



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Ultrafiltrering av sur myse - Effekt av forbehandling og filtreringstemperatur

Ultrafiltration of acid whey – Effect of pretreatment
and filtration temperature

Erika Dagsvik

Matvitenskap – Produksjon og utvikling av næringsmidler

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet i samarbeid med forskningsgruppen SciFood og TINE SA, ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU). Gjennomføring av oppgaven har foregått fra januar 2023 til mai 2023.

Det har vært utrolig spennende å jobbe med denne oppgaven våren 2023, og ikke minst vært veldig lærerikt. For meg var det avgjørende å velge en oppgave som innebar en utfordring både i forhold til tema og problemstilling. Det var viktig for meg å jobbe med en oppgave av betydning og mulighet til å bidra til ny kunnskap og forståelse innenfor fagfeltet.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder Anne-Grethe Johansen for god hjelp og konstruktive tilbakemeldinger under arbeidet med oppgaven. Du har alltid vært tilgjengelig for spørsmål og vært en god støttespiller under arbeidet. Takk for alle de gode samtalene om både teori og hverdagslige utfordringer på kontoret ditt, og ikke minst god oppfølging gjennom hele våren 2023. Jeg ønsker også å takke mine biveiledere Tove Devold og Kim Marius Moen for hjelp under skriving, laboratoriearbeid, tolking av resultater og korrekturlesing. Jeg ønsker også å rette en takk til Ahmed Abdelghani, May Helene Aalberg og Kari Olsen for gode samtaler og hjelp med laboratoriearbeid. Dere har alltid bidratt med godt humør og gode diskusjoner rundt arbeidet mitt og gitt meg gode forutsetninger for å trives med laboratoriearbeid under denne perioden. Dette setter jeg utrolig stor pris på. En takk rettes mot Marius Normann og Ola Tjøland for god hjelp ved bruk av utstyr i piloten. En takk rettes også mot Tine Kalbakken for lån av laboratorieversjon av et ultrafiltreringsanlegg og Tine Frya for lån av sur myse til arbeidet og for økonomisk finansiering av Tine.

Til slutt vil jeg benytte anledningen til å takke mine klassekamerater for godt selskap under lunsj og til å spille hverandre gode i perioden med arbeidet. En stor takk rettes til familie for motiverende ord og økonomisk hjelp under hele min studieperiode. Det har vært inspirerende å jobbe så tett med en oppgave og jeg ser frem til å lære enda mer om matfaget videre i jobbtilværelsen. Takk til NMBU for en uvurderlig studietid som har gitt meg mange gode minner og venner for livet.

Sammendrag

Meieriindustrien strever med å finne gode løsninger for bruk av sur myse på bakgrunn av dens syrlighet og sammensetning. Ultrafiltrering av søt myse er utbredt og resultatet av dette er en rekke ingredienser som har blitt viktig i industri, samt blant forbrukere. Produksjon av cottage cheese, kvarg og gresk yoghurt har økt betraktelig de siste årene og dette øker presset på å kunne utnytte sur myse i samme grad som søt myse. Det er gjort få studier på ultrafiltrering av sur myse og de som eksisterer forteller om utfordringer knyttet til fouling. Det vil derfor være hensiktsmessig å finne betingelser som optimaliserer ultrafiltreringen av sur myse.

Formålet med denne oppgaven var å undersøke hvilken effekt forbehandling og filtreringstemperatur har for ultrafiltrering (UF) av sur myse. Forbehandling bestod i pH-justering til pH 3.0 og 7.0 og varmebehandlet ved to ulike temperaturer; romtemperatur og 50°C i 30 minutter, før sentrifugering. Filtreringen ble kjørt til en volumetrisk konsentrasjonsfaktor (CF) 2 og ble utført ved to ulike temperaturer, henholdsvis 10°C og 50°C. For kartlegging av data ble flux registrert under UF i tillegg til kjemiske analyser av fraksjonene før, under og etter UF-prosessen. Studien viste dårlig effekt av UF av sur myse pH-justert til 7.0 da membranen gikk tett tidlig i prosessen, både med og uten sentrifugering som forbehandling. Resultatene fra prosessbetingelsen viste god effekt for filtreringstemperatur under UF hvor det ble observert høyere flux ved bruk av høyere filtreringstemperatur. Varmebehandling før sentrifugering viste effekt for UF av sur myse da varmebehandling ved høy temperatur før sentrifugering viste en forbedret flux. Selv om forbehandling av sur myse viste positiv effekt for filtreringsbetingelsene, ble det ikke observert signifikant forskjell i retentatet ved de ulike metodene.

Studien viste at det fortsatt er behov for flere undersøkelser for hvordan forbehandling påvirker sammensetningen til sur myse, og hvilke komponenter i sur myse som er viktig å ta hensyn til ved valg av prosessbetingelser. En grundigere undersøkelse er derfor nødvendig for å kunne finne gode prosessbetingelser ved UF av sur myse, samt videre utnyttelse av produktet.

Abstract

The dairy industry is struggling to find good solutions for the use of acid whey, based on its acidity and composition. Ultrafiltration (UF) of sweet whey is commonly used in the dairy industry, and the result is several ingredients that have become important in food industry and among consumers. Production of cottage cheese, quark and Greek yoghurt has increased considerably in recent years, and this increases the pressure to be able to utilize acid whey to the same extent as sweet whey. Few studies have been done on UF of acid whey and those that do exist are having problems linked to fouling during UF. It will therefore be appropriate to find conditions that optimize the U of acid whey.

The purpose of this study was to investigate the effect of pretreatment and filtration temperature on UF of acid whey. Acid whey was pH-adjusted to 3.0 and heat-treated at different temperatures; room temperature and 50°C for 30 minutes before centrifugation. The filtration was run to a volumetric concentration factor (CF) of 2 and was carried out at different temperatures, respectively 10°C and 50°C. For data collecting, flux registration was carried out during UF in addition to chemical analyzes of the components before during and after the process. The study showed a poor effect during UF of acid whey pH-adjusted to 7.0 when severe membrane fouling was discovered early in the process, both with and without centrifugation. The results from the process condition showed a good effect for use of filtration temperature during UF where a higher flux was observed when using a higher temperature. Heat treatment before centrifugation showed an effect of UF of acid whey as heat treatment at high temperature before centrifugation showed an improved flux. Although the treatment of acid whey showed an effect for the filtration conditions, no significant difference was observed in the retentate with the various methods.

The study showed that there is still need for more research to be done of how pre-treatment of acid whey affects the composition, and which components in acid whey that are important when it comes to choosing process conditions. A more thorough investigation is therefore necessary to find good process conditions for UF of acid whey and further utilization of the product.

Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i>	<i>I</i>
<i>Sammendrag</i>	<i>II</i>
<i>Abstract</i>	<i>III</i>
1. Innledning og hensikt	1
2. Teori	2
2.1 Melken sammensetning	2
2.2 Myse	3
2.2.1 Sur myse.....	3
2.2.2 Myseproteiner	4
2.2.3 Kalsiumfosfat	5
2.3 Membranfiltrering	6
2.3.1 Effekt for prosessoptimalisering	8
3 Materialer og metoder	10
3.1 Prøvemottak	10
3.2 Forforsøk	10
3.3 Forsøksdesign	11
3.4 Hovedforsøk	12
3.5 Ultrafiltrering	13
3.6 Vasking av membran	14
3.7 Analyser	15
3.7.1 Brix.....	15
3.7.2 Tørrstoffanalyser	15
3.7.3 Proteinanalyser med kjeldahl metoden	16
3.7.4 Kalsium innhold bestemt ved kompleksimetrisk titrering	17
3.7.5 Kapillærelektroforese av fosfat og proteinsammensetning.....	18
3.7.6 HPLC	19
4. Resultater	21
4.1 Forforsøk	21
4.2 Hovedforsøk	27
5. Diskusjon	36
5.1 Forforsøk	36
5.2 Hovedforsøk	40
6. Oppsummering og videre arbeid	46
<i>Litteraturliste</i>	<i>47</i>
<i>Vedlegg</i>	<i>i</i>

1. Innledning og hensikt

Meieriindustrien har lenge hatt utfordringer med å finne gode løsninger på bærekraftig anvendelse og økonomisk lønnsomhet for sur myse. Årsaken til utfordring knyttet til bruk av sur myse, ligger i dens syrlighet og sammensetningen (Rocha-Mendoza et al., 2021). Derimot finnes det flere metoder for anvendelse av søt myse som brukes mye i ultrafiltrering og produserer verdifulle ingredienser som myseproteinkonsentrat (WPC) og myseprotein isolat (WPI) (Walstra et al., 2005). Siden produkter som cottage cheese og gresk yoghurt har økt i popularitet de siste årene resulterer dette også i økt produksjon, som igjen gir økte mengder sur myse. Derfor vil det være viktig å finne gode bruksområder for sur myse slik at avfallsmengden kan reduseres og viktige næringsstoffer utnyttes.

Hensikten med denne masteroppgaven var å undersøke om forbehandling av sur myse hadde en effekt på valgte prosessbetingelser ved ultrafiltrering. For å undersøke effekt av forbehandling ved ultrafiltrering av sur myse ble det benyttet et laboratorie-skala ultrafiltreringsanlegg. Forbehandling bestod av pH justering og varmebehandling før sentrifugering. Videre ble sur myse ultrafiltrert ved to ulike temperaturer, 10°C og 50°C, for å vise hvordan filtreringstemperatur påvirker flux og sammensetning av sluttprodukt. For å kunne se på effekt av valgte prosessbetingelser ble flux studert og mengde protein i retentat undersøkt. I tillegg ble andre undersøkelser som analyse av tørrstoff, kalsium, karbohydrater og organiske syrer undersøkt. Til slutt ble resultatene fra forsøket sammenlignet med tidligere studier for å kunne vurdere oppnådd resultat og videre arbeid.

2. Teori

2.1 Melken sammensetning

Melk og meieriprodukter er på grunn av sin komplekse sammensetning svært næringsrikt og en god kilde til nødvendige næringsstoffer for vedlikehold av god helse (Walstra et al., 2005). Næringsstoffene i melk inkluderer fett, protein, laktose og mineraler som kalsium, magnesium, fosfor, i tillegg til fettløselige vitaminer som A, D, E og K, og vannløselige vitaminer som B12, riboflavin og C (Fox et al., 1998, Kanekanian, 2014). Sammensetning av næringsstoffene i melk kan variere på bakgrunn av faktorer som genetikk, miljø, laktasjonsstadium og fôr (Fox et al., 1998). Gjennomsnittlig sammensetning i fersk melk er presentert i Tabell 1.

Tabell 1. Innhold av vann og ulike næringsstoffer i fersk melk oppgitt i prosent (%) av totalt fersk melk (Fox et al., 1998, Walstra et al., 2005).

Produkt	Vann	Fett	Protein	Lactose	Salter
Fersk melk	87,1	3,3 – 4,7	3,3 – 3,4	4,6 – 4,9	0,7 – 0,8

Melkeproteiner er ikke bare viktige for produksjon av tradisjonelle meieriprodukter, men har også en rekke funksjonelle egenskaper og høy næringsverdi (Walstra et al., 2005). I melk finnes det to hovedkategorier av proteiner hvor kasein tilsvarende rundt 80 %, og myseproteiner tilsvarende opp til 20 % av melkens totale proteininnhold (Fox et al., 1998, Swaisgood, 2007). De ulike typer proteiner innenfor kaseiner er α -s₁, α -s₂, β -kasein og κ -kasein (Fox et al., 1998, Swaisgood, 2007). Myseproteinene består av blant annet β -Laktoglobulin, α -Laktalbumin og proteose-peptoner (Fox et al., 1998, Swaisgood, 2007). Til slutt inneholder melk også blodproteinene serum albumin og imunoglobuliner (Fox et al., 1998, Swaisgood, 2007).

Melkens sammensetning har variert med tiden og dette er et resultat av forandring i fôr og avl av kyr med lavere fettinnhold i melken (Alsaed et al., 2013). De siste 20 årene har det blitt viktigere i avl av kyr med høyere proteininnhold/fett ratio i melka da etterspørselen er konsentrert rundt produkter med høyt proteininnhold (Swaisgood, 2007). Produkter med høyt proteininnhold som har blitt populære er blant annet cottage cheese, kremost og gresk yoghurt, og dette har resultert i økt mengde biprodukter (Ahmad et al., 2019).

2.1 Myse

Global myse produksjon er estimert til 118 millioner tonn, hvor 65 % av dette produseres i Europa, 25 % i Nord-Amerika, og de resterende 9 % andre steder i verden (Spreer, 2017). Det finnes flere fordeler ved å ta i bruk myse til produksjon av mat og ingredienser, blant annet inneholder myse næringsstoffer av høy kvalitet som kan brukes farmasøytisk og som tilsetning i matprodukter (Spreer, 2017). Myse er et biprodukt fra meieriindustrien og produseres i store kvantum på grunn av volumet av melk som er nødvendig for å produsere produkter som ulike typerost og yoghurt (Ganju and Gogate, 2017). Noen av næringsstoffene i myse er laktose, løselige proteiner, mineraler og inneholder også mindre mengder laktat, sitronsyre og nitrogen holdige komponenter som urea- og urin syre (Siso, 1996). Den største delen av næringsstoffer i myse er laktose, hvor opptil 90 % av laktosen i melk overføres til i mysen under produksjon av ost (Prazeres et al., 2012).

Avhengig av hvilken type ost som produseres og enzymene brukt under produksjon kan myse bli klassifisert i to kategorier, søt myse og sur myse (Ganju and Gogate, 2017). Söt myse er produsert fra løpe- eller enzymkoagulerte oster som for eksempel cheddar og gouda og er væsken som blir igjen etter fjerning av fett og kasein (Tarapata et al., 2022). Siden søt myse er et melkeserum oppnådd under enzymatisk koagulering vil mysen i utgangspunktet være fri for kalsium, og det kan ikke danne kalsiumlaktat med melkesyre (Spreer, 2017).

2.2.1 Sur myse

Sur myse er et biprodukt fra produksjon av syrekoagulerte produkter som cottage cheese, kremoster og gresk yoghurt (Tarapata et al., 2022). Generelt har sur myse lavere pH, protein- og laktoseinnhold, mer kalsiumfosfat og melkesyre, sammenlignet med søt myse som vist i Tabell 2 (Siso, 1996, Chandrapala et al., 2015). Ved syrekoagulering vil kalsiumfosfat emigre ut av kaseinmicellen, som resulterer i utfelling av kasein, og kalsium binder seg til laktat (Spreer, 2017). På grunn av den høye mengden melkesyre og lave pH-verdien, kan spraytørring av sur myse være utfordrende, da laktosen i mysen i stor grad finnes i krystallform (Rocha-Mendoza et al., 2021). Dette resulterer i at pulveret klister seg på innsiden av veggene i spraytørkeren (Nishanthi et al., 2017).

Tabell 2. Sammenligning av sammensetning i søt og sur myse basert på pH, proteininnhold, laktoseinnhold og kalsiuminnhold (Fox et al., 1998, Ganju and Gogate, 2017, Tarapata et al., 2022).

