



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och  
jordbruksvetenskap  
Institutionen för livsmedelsvetenskap

## **Proteinsammansättning i mjölk med lång hållbarhet (UHT-behandlad mjölk)**

Protein composition in milk with extended shelf-life (ultra-high temperature treated milk)

*Johanna Frick*

Institutionen för livsmedelsvetenskap

Självständigt arbete i biologi- kandidatarbete, 15 hp, G2E

Agronomprogrammet - livsmedel

Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap, nr 443  
Uppsala, 2016

# Proteinsammansättning i mjölk med lång hållbarhet (UHT-behandlad mjölk)

Protein composition in milk with extended shelf-life (ultra-high temperature treated milk)

*Johanna Frick*

**Handledare:** Maria Karlsson, institutionen för livsmedelsvetenskap, SLU

**Examinator:** Lena Dimberg, institutionen för livsmedelsvetenskap, SLU

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i biologi - kandidatarbete

**Kurskod:** EX0689

**Program/utbildning:** Agronomprogrammet - Livsmedel

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2016

**Serietitel:** Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap  
nr: 443

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** UHT-mjölk, kapillärelektrofores, mjölkprotein, proteinprofil, lagringstid, lagringstemperatur

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för livsmedelsvetenskap

## Sammanfattning

I den här rapporten har lagring av mjölk med lång hållbarhet analyserats för att ta reda på om det sker proteinnedbrytning under lagring och om nedbrytningen är beroende av lagringstid, lagringstemperatur (4, 20, 30 respektive 37°C), eller en kombination av dessa parametrar. Den analyserade mjölken producerades i november 2014 och lagrades ett år. Prover togs ut var fjärde vecka. Analys och kvantifiering av proteiner har gjorts med hjälp av kapillärelektrofores. Studien visar att nedbrytning av proteiner skedde i mjölken under lagring och att nedbrytningen var beroende av lagringstemperatur. Studien visar också att en metodutveckling är nödvändigt för att anpassa analysen till långhållbarhetsmjölk.

*Nyckelord:* UHT-mjölk, kapillärelektrofores, mjölkprotein, proteinprofil, lagringstid, lagringstemperatur.

## Abstract

In this report ultra-high temperature treated milk has been analyzed in order to investigate if protein degradation occurs during storage and if the degradation is correlated to storage time, storage temperature (4, 20, 30 and 37°C), or a combination of both parameters. The milk used for analysis was produced in November 2014 and has been stored for one year. Samples were taken out for analysis every fourth week. Analysis and quantification of proteins was made by capillary electrophoresis. The study shows that degradation of protein occurred in milk during storage and that it was temperature dependent. The study also shows that a method development is required to adapt the analysis on ultra-high temperature milk.

*Keywords:* UHT milk, capillary electrophoresis, milk protein, protein profile, storage time, storage temperature.

# Innehållsförteckning

<b>1 Inledning</b>	<b>4</b>
1.1 Mjök med lång hållbarhet	4
1.2 Mjökprotein	5
1.2.1 Kaseiner	5
1.2.2 Vassleprotein	6
1.3 Proteaser i långhållbarhetsmjök	7
1.4 Kapillärelektrofores	7
1.5 Proteinprofil	8
1.6 Lagringstemperatur och lagringstid	8
1.7 Syfte	9
<b>2 Metod</b>	<b>10</b>
2.1 Lösningar och buffertar	10
2.2 Upparbetning av prov	11
2.3 Kapillärelektrofores	11
2.4 Analys	12
<b>3 Resultat och diskussion</b>	<b>13</b>
3.1 Lagringstemperatur 4°C	13
3.2 Lagringstemperatur 20 °C	15
3.3 Lagringstemperatur 30 °C	15
3.4 Kaseiner och vassleproteiner	15
3.5 Oidentifierade och nedbrutna proteiner	16
3.6 Maillardreaktion	19
3.7 Psykrotrofa bakterier	19
3.8 Temperatur eller lagringstid?	20
3.9 Utvärdering av metoden	20
3.10 Slutsatser	21
3.11 Förslag till fortsatta studier	21
<b>Referenser</b>	<b>23</b>
<b>Bilaga 27</b>	

# 1 Inledning

## 1.1 Mjök med lång hållbarhet

Att förlänga hållbarheten på mjök har varit av stor betydelse genom historien. Från att ha färsk kommjök med bara några dagars hållbarhet har vi idag mjökprodukter som håller i upp till ett halvår i rumstemperatur efter produktionsdag, så kallad ultrahög temperaturbehandlad mjök (UHT-mjök) även kallad långhållbarhetsmjök (Chavan *et al.*, 2011). En mjökprodukt som kan lagras i rumstemperatur är fördelaktig då tillgången till kylförvaring är begränsad.

Enligt Lantbrukarnas Riksförbund producerades det 810 034 ton mjök i Sverige under år 2014. Drygt hälften, 419 452 ton, användes till konsumtionsmjök, det vill säga färsk mjök som förvaras kyld och har en hållbarhet på ca en vecka. Cirka 9,4 % användas till produkter som UHT-mjök. Av den resterande mängden mjök producerades ost, grädde, syrade produkter och pulvermjök (Holmström *et al.*, 2016). Europa är en världsledande producent av UHT-mjök och står för 65 % av den globala produktionen. Kina växer som den största importören av UHT-mjök (Holmström *et al.*, 2016).

UHT processen innebär att mjölken hettas upp till över 135 °C under en kort tid, 2-4 sekunder. Detta är att jämföra med konsumtionsmjök som upphetas till 72 °C under 15 sekunder. I konsumtionsmjölken är det ofta förekomst av bakterier som gör att mjölken surnar och blir odrickbar. Detta undviks i UHT-mjök, där den högre upphettningstemperaturen gör att majoriteten mikroorganismerna avdödas samt att sporer från sporbildande bakterier förstörs. Därtill förpackas UHT-mjök aseptiskt, ytterligare ett steg för att undvika bakteriell kontamination (Varnam *et al.*, 1994). Risken att värmestabila enzym, naturligt förekommande i mjölken eller från bakterier, överlever kan dock inte bortses ifrån. Dessa kan ha negativ inverkan på mjölken under lagring (Topçu *et al.*, 2005).

Det finns olika typer av UHT-processer, som grovt kan delas in i indirekta och direkta system. Den vanligaste förekommande är indirekt värmeprocessning, vilket innebär att mjölken och värmekällan är separerade under hela processen. Vid direkt värmeprocess, hettas mjölken upp med hjälp av ånga som förs in i mjölken vilket leder till att såväl upphettning som nedkylning av mjölken går snabbare, vilket är fördelaktigt för produktkvaliteten. Direkt UHT-process kan i vissa fall innebära att mjölken uppvärms lite mer än vid indirekt system (Clausen *et al.*, 2015).

Vid uppvärmning av mjölk är en av de största förändringarna att vassleproteinet  $\beta$ -laktoglobulin denaturerar (Datta *et al.*, 2002). Vid jämförelser, med hjälp av *high performance liquid chromatography* (HPLC), av de två UHT-värmeprocesserna (direkt och indirekt) visar flera källor att mjölk behandlad i direkt värmesystem har större andel icke denaturerat  $\beta$ -laktoglobulin (Datta *et al.*, 2002). Mjölken i detta projekt har behandlats med indirekta plattvärmeväxlare.

En defekt som kan uppstå i UHT-mjölk är gelering, bildning av ett tredimensionellt nätverk av proteiner. Vassleproteinet  $\beta$ -laktoglobulin tenderar att binda till  $\kappa$ -kasein på kaseinmicellens yta och bilda komplex, vilket får viskositeten att öka och mjölken blir mer eller mindre geléaktig (Datta *et al.*, 2001). En annan anledning till att mjölken gelerar tros vara kontaminering av plasmin i råvaran. För att undvika gelering är det vanligt att mjölkråvara förvärms innan UHT-process. Den hettas då upp till 80-90 °C under 30-60 sekunder. Detta leder till att  $\beta$ -laktoglobulin stabiliseras (Newstead *et al.*, 2005).

Andra problem som kan uppstå i UHT-mjölk under lagring är färgförändring som beror på Maillard reaktioner där fria aminosyror och peptider från nedbrutet protein reagerar med laktos (van Boekel, 1998; Dalsgaard *et al.*, 2007). Fria aminosyror är främst lysin som härrör från nedbrytning av  $\kappa$ -kasein (van Boekel, 1998).

