\beta$ -lactoglobulin stabiliserede emulsioner. Lukkede symboler: Krydsbundet protein; åbne symboler: Ikke-krydsbundet protein. Protein koncentration: ● 0.2%, ▼ 0.5%, ■ 1.0%, ◆ 3.0%.



**Figur 10.** Gennemsnitlig dråbediameter som funktion af lagringstid af olie-i-vand emulsioner stabiliseret med 0.2%  $\beta$ -lactoglobulin krydsbundet (eller ikke krydsbundet) efter emulgering med 10 U/g TGase ved 40°C. ● Krydsbundet i 15 min, ○ Emulsion uden TGase, inkuberet ved 40°C i 15 min, ■ Krydsbundet i 60 min, □ Emulsion uden TGase, inkuberet ved 40°C i 60 min.

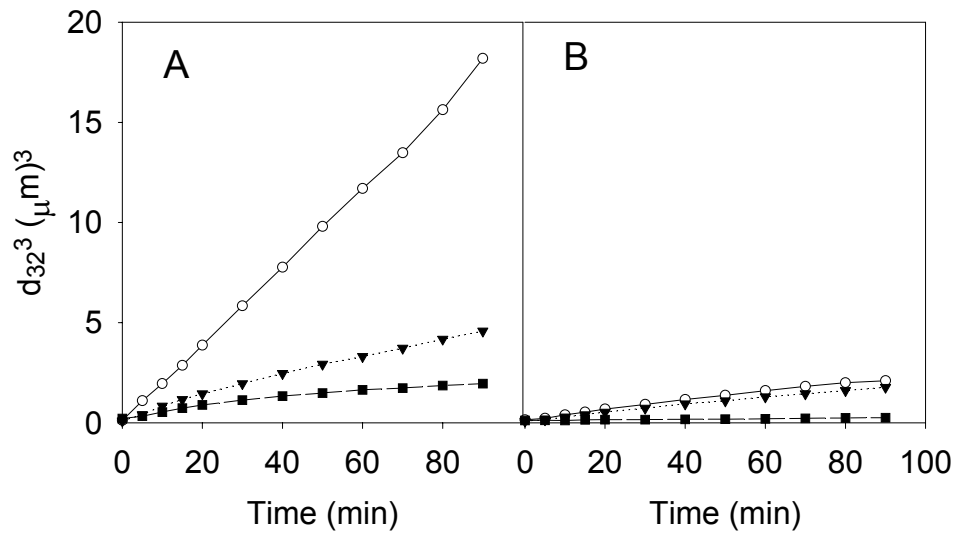
**Tabel I:** Flødeafsætning i 20% olie-i-vand emulsioner stabiliseret med forskellige koncentrationer krydsbundet (2 timer, 40°C, 10 U/g TGase, efter emulgering) eller ikke-krydsbundet protein. Tabellen viser tiden til dannelse af et 2 mm flødelag. Flødeafsætningen blev observeret visuelt i 3 uger. >21 indikerer at emulsionen ikke afsatte noget fløde i forsøgsperioden.

---

**Time (days) for formation of a 2 mm cream layer**

Protein concentration (wt-%)	Caseinate stabilized emulsions		$\beta$ -LG stabilized emulsions	
	<i>Cross-linked Native</i>		<i>Cross-linked Native</i>	
0.2	4	1	4	2
0.5	5	3	4	4
1.0	11	5	11	4
3.0	13	13	12	8
5.0	>21	>21	18	11

---



**Figur 11.** Ostwald ripening/aggregering af olie-i-vand emulsioner, stabiliseret med 1% protein, i 50% ethanol. Den gennemsnitlige dråbestørrelses udvikling over tid (A) Na kaseinat stabiliserede emulsioner. (B)  $\beta$ -lactoglobulin stabiliserede emulsioner.  $\circ$  Emulsioner med ikke-krydsbundet protein,  $\blacktriangledown$  Emulsioner med protein, som er krydsbundet med 10 U/g TGase i 2 timer ved 40°C før emulgering,  $\blacksquare$  Emulsioner krydsbundet med 10 U/g TGase i 2 timer ved 40°C efter emulgering.