	<i>Søt myse</i>	<i>Sur myse</i>
<i>pH</i>	6,00 – 7,00	4,21 – 4,60
<i>Protein (%)</i>	0,80 – 1,00	0,50 – 0,84
<i>Laktose (%)</i>	4,50 – 5,00	3,80 – 4,30
<i>Kalsium (mg/100g)</i>	45	103-140

Ved produksjon av 1 kg syrekoagulert ost, blir 10 L av sur myse produsert (Rocha-Mendoza et al., 2021). I 2019 var 50 % av all yoghurt solgt i USA, gresk yoghurt, noe som resulterer i store mengder sur myse (Rocha-Mendoza et al., 2021). I EU er det estimert 40 millioner tonn sur myse per år, og dette alene fra syrekoagulert osteproduksjon (Zotta et al., 2020, Rocha-Mendoza et al., 2021).

2.2.2 Myseproteiner

Myseproteiner utgjør rundt 20 % av melkens totale innhold av proteiner og består hovedsakelig av β -Laktoglobulin og α -Laktoalbumin, og mindre mengder av serum albumin og immunoglobuliner (Fox et al., 1998). Det som skiller myseproteiner fra kasein, er at myseproteiner er kuleformet og kasein er utstrakte (Walstra et al., 2005). En annen viktig faktor er varmestabilitet, hvor kasein er svært stabile ved høye temperaturer ($>90^{\circ}\text{C}$) (Boland and Singh, 2019). Myseproteiner har høye innhold av sekundære struktur og en mer kompakt tertiær struktur, og blir lett påvirket av høy varme ($>70^{\circ}\text{C}$) (Fox et al., 1998, Swaisgood, 2007). En annen forskjell mellom kaseiner og myseproteiner er deres løselighet, hvor myseproteiner er løselig over et større pH intervall inklusiv pI og kaseiner er uløselige ved pH 4,6 (Walstra et al., 2005, Boland and Singh, 2019).

I native tilstand er myseproteinerens konformasjoner stabilisert av et stort antall svake bindinger. Hvis peptidkjeden utfolder seg, vil dens konformasjonsentropi i stor grad øke, flere grupper blir hydrert, da spesielt peptidbindingene (Walstra et al., 2005). Små endringer i forholdene kan derfor føre til utfoldelse og en slik utfoldelse kalles for denaturering. Denne endringen i konformasjon forvandler et naturlig kuleprotein til et mer eller mindre uordnet protein (Walstra et al., 2005). Denaturerte myseproteiner, spesielt β -laktoglobulin, er mindre løselig og mer

sensitivt til utfelling med kalsium ioner enn i nativ tilstand (Swaisgood, 2007). Myseproteiner er også mer løselig ved lav pH, dersom de ikke har denaturert (Swaisgood, 2007).

Det har blitt mer fokus på helsefordelene ved inntak av myseproteiner (Rocha-Mendoza et al., 2021). Bioaktiviteten til myseproteiner er blitt studert i både dyre- og menneskemodeller, og viser blant annet forbedret fornøyelighet og reduksjon av kronisk sykdomsrisiko (Rocha-Mendoza et al., 2021, Zhao et al., 2022). Av denne grunn har det blitt spesielt viktig å kunne utnytte myseproteinene og finne potensielle bruksområder for sur myse (Rocha-Mendoza et al., 2021).

2.2.3 Kalsiumfosfat

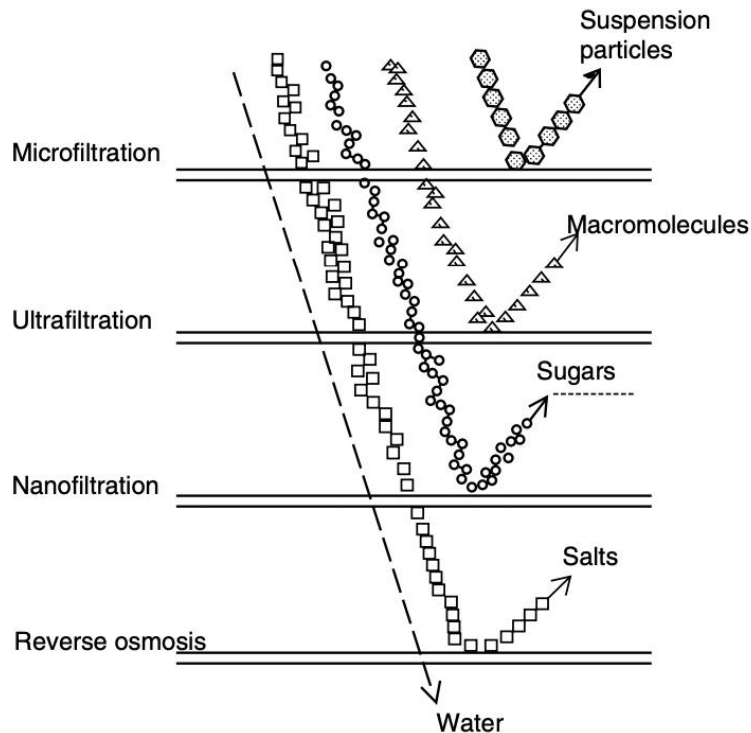
Konsentrasjonen av mineraler i melk kan variere, men er vanligvis rundt 0,7-0,8 %, og faktorer som påvirker mineralsammensetning er rase, individualiteten til kyr, laktasjon, for og sesong (Fox et al., 1998). Sur myse inneholder høyere mengder av mineraler sammenlignet med søt myse, noe som kan skape problemer under konsentrering og tørkeprosesser (Crowley et al., 2019, Rocha-Mendoza et al., 2021). I industrien er utfelling av kalsiumfosfat i utstyr knyttet til en rekke problemer som i varmeplatevekslere (Tanguy et al., 2016). Kalsiumfosfat kan danne avleiringer på den indre overflaten som reduserer varmeoverføring, og fører til trykkfall og økte kostnader i drift og rengjøring (Tanguy et al., 2016).

Kalsiumfosfat har blitt knyttet til membran fouling på grunn av uløselige kalsium salter og som mulige katalysatorer eller brodannende midler mellom membran og proteiner eller selve proteinene (Matzinos and Álvarez, 2002, Ganju and Gogate, 2017). Det har blitt gjort studie (Almécija et al., 2009) på utvikling av metoder for å redusere kalsiumfosfat i sur myse, som viser til en forbedret flux under filtrering ved bruk av 50 kDa membran, ved en kombinerende av CaCl₂ tilsetning, alkalisering og oppvarming. Selv om sur myse med høye mengder kalsiumfosfat fører til utfordringer under membranfiltrering, er det fortsatt en mulighet å utvinne melkemineraler fra sur myse og anvende dem som ingrediens i næringsmiddelindustrien (Crowley et al., 2019).

2.2 Membranfiltrering

Membranfiltrering basert på separasjon har opplevd en sterk vekst de siste årene da membranteknologi har spilt en viktig rolle i å redusere forurensing fra næringsmiddelindustrien (Guo et al., 2012). Membranfiltrering er en prosess hvor en væske splittes i to separate væsker som inneholder ulike komponenter, ved hjelp av en semipermeabel membran (Walstra et al., 2005). Væsken som passerer membranen kalles permeat, og den gjenværende væsken som holdes igjen kalles retentat (eller konsentrat) (Walstra et al., 2005). Slik begrepet brukes i dag, kan membraner være porøse eller ikke-porøse, polymere eller uorganiske (Sutherland and Chase, 2011). I løpet av de siste årene har membranteknologi blitt benyttet i mange industrielle sektorer, inkludert kjemisk, petrokjemisk, mat- og drikkeforedling, farmasøytiske produkter og spesielt behandling av vann (Sutherland and Chase, 2011). De kan brukes til en rekke separasjoner, inkludert faste stoffer fra væske, væsker fra væsker og gasser fra gasser, men spesielt er det filtrering av mikrometer og submikrometer fra væsker og gasser hvor membraner har vist sin verdi i filtreringsbransjen (Sutherland and Chase, 2011).

En vellykket separasjon av komponenter avhenger først og fremst av strukturen og sammensetningen av membranen. Disse kan klassifiseres i tre kategorier: naturlige membraner (cellulose), syntetiske membraner (polyolefiner, polyester, fluorpolymerer) og uorganiske membraner (keramikk) (Sutherland and Chase, 2011). Basert på størrelse på membraner finnes det 4 ulike teknikkene innenfor membranfiltrering. Disse er omvendt osmose (RO), nanofiltrering (NF), ultrafiltrering (UF) og mikrofiltrering (MF) (Walstra et al., 2005). Klassifisering for separeringsprosesser er basert på partikkel eller molekyl størrelse, som vist i Figur 1 (Cheryan, 1986).



Figur 1. Metoder for membranfiltrering, og eksempel på komponenter som separeres under prosessen (Ibarz and Barbosa-Cánovas, 2002).

Figur 1 viser eksempler på komponenter som faller under disse fire prosessene. Siden membraner klassifiseres etter størrelse på separerte partikler, blir partikkel størrelse spesifisert i mikrometer (μm) (Cheryan, 1986). Ved RO brukes en membraner med porestørrelse på $>0,002 \mu\text{m}$, og trykk 15-150 bar, som hovedsakelig bare tillater vann å passere membranen (Wagner, 2001). Ved NF brukes en membraner med porestørrelse $>0,002 \mu\text{m}$, og trykk 5-35 bar, og avviser ioner med mer enn en negativ ladning, og dermed passerer enkeltladede ioner (Wagner, 2001). Dette har vist seg å være kostnadseffektivt sammenlignet med RO dersom moderat saltfjerning er akseptabelt, da strømforbruket er redusert som reduserer kostnadene ved drift (Wagner, 2001). UF er en prosess som tillater partikler mindre enn $0,2 - 0,02 \mu\text{m}$ å passere membranen, med trykk fra 1-10 bar (Wagner, 2001). Partikler som passerer membranen er lav molekylvekt komponenter som salter, mono- og disakkarider, aminosyrer, organiske og uorganiske syrer, mens komponenter med høyere molekylvekt som proteiner holdes igjen i retentatet (Wagner, 2001). Den siste av filtreringsteknikkene er MF, og her kan partikler mindre enn $4 - 0,2$ passere membranen, ved et trykk på <2 bar (Wagner, 2001).

Generelt kreves det mye energi å separere eller konsentrere et materiale. Derimot krever en separasjonsprosess ved bruk av membraner liten energi og derfor har denne teknologien blitt viktig (Ibarz and Barbosa-Cánovas, 2002). Under membranfiltrering er drivkraften for separasjon en hydrostatisk trykkforskjell over membranen og dette kalles transmembrantrykk (TMP) (Walstra et al., 2005). TMP defineres som mengden kraft som er nødvendig for å presse væske gjennom en membran (Walstra et al., 2005). Dersom en rask økning i TMP under filtrering eller reduksjon av flux ved konstant trykk oppdages, skyldes dette fouling (Yusuf et al., 2019). Fouling kan klassifiseres som reversibel og irreversibel og oppstår ved oppsamling av partikler eller konsentrasjonspolarisering ved membranoverflaten (Guo et al., 2012). Fouling er en begrensende faktor under membranfiltrering og myseproteiner er en faktor som begrenser konsentrasjon og fraksjonseffektiviteten (Steinhauer et al., 2015).

En tidligere studie (Konrad et al., 2012) viser at ultrafiltrering av sur myse er spesielt vanskelig, på grunn av fouling knyttet til utfelling av kalsiumfosfat, høy konsentrasjon av mineraler, laktat innhold, som resulterer i uløselighet av noen myseproteiner. Under studien ble det vist at flux under ultrafiltrering av direkte avhengig av pH (2,5-4,5), og ved lavere pH (<3,9) økte permeat fluxen, og var ufiltrerbar ved pH 4,6 (Konrad et al., 2012). I tillegg til pH er det mange andre faktorer som kan påvirke fouling, som membrantype (overflate, hydrofobitet, ladning og molekylvektgrense), sammensetning av væske, temperatur og hydrodynamiske forhold (Guo et al., 2012). For å kunne optimalisere membranfiltrering er det derfor svært viktig å undersøke faktorene som påvirker membranytelsen.

2.3.1 Effekt for prosessoptimalisering

Under ultrafiltrering er det ulike parametere å kontrollere under drift. Et av disse er trykk og holdes konstant eller blir justert noe for at et filteringsanlegg skal ha en viss form for kontroll (Wagner, 2001). I ultrafiltreringsanlegg blir trykk kontrollert for å forsikre at trykket ikke stiger over maksgrense og for å ikke overstige kapasitet (Wagner, 2001). Et ultrafiltreringssystem bør ha en fornuftig stabil flux og bør holde energibruk så lav som mulig (Wagner, 2001). For å kunne holde energibruken så lav som mulig, bør prosessen optimaliseres etter flux, trykk og temperatur (Wagner, 2001). Temperatur er en viktig faktor som påvirker flux ved ultrafiltrering og høyere temperatur gir høyere flux. Derimot vil høyere temperatur føre til flere problemer basert på sammensetningen til det som filtreres da det kan forekomme bakterievekst under rette forhold (Wagner, 2001). Ved filtrering av produkter som inneholder kalsium salter vil økende

temperaturer føre til utfelling som resulterer i reduksjon i flux (Wagner, 2001). Membranfiltrering av myseproteiner utføres vanligvis på temperaturer $<15^{\circ}\text{C}$ eller $>50^{\circ}\text{C}$, derimot er det gjort få studier på fouling med myseproteiner knyttet til temperatur (Steinhauer et al., 2015).

3 Materialer og metoder

3.1 Prøvemottak

Sur myse fra cottage cheese produksjon ble levert av Tine Meieriet Frya, opptil 3 virkedager fra forsendelse til ankomst ved NMBU. Alle leveransene med sur myse ble pasteurisert (ukjent produsent, type alfa laval, Landteknikk, Oslo) ved mottak i Pilotanlegget i Meieribygget ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Pasteurisering av myse foregikk ved 72°C i 15 sekunder, og ble oppbevart på kjølerom ved 4°C før videre behandling. Den sure mysen ble filtrert ved Tine Frya for å fjerne ostestøv før videre forsendelse. All filtrering ble gjennomført innen 1 uke etter mottak av sur myse.

3.2 Forforsøk

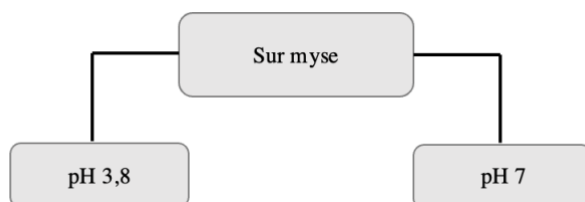
De ulike pH verdiene for forforsøket var 3.0 3.8, 4.5, 6.2 og 7.0 og 9.0 og det ble benyttet 1 M HCl (Emsure®, Germany) og 1 M NaOH (Emsure®, Germany) ved pH justering. To paralleller med totalt 6 falconrør (15 mL CELLSTAR® Polypropylene Tube, Greiner Bio-One International BmbH, Germany) med 10 mL sur myse per pH verdi ble preparert, under omrøring ved tilsetning av 1 M HCl eller 1 M NaOH. Ved måling av pH (PHM 92 LAB pH meter METERLab™, Radiometer Analytical S.A, Lyon, Frankrike). Alle prøvene ble sentrifugert ved 3,000 g 4°C i 10 minutter. Prøvene ble analysert for protein- og kalsiuminnhold i supernatant.