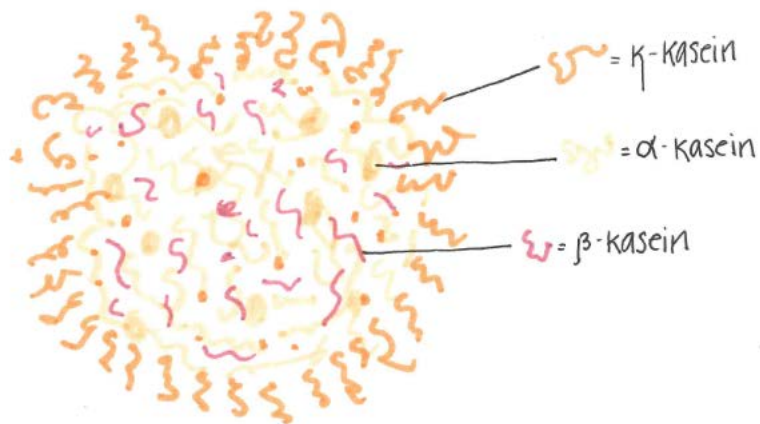
## 1.2 Mjolkprotein

Obehandlad mjölk består av ca 3,3 % protein. Proteinerna kan delas upp i två grupper, kaseiner och vassleproteiner.

### 1.2.1 Kaseiner

Kasein består av  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - och  $\kappa$ -kasein och utgör ca 80 % av det totala proteininnehållet i mjölk. Kaseinerna bildar aggregat som kallas kaseinmiceller (Walstra *et al.*, 2006). Det är lätt att urskilja de vanligast förekommande kaseiner-

na men de kan också förkomma i olika genetiska former, vilka är svårare att identifiera.



Figur 1. Schematisk bild över en micell med hydrofila  $\kappa$ -kaseiner på utsidan, som håller ihop det inre klustret av  $\alpha$ - och  $\beta$ -kaseiner. Bilden är fritt avritad av Holt 1994.

Som Figur 1 visar förekommer  $\alpha$ -kasein i så gott som hela micellstrukturen,  $\kappa$ -kasein är i huvudsak mest förekommande på micellens yta och  $\beta$ -Kasein i dess inre (Oldfield *et al.*, 2000). Samtliga kaseiner är mer eller mindre hydrofoba och innehåller hög andel av aminosyrorna prolin och cystein.  $\kappa$ -Kasein är negativt laddat och mer hydrofil. Detta leder till att micellen kan hålla en intakt struktur i lösning (Walstra *et al.*, 2006). Kaseinerna är värmetåliga och stabila i temperaturer upp till 140°C (Varnam *et al.*, 1994).

### 1.2.2 Vassleprotein

Vassleproteinerna  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin och serumalbumin utgör tillsammans ca 20 % av alla mjölkproteiner (Vaclavik *et al.*, 2013). Vassleproteinerna är hydrofila och värmekänsliga (Jonsson *et al.*, 2007). Denaturering av  $\beta$ -laktoglobulin ger konsekvenser då det över 100°C interagerar med  $\kappa$ -kasein. Detta gör att ytan på micellen förändras, dess stabilitet och struktur rubbas. För att minska effekten av denna interaktion förvärms mjölk till ca 90 °C innan den UHT-processas (Varnam *et al.*, 1994). Detta steg gör att  $\beta$ -laktoglobulin så gott som denaturerar och att proteinet inte längre är lika reaktionsbenäget. De binder inte till kasein eller kalcium lika lätt och risken att UHT-mjölken under lagring ska gelera minskar (Anema *et al.*, 2002).

Enligt Oldfield (2000), som jämfört mjölk uppvärmd till 70-90 °C respektive 100-130 °C, ändras koncentrationerna av  $\beta$ -laktoglobulin och  $\alpha$ -laktalbumin vid temperaturhöjning. En proteinprofil, som visar vilka protein som förekommer i ett livs-



medel, ser annorlunda ut i mjölk uppvärmd till olika temperaturer. Det är rimligt att det förekommer lägre kvantitet av vassleprotein i mjölk som hettats upp mer (Rauh *et al.*, 2015).

Protein i mjölk med lång hållbarhet förändras fysiokemiskt vid upphettning och lagring. Men det finns andra faktorer än temperatur som leder till att UHT-mjölk får ändrade egenskaper vid långvarig lagring.

### 1.3 Proteaser i långhållbarhetsmjölk

Mjölkindustrin har utmaningar med psykrotrofa bakterier. De psykrotrofa bakterierna klarar av att tillväxa i temperaturer så låga som  $-10^{\circ}\text{C}$  (Sørhaug *et al.*, 1997). Enzymer från dessa bakterier kan överleva både pastörisering och UHT-behandling. Proteolys av enzymerna från psykrotrofa bakterier tros ha ett samband med att UHT-mjölk gelerar (Walstra *et al.*, 2006). UHT-mjölk producerad av råvara som innehåller 5,9 *colony forming units per milliliter* (CFU/ml) psykrotrofa bakterier kan förvaras upp till 20 veckor utan antydning till gelering. Ökar antalet CFU till runt 7 CFU/ml minskar hållbarheten på UHT-produkten till 2-10 veckor, då den anses ha gelerat (Sørhaug *et al.*, 1997). UHT-mjölk producerad på råvara som innehåller psykrotrofa bakterier tenderar även att smaka bittert efter en tids lagring.

Ett annat vanligt enzym som inverkar på kvaliteten under lagring av UHT-mjölk är plasmin. Ett värmetåligt proteas som sägs bidra till såväl gelering som att mjölken flockar sig (Kelly *et al.*, 1997). Plasmin utsöndras i mjölk som plasminogen och aktiveras under lagring, ibland redan i juvret innan mjölkning. Hos äldre kor med juverinflammation (mastit) uppmäts högre halt plasmin i mjölken. Dessutom skiljer det sig plasmin-nivåerna mellan olika raser och var i laktationsfasen kon befinner sig, ju senare i laktationsfasen desto mer förekomst av plasmin (Bastian *et al.*, 1995).

### 1.4 Kapillärelektrofores

Olika metoder för separation och detektion av protein utvecklas ständigt. I dag är kapillär elektrofores mass-spektrofotometri (CE-MS) och kapillär vätskekromatografi mass-spektrofotometri (CapLC-MS) de två vanligaste metoderna (Grossman *et al.*, 1992).

Kapillärelektrofores grundar sig på teorin att protein kan migrera genom en kapillär som influeras av ett elektriskt fält. Beroende av proteinernas storlek, form och

laddning kommer migrationen att ta olika lång tid. På så sätt fås en fullständig separering av protein (Harrison *et al.*, 1992). Kapillären kan vara täckt med olika material, vanligtvis kisel. Kisel håller kvar molekyler med negativa laddningar längre medan positiva katjoner eluerar snabbare (Lauer *et al.*, 1985).

## 1.5 Proteinprofil

Proteinsammansättningen i UHT-mjölk skiljer sig från konsumtionsmjölk. Det beror på att proteinerna denaturerar mer vid högre upphettning. Dessutom bidrar Maillardreaktion i UHT-mjölk till att proteinkvaliteten försämras. Reaktionen startar vid upphettning och fortsätter under lagring och går snabbare vid högre lagringstemperatur (Alkanhal *et al.*, 2001).

För att mäta proteinnedbrytning och skillnader mellan mjölk som värmebehandlats med olika metoder och temperaturer är det vanligt att analysera mängden  $\beta$ -laktoglobulin, som utgör den största andelen av vassleprotein.  $\beta$ -Laktoglobulin denaturerar vid temperaturer över 60 °C eller vid ett lägre pH än 6.2 (Langton *et al.*, 1992; Boitz *et al.*, 2015). För att säkerställa den nutritionella kvaliteten på mjölkproteinerna efter UHT-behandling har *International Dairy Federation* (IDF) föreslagit att UHT-mjölk måste innehålla minst 50 mg/l  $\beta$ -laktoglobulin, jämfört med konsumtionsmjölk där mängden  $\beta$ -laktoglobulin bör vara minst 2600 mg/l efter pastörisering (Boitz *et al.*, 2015).

I en bra proteinprofil från en mjölk som inte upphettats framgår vilka proteiner som förekommer i mjölken. Vanligtvis upprättas en proteinprofil med kromatografiska eller elektroforetiska metoder, men för att göra de mer exakta krävs även statistiska analyser (Bordin *et al.*, 2001).