For måling av proteininnhold ble The Thermo Scientific™ Micro BCA™ Protein assay kit fra ThermoFisher Scientific brukt. Denne metoden brukes for å bestemme proteinkonsentrasjon, ved bruk av spektrofotometri. Etter sentrifugering ble prøvene fortynnet med destillert vann til 1:500, 1:1000 og 1:2000. En standardkurve ble laget for ulike konsentrasjoner av bovint serum albumin (BSA).

For metode ble prosedyre fra Micro BCA Protein Assay Kit fulgt (ThermoFisher). For absorbanmålingen ble et spektrofotometer (UV-1280, Shimadzu, Japan) brukt. For å beregne proteinkonsentrasjon i prøvene, ble resultatene fra absorbanmålingen av standardkurven satt inn i en funksjon som ble brukt til å beregne konsentrasjonen.

For bestemmelse av kalsiuminnhold i supernatant ved pH 3.0, 3.8, 4.5, 6.2, 7.0 og 9.0 ble metoden for kalsium titrering brukt, og metoden er beskrevet i kapittel 3.7 Analyser, under delkapittel 3.7.4 Kalsium innhold bestemt ved kompleksimetrisk titrering.

Videre ble sur myse med pH 3.8 og 7.0 ultrafiltrert ved 50°C som vist under i Figur 2



Figur 2. Ultrafiltrering av pH-justert sur myse i forforsøk.

Ultrafiltreringen foregikk ved en små skala ultrafilteringsanlegg lånt av TINE Kalbakken. Under ultrafiltrering er en 30 kDa membran (Pellicon® XL50 with Biomax® 30 kDa Membrane, A screen, 50 cm²) brukt, og membranen er oppgitt å være stabil i pH området pH 1.0 til 14. Som et resultat av tett membran ved pH 7.0, ble denne erstattet med pH 3.0. Siden litteratur viser til en økning i flux ved lavere pH, og sur myse er ikke filterbar mellom pH 4-5, ble det besluttet å bruke pH 3.0. Forsøket ble utført en runde med pH 3.8 og 3.0. For videre oppsett til hovedforsøk ble det besluttet å sentrifugere mysen for å kunne fjerne bunnfall som hemmer filtreringen.

3.3 Forsøksdesign

Sur myse ble forbehandlet ved 4 ulike varianter som bestod av justering til pH 3.0 og/uten varmebehandling. Forforsøket foregikk i laboratoriet i 2 etasje Meieribygnning ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Forsøksdesignet er vist i Tabell 3 under.

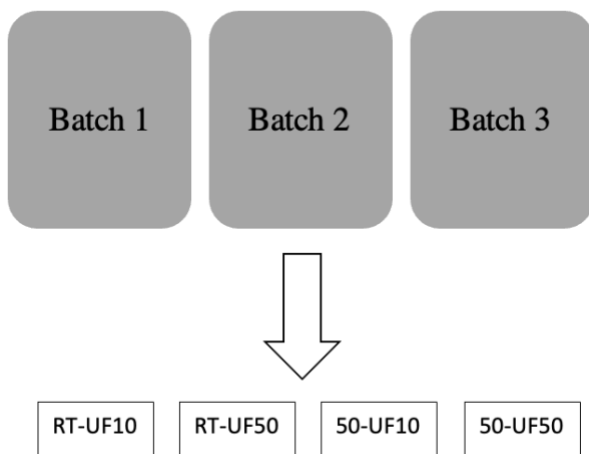
Tabell 3. Forsøksdesign til hoved forsøk. Ultrafiltreringen ble utført i 3 forskjellige batcher, og i randomisert rekkefølge.

Kode	pH	Forbehandling	Temperatur (°C) ultrafiltrering
RT-UF50	3	-	50
RT-UF10	3	-	10
50-UF50	3	50°C i 30 minutter	50
50-UF10	3	50°C i 30 minutter	10

Det ble opprinnelig inkludert pH 7.0 i forsøksdesignet, men dette ble fjernet da pH 7.0 viste seg å tette membranen under ultrafiltrering. Faktorer som ble sett nærmere på er hvordan varmebehandling påvirker myseproteinene og kalsiumfosfat, og om dette vil felle ut under sentrifugering. Videre ble det undersøkt om temperatur under ultrafiltrering har en effekt på flux og proteinkonsentrasjon i retentat.

3.4 Hovedforsøk

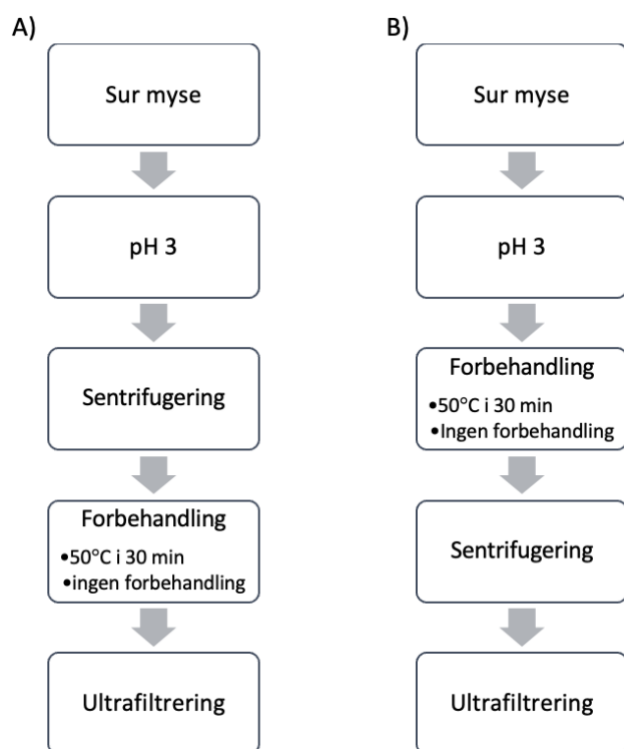
Under hovedforsøket ble det levert tre batcher med sur myse fra TINE Frya. Hvorav en batch ble fordelt på fire 1 liters flasker som ble brukt til filtrering. Ved ultrafiltrering ble 2 betingelser benyttet, forbehandling før ultrafiltrering og filtreringstemperatur som vist i Figur 3.



Figur 3. Prosessbetingelser for ultrafiltrering.

Koder for ultrafiltrering er markert som RT/50, som betyr hvilken forbehandling som er valgt for sentrifugering. RT står for romtemperert og 50 står for 50°C. UF10/UF50 er koder for hvilken temperatur (10°C og 50°C) benyttet under ultrafiltrering.

Batch 1 ble pH justert og sentrifugert (Avanti®, JXN-26, USA) ved 3,000 g i 10 minutter ved 20°C, og varmebehandlet i vannbad ved 50°C i 30 minutter før filtrering. Batch 2 og 3 ble sentrifugert ved 3,000 g i 10 minutter ved 20°C etter pH justering til 3.0 og varmebehandling, for å kunne se om dette har en effekt på filtreringen. pH justert myse ble veid (Mettler PJ300, Switzerland) i 250 mL sentrifugekopper (Nalgene™, PPCO). Figur 4 under viser fremgangsmåte for batch 1, 2 og 3.



Figur 4. Viser oppsett for forsøk. A viser forbehandling ved batch 1, og B viser forbehandling for batch 2 og 3.

3.5 Ultrafiltrering

Ultrafiltreringsanlegget manglet temperaturkontroll og automatisk innstilling for trykk. For å holde temperaturen rundt 50°C under filtreringen ble det benyttet et vannbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH d 3006 burgwedel, type 1002, Germany). Ved 10°C ble vannbadet fylt med is for å opprettholde en temperatur på 10°C gjennom hele filtreringsprosessen. For å overvåke temperatur ble det samme kalibrerte termometeret brukt ved hver filtrering. Trykk og hastighet ble manuelt kontrollert og det ble forsøkt og holde et konstant trykk for alle filtreringer, men hastigheten varierte.

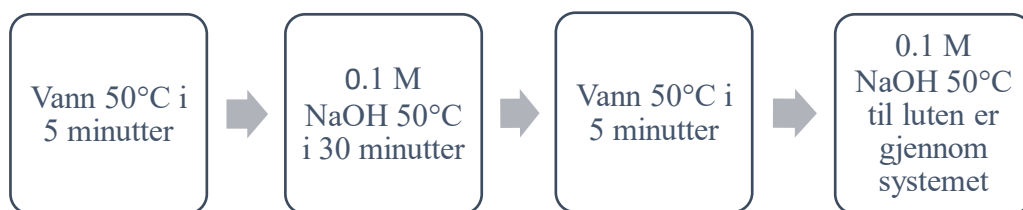


Figur 5. Ultrafiltreringsanlegg brukt under studien.

Figur 5 viser ultrafiltreringsutstyr brukt under forforsøk og hovedforsøk og består av manuell innstilling for trykk og hastighet. En 30 kDa membran (Pellicon® XL50 with Biomax® 30 kDa Membrane, A screen, 50 cm²) ble brukt for alle filtreringer og konsentrasjonsfaktoren (CF) var 2. Tiden ble notert kontinuerlig under filtreringen og flux (mL/15minutt) ble målt. Permeatet ble samlet i en målesylinder på 250 mL for å kunne senere beregne flux.

3.6 Vasking av membran

Før ultrafiltrering ble det kjørt gjennom 500 mL vann før start av ultrafiltrering for å fjerne NaOH i ultrafiltreringsanlegget. Etter ultrafiltrering ble en vaskerutine utført for å gjenopprette membran permeabilitet. Ultrafiltrering av 500 mL vann ved 50°C, fulgt av 0.1 M NaOH ved 50°C i 30 minutter, fulgt av en ny runde med 200 mL vann ved 50°C. Vasken avsluttes med å fylle rørene med 0.1 M NaOH ved å kjøre gjennom filtrering på 5 minutter og rørene ble lagt i 0.1 M NaOH under lagring til neste filtrering for å hindre mikrobiell vekst. Denne vaskerutinen ble utført etter ultrafiltrering og er vist i Figur 6 under.



Figur 6. Flytskjema for vaskeprosedyre av ultrafiltreringsanlegg.

For å kontrollere tilstrekkelig vask ble det utført en måling av flux ved ultrafiltrering av vann. Dette ble utført ved å ha permeat flowen i en 250 mL målesylinder ved tilnærmet inlet trykk 2.5 og outlet trykk 2.0. Tiden for å fylle 10 mL vannflux i målesylinder ble notert.

3.7 Analyser

Analyser til hovedforsøk ble foretatt ved Forskningslaboratorium for Meieriteknologi og Matkvalitet ved fakultetet KBM. Alle prøver ble vendt om før prøveuttak for å sikre homogene prøve til analyse. Foruten pH, kalsium og tørrstoff, ble prøvene nedfrost før analyse. All pH justering (PHM 92 LAB pH meter METERLab™, Radiometer Analytical S.A, Lyon, Frankrike) er utført på sur myse og pH meter var kalibrert før bruk med standardløsningene pH 4.01 og pH 7.00 før bruk.

3.7.1 Brix

For batch 2 og 3 ble brixmålinger (Milwaukee, MA885 Wine Refractometer) utført hvert 15 minutt på retentat og permeat. Det ble også registrert brix av supernatant før ultrafiltrering. 1 °Brix er det samme som 1 % sukker, og er mengde sukker fordelt i væsken (Jaywant et al., 2022).

3.7.2 Tørrstoffanalyser

For å analysere tørrstoffinnhold i prøvene sur myse, supernatant, retentat og permeat ble en metode fra meierienes analysehåndbok (IDF, 1987) benyttet. For tørrstoffanalyse av bunnfall ble en modifisert metode brukt, da prøvemengden var for lav. Først ble en tom aluminiumsskål veid (Entris224-1S, Sartorius AG, Germany), og notert med fire desimaler. En parallell med

0.5 – 0.3 gram bunnfall ble veid inn, og vekten notert. For videre fremgangsmåte ble metoden fra meierienes analysehåndbok brukt. For utregning av tørrstoff ble Formel 1 benyttet.

$$\% \text{ Tørrstoff} = \frac{\text{Vekt tørr prøve} - \text{vekt skål}}{\text{Vekt våt prøve} - \text{vekt skål}} * 100$$

Formel 1. Utregning av tørrstoff (%) i prøver.

3.7.3 Proteinanalyser med kjeldahl metoden

Analyser ved kjeldahl metoden ble brukt for å bestemme proteininnhold i sur myse, supernatant, bunnfall, retentat og permeat. Analysene bestod av total nitrogen (TN) og ikke-protein nitrogen (IPN), og formålet var å undersøke proteininnhold ved ulik behandling før og under ultrafiltrering av sur myse. Alle prøvene ble fryst ved -18°C, og tint i vann før analyse.

Total nitrogen (TN) er et mål på totalt nitrogeninnhold i prøven, inkludert både protein og ikke-protein nitrogen. Ikke protein-nitrogen (IPN) er nitrogen som ikke er bundet til proteiner. For å beregne proteininnhold i de ulike proteinene ble proteinfaktor 6.38 brukt. Proteinfaktoren er en omregningsfaktor basert på innholdet av nitrogen i proteinet. For å beregne innholdet av protein ble ikke protein-nitrogen (IPN) trukket fra total nitrogen (TN), multiplisert med proteinfaktor 6,38. Prøveopparbeidelsen og metode for analysen ble fulgt i henhold til IDF 020-5:2001 (IDF, 2001b) for TN, og 020-4:2001 (IDF, 2001a) for IPN. To blanke prøver og tre rør med 0.5 gram skummetmelk ble brukt som kontroll ved hver runde med 3 paralleller av TN og IPN. Prøvene ble veid (Mettler PAE260 DeltaRange®), og til slutt ble hvert rør tilsatt 1 Kjeldahl tablett (Kjeltabs Auto-AA11, Thompson and Capper Ltd.) og 3 mL H₂SO₄ (svovelsyre). Oppslutning av prøver ble utført i oppslutningsblokk med avsug i avtrekkskap (Tecator™ Digestor Auto 20, S.nr. 535940608, Foss, Höganäs, Sverige, 2007). Etter oppslutning ble prøvene avkjølt 1 time til romtemperatur. Under titrering ble det brukt en Kjeltec (Kjeltec™ 8400 Analyzer Unit, S.nr. 520041194, Foss, Höganäs, Sverige, 2009), og svaret fra maskinen er oppgitt i titer (mL). Etter titrering ble prøvesvar brukt for å beregne TN og IPN:

$$\frac{\text{Titreringsvolum (mL)} \times 0,07}{\text{Vekt prøve (g)}} = \% \text{ Total nitrogen}$$

$$\% \text{ Total nitrogen} \times 6,38 = \% \text{ protein}$$

$$\frac{\text{Titreringsvolum (mL)} \times 0,07 \times \text{Vekt av S}}{\text{Vekt av P} \times \text{Vekt av L}}$$

Formel 2. Utregning av total nitrogen-protein og ikke nitrogen-protein.

IPN trekkes fra TN for å finne totalt proteininnhold, da eksempelvis urea vil kunne registreres som protein ved kjeldahl metoden.

3.7.4 Kalsium innhold bestemt ved kompleksimetrisk titrering

For bestemmelse av kalsium i prøvene ble en metode for kalsiumtitrering) ved EDTA av Visser (Visser, 1976) benyttet. Til kalsiumtitrering ble en titreingsmaskin (876 Dosimat plus, Metrohm, Switzerland benyttet og det var behov for bufferløsning og EDTA, som ble lagd på forhånd. Bufferløsningen bestod av en 1:6 blanding av 1 M NH_4Cl (Emsure®, Germany) og 1 M NH_4OH (Emsure®, Germany), og denne ble laget i avtrekkskap. Bufferløsningen ble kontrollert ved å måle pH, da pH i denne skulle være 10.2. For tillaging av EDTA ble 4.00 gram di-sodium-dihydrogensalt (Emsure®, Germany), 0.5 gram NaOH blandet med eksempelvis 3-400 mL destillert vann. Videre ble 0.1 gram MgCl_2 tilsatt, og fortynnet med destillert vann opp til 1000 mL. For å kvalitetssjekke EDTA løsningen ble det foretatt en sjekk hvor standardløsning med 1 mL CaCO_3 (Emsure®, Germany) skulle korrespondere med 1 mL EDTA. For å lage standardløsning ble 1.0 gram CaCO_3 løst i en liten mengde saltsyre (HCl), og nøytralisert med NH_4OH til en liten alkalisk reaksjon med lakmus. Totalt volum med 1000 mL destillert vann ble tilsatt, og endelig løsning tilsvare 1 mg CaCO_3 eller 0.4 mg Ca^{++} .

For analyse av kalsium ble 5 mL prøve tilsatt en 50 mL Erlenmeyerkolbe, sammen med 10 mL bufferløsning og 40 mL destillert vann. Noen få korn av Erchromblack T ble tilsatt, og aluminiumsfolie bukes for å dekke åpningen, og Erlenmeyerkolben ble satt i varmt vannbad i 2 minutter. Totalt 3 paralleller ble laget med unntak av bunnfall prøven. Til slutt ble alle prøvene titrert med EDTA.

3.7.5 Kapillærelektroforese av fosfat og proteinsammensetning

Bakgrunns elektrolytt brukt ved kapillær elektroforese (Aligent, G1600AX, Germany) ble preparert med 12 mM 2,6-pyridinedikarboksylik syre (PDC) og 0.55 mM CTAB (Sigma®, China), omregnet til 0.2005 gram PDC (Sigma®, China) og 0.0200 gram CTAB per 100 mL milli-Q-vann, veid inn (Entris224-1S, Sartorius AG, Germany). pH i buffer ble justert til 3 med 1 M NaOH, og deretter satt til omrøring ved vendemaskin (Weg, Germany) for å løse opp pulveret. Til slutt ble bufferen filtrert gjennom et 0.45- μ m filter. Før kjøring av prøver ble kapillæren preparert med 0.1 M NaOH i 10 minutter, fulgt av vann i 10 minutter og buffer i 10 minutter. Prøvene ble injisert hydrodynamisk i 5 p.s.i. i 2 sekunder. Separasjonen ble utført ved -25 kV og bølgelengde for indirekte UV-deteksjon var 230 nm.

Alle prøvene var fryst og tint i vann før analyse. Prøvene ble preparert i ependorfrør (Microtubes MCT-200-C, Axygen®, Mexico) med 24 μ L tilsatt prøvemengde, sammen med 976 μ L milli-Q-vann. Prøvene ristet ved vortex og sentrifugert (Micro star 17, VWR, Germany) ved 16.000 G i 1 minutt for å felle ut partikler som kan blokkere kapillæren.

Tabell 4. Fosfatkonsentrasjon i standardkurve

Navn	Fortynning	Vann (mL)	Konsentrasjon fosfat per/L
C1	0.156 fosfat	1000	0.156
C2	50 mL C1	50	0.078
C3	50 mL C2	50	0.039
C4	50 mL C3	50	0.02
C5	25 mL C3	75	0.01

For å kunne beregne fosfat konsentrasjon i prøvene ble det utarbeidet en standardkurve. Denne standardkurven ble laget ved å tilsette 0.156 gram fosfat til 1 liter destillert vann, for å få en konsentrasjon på 0.156 gram fosfat per liter. For videre utarbeidelse av standardkurven, se Tabell 4 over. For å beregne fosfatkonsentrasjon i prøvene ble resultatene fra CE av standardkurven satt inn i en funksjon som ble brukt til å beregne konsentrasjonen.

Fremgangsmåte for kapillærelektroforese av fosfat er basert på metoden beskrevet av Izco med noen endringer (Izco et al., 2003).

Ved bestemmelse av proteinsammensetning med bruk av kapillærelektroforese (CE) ble metoden noe modifisert (Heck et al., 2008). 600 µL med prøve ble blandet sammen med 300 µL runbuffer. Prøven ble oppbevart i romtemperatur i en time før den ble sentrifugert i 5 minutter ved 5,000 g, og filtrert med 0.45 µm membranfilter (Millex, Carrigtwohill, Ireland), for å fjerne fett. For preparering av runbuffer, se fremgangsmåte i Heck (2008). Ved preparering av bunnfallprøve ble 0.200 gram veid opp og blandet sammen med 300 µL runbuffer. CE analysen ble utført på Aligent kapillærelektroforese system kontrollert av Aligent Chemstation software (ersjon B.03.02(341)) (Aligent Technologies) med dimensjonene 50 µm i.d. og 56 cm.

Alle prøvene ble injisert med et trykk på 34.5 mbar i 20 sekunder og UV deteksjon var utført ved 240 nm. Kapillæren ble vasket med 0.1 M NaOH i 5 minutter fulgt av vasking med runbuffer.

3.7.6 HPLC

For analyse av organiske syrer og karbohydrater ble high performance liquid chromatography (HPLC) benyttet, en modifisert metode av (Grønnevik et al., 2011). Alle prøvene er analysert etter fryst ved -18°C.

Prøvene ble blandet godt før 1.0 gram ble veid (Entris224-1S, Sartorius AG, Germany) inn i et 10 mL. 2.5 mL ionebyttet vann, 200 µL 0,5 M H₂SO₄ og 8 mL acetonitril (Merck) ble tilsatt rørene, før en vendingsmaskin (MultiRS-60 BIOSAN) i 30 minutter. Prøvene ble sentrifugert i 15 minutter i romtemperatur ved 1,470 g i en Kubota 2010 (Kubota Corporation, Tokyo, Japan). Etter sentrifugering ble supernatanten filtrert med 0.2 µm PTFE membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC rør. HPLC instrumentet Agilent Technologies 1260 Infinity II (Aligent Technologies, Singapore) ble brukt under analysering, bestående av pumpe (Agilent Technologies), autosampler (Aligent Technologies), kolonneovn (Aligent Technologies), UV detektor (Aligent Technologies), og RI-detektor (Aligent Technologies). For videre behandling ble 25 µL av prøven injisert og separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Prøvene ble først kjørt gjennom en forkolonne av typer Cation-H refill (Bio Rad Laboratories) ved en temperatur på 32°C.

Hastigheten under den mobile fasen var satt på 0.4 mL/min, og det ble benyttet 5 mM H₂SO₄ (Merck).

For kalibrering ble en standardløsning benyttet og dette ble preparert på samme måte som prøvene. Kvantifisering på bakgrunn av retensjonstid og komponentene ble sammenlignet med standardløsningen. Under HPLC ble karbohydratene laktose, maltose, fruktose, galaktose og glukose (Merck), og av organsike syrer ble urinsyre, eddiksyre, orotinsyre, sitronsyre, ravsyre, pyrodruesyre, maursyre, melkesyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsning. En DAD-UV detektor ble brukt til analyse av organiske syrer, og en RI-detektor ble brukt til analyse av karbohydrater.

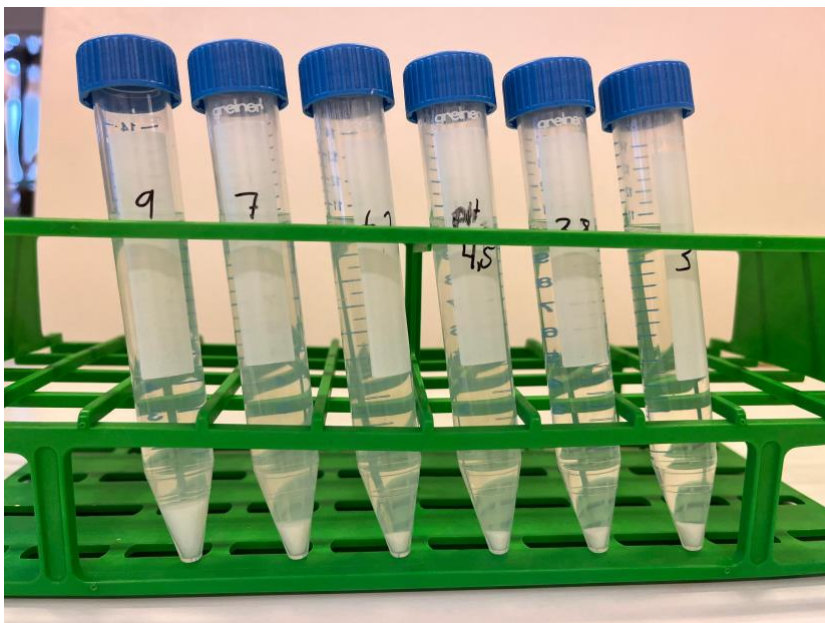
4. Resultater

I dette kapitlet er resultater fra forforsøk og hovedforsøk fremstilt. Studien er basert på et innledende forforsøk hvor resultatet var grunnlag for valg av betingelser under hovedforsøk. I forforsøket ble effekten av å justere pH i sur myse vist. Forforsøket kartla hvordan proteiner og kalsium fordelte seg i bunnfall og supernatant etter pH justering og sentrifugering. På bakgrunn av resultatene i forforsøket, ble sur myse justert til pH 3.0 i hovedforsøket. I tillegg ble det sett på effekten av temperering før filtrering og filtreringstemperatur. Ulike registreringer og kjemiske analyser før, under og etter ultrafiltreringer (UF) ble gjennomført for å kunne vurdere effekten av valgte prosessbetingelser på UF av sur myse.

4.1 Forforsøk

I forforsøket ble det undersøkt hvilken effekt pH-justering og sentrifugering har på innholdet av kalsium og protein i supernatant av sur myse. Til slutt ble en ultrafiltrering av sur myse gjennomført ved to ulike pH-verdier for å kunne undersøke om pH-justering påvirker effektiviteten av UF. Basert på sentrifugeringsforsøket og analyse av kalsium og protein, ble det valgt å bruke pH 3.8 og 7.0 ved UF av sur myse i forforsøket. Prosessen for UF foregikk ved 50°C til en volum-konsentrasjonsfaktor 2.

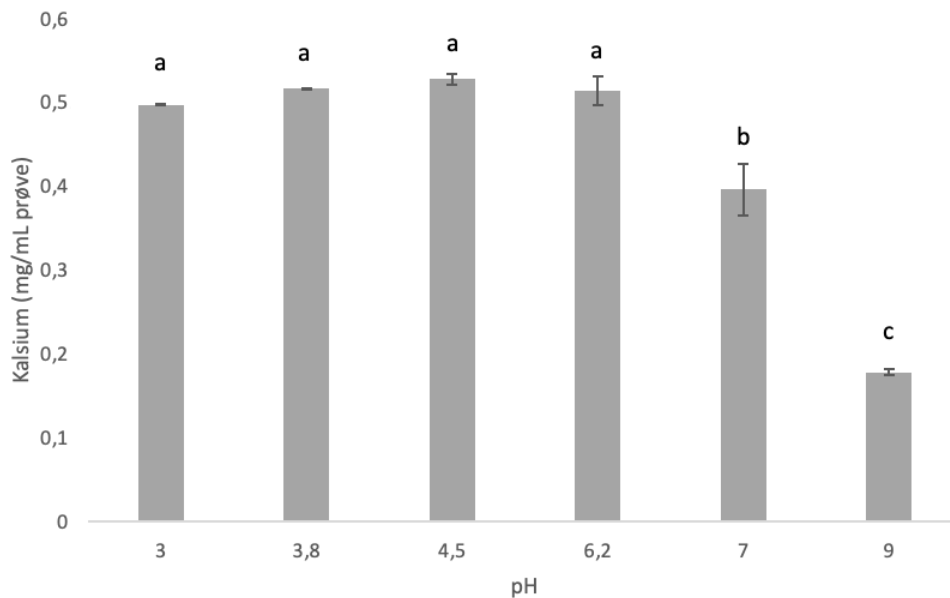
Sur myse ble pH-justert til ulike pH-verdier og sentrifugert som vis i Figur 7 under.



Figur 7. Sentrifugert sur myse ved pH 9.0, 7.0, 6.2, 4.5, 3.8 og 3.0.

Prøvene i Figur 7 viser observert mengde bunnfall for pH-justert sur myse. Figuren viser høyere innhold av bunnfall i sur myse pH-justert til 9 og det ble observert mindre mengde bunnfall i pH 6.2, 4.5, 3.8 og 3.0.

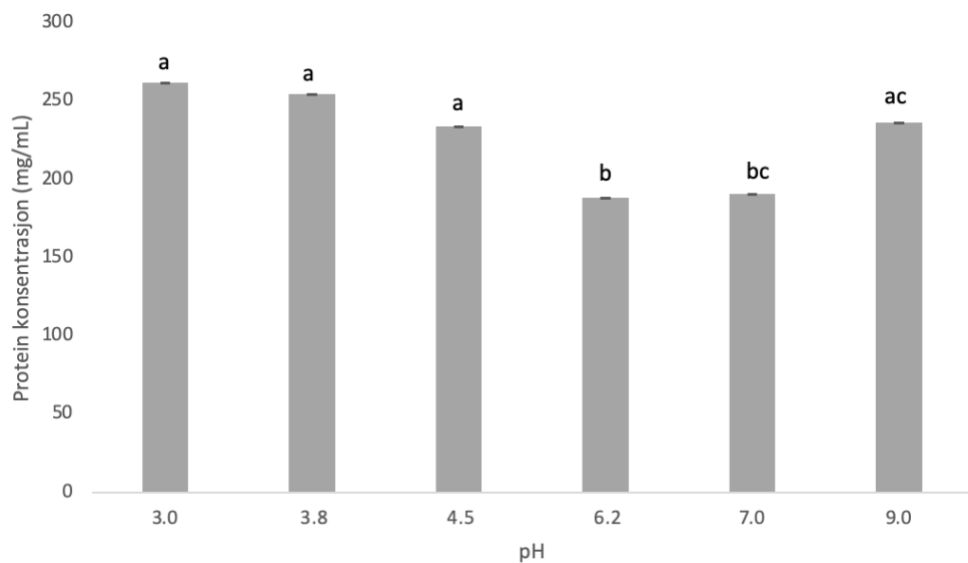
Etter sentrifugering av pH-justert sur myse ble supernatanten analysert for innhold av kalsium, og resultatet er fremstilt i Figur 8.