## 1.6 Lagringstemperatur och lagringstid

Lagringstiden i kombination med lagringstemperatur har stor betydelse för hållbarheten av UHT-mjölk (Datta *et al.*, 2001). Holland *et al.* (2011) visade att mjölk som lagrats vid 4 °C i upp till två månader har mindre tendens till gelering än UHT-mjölk som lagrats i 28 respektive 37°C. Den proteolytiska aktiviteten i mjölk är temperaturberoende upp till 30°C (García-Risco *et al.*, 1999), vilket innebär att proteaser verkar långsammare i temperaturer under detta.

I en studie där olika kaseinhalter analyserats i förhållande till lagringstemperatur i UHT-mjölk, och prov togd efter 6 månader vid 4, 20 respektive 40 °C, noterades

ingen märkbar skillnad på de prov som lagrats i 4 eller 20 grader. Däremot märktes tydlig skillnad på mjölken som lagrats i 40 °C, där tydlig gelering visades. (Gaucher et al., 2008).

## 1.7 Syfte

Syftet med denna studie var att med hjälp av kapillärelektrofores studera hur lagringstid och lagringstemperatur påverkar denaturering av mjölkproteiner i långhållbarhetsmjölk. Vidare syftar studien till att undersöka om proteinprofilen kan användas som prediktiv metod för att förutse hållbarheten på UHT-mjölk. Genom att studera förändringar i proteinprofil under lagring kan också eventuella kvalitetsförändringar tidigt upptäckas.

## 2 Metod

UHT-mjölken som analyserades i denna studie producerades i november 2014 och förvarades under ett år i fyra temperaturer, 4, 20, 30 respektive 37 °C. Var fjärde vecka togs ett prov om 15 ml från varje temperatur ut och frystes in i -20 °C fram till upparbetning.

### 2.1 Lösningar och buffertar

Enligt Tabell 1 förberedes 0,35 liter 6 M ureabuffert. Den blandas över natt till dess att ledningsförmågan är mindre än 2 µS/cm.

Urea-bufferten tillsattes sedan i ”körnings-buffer” (Tabell 2) till en volym av 100 ml. Sedan filtrerades lösningen genom ett filter (*Filter Millipore no 83.1826 non-pyrogenic sterile-R pore size 0.45 µm*). Filtratet förvarades i Eppendorfrör om 2 ml i -20 °C fram till analys.

Provbufferten förbereddes med ingredienser enligt Tabell 3 och urea-buffert tillsattes till en slutlig volym om 200 ml. Lösningen filtreras (*Filter Millipore no 83.1826 non-pyrogenic sterile-R pore size 0.45 µm*) och förvaras i falconrör om 15 ml i -20 °C.

DTT (0,039 g/15 ml) tillsätts i provbufferten precis innan analys. Detta för att den lätt sönderfaller och förlorar sin effekt och funktion, att klippa upp svavelbryggor mellan proteiner, vilket bidrar till att proteinerna vecklar upp sig.

Tabell 1. Ureabuffert

	c
Urea (M)	6,00
MHEC (Hydroxipropylmetylcellulosa) (%)	0,05

Tabell 2. *Ingredienser i körnings- buffert,*

	c (M)
Trinatriumcitratdihydrat	0,02
Citronsyra	0,19

Tabell 3. *Provbuffert.*

	c (M)
Tris	0,167
EDTA (Etylendiamintetraättiksyra)	0,067
MOPS (3-(N-morfolino) propansulfonsyra)	0,042
DTT (Ditiotreitol)	0,017

## 2.2 Upparbetning av prov

För att uppnå konsistens som är så lik mjölk som möjligt bör upptiningen ske långsamt. Mjölksproverna tinades i +4°C över natt. Därefter i vattenbad, 45°C 15 minuter, för att sedan vortexas. Visade proverna tecken på att vara flockade upprepades proceduren. Detta bör dock inte ske fler än två gånger eftersom hög temperatur gynnar enzymatisk aktivitet och bakterietillväxt, vilket kan påverka resultaten.

Prov av mjölk om 150 µl överfördes till ett 1,5 ml Eppendorfrör i duplikat. Provbuffert, 350 µl, tillsattes till varje prov. Detta möjliggör för proteinerna att vecklas ut. Proverna vortexades och inkuberades en timme i rumstemperatur.

Mjölken avfettades genom centrifugering 10 min i 4 °C 10 000 rpm. Fettet lade sig som en hinna överst i Eppendorfröret och kunde lätt tas bort med en bomullspinne. En milliliter av vart duplikat togs upp med en spruta och filtrerades genom filter (*Dalco Chrotech, MS Nylon syringe filter, SFNY013045N, diameter 13 mm, pore size 0,45mm*) till ett nytt Eppendorfrör. De prover som inte analyserades direkt frystes in (-20 °C).

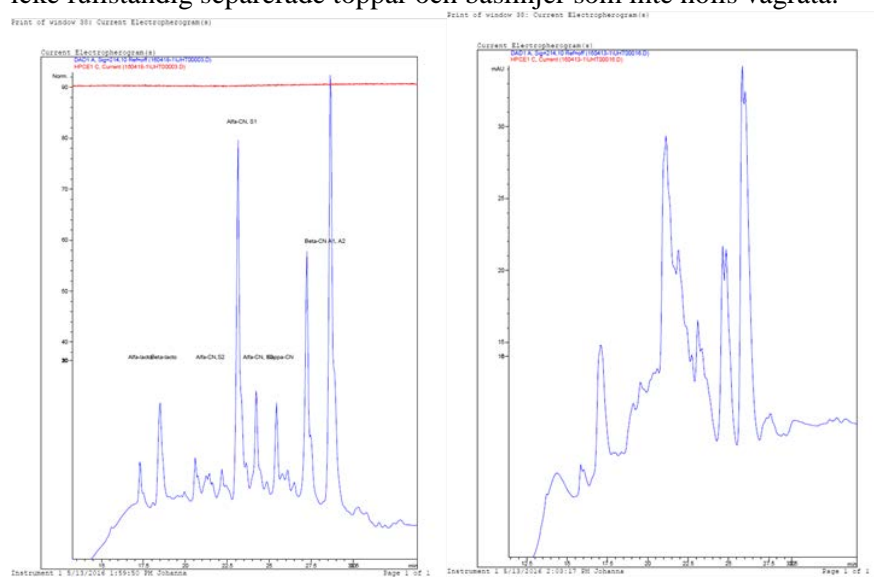
## 2.3 Kapillärelektrofores

Av det upparbetade provet överfördes 30 µl till en konformad vial anpassad för kapillärelektrofores och eventuella luftbubblor eliminerades. Proverna matades in i *Agilent Capillary Electrophoresis* med system G1600ACE med kisel i kolon-

nen. Körnings-buffert med urea-lösning tillsattes och proteinerna detekterades med UV-ljus.

## 2.4 Analys

För att använda kapillärelektrofores i kvantitativa mätningar kan arean i elektroferogrammet användas (Verzola *et al.*,1999). Genom att integrera topparna i elektroferogrammet med hjälp av mjukvaran, 3D-CE Chemstation (Agilent technology ©), beräknas varje topps area. Eftersom den totala arean är 100 % kan andelen av ett visst protein beräknas, Bilaga 1 (Tabell1-3). Figur 2 illustrerar elektroferogram, av olika kvalitet. Detta visar på svåranalyserade elektroferogram med icke fullständig separerade toppar och baslinjer som inte hölls vågräta.



Figur 2. Exempel på elektroferogram från kapillärelektrofores. Till vänster ett elektroferogram från UHT-mjölk lagrad 4 veckor vid 4 °C . Till höger ett ofullständigt elektroferogram från UHT-mjölk lagrad 48 veckor vid 30 °C.

## 3 Resultat och diskussion

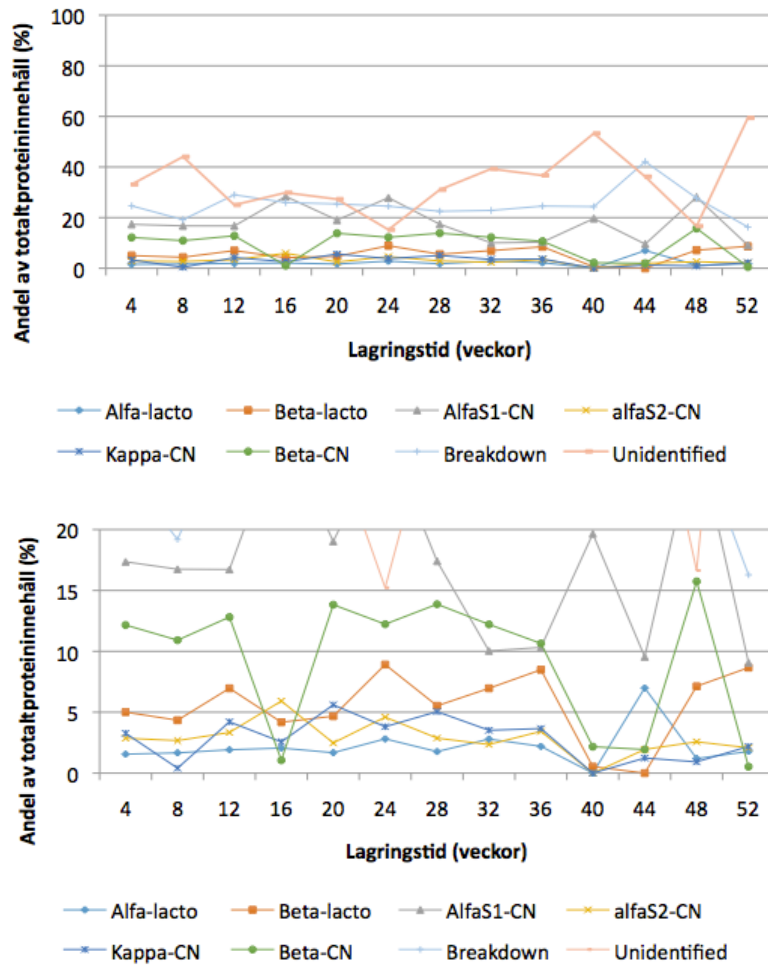
Resultatet presenteras uppdelade på olika lagringstemperatur. Inga proteiner har identifierats i de prover som lagrades i 37 °C, därav saknas resultat för denna lagringstemperatur.

Mjölken som använts i detta projekt testades för förekomst av plasmin och resultaten visade att UHT-processen helt inaktiverat plasmin. Mjölken testades även för bakterier och det totala antalet var 59000 CFU/ml. Inga psykrotrofa bakterier hittades i mjölkkråvaran.

### 3.1 Lagringstemperatur 4°C

I obehandlad mjölk består proteinerna till 80 % av kasein och 20 % vassleprotein. Ändras detta efter UHT-processen och under lagring? I Tabell 4 visas en översikt av proteinerna, grupperade i vassle och kasein samt nedbrutet och oidentifierbara protein för prov lagrade i 4 °C. Resultaten visar att en mycket stor andel av proteinerna är nedbrutna (*breakdown*) eller inte går att identifiera (*unidentified*). Proteinsammansättningen består av 15-47 % kasein och 0,5-12 % vassleprotein.

Vid lagring i 4 °C bör inte proteinprofilen förändrats nämnvärt, då ingen Maillard reaktion sker och få bakterier klarar av att tillväxa. Resultaten överensstämmer bra med det förväntade. Som visat i Figur 3 hålls samtliga protein på en relativt jämn nivå under hela lagringstiden. De avvikande siffrorna i Figur 3 visar som ovan nämnt problem med separation av toppar och svåranalyserade baslinjer i elektroferogrammen.



Figur 3. Proteinförändring över tid då UHT-mjölk lagrats i 4 °C. CN=kasein och fyra olika genetiska kasein har identifierats. Den nedre grafen visar resultatet enbart upp till 20 %, urklippt ur grafen över för en tydligare bild.

Tabell 4. Fördelning av protein i procent vid lagring i 4 °C under ett lagringsår. Samtliga kasein är adderade i samma kategori, likaså vassleprotein. Nedbrutet och oidentifierbara protein är sammanslagna till en kategori.

Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Vassle	7	6	9	6	6	12	7	10	11	0,5	7	8	10
Kasein	36	31	37	38	41	48	39	28	28	22	15	47	14
Nedbrutet och oidentifierbart	58	63	54	56	53	40	52	62	61	78	78	44	76



### 3.2 Lagringstemperatur 20 °C

Vid lagring i 20 °C ses liksom vid 4 °C att största förändringen skett i kasein. Proteinprofilen håller sig relativt jämn under ett år, ingen nedbrytning kan ses (Tabell 5). Genom att se på hur väl kurvorna för de olika proteinerna i Figur 4 följer varandra ser det ut att vara ett metodfel snarare än nedbrytning av proteiner som gör att kurvorna inte riktigt följer någon tydlig trend (tydligast i den nedre bilden i Figur 4). Detta hänger ihop med otydliga proteinprofiler, där integrering av toppar varit otillräcklig, se exempel i Figur 2. Elektroferogrammen har inte integrerats fullständigt eller proteinerna har inte separerats ordentligt under upparbetning. UHT-mjölken tenderar alltså med denna metod att bli svåranalyserad. Det går att jämföra med Figur 3, mjölk lagrad i 4 °C, där kurvorna är mer följsamma.

### 3.3 Lagringstemperatur 30 °C

Figur 5 visar förändring av protein i UHT-mjölk som lagrats totalt 52 veckor i 30 °C. Resultaten visar att det förmodligen varit ”dåliga” elektroferogram som integrerats, märkbart sämre än de i Figur 4. Nedbrytningen av proteinerna följer inte den trend som de borde gjort om metoden kunde detektera alla protein.

Tilläggs till resultaten för proteinnedbrytning vid 30 °C är att det fattas resultat för lagringsvecka 4, 20 samt 44. Vilket gör att det ser ut som om de veckorna endast presenterar icke-identifierat protein, vilket inte stämmer.

I prover som lagrats i 30 °C kan ses att nedbrytning av vassleprotein varit påtaglig, mer än de som lagrats i de lägre temperaturerna (Tabell 6). Vassleprotein är värmekänsliga och de borde denaturera under UHT-processen. Resultaten av denna studie pekar på att nedbrytningen av vassleprotein ökar om lagringstemperaturen höjs. Detta kan också ses i Figur 5. Proteinprofilen är märkbart förändrad jämfört med de lägre lagringstemperaturerna.

Det är alltså rimligt att påstå att elektroferogrammen blev mer och mer svårintegrerade, och resultaten mer svårtolkade, desto högre lagringstemperatur och längre tid som mjölkproverna lagrades.

### 3.4 Kaseiner och vassleproteiner

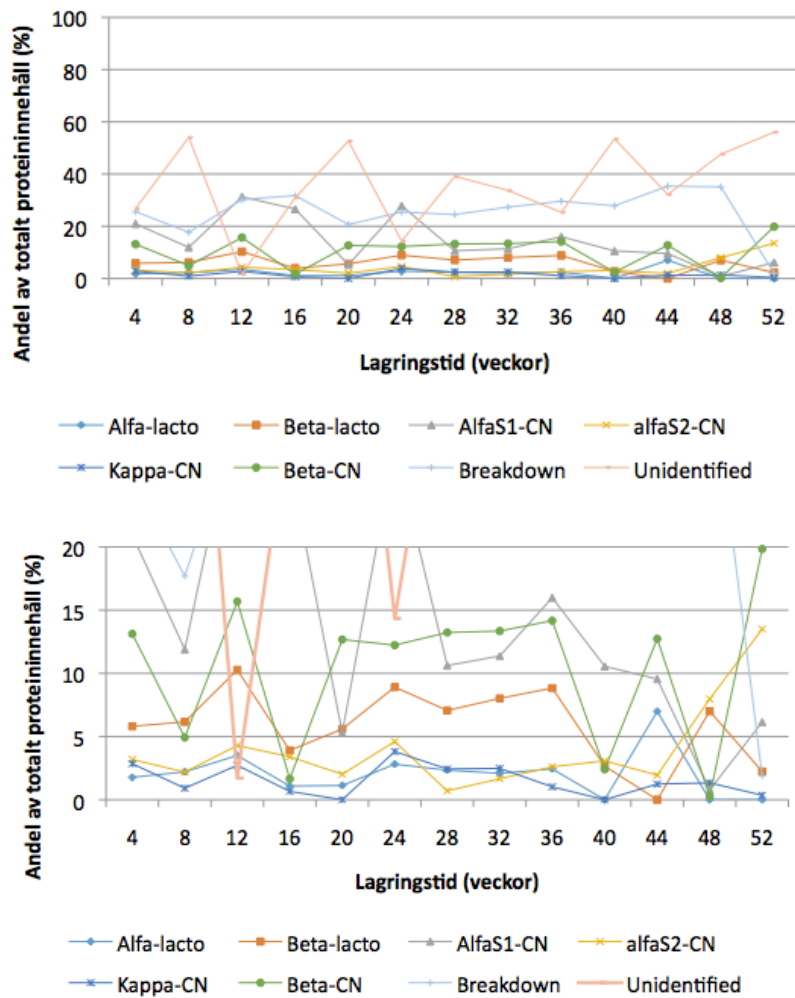
Då vassleproteinerna är mer värmekänsliga kan en teori vara att de borde brytas ner mer än kaseinerna. Detta har dock inte kunnat visas med denna metod. Samtliga proteiner löper längs med x-axeln ganska jämt i figurerna från alla temperaturlagringar (Figur 3-5). Totalt sätt är andelen kasein större än vassleprotein i