Figur 8. Kalsiumkonsentrasjon i supernatant etter sentrifugering av sur myse justert til pH 3.0, 3.8, 4.5, 6.2, 7.0 og 9.0 (n=2). Standardavvik er illustrert på toppen av stolpene, og ulik bokstav viser signifikant forskjell ($p < 0.05$).

Figur 8 viser kalsiumkonsentrasjon i supernatant, hvor pH 9.0 og 7.0 inneholder signifikant mindre kalsium sammenlignet med de øvrige prøvene. For sur myse justert til pH 3.0, 3.8, 4.5 og 6.2 har ingen signifikant forskjell.

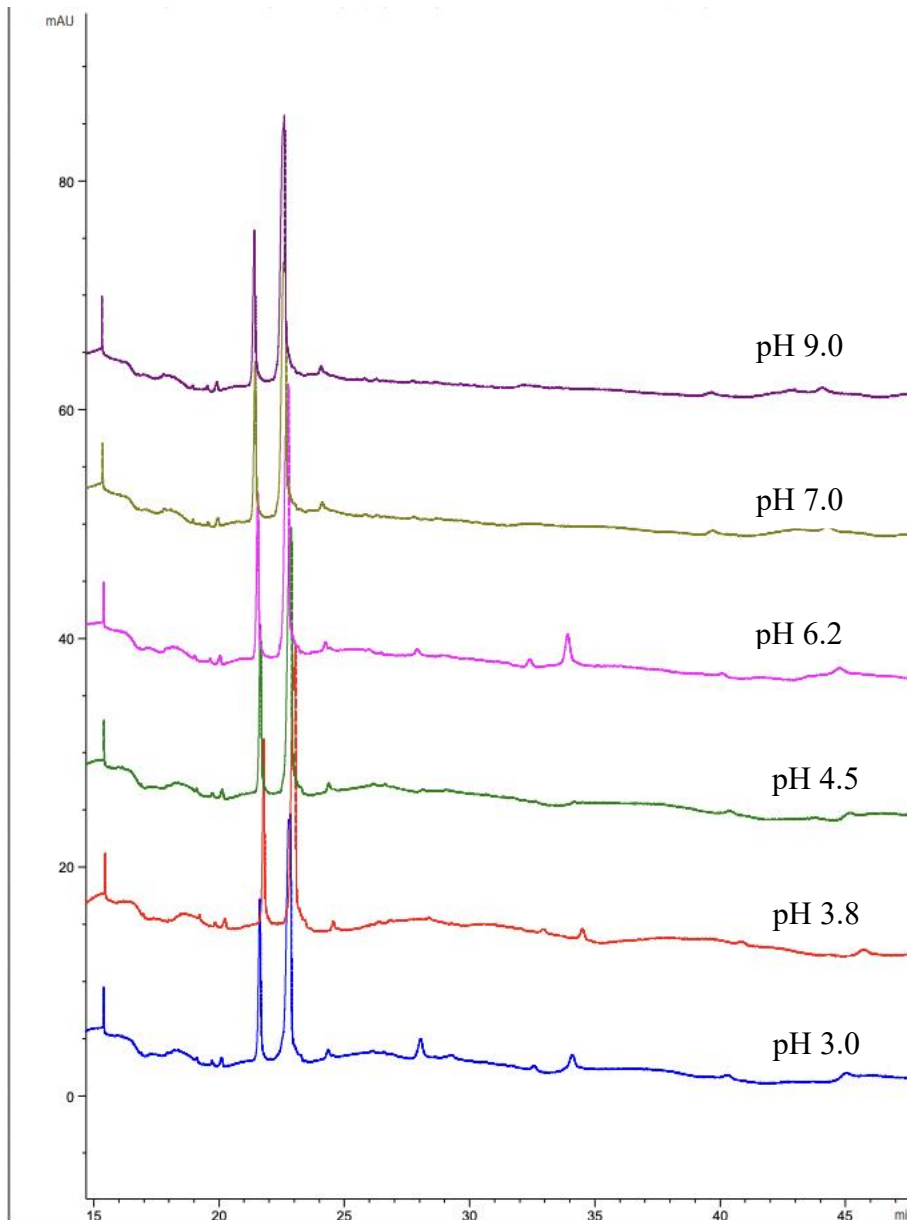
Proteinkonsentrasjon i sur myse etter pH-justering ble målt med BCA metoden. For utregning av proteinkonsentrasjon ble standardkurven og absorbansverdiene i vedlegg 1 benyttet. Resultatene er gjengitt i figur 9 under.



Figur 9. Proteinkonsentrasjon i supernatant ($n=2$) av sentrifugert sur myse justert til ulike pH. Standardavvik er illustrert på toppen av stolpene, og ulike bokstaver viser signifikant forskjell ($p < 0.05$).

Proteinkonsentrasjon i supernatant med ulike pH verdier er illustrert i figur 9 og det ble observert lavere proteinkonsentrasjon i supernatant ved pH 6.2 og 7.0. Resultatet viser ingen signifikant forskjell i proteinkonsentrasjon ved prøve 3.0, 3.8, 4.5 og 9.0.

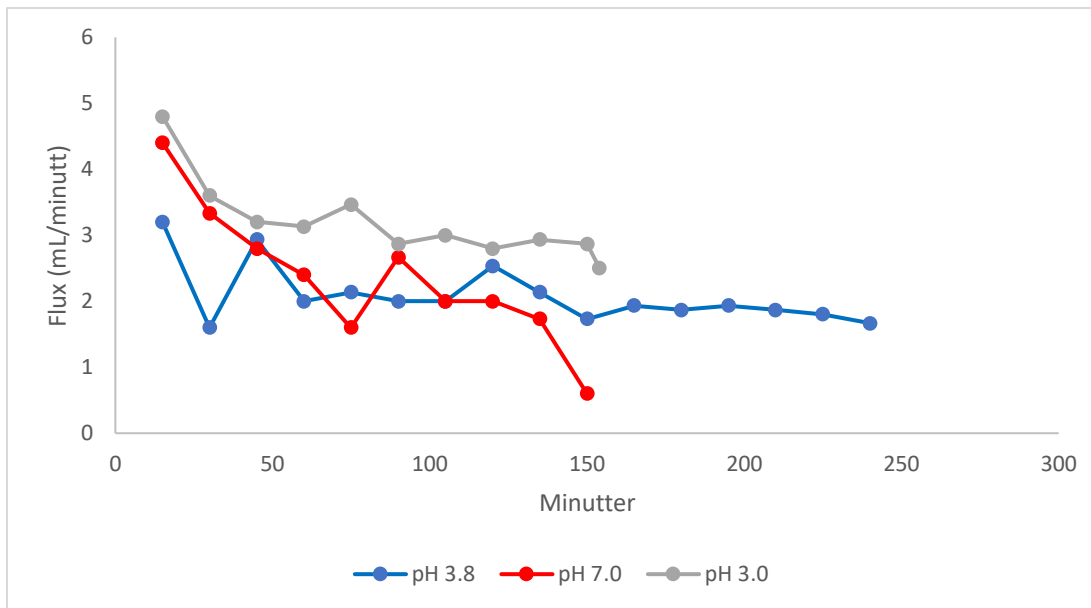
Figur 10 viser ulike proteiner til stede i supernatant av sentrifugert sur myse justert til pH 3.0, 3.8, 4.5, 6.2, 7.0 og 9.0. For å identifisere hvilke proteiner CE registrerte ble vedlegg 2 benyttet. Resultatet er ikke kvantifisert, men gir et uttrykk for tilstedeværelse av hvilke proteiner som finnes i supernatanten.



Figur 10. Kapillær elektroforese (CE) av supernatant fra sentrifugert sur myse ved ulike pH ($n=1$).

Resultat fra figur 10 viser kapillærelektroforesen (CE) i supernatanten fra sentrifugert sur myse justert til ulike pH. Resultatet viser β -laktoglobulin og α -laktalbumin til stede i alle prøver. Det ble observert utslag på uspesifiserte proteiner ved pH 3.0, 3.8 og 6.2.

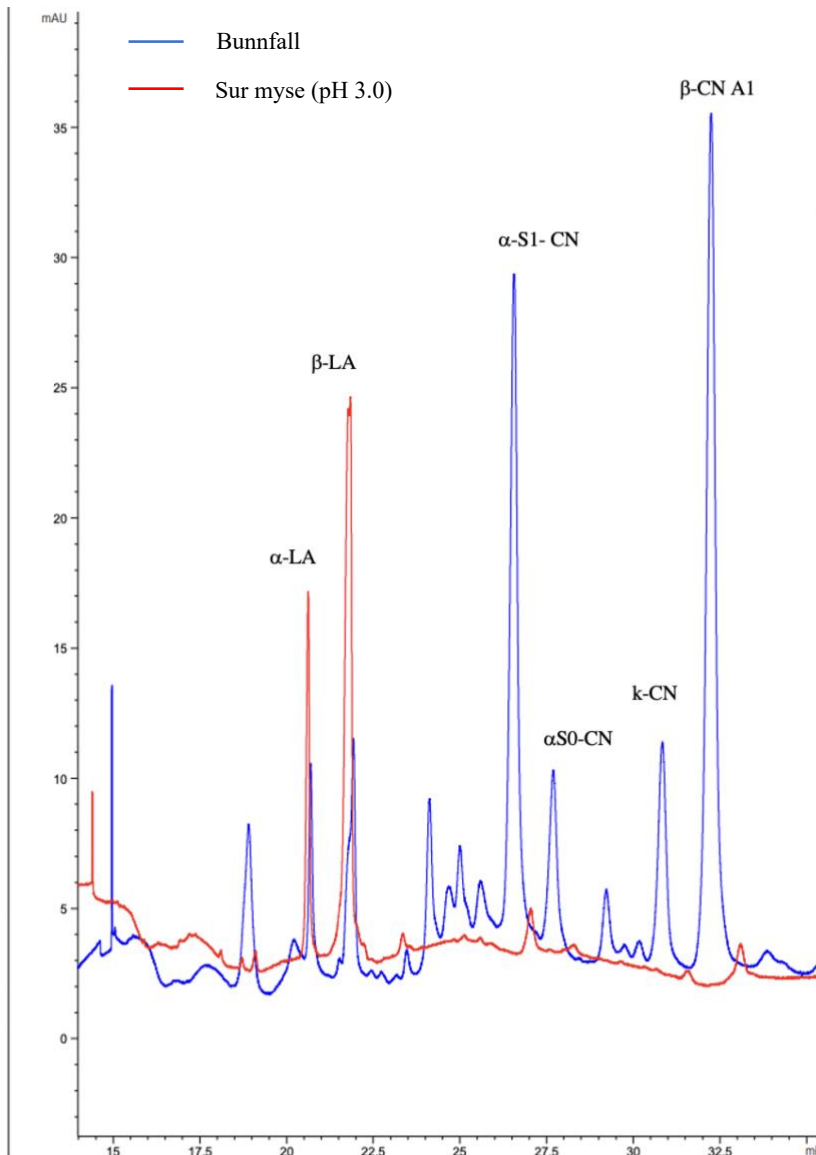
Myse justert til pH 7.0 og pH 3.8 ble ultrafiltrert for å anslå hvor mye pH-justeringen påvirket filtreringseffektiviteten. Figur 11 presenterer flux for sur myse justert til pH 7.0 og pH 3.8. Sartvolumet var 1 L myse, og filtreringsprosessen ble gjennomført til permeatvolumet var 0,5 L, altså en volum-konsentrasjonsfaktor (CF) på 2. Mengden permeat ble registrert hvert 15 minutt og verdiene ble brukt i beregningen av flux (mL/min) under UF (figur 11)



Figur 11. Endringer i flux ved ultrafiltrering av sur myse med pH 3.0, 3.8 og 7.0 ved 50 °C (n=1).

Grafen i Figur 11 viser sammenhengen mellom flux og pH. Under filtrering av myse justert til pH 7.0 ble det observert en rask nedgang i flux og det ble besluttet å avslutte videre filtrering før ønsket konsentreringsgrad var nådd, for å hindre tett membran. På bakgrunn av denne avgjørelsen ble det besluttet å legge til en ekstra filtrering ved pH 3.0. Under alle ultrafiltreringsforsøkene ble det observert en rask nedgang i flux etter oppstart, men prosessen med myse justert til pH 3.0 og 3.8 stabiliserte seg og gir et mer eller mindre jevnt prosessforløp. Ved filtrering av sur myse justert til pH 3.0 ble det observert en høyere flux sammenlignet med filtrering av sur myse til pH 3.8.

I Figur 12 ble ulike kaseiner og myseproteiner identifisert i sur myse justert til pH 3.0, og i bunnfall etter sentrifugering. Proteinene ble identifisert ved hjelp av diagrammet i vedlegg 2. Sur myse i denne analysen var hentet fra batch 1 og bunnfall prøven brukt under analysen var fra filtrering 50-UF50 batch 1. Resultatet er ikke kvantifisert, men gir uttrykk for tilstedeværelse av de ulike proteinene som finnes i den sure mysa.



Figur 12. Kapillærelektroforese som viser proteinsammensetning av sur myse justert til pH 3.0 og bunnfall etter sentrifugering. Sur myse fra batch 1, og bunnfall fra varmebehandlet sur myse før sentrifugering i batch 1(50-UF50) (n=1).

Resultatene i Figur 12 gir uttrykk for høyere andel kaseiner i bunnfall sammenlignet med sur myse hvor det observeres lite kaseiner. I sur myse observeres det høye mengder β -laktoglobulin og α -laktalbumin, basert på lav tilstedeværelse av andre proteiner. Under sentrifugering av pH-justert sur myse blir små andeler β -laktoglobulin og α -laktalbumin felt ut, sammenlignet med kasein.

4.2 Hovedforsøk

For å undersøke effekt ved ultrafiltrering av sur myse ble følgende betingelser valgt basert på resultatene i forforsøk; pH-justering, forbehandling før sentrifugering og filtreringstemperatur. Under hovedforsøket ble 3 batcher med sur myse benyttet. Ved opparbeidelse til ultrafiltrering ble pH i sur myse redusert til 3.0 før temperering, enten romtemperering (RT) eller varmebehandling ved 50°C (50°C) før sentrifugering. Temperatur 10°C og 50°C ble benyttet under ultrafiltrering av supernatant og er oppgitt i kode (UF50/UF10). For batch 1 ble varmebehandling utført etter sentrifugering som resulterte i kun to gjentak for filtrering ved 50-UF50 og 50-UF10, som er utført i batch 2 og 3. Alle filtreringer har konsentrasjonsfaktor 2, og det ble tilstrebet å holde lik TMP under hver filtrering. I hovedforsøket ble sur myse, supernatant, bunnfall, retentat og permeat analysert.