mjolk, vilket fortfarande överensstämmer med resultatet efter lagring. Enligt Miralles *et al.*, (2000) bör inte nedbrytning av vassleprotein skilja sig mellan lagringstemperaturerna så länge förekomst av bakterier är lågt. Men vid eventuell förekomst av bakterier gäller; ju fler bakteriekolonier i mjölken från början desto mer nedbrytning av protein. Eftersom bakterier har tillväxtoptimum vid olika temperaturer kan proteinnedbrytning orsakad av bakteriella proteas skilja sig mellan lagringstemperaturerna (Sørhaug *et al.*, 1997).

### 3.5 Oidentifierade och nedbrutna proteiner

Det framgår av resultaten att andelen oidentifierade proteiner är hög men relativt konstant under hela lagringstiden, bortsett från vecka 4, 20 och 44 i Figur 5. De oidentifierade proteinerna kan vara rester av protein, det kan också vara proteiner som har bildat aggregat med varandra. Vid höga temperaturer kan proteiner bli helt fullständigt utvecklade vilket gör att de kan flytta om sin konformation och reagera med andra proteinrester (Raikos, 2009). Det går inte att utesluta att några av de oidentifierbara proteinerna är rester av nedbrytningsprotein. Metoden som använts i denna studie är inte ännu anpassad för UHT-mjolk. Detta har lett till svårtolkade resultat.

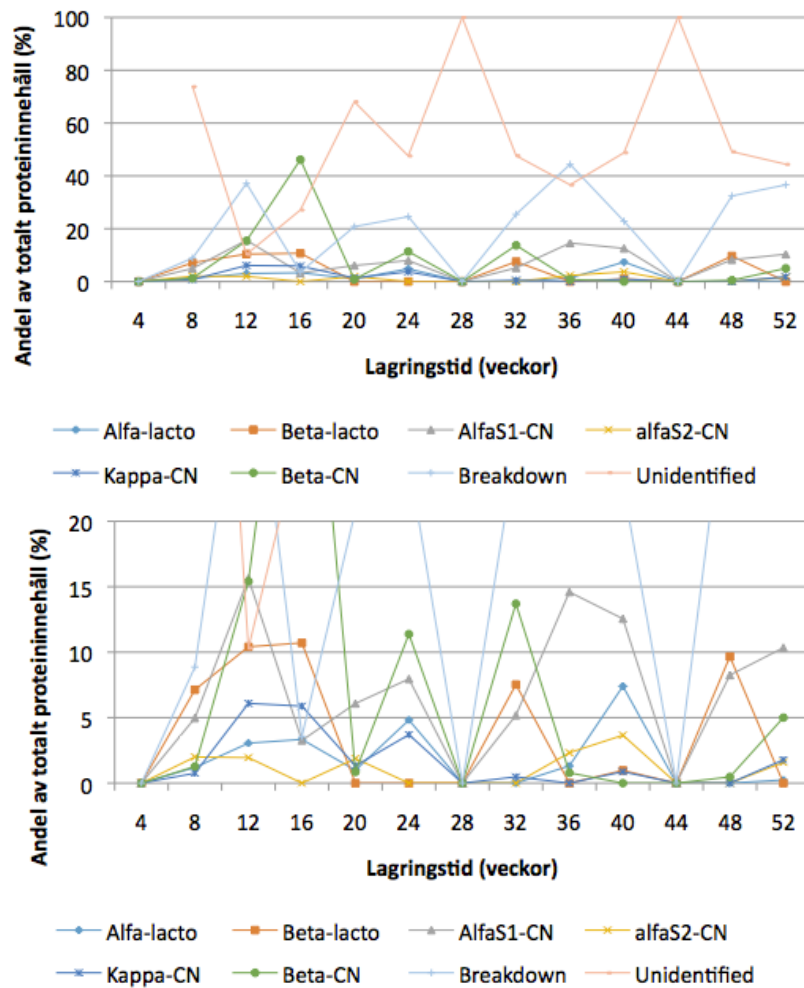
Mjolk innehåller förutom proteiner kolloidalt kalciumfosfat. Detta kan interagera med proteiner vid förändringar i mjölken, exempel vid minskat pH (Kruif *et al.*, 2012). Det leder till att kaseinstrukturen förändras, kasein bryts ned. När kasein denaturerats kan rester av proteinet bilda aggregat med andra proteinrester (Holt 1998). Anledningen till att andelen nedbrutet och oidentifierbart protein ökade med stigande lagringstemperatur skulle kunna vara att pH sjunker i snabbare takt i de proverna jämfört med de som lagrats i 4 °C, vilka håller relativt konstant pH, kring 6,7.



Figur 4. Proteinförändringen över tid då mjölk lagrats i olika temperaturer 20 °C. CN =kasein och fyra olika genetiska kaseiner har identifierats. Den undre grafen är ett utklipp ur den övre för att tydliggöra bilden av nedbrytning av de olika proteinerna.

Tabell 5. Fördelning av kaseiner och vassleprotein i procent vid lagring i 20 °C under ett lagringsår. Nedbrutet och oidentifierbara protein är sammanslagna till en kategori.

Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Vassle	7	9	14	5	7	12	10	10	11	3	7	7	2
Kasein	40	20	54	32	20	48	27	29	34	16	25	10	40
Nedbrutet och oidentifierbart	52	72	32	63	73	41	64	61	55	81	67	83	58



Figur 5. Proteinförändringen över tid då mjölk lagrats i olika temperaturer 30 °C. CN =kasein och fyra olika genetiska kaseiner har identifierats. Den undre grafen är ett utklipp ur den övre för att tydliggöra bilden av nedbrytning av de olika proteinerna.

Tabell 6. Fördelning av kaseiner och vassleprotein i procent vid lagring i 30 °C under ett lagringsår. Nedbrutet och oidentifierbara protein är sammanslagna till en kategori. Inga proteiner kunde identifieras för vecka 4, 28 och 44.

Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Vassle	0	8	13	14	1	5	0	8	1	9	0	10	0,2
Kasein	0	9	40	55	10	23	0	19	18	17	0	9	19
Nedbrutet och oidentifierbart	100	83	48	30	89	72	100	73	81	74	100	82	81

### 3.6 Maillardreaktion

Av de 52 prover som analyserats i det här projektet hade inget gelerat. Viss problematik med sedimenterad mjölk och framförallt påtaglig färgförändring som en följd av Maillardreaktion uppmärksammades dock (Figur 6). Maillardreaktion i mjölk sker då ett reducerande socker som laktos och aminosyror reagerar under upphettning. Det är främst prover som lagrats i 40-52 veckor i 30 och 37 °C som visar tydlig färgförändring. Elektroferogrammen av dessa prov var också svårtydda. Detta visar att mjölken genomgår flera fysio-kemiska förändringar under lagring som ger förändrade egenskaper. Dessutom, mot slutet på lagringstiden kunde endast små mängder  $\kappa$ -kasein detekteras.



Figur 6. Till vänster, frusen mjölk förvarad 52 veckor, 37 °C. Till höger fryst mjölk förvarad 4 veckor i 4 °C.

### 3.7 Psykrotrofa bakterier

För att producera UHT-mjölk av hög kvalitet är det viktigt att mjölkråvaran innehåller så få bakterier som möjligt (Griffiths *et al.*, 1988). Mätningar på den oprocessad silomjölken visade att den inte innehöll några psykrotrofa bakterier men totalantalet bakterier uppmättes till 59000 CFU/ml. Det går inte att bortse från att psykrotrofa bakterier är en utmaning i mjölkindustrin. Många psykrotrofa bakterier har ett tillväxtoptimum vid 20-30 °C (Donalt Muir, 1996) men kan försämra kvaliteten hos UHT- mjölk i så låga temperaturer som 4 °C. Psykrotrofa bakterier kan producera proteaser stabila nog att överleva UHT-behandling (Vithanage *et al.*, 2016). I en rapport av Zhang (2015) diskuteras *Pseudomonas fluorescens*, en av de vanligaste psykrotrofa bakterierna, som bryter ner kasein i följande ordning:  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -kasein,  $\alpha$ -kasein, men som har liten påverkan på vassleproteinerna. Dessutom är *P. fluorescens* mycket värmetålig och kan överleva UHT-behandling. Ju längre proverna lagras desto mer bakterier kan tillväxa och därmed bryta ner mer protein.

Genom att välja UHT-system (indirekt eller direkt) är det möjligt att reducera mängden proteaser. Då det vid indirekt UHT-process inaktiveras fler proteaser än vid direkt värming (Kelly et al., 1997) kan den metoden vara fördelaktig vid tillverkning av en UHT-mjök där en lång hållbarhet eftersträvas. Av samma anledning hävdar också Newstead (2005) att UHT-mjök från direkta system ger ökad risk för gelering. Eftersom det är ett indirekt-system som använts för mjölken i projektet bör alla proteaser ha inaktiverats, och dessutom visade inget prov tecken på gelering.

### 3.8 Temperatur eller lagringstid?

Resultaten visar att mjökproteinerna förändrades över tid och de bröts ned i större utsträckning om lagringstemperaturen ökades. Den mesta nedbrytningen och förändringen i proteinprofil skedde i samband med UHT-processen eller direkt efter.

I prover lagrade vid 4 °C hade proteinnedbrytningen skett i samband med UHT-processen eller inom de närmaste 4 veckorna efter process. Därefter höll proteinprofilen relativt konstant och endast små förändringar skedd under lagringen. De skillnader som uppstod i dessa prover tycks bero på analysmetoden snarare än fysiska eller kemiska förändringar.

Likaså förändrades proteinprofilen för mjölken lagrad i 20 °C lite under lagringsperioden. Mot slutet av perioden var dock elektroferogramen vara mer svåranalyserade, då proteinsammansättningen inte följer något mönster. Detta indikerar på en ökad nedbrytning eller biokemisk aktivitet. Det går inte att utesluta att detta beror på metodfel under upparbetningen av proverna. Proteiner separerades inte tillräckligt innan detektion.

För prover lagrade i 30 °C följer proteinprofilen inte något tydligt mönster. Nedbrytningen som börjar direkt efter UHT-processen följer ingen tydlig trend. Vid jämförelser av fördelningarna mellan kasein och vassleprotein i Tabell 6 går det inte att se något tydligt mönster. Inte heller i Figur 5 kan någon tydlig trend ses. Det går dock inte att bortse från att andelen oidentifierade protein ökade markant efter lagringsvecka 16, vilket syns tydligt i Figur 5.

### 3.9 Utvärdering av metoden

Detektion och separation av proteiner är möjlig med kapillärelektrofores (Recio et al., 1997). I denna rapport påvisas att även analys av mjökprotein från

UHT-processad mjölk fungerar med samma metod. Den mall som är framtagen för att identifiera proteiner är anpassad efter vilken retentionstid proteinet har i oprocessad mjölk. Det innebär att proteinseparation sker med avseende på olika egenskaper, varav vissa gör att proteinerna stannar längre i kapillären. Resultaten av många av de detekterade proteinernas elektroferogram matchade inte mallen. Därför skapades kategorin oidentifierade proteiner. Dessa proteiner utgör troligen nedbrytningsproteiner. Ju högre lagringstemperaturer desto fler nedbrutna proteiner då de är värmekänsliga och denaturerar (Grappin et al., 1997).

För att utveckla metoden ytterligare kan kombinationen kapillärelektrofores/massspektrofotometri (CE/MS) användas. Fördelen med denna metod är att separering med kapillärelektrofores är väldigt effektiv. Identifieringen av topparna är dock mer specificerad med kombinerad CE/MS (Thompson et al., (1993).

Ett vanligt förekommande problem med att använda smält kisel i kapillären när proteiner separeras är absorption. Proteinerna som innehåller många vätebindningar har förmåga att binda till den negativt laddade kiselväggen i kolonnen (Zhao et al., 1993). Att bestämma kvantiteten av proteiner med denna metod är med andra ord inte helt tillförlitligt, men metoden kan ge rättvisa resultat då en proteinprofil ska upprättas.

### 3.10 Slutsatser

Både lagringstemperatur och lagringstid påverkar proteinprofilen. Elektroferogrammen blir mer svårintegrerade i prov lagrade i höga temperaturer och med längre lagringstid.

Det är med den valda metoden svårt att hitta en specifik tidpunkt i lagringen då förändringen av proteinprofil är påtaglig. Däremot verkar det som om de största förändringarna sker under de första fyra lagringsveckorna, under eller direkt efter UHT-processen.

### 3.11 Förslag till fortsatta studier

Metoden som valdes hade fungerat bättre med en mall anpassad för UHT-mjölk. För att öka valideringen i försöken måste också samtliga försök upprepas. Den mjölk som lagrats i 30 respektive 37 °C grader måste analyseras om helt.

Som ett komplement rekommenderas att mäta halten proteas i varje prov samtidigt som proteinprofilen undersöks för att fastställa eventuell korrelation mellan proteinnedbrytning och förekomst av proteas eller psykrotrofa bakterier.



## Referenser

- Alkanhal, H. A., Al-Ohtman, A. A., Hewedi, F. M. (2001) Changes in protein nutritional quality in fresh and recombined ultra high temperature treated milk during storage *International Journal of Food Sciences and Nutrition* vol 52 ss 509-514
- Anema S. G., Li, Y. (2002) Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size *Journal of Dairy Research* vol 70 ss 73-83
- Bastian, E. D., Brown, R. J. (1995) Plasmin in milk and dairy products: An update<sup>1</sup> *International Dairy Journal* vol 6 ss 435-457
- Van Boekel M. A. J. S. Effect of heating on Maillard reactions in milk *Food Chemistry* vol 65 ss 403-414
- Boitz, L. I., Fiechter, G., Seifried, R. K., Mayer, K. H. (2015) A novel ultra-high performance liquid chromatography method for the rapid determination of  $\alpha$ -lactoglobulin as heat load indicator in commercial milk samples *Journal of Chromatography A* vol 1386 ss 98-112
- Bordin, G., Cordeiro-Raposo, F., de la Calle, B., Rodriguez, A.R (2001) Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography *Journal of Chromatography A* vol 928 ss 63-76
- Celestino, E. L., Iyer, M., Roginski, H. (1996) Reconstituted UHT-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT Milk on its physico-chemical attributes and flavour *International Dairy Journal* vol 7 ss 129-140
- Chavan, R. S., Khedar C. D., Jana A. H. (2011) UHT milk process and effect of plasmin activity of shelflife: a review *Comprehensive Reviews of Food Science & Food Technology* vol 10 ss 251-268
- Clausen, M. R., Larsen L. B., Andersen H. J., Bertram H. C. (2015) Storage-induced changes in sensory characteristics and volatiles of conventional and lactose-hydrolyzed UHT processed milk *European Food Research and Technology* vol, 240 ss 1247-1257

- Dalgleish, D. G., Horne, D. S., Law, A.J.R (1988) Size-related differences in bovine casein micelles *Biochimica et Biophysica Acta*. vol 991 ss 383-387
- Dalsgaard T.K., Nielsen J.H., Larsen, L.B (2007) Proteolysis of milk proteins lactosylated in model systems *Molecular Nutrition Food Research* vol 51 ss 401-414
- Datta, N., Deeth, H. C. (2001) Age gelation of UHT milk - A review *Food and Bioproducts Processing* vol 79 ss 197-210
- Datta, N., Deeth, H. C. (2002) Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk *LWT – Food Sciences and Technology* vol 36 ss 173-182
- Datta, N., Elliott, A. J., Perkins, M. L., Deeth, H. C. (2002) Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect modes of heating *Australian Journal of Dairy Technology* vol 57 ss 211-227
- Donald Muir, D (1996) The shelf-life of dairy products: 1 Factors influencing raw milk and fresh products *Journal of the Society of Dairy Technology* vol 49 ss 24-32
- García-Risco, M. R., Ramos, M., López-Fandriño, R (1999) Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature *Journal of the Science of Food and Agriculture* vol 59 ss 1171-1178
- Gaucher, I., Mollè, D., Gagnaire, V., Gaucheron, F (2008) Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk *Food Hydrocolloids* vol 22 ss 130-143
- Grappin, R., Beuvier, E. (1997) Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese *International Dairy Journal* vol 7 ss 751-761
- Griffiths, M.W., Phillips, J.D., West, I.G., Muir, D.D (1988) The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk *Food Microbiology* vol 5 ss 75-87
- Grossman, P. D., Colburn, J. C (1992) *Capillary Electrophoresis: Theory and practice* Academic Press San Diego, California
- Harrison, D.J., Manz, A., Fan, Z., Lüdi, H., Widmer, H.M (1992) Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip *Analytical Chemistry* vol 64 ss 1926-1932
- Holland, J. W., Gupta, R., Deeth, H. C., Alewood, P. F. (2011) Proteomic analysis of temperature-dependent changes in stored UHT milk *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol 59 ss 1837-1846
- Holmström, L., Engelbrekts, E. (2016) *Mjölkrapporten* LRF Mjök (2016:1)
- Holt, C. (1998) Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography *Journal of Dairy Sciences* vol 81 ss 2994-3003