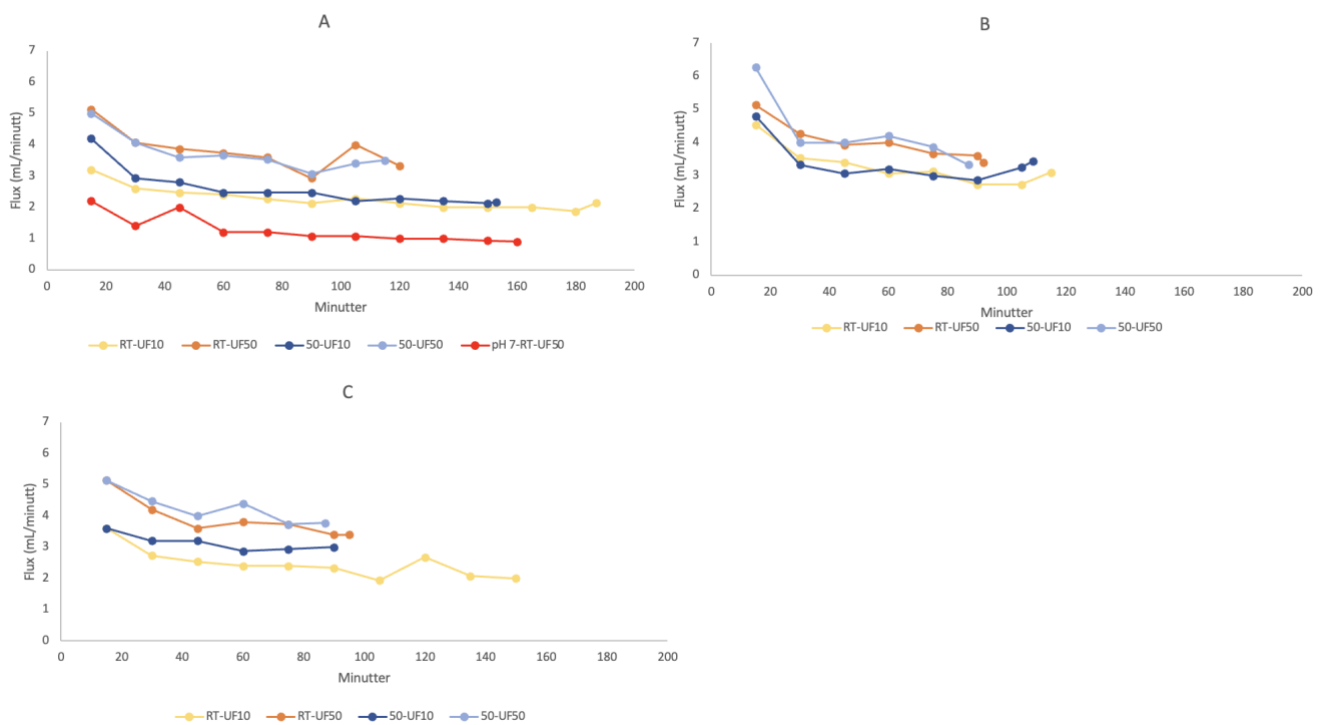
Under hovedforsøket ble 3 ulike batcher av sur myse benyttet ved filtrering og sammensetningen for hver batch er illustrert i tabell x under. For beregning av signifikant i R studio ble 3 paralleller av hver batch benyttet.

Tabell 5. Sammensetning (%) av sur myse benyttet under hovedforsøk (n=9).

	<i>Batch 1</i>	<i>Batch 2</i>	<i>Batch 3</i>
<i>Tørrstoff</i>	2.72	2.42	2.52
<i>Protein</i>	0.36	0.29	0.33
<i>Kalsium</i>	0.06	0.05	0.05
<i>Laktose</i>	1.90	1.65	1.72

Sammensetningen i sur myse i Tabell 5 viser en høyere konsentrasjon av komponenter i batch 1 sammenlignet med batch 2 og 3. Alle komponenter i sur myse viste signifikant forskjell ved signifikantnivå $p = <0,001$ mellom de ulike batchene.

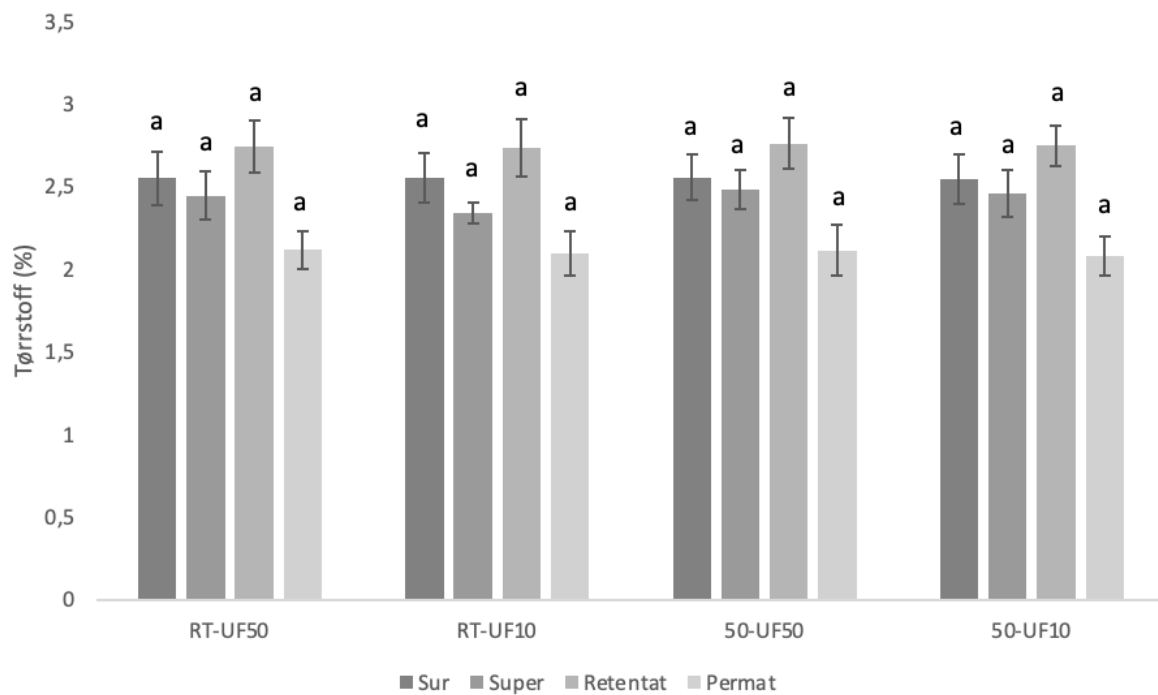
Figur 13 viser flux (mL/min) ved ultrafiltrering av sur myse ved ulik forbehandling før sentrifugering (RT/50°C), og ulik temperatur (50°C/10°C) under filtrering. Startvolum under UF i batch 1 varierte for hver filtrering og var i intervallet 800 – 920 mL. Dette var høyere enn i batch 2 og 3 hvor startmengde av sur myse var 750 mL for alle filtreringer.



Figur 13. Flux(mL/min) for batch 1 (A), Batch 2 (B) og Batch 3 (C). For batch 1 varierte startvolum for UF, og for batch 2 og 3 var startvolum 750 mL ved hver UF.

Alle batcher viste sammenheng mellom flux og temperatur under ultrafiltrering, som kan observeres i Figur 13. Flux under filtrering ved 50°C var høyere enn ved 10°C uavhengig av forbehandling av den sure mysa. Alle filtreringene viser en høyere flux ved start før prosessen stabiliseres utover filtreringen med en jevn flux. Figuren viser en forskjell i RT-UF50 og 50-UF50, da 50-UF50 oppnår konsentrasjonsfaktor 2 noe raskere enn RT-UF10. 50-UF10 og 50-UF50 viser den samme trenden, da 50-UF10 oppnår konsentrasjonsfaktor 2 raskere ved alle batcher. Filtrering av sur myse pH-justert til 7.0 i batch 1 resulterte i en flux på mindre enn 2.0 mL per minutt, som var betydelig lavere enn flux observert i andre filtreringer

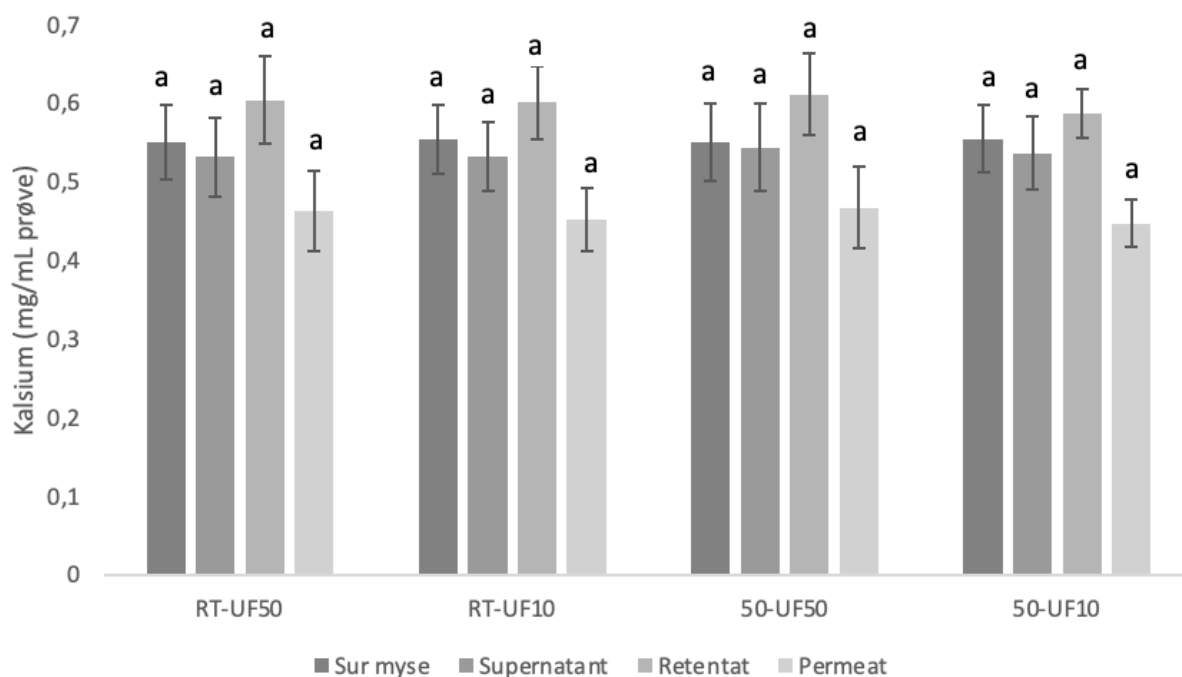
Tørrestoffinnhold i prøvene gjennom UF-prosessen er vist i Figur 14 og verdiene oppgitt er et gjennomsnitt av 3 prøver. Standardavvik er beregnet fra prøver med 3 paralleller.



Figur 14. Tørrstoff (%) i sur myse, bunnfall, supernatant, retentat og permeat ($n=3$) i batch 1, 2 og 3. Standardavvik er illustrert øverst på stolpene i figuren. Signifikant ($p > 0.05$)

Figur 14 viser høyere innhold av kalsium i retentatet. Forskjellen i sur myse og supernatant viser komponenter som har forsvunnet under sentrifugering. Det var ingen signifikant forskjell mellom forbehandling og filtreringstemperatur på tørrstoffinnhold.

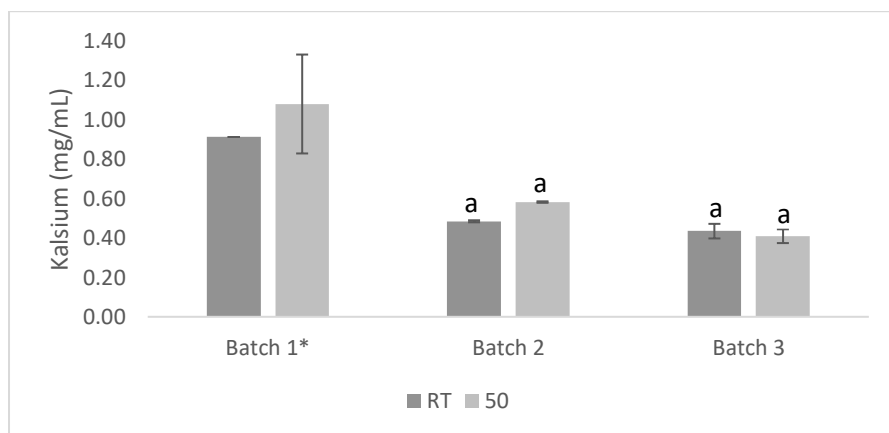
Innholdet av kalsium ble analysert gjennom hele prosessen, og er illustrert i Figur 15 og verdiene oppgitt er et gjennomsnitt av 3 prøver.



Figur 15. Konsentrasjon(mg/mL) av kalsium i sur myse, supernatant, retentat og permeat(n=3) ved batch 1,2 og 3. Standardavvik er representert øverst i stolpene (n=3). Signifikant ($p > 0.05$)

Det ble observert høyere innhold av kalsium i retentat enn permeat for alle filtreringer, som vist i Figur 15. En annen observasjon er mengde kalsium tapt ved sentrifugering som illustreres i forskjellen mellom sur myse og supernatant. Det var ingen signifikant forskjell mellom forbehandling og filtreringstemperatur.

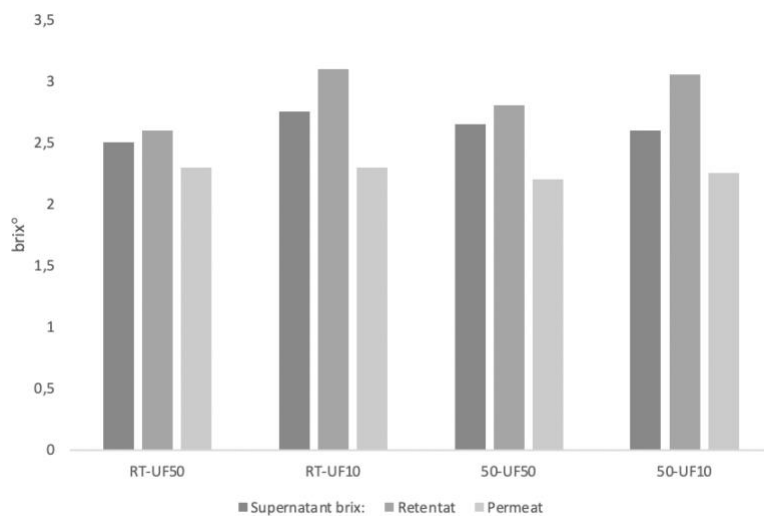
Figur 16 illustrerer bunnfall ved ulik forbehandling før sentrifugering. Det er analysert to prøver per forbehandling med unntak av RT batch 1, hvor det bare ble analysert en prøve. Batch 1 ble ikke inkludert i den statistiske analysen da forbehandlingen var forskjellig fra batch 2 og 3.



Figur 16. Kalsium (mg/mL) i bunnfall (n=2). *Sur myse var ikke temperert før sentrifugering. Standardavviket for RT batch 1 mangler, da bare ble analysert en prøve. Signifikant ($p > 0.05$) er oppgitt som a i figuren, og representerer signifikant mellom RT og 50.