- Jonsson, L., Marklinder, I., Nydahl, M., Nylander, A., (2007) *Livsmedelsvetenskap Studentlitteratur*
- Kelly, A. L., Foley, J. (1997) Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/B-Lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count *International Dairy Journal* vol 7 ss 411-420
- Kelly, A. L., O'Donnell, H. J. (1998) Composition, gel properties and microstructure of quarg as affected by processing parameters and milk quality *International Dairy Journal* vol 8 ss 295-301
- de Kruijff C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., Petukhov A. V. (2012) Casein micelles and their internal structure *Advances in Colloid and Interface Science* vol 171-172 ss 36-52
- Langton, M., Hermansson, A-M. (1992) Fine-stranded and particulate gels of  $\beta$ -lactoglobulin and whey protein at varying pH *Food Hydrocolloids* vol 5 ss 523-539
- Lauer H. H., McManigill (1985) Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing *Analytical Chemistry* vol 58 ss 166-170
- Miralles, B., Bartolomé, B., Ramos, M., Amigo, L. (2000) Determination of whey protein to total protein ratio in UHT milk using fourth derivative spectroscopy *International Dairy Journal* vol 10 ss 191-197
- Monahan F. J., German J. B., Kinsella J. E. (1995) Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol 43 ss. 46-52
- Newstead, D. F., Paterson, G., Anema, S. G., Coker, C. J., Wewala, A. R. (2005) Plasmin activity in direct-steam-injection UHT-processed reconstituted milk: Effects of preheat treatment *International Dairy Journal* vol 16 ss 573-579
- Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W., Pearce, K. N. (1998) Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot plant *International Dairy Journal* vol 8 ss 311-318
- Raikos, V. (2009) Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review *Food Hydrocolloids* vol 24 ss 259-265
- Rauh, V. M., Johansen, L. B., Bakman M., Ipsen, R., Paulsson, M., Larsen, L. B., Hammershøj, M. (2015) Protein lactosylation in UHT milk during storage measured by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and quantification of furosine *International Journal of Dairy Technology* vol 68 ss 486-494
- Recio, I., Amigo, L., Lopez-Frandiño, R. (1997) Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins *Journal of Chromatography B* vol 697 ss 231-242
- Sørhaug, T., Stepaniak, L (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects *Trends in Food Science & Technology* vol 8 ss 35-41

- Thompson, T. J., Foret, F., Vouros, P., Karger, B.L (1993) Capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry: improvement of protein detection limits using on-column transient isotachopheric sample preconcentration *Analytical Chemistry* vol 65 ss 900-908
- Topçu, A., Numanoğlu, E., Saldamli, İ (2006) Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey *International Dairy Journal* vol, 16 ss 633-638
- Vaclavik, V., Christian, E.W. (2013) *Essentials of Food Science 4<sup>th</sup> edition* Springer Science & Business Media Texas, USA
- Varnam, A.H., Sutherland, J. P (1994) *Milk and Milk products* Chapman & Hall Inc. London, UK
- Verzola, B., Gelfi, C., Righettim P.G. (1999) Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis Quantitative study on the chemical composition of the background electrolyte for minimizing the phenomenon *Journal of Chromatography A* vol 868 ss 85-99
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, N. R., Datta, N. (2016) Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable conditions, seasonality and their spoilage potential *International Dairy Journal* vol 57 ss 80-90
- Walstra, P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. (2005) *Dairy Science and Technology*, 2 uppl. CRC press Boca Raton, Florida
- Zhao, Z., Malik, A., Lee M. L (1993) Solute adsorption on polymer-coated fused-silica capillary electrophoresis columns using selected protein and peptide standards *Analytical Chemistry* vol 65 ss 2747-2752
- Zhang, S., Li, H., Uluko, H., Liu, L., Pang, X., Lv, J. (2015) Investigation of protease production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and degradation on milk proteins *Journal of Food Processing and Preservation* vol 39 ss 2466-2472

## Bilaga

Nedan presenteras procentandel av vart protein för de olika lagringstemperaturerna. Dessutom är mallen för elueringstid bifogad. Av dessa har resultaten i studien beräknats.

*Tabell 1.* Topparnas area, % av totalarea som använts för att beräkna andel protein vid lagringstemperatur 4 °C

Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Alfa-lacto	1,5	1,6	1,9	2,0	1,6	2,8	1,8	2,8	2,2		6,9	1,2	1,8
Beta-lacto	5,0	4,3	6,9	4,2	4,7	8,9	5,5	7,0	8,5	0,5		7,1	8,6
AlfaS1-CN	17,3	16,7	16,7	28,4	19,0	27,9	17,4	10,0	10,3	19,7	9,5	28,0	9,0
AlfaS2-CN	2,8	2,7	3,3	5,9	2,5	4,6	2,9	2,3	3,4		1,9	2,6	2,0
Kappa-CN	3,3	0,4	4,2	2,6	5,6	3,8	5,0	3,5	3,7		1,2	0,9	2,2
Beta-CN	12,2	10,9	12,8	1,0	13,8	12,2	13,9	12,2	10,6	2,2	1,9	15,7	0,5
Breakdown	24,6	19,2	29,0	25,9	25,4	24,5	22,5	22,8	24,6	24,4	42,1	27,7	16,3
Unidentified	33,1	44,0	25,0	29,8	27,3	15,2	30,	39,3	36,7	53,3	36,2	16,6	59,4
Total peak area	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabell 2. Topparnas area, % av totalarea som använts för att beräkna andel protein vid lagringstemperatur 20 °C

Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Alfa-lacto	1,8	2,2	3,5	1,0	1,1	2,8	2,3	2,1	2,4		7,0		
Beta-lacto	5,8	6,1	10,3	3,9	5,6	8,9	7,1	8,0	8,8	2,6		7,0	2,2
AlfaS1-CN	20,9	11,9	31,3	26,6	5,3	27,8	10,6	11,4	15,9	10,5	9,5	0,7	6,1
AlfaS2-CN	3,2	2,2	4,3	3,4	2,0	4,6	0,7	1,7	2,6	3,1	1,9	7,9	13,5
Kappa-CN	2,8	0,9	2,7	0,7		3,1	2,4	2,5	1,0		1,2	1,3	0,3
Beta-CN	13,1	4,9	15,7	1,6	12,7	12,2	13,2	13,3	14,2	2,4	12,7	0,3	19,8
Breakdown	25,6	17,7	30,2	31,7	20,7	25,4	24,5	27,3	29,6	27,8	35,3	35,0	1,8
Unidentified	26,7	54,0	1,7	30,0	52,6	14,3	39,1	33,7	25,3	53,5	32,2	47,6	56,0
Total peak area	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabell 3. Topparnas area, % av totalarea som använts för att beräkna andel protein vid lagringstemperatur 30 °C Data för lagringsvecka 4, 28 och 44 saknas och därför registreras 100 % som nedbrutet protein

Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Alfa-lacto	0	1,2	3,0	3,3	0,9	4,8	0		1,3	7,4	0		0,2
Beta-lacto	0	7,1	10,4	10,7			0	7,5		0,9	0	9,6	
AlfaS1-CN	0	5,0	15,6	3,2	6,0	7,9	0	5,2	14,6	12,5	0	8,2	10,3
AlfaS2-CN	0	2,0	1,9	0	1,8		0		2,3	3,6	0		1,6
Kappa-CN	0	0,7	6,0	5,9	1,3	3,7	0	0,5		0,9	0		1,8
Beta-CN	0	1,3	15,4	46,1	0,8	11,4	0	13,7	0,8		0	0,5	5,0
Breakdown	0	8,8	37,1	3,6	20,8	24,6	0	25,5	44,3	22,8	0	32,4	36,6
Unidentified	100	73,8	10,31	27,0	68,0	47,6	100	47,6	36,6	50,2	100	49,2	44,4
Total peak area	100	100	100	100	100	100	100	100	100	97	100	100	100

Tabell 4. Lagringstemperatur 4 °C, migrationstiden (min) för topparna matchas in i mallen för att avgöra vilket protein som detekterats

Peak	Protein	Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
1	BSA?	0,709469			0,68							0,68	0,67	0,68	0,62
2	α-la	0,789789	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,76	0,76		0,78	0,76	0,76
3	β-Ig	0,832448	0,80	0,80	0,80	0,81	0,80	0,81	0,80	0,81	0,81	0,81		0,81	0,88
4	?	0,866444	0,86												
5	as2-10P	0,887298	0,89	0,89	0,89	0,87	0,89								
6	as2-11P	0,912381			0,93	0,89		0,90	0,89	0,90	0,90			0,90	
7	as2-12P?	0,941486	0,93	0,93		0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,94		0,94	0,93	0,93
8	as1-7P (?)	0,965316	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96		0,96		0,96	
9	αs1-cn 8p 1	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	?	1,019481													
11	αs0-cn	1,037372	1,05	1,05	1,05	1,04						1,03		1,04	
12	k-cn 1?	1,067084			1,07	1,08	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05				
13	κ-cn 2	1,091452	1,08	1,08	1,09	1,10	1,09				1,08		1,11	1,09	
14	β-cas B	1,106739		1,11		1,11	1,10	1,08	1,11	1,11	1,11			1,10	
15	k-cn 3?	1,121973	1,10		1,12		1,13	1,12			1,12			1,13	1,15
16	k-cn 4?	1,138375	1,13	1,14											
17	β-cas A1	1,148827	1,14	1,15	1,14	1,14		1,14	1,14	1,14			1,15		
18	β-cas A2	1,195988	1,18	1,18	1,17		1,18	1,18	1,19	1,18	1,18	1,19	1,19	1,18	1,19
19	breakdown	1,229523	1,24	1,22	1,22	1,23						1,23	1,23	1,23	1,23

20	breakdown	1,25697	1,31	1,25	1,29	1,24	1,24	1,25	1,24	1,24	1,26			1,29	
21	breakdown	1,317967		1,32	1,31	1,31	1,31		1,32	1,31	1,30	1,32	1,29	1,30	
22	breakdown	1,331208		1,34	1,35	1,36	1,33	1,33	1,34	1,33			1,36	1,32	1,36
23	breakdown	1,381415	1,36	1,38	1,39	1,39		1,37		1,40	1,38	1,40	1,40	1,39	
24	breakdown	1,417871	1,42	1,42		1,40	1,41	1,40	1,41		1,48	1,43	1,44		
25	breakdown	1,453995		1,51	1,46		1,49	1,49	1,43		1,52	1,49		1,49	
26	breakdown	1,623273			1,50		1,57	1,57		1,65	1,63	1,64	1,59		

Tabell 5. Lagringstemperatur 20 °C, migrationstiden (min) för topparna matchas in i mallen för att avgöra vilket protein som detekterats

Peak	Name	Lagringsvecka	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
1	BSA?	0,709469	0,67	0,62	0,69				0,67		0,64	0,66	0,67		0,75
2	α-la	0,789789	0,74	0,75	0,76	0,76	0,75	0,75	0,75	0,76	0,76	0,78			
3	β-lg	0,832448	0,79	0,80	0,808447	0,81	0,81	0,81	0,80	0,81	0,81			0,84	0,82
4	?	0,866444			0,867526										
5	as2-10P	0,887298	0,89										0,89		
6	as2-11P	0,912381	0,92		0,90	0,90	0,92	0,90		0,90		0,93	0,93		0,93
7	as2-12P?	0,941486		0,93	0,936179	0,93		0,93	0,91	0,94	0,94			0,93	
8	as1-7P (?)	0,965316	0,96	0,96	0,96122	0,96		0,96	0,97	0,96					
9	αs1-cn 8p	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1
10	?	1,019481													
11	αs0-cn	1,037372	1,05	1,05	1,04	1,04	1,04				1,04				1,04
12	k-cn 1?	1,067084						1,05	1,05	1,05	1,08				



13	κ-cn 2	1,091452	1,08	1,09	1,09	1,08			1,08	1,08					1,08
14	β-cas B	1,106739		1,11	1,11	1,10	1,10	1,08	1,11	1,11	1,11	1,11			1,09
15	κ-cn 3?	1,121973	1,11					1,12			1,12		1,12	1,12	1,13
16	κ-cn 4?	1,138375	1,14	1,13		1,14					1,14			1,14	
17	β-cas A1	1,148827	1,16		1,16			1,14	1,14	1,14		1,16	1,15		1,18
18	β-cas A2	1,195988	1,19	1,18			1,18	1,18	1,19	1,18	1,18	1,20	1,21	1,21	1,23
19	breakdown	1,229523		1,20	1,21	1,23					1,24	1,23	1,23		
20	breakdown	1,25697	1,26	1,25	1,2		1,24	1,24	1,25	1,24				1,24	
21	breakdown	1,317967				1,29	1,32		1,32		1,30		1,29	1,28	1,31
22	breakdown	1,331208	1,35	1,34	1,34	1,31		1,33		1,33		1,33	1,32	1,35	1,33
23	breakdown	1,381415		1,37	1,37	1,36		1,37		1,39	1,38	1,36	1,36		1,38
24	breakdown	1,417871		1,42	1,42	1,39	1,41	1,40	1,41		1,48	1,39	1,38	1,44	1,45
25	breakdown	1,453995	1,41	1,52	1,48	1,43	1,51	1,49		1,50	1,58	1,45	1,45		
26	breakdown	1,623273	1,47			1,59	1,53	1,57	1,59	1,61	1,66	1,62	1,52	1,62	

Tabell 6. Lagringstemperatur 30 °C, migrationstiden (min) för topparna matchas in i mallen för att avgöra vilket protein som detekterats. Resultat för vecka 4, 28 och 44 presenteras inte då de saknas

Peak	Name	Lagringsvecka	8	12	16	20	24	32	36	40	48	52
1	BSA?	0,709469	0,59	0,69	0,68	0,67	0,75		0,67	0,75	0,67	0,74
2	α-la	0,789789	0,68	0,76	0,75	0,80	0,81		0,77	0,80		0,78
3	β-Ig	0,832448		0,81	0,81			0,81			0,83	
4	?	0,866444										
5	as2-10P	0,887298	0,88			0,88						

6	as2-11P	0,912381	0,93	0,92								
7	as2-12P?	0,941486	0,95	0,94		0,94			0,93	0,94		0,93
8	as1-7P (?)	0,965316		0,97	0,97		0,96	0,96				
9	αs1-cn 8p	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	?	1,019481										
11	αs0-cn	1,037372		1,04			1,04	1,04				
12	k-cn 1?	1,067084						1,07				
13	κ-cn 2	1,091452	1,11	1,09								
14	β-cas B	1,106739			1,06		1,08	1,11				
15	k-cn 3?	1,121973					1,11					1,18
16	k-cn 4?	1,138375				1,13			1,14			
17	β-cas A1	1,148827	1,15	1,16	1,16	1,16			1,14		1,18	1,24
18	β-cas A2	1,195988	1,20			1,19	1,18	1,18				1,28
19	breakdown	1,229523		1,21								
20	breakdown	1,25697	1,25	1,29	1,21	1,24	1,24	1,24	1,27	1,27	1,23	
21	breakdown	1,317967	1,30		1,28		1,32					
22	breakdown	1,331208	1,31					1,32				
23	breakdown	1,381415	1,38	1,37	1,36	1,37		1,40	1,36	1,38	1,39	1,38
24	breakdown	1,417871	1,42				1,40	1,51	1,45			1,45
25	breakdown	1,453995	1,49	1,48	1,53	1,43	1,44	1,52	1,52	1,45	1,45	1,52
26	breakdown	1,623273	1,56	1,53		1,59	1,60	1,69	1,61	1,61	1,61	1,61