Figur 17 viser konsentrasjonen av kalsium i bunnfall. Resultatet tyder på at det ikke er noen sammenheng mellom kalsiumkonsentrasjon og effekt av forbehandling før sentrifugering. Det ble ikke påvist noen signifikant effekt av forbehandling før sentrifugering i batch 2 og 3 ved analyse av bunnfallprøver. Batch 1 viser høyt innhold av kalsium i bunnfall sammenlignet med batch 2 og 3, men ble ikke inkludert i den statistiske analyse da forbehandling var forskjellig fra batch 2 og 3.

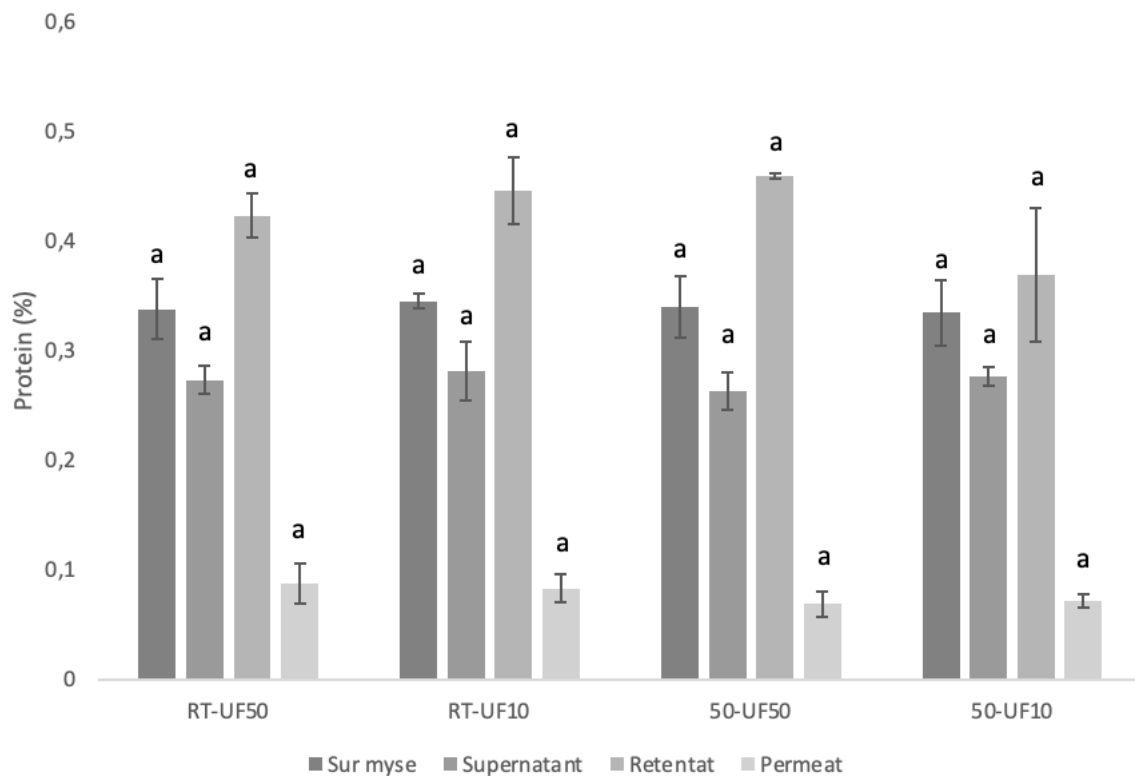
Figur 17 viser forskjellene i brix^o i supernatant, retentat og permeat etter filtrering.



Figur 17. Brix^o målt i supernatant før ultrafiltrering, og i retentat og permeat (n=1).

Resultatet i Figur 17 viser høyere innhold av laktose (%) i retentatet, sammenlignet med permeat. Den samme trenden i innhold av laktose kan observeres i alle prøver.

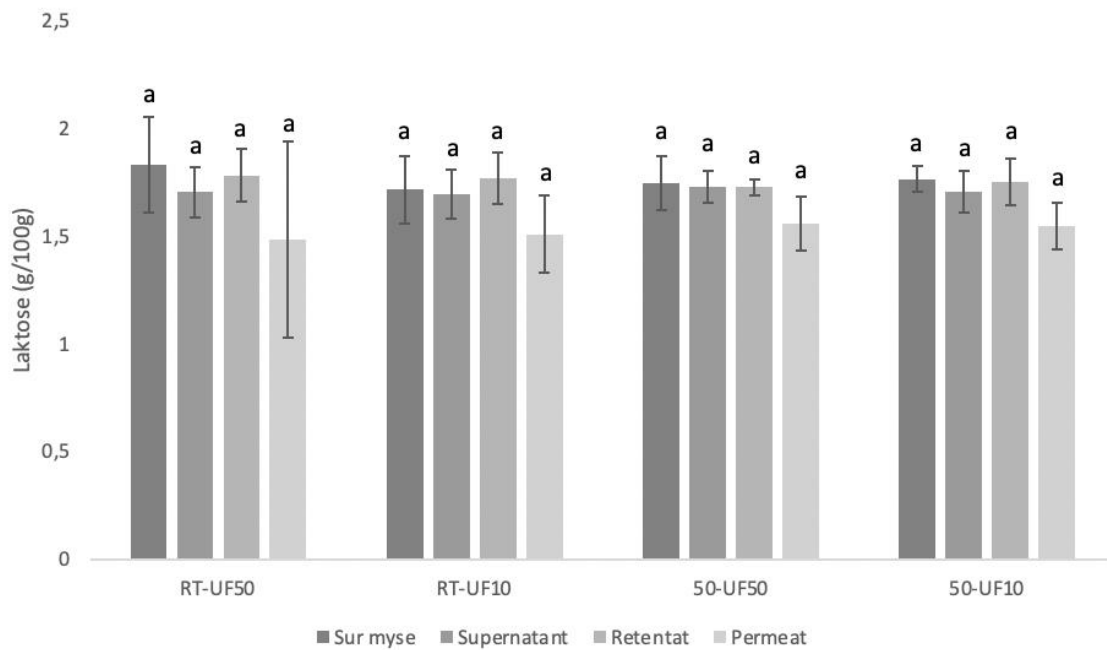
Proteinkonsentrasjonen i de ulike fraksjonene fra UF er vist i Figur 18 og verdiene er et gjennomsnitt på 3 gjentak.



Figur 18. Proteinkonsentrasjon i sur myse, supernatant, retentat og permeat ($n=3$). Standardavvik er illustrert i toppen av stolpene ($n=3$), og ulik bokstav viser signifikant forskjell ($p < 0.05$).

Figur 18 viser høyt proteininnhold i retentatet. Alle prøver av supernatant viste et lavere innhold av protein, sammenlignet med sur myse. Det var ingen signifikant forskjell mellom forbehandling og filtreringstemperatur. I midlertidig var forskjellen mellom retentatprøvene signifikant med en p-verdi på 0.0612 for ulik forbehandling og filtreringstemperatur. Dette indikerer at det ikke ble observert noen signifikant forskjell, men det kan være en forskjell ved lavere signifikantnivå. Utrekning av signifikant for startvolum og proteininnhold i retentat viste $p = 0,0795$, som tyder på ingen signifikant forskjell.

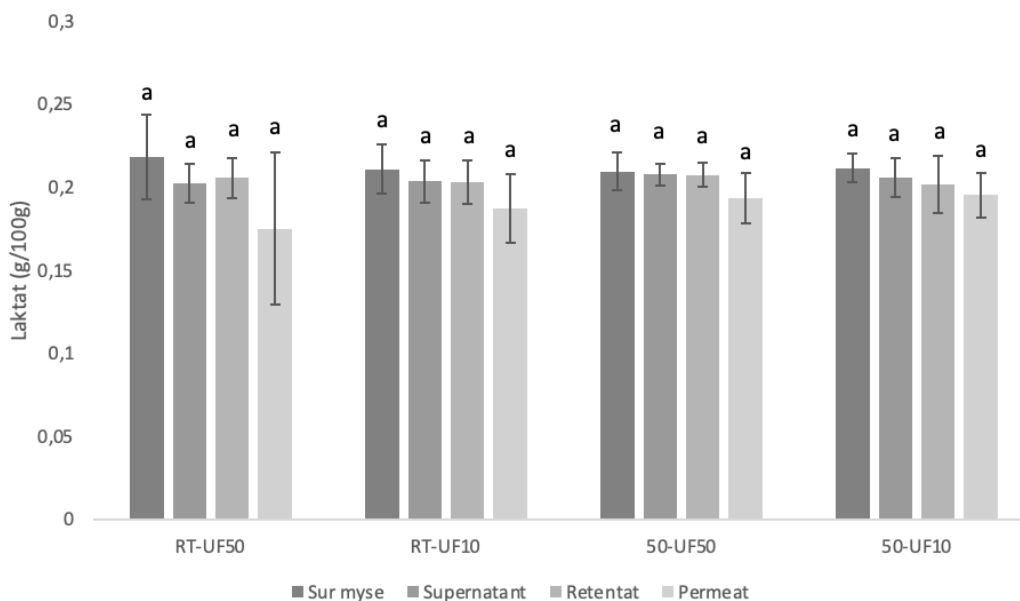
Innholdet av laktose i sur myse, supernatant, retentat og permeat er illustrert i Figur 19, og er et gjennomsnitt av batch 1, 2 og 3. Batch 1 50-UF50 retentat og permeat mangler en verdi, og det er derfor brukt 2 paralleller ved utregning av gjennomsnitt ved denne filtreringen.



Figur 19. Laktose i sur myse, supernatant, retentat og permeat (n=3) ved ulike forbehandling og filtreringstemperatur. Standardavvik er illustrert i toppen av stolpene (n=3), og ulike bokstaver viser signifikant forskjell ved signifikantnivå $p < 0.05$.

I Figur 19 var ingen signifikant effekt av forbehandling eller filtreringstemperatur på konsentrasjon av laktose i de ulike prøvene.

Figur 20 presenterer resultatet av laktat i sur myse, supernatant, retentat og permeat, og det ble kjørt en analyse per prøveuttak. For 50-UF50 retentat og permeat mangler et resultat og som konsekvens ble det brukt 2 paralleller ved utregning av gjennomsnitt.



Figur 20. Laktat i sur myse, supernatant, retentat og permeat (n=3) ved ulike forbehandling og filtreringstemperatur. Standardavvik er illustrert i toppen av stolpene (n=3), og ulike bokstaver viser signifikant forskjell ved signifikantnivå $p < 0.05$.

Innhold av laktat viser ingen signifikant forskjell mellom ulik forbehandling og filtreringstemperatur, som vist i figur 20. Ved sammenligning av figur 19 og 20 kan det observeres en sammenheng mellom resultatet fra laktose og laktat.

Massebalanse av komponenter i supernatant, retentat og permeat er vist i Tabell 6, og prøvene sammenligner effekt av forbehandling før sentrifugering. Verdiene er oppgitt i gram per 100 gram produkt, og standardavvik. Resultatet i tabellen er et gjennomsnitt for alle filtreringer med samme betingelse eksempelvis alle filtreringer med varmebehandling før sentrifugering er slått sammen til en verdi. Signifikant verdi ble beregnet for protein- og kalsiumkonsentrasjon, og tabellen inneholder til slutt en oversikt over svinn i prosent. Massebalansen ble beregnet i forhold til Svanborg (2014) (Svanborg et al., 2014).

Tabell 6. Massebalanse av komponenter i supernatant, retentat og permeat fra romtemperert og varmebehandlet sur myse før sentrifugering (RT/50) oppgitt i gram per 100 gram, standardavvik er vist bak verdiene. Massebalansen tar utgangspunkt i konsentrasjonsfaktor 2. (*Signifikant = $p > 0.05$)

	Supernatant (RT)	Supernatant (50°C)	Retentat (RT)	Permeat (RT)	Retentat (50°C)	Permeat (50°C)	Svinn (RT)	Svinn (50°C)
Masse (g)	100	100	50	50	50	50		
Tørstoff (g)	2,39 ± 0,12	2,47 ± 0,12	1,37 ± 0,15	1,05 ± 0,11	1,38 ± 0,12	1,05 ± 0,12	0,00 %	1,83 %
Protein (g)	0,28 ± 0,02*	0,27 ± 0,01*	0,23 ± 0,02*	0,02 ± 0,05*	0,23 ± 0,05*	0,04 ± 0,01*	8,29 %	4,26 %
Kalsium (g)	0,05 ± 0,01*	0,05 ± 0,01*	0,03 ± 0,01*	0,02 ± 0,01*	0,03 ± 0,01*	0,02 ± 0,01*	0,40 %	2,23 %
laktose (g)	1,70 ± 0,10	1,72 ± 0,08	0,89 ± 0,11	0,75 ± 0,31	0,87 ± 0,08	0,78 ± 0,01	3,71 %	4,15 %
laktat (g)	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	5,00 %	3,49 %

Resultat fra Tabell 6 viste ingen signifikant forskjell i kalsium og protein i supernatant, retentat og permeat som faktor av forbehandling før sentrifugering. Hos proteiner var det høy grad av svinn ved romtempert forbehandling.

Tabell 7 illustrerer massebalanse av komponenter i supernatant, retentat og permeat ultrafiltrert ved 50°C og 10°C. Verdiene er oppgitt i gram komponent per 100 gram produkt og standardavvik er illustrert bak verdiene. Signifikant verdi ble beregnet for protein- og kalsiumkonsentrasjon og tabellen inneholder til slutt en oversikt over svinn i prosent. Massebalansen ble beregnet i forhold til Svanborg (2014).

Tabell 7. Massebalanse av komponenter i supernatant, retentat og permeat fra ultrafiltrering ved 50 °C og 10 °C oppgitt i gram per 100 gram, standardavvik er vist bak verdiene. Massebalansen tar utgangspunkt i konsentrasjonsfaktor 2. (*Signifikant = $p > 0,05$)

	Supernatant (50°C)	Supernatant (10°C)	Retentat (50°C)	Permeat (50°C)	Retentat (10°C)	Permeat (10°C)	Svinn (50°C)	Svinn (10°C)
Masse (g)	100	100	50	50	50	50		
Tørrstoff (g)	2,46 ± 0,12	2,40 ± 0,12	1,38 ± 0,14	1,06 ± 0,12	1,37 ± 0,13	1,04 ± 0,11	2,91 %	0,00 %
Protein (g)	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,23 ± 0,02*	0,04 ± 0,02*	0,22 ± 0,05*	0,02 ± 0,05*	0,00 %	13,31 %
Kalsium (g)	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01*	0,02 ± 0,01*	0,03 ± 0,01*	0,02 ± 0,01*	0,14 %	2,39 %
laktose (g)	1,71 ± 0,09	1,70 ± 0,10	0,88 ± 0,10	0,76 ± 0,33	0,88 ± 0,10	0,76 ± 0,13	7,80 %	3,31 %
laktat (g)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,96 %	3,81 %

Massebalansen beregnet i Tabell 7 viser ingen signifikant effekt av filtreringstemperatur på innhold av kalsium og protein i retentat og permeat. Resultatene av studien indikerer at filtrering ved 10°C førte til høyest tap av proteiner (13.31%) sammenlignet med tapet av andre komponenter i massebalansen. Videre viser resultatet for filtrering ved 50°C høyt tap av laktose (7.80%) hvor massebalansen viser relativt lavt tap for andre komponenter.

5. Diskusjon

I denne studien har sur myse blitt forbehandlet før ultrafiltrering og effekten målt som endring i flux under UF. Hensikten var å finne hvilke kombinasjoner av forbehandling som ga best betingelser under UF. Både pH-justering, temperering og sentrifugering før UF har blitt vurdert som momenter i forbehandling av sur myse før UF. I dette kapittelet blir resultatene fra studien diskutert og vurdert opp mot tilgjengelig litteratur.

5.1 Forforsøk

Under forforsøket ble det undersøkt hvordan pH påvirket løseligheten av proteiner og kalsium ved sentrifugering av sur myse. Den sure mysa ble justert til pH-verdier over hele pH-skalaen, fra pH 3.0 til pH 9.0, og sentrifugert for å felle ut uløselige komponenter. Kalsiumkonsentrasjonen i supernatanten ble målt og resultatene viste at kalsium var minst løselig ved \geq pH 7, da det var minst kalsium i supernatant ved høy pH. Dette stemmer med tidligere studie som viser utfelling av kalsium ved høyere pH (Rodgers et al., 2006). Ved analyse av proteiner i supernatant ble det observert noe mindre proteiner ved pH 6.2 og 7.0, noe som forteller at proteinene er minst løselige ved disse pH-verdiene. Ved valg av pH-verdi for hovedforsøk var det viktig å velge supernatant med høyt innhold av proteiner da hensikten med UF av sur myse er å kunne utvinne myseproteinene. For å vise proteinsammensetning ved ulike pH ble kapillærelektroforese (CE) utført på supernatant. Resultatet fra CE viste hovedsakelig tilstedeværelse av β -Laktoglobulin og α -Laktalbumin.

CE ble også benyttet for analyse av bunnfall og pH justert sur myse (pH 3.0) for å vise hvilke komponenter som ble felt ut under sentrifugering. Metoden for CE er ikke kvantifisert, som betyr at resultatet bare indikerer mengdeforhold mellom proteinene i samme prøve. Siden det ble identifisert flere kaseiner i bunnfall, blant annet α -s₁-kasein, α -S₀-kasein, k-kasein og β -kasein, kan dette skyldes rester av ostestøv i mysen fra cottage cheese produksjon. Derimot er mengdeforholdet i en prøve representativ, og dette kan tyde på at langt flere kaseiner befinner seg i bunnfallet sammenlignet med andre proteiner. De høye verdiene av kasein i bunnfall kan skyldes høyt tørrstoff i bunnfall som gir høy konsentrasjon av proteiner. I tillegg til kaseiner, ble det observert utfelling av β -Laktoglobulin og α -Laktalbumin. Siden mysen tidligere har blitt pasteurisert, kan det antas at noen av myseproteinene har denaturert, og lettere felles ut ved sentrifugering (Fox et al., 1998, Swaisgood, 2007). Det var ønskelig å finne en pH med høyest

mulig oppkonsentrering av β -Laktoglobulin og α -Laktalbumin. Analysen fra CE viste tap av β -Laktoglobulin og α -Laktalbumin ved sentrifugering ved alle pH verdier. Ved undersøkelse av løselige proteiner viste resultatet høyt proteininnhold ved pH 3.0, 3.8, 4.5 og 9.0. Myseproteiner har høy løselighet ved lav pH, og det vil derfor være hensiktsmessig å velge en lav pH før sentrifugering for å kunne oppkonsentrere mest mulig av β -Laktoglobulin og α -Laktalbumin under UF (Fox et al., 1998).

På bakgrunn av membrantype brukt i forforsøk og for videre bruk i hovedforsøk, er alle faktorer som pH og temperatur vurdert opp mot en polyethersulfone membran (Pellicon® XL50 with Biomax® 30 kDa Membrane, A screen, 50 cm²). For å kunne vurdere valg av betingelser ble det utført ultrafiltrering av sur myse ved forskjellig pH opp til konsentrasjonsfaktor (CF) 2. I en studie (Konrad et al., 2012) ble det forsøkt å ultrafiltrere sur myse ved pH 4.5 som resulterte i tett membran. Studien (Konrad, 2012) benyttet sur myse laget av rekonstituert skummet melkepulver med tilsatt melkesyrebakterier (*Lactobacillus helveticus*), og videre sentrifugert ved 3,000 x g, og til slutt pH-justert før UF. Konrad (2012) viste at ved å senke pH i sur myse fra 3.9 i og nedover, vil flux øke i takt med lavere pH. Som et resultat av studien (Konrad, 2012) ble det besluttet å justere sur myse ned til pH 3.8 i forforsøket for å kunne se effekten pH-justering hadde på prosessbetingelsene under UF.

Flere studier (Chandrapala et al., 2015, Ganju and Gogate, 2017, Tarapata et al., 2022) har knyttet myseproteiner mot fouling i tillegg til uløselig kalsiumfosfat. En studie (Musale and Kulkarni, 1998) viste at å klarifisere sur myse ved bruk av Whatman papir ved pH 7.5 før ultrafiltrering, vil ha en positiv effekt på flux. Før klarifiseringen ble sur myse pH-justert til 7.5 og holdt i 10 minutter ved 27-28°C. Denne metoden ga en forbedret flux. Studien (Musale og Kulkarni, 1998) konkluderte med at årsaken til en forbedret flux skyldtes en reduksjon i kalsium og nedgang i konsentrasjon av høy molekylvekt proteiner som immunoglobuliner. Basert på denne studien (Musale og Kulkarni, 1998) ble det besluttet å bruke pH 7.0 i tillegg til pH 3.8, som et nivå på forsøksfaktoren pH i myse da studien viste gode resultater ved bruk av pH 7.0 (Musale and Kulkarni, 1998).

I forforsøket ble sur myse UF etter pH-justering (3.8 og 7.0) for å kunne se effekten av forbehandlingen ved pH-justering har på flux. Ultrafiltrering av sur myse ved pH 7.0 viste tidlig drastisk nedgang i flux, som ga indikasjoner om alvorlig fouling og førte til en avbrutt UF-

prosess i frykt for tett membran. Etter avbrutt UF-prosess ble det undersøkt om hva som kunne være årsaken til tett membran. Ved en gjennomgang av tidligere studier ble det tydelig at flere faktorer kan ha bidratt til tett membran ved UF av sur myse ved pH 7.0. Av alle myseproteiner er det β -laktoglobulin som bidrar mest til fouling under UF (Wen-Qiong et al., 2019). En studie (Merin and CHERYAN, 1980) viste at pH, ionestyrke og type salter, så vel som membran-protein-interaksjoner har betydelig effekt på fouling under UF av sur myse fra cottage cheese. Under beskrivelse av studien til Musale og Kalkarni (1998) tidligere i diskusjonen ble det nevnt bruk av grovfiltrering før UF. Dette var for å fjerne uløselige komponenter i mysen som kan føre til fouling under UF (Musale and Kulkarni, 1998). Denne detaljen ble oversett og dette kan være en årsak til tett membran ved UF av sur myse ved pH 7.0, da sur myse ikke ble filtrert før UF i forforsøket. Basert på denne informasjonene ble det besluttet å bruke pH 7.0 videre i hovedforsøk og inkludere sentrifugering av sur myse før UF. Forhåpentligvis vil sentrifugering føre til utfelling av uløselige komponenter som forårsaker tett membran ved UF av sur myse ved pH 7.0, slik som i studien til Musale og Kalkarni (1998).

Før den underliggende årsaken til tett membran ved pH 7.0 ble oppdaget ble det bestemt å gjennomføre en filtreringsprosess ved pH 3.0 under forforsøket. Dette ble gjort med den hensikt å ha to ulike pH-verdier (3.8 og 3.0) tilgjengelig for sammenlikning og vurdering av eventuelle forskjeller i filtreringsytelsen mellom de to betingelsene. Under UF av sur myse ved pH 3.8 og 3.0 viste UF en høyere flux ved pH 3.0, sammenlignet med 3.8. Dette stemmer med funnene til Konrad (2012), hvor sur myse ved pH <3,9 opplever en økt flux i takt med lavere pH. Etter UF av sur myse ved pH 3.0, 3.8 og 7.0 i forforsøket, ble det tatt en vurdering for hvilke betingelser som skulle være med videre i hovedforsøk. Som en konsekvens av mangel på forbehandling for sur myse ved pH 7.0 i forforsøk ble det besluttet å bruke pH 7.0 videre i hovedforsøk. Videre ble det innført sentrifugering i håp om å kunne felle ut uløselige komponenter før UF. Hensikten med studien var å forbedre prosessbetingelsene ved UF av sur myse. Av denne grunn ble det besluttet å bruke pH 3.0 videre i hovedforsøket på bekostning av pH 3.8, da pH 3.0 ga en forbedret flux.

Til slutt ble en varmebehandling (50°C) lagt til som faktor før sentrifugering. Dette var for å kunne undersøke om varmebehandling hadde en effekt på hvilke komponenter som feltes ut, og om endt sammensetning av sur myse påvirket UF. En studie (Taddei et al., 1989) viste til redusert polarisering og fouling ved sentrifugering som forbehandling før UF. Studien (Taddei, 1989) benyttet rekonstituert søt myse fra mysepulver, og sentrifugerte mysen (30,000 g, 30

minutter) for å fjerne suspendert materiale før UF. Dette ga en bedre flux og Taddei (1989) konkluderte med at sentrifugeringen optimaliserte UF-prosessen, og reduserte effekten av reversibel og irreversibel fouling (Taddei et al., 1989). Studien av Konrad (2012) viser også til en forbedret flux ved sentrifugering av sur myse ved pH 3.0, en økning på 25 % i flux sammenlignet med usentrifugert sur myse. I studien (Konrad et al., 2012) ble sur myse holdt ved 55 C i 8 minutter, for deretter å sentrifugeres (3,000 g). I studien til Konrad (2012) ble ikke utført forbehandling før sentrifugering. For å kunne se effekten av varmebehandling (50°C) før sentrifugering, ble romtemperatur (RT) valgt som nivå 2 av tempereringsfaktoren. Sentrifugering er en teknikk som kan brukes i industriskala og dette ble tatt i betraktning ved valg av metoden. Til slutt ga resultatene fra forforsøket grunnlaget for valg av betingelser til hovedforsøk som bestod av pH 3.0 og 7.0, sammen med temperering (50°C / RT) før sentrifugering.

5.2 Hovedforsøk

Oppsettet i hovedforsøk bestod opprinnelig av to forsøksfaktorer, pH-justering og temperering før sentrifugering. Imidlertid viste det seg å være utfordrende å bruke pH 7.0 i hovedforsøket da UF ved pH 7.0 viste tegn til fouling tidlig i prosessen. Årsak til tett membran ved pH 7.0 ble diskutert i forforsøket, der det ble besluttet å sentrifugere prøvene etter pH-justering og varmebehandling for å fjerne uløselige komponenter. Det ga ikke ønsket effekt og trolig har ikke årsaken til fouling i hovedforsøket forsvunnet ved sentrifugering. Batch 1 ble ikke varmebehandlet før sentrifugering og derfor kan også dette være en årsak til at uløselige komponenter ikke forsvant ved sentrifugering. Det kan ikke utelukkes at varmebehandling ved 50°C før sentrifugering kan ha en positiv effekt på UF av sur myse ved pH 7.0. I forforsøket ble supernatant ved pH 7.0 analysert og viste innhold av kalsium. Basert på forforsøket kan innhold av kalsium trolig være en årsak til tett membran da dette ikke forsvinner under sentrifugering. Derimot ble sur myse i studien til Musale og Kulkarni (1998) preparert ved tilsetning av HCl til bøffelmelk som betyr at prøvematerialet i utgangspunktet var forskjellig, og følgelig blir det vanskelig å sammenligne resultatene. Bøffelmelk har høyere innhold av fett, laktose, protein og mineraler sammenlignet med kumelk, og dette kan ha betydning for resultatet i studien til Musale og Kulkarni (1998) (Ahmad et al., 2008). Det var til slutt ikke mulig å trekke en konklusjon om årsakssammenheng til tett membran da det ikke ble utført flere undersøkelser ved UF av pH 7.0.

Som en konsekvens av tett membran ved pH 7.0 ble «pH-justering av sur myse» som faktor erstattet med «filtreringstemperatur». En omfattende litteraturgjennomgang har avdekket flere studier med suksessfull bruk av 50-55°C under UF, og vanligvis foretrekkes temperaturer 50-55°C under UF på grunn av høy flux og lav energibruk (Ng et al., 2018). I tillegg til høy flux vil UF ved 50°C hindre høy vekst av bakterier, og føre til liten grad av denaturering hos myseproteiner. Studie av Steinhauer (2015) undersøkte effekten av filtreringstemperatur ved UF av sur myse og viste til høyere flux ved bruk av temperatur høyere enn 40°C. På bakgrunn av godt dokumentert bruk av 50°C under UF ble det besluttet å bruke denne filtreringstemperaturen da den sikrer god flux. Det er gjort få studier knyttet til UF ved <10°C for skummet melk og myse (Méthot-Hains et al., 2016, Ng et al., 2018) og tilgjengelig litteratur knyttet til temperatur ved UF av sur myse er få. Steinhauer (2015) er en av få studier hvor effekt av temperatur på mikrofiltrering (MF) og UF av sur myse ble undersøkt. Studien (Steinhauer et al., 2015) så på effekten av filtreringstemperatur fra 10°C til 50°C for MF (0.1 µm) og UF (30

kDa membran) av søt og sur myse. Steinhauer (2015) viste gjennom studien at høyere temperatur under MF gir høyere flux. I samme studie konkluderte Steinhauer (2015) at temperaturer $<10^{\circ}\text{C}$ er fordelaktig da dette gir forlenget levetid for prosessanlegget (Steinhauer et al., 2015) da det dannes mindre fouling under UF av sur myse ved bruk av lav temperatur. På bakgrunn av denne informasjonen kunne det være av interesse å undersøke hvilken effekt filtreringstemperaturen 10°C har på prosesseffektiviteten til UF av sur myse. Som et resultat av endring i forsøksoppsettet ble all sur myse under hovedforsøket justert til pH 3.0. Endelig forsøksfaktorer bestod av temperering til 50°C eller romtemperatur (RT) før sentrifugering og ulik temperatur under UF (50°C eller 10°C).

Flux blir ofte brukt i membranteknologi for å kunne måle effektiviteten under UF. Et positivt aspekt med høye temperaturer i filtrering er økning i flux, men dette kan føre til problemer som fysisk stress på produkt og membran (Wagner, 2001). I tillegg vil bruk av høye temperaturer føre til høye kostnader i strøm. Derfor var det viktig å kunne finne optimal temperatur ved drift av et filtreringsanlegg for å kunne utnytte energien maksimalt og produsere effektivt (Wagner, 2001). Basert på tidligere diskusjon i valg av filtreringstemperatur ble det vist til teori om økende temperatur under UF vil gi økt flux (Ng et al., 2018). I hovedforsøket viste UF av sur myse signifikant ved bruk av høyere filtreringstemperatur (50°C), sammenlignet med UF ved 10°C , og trenden i høyere flux ved filtreringstemperatur 50°C framfor 10°C er til stede i alle batcher. Det ble også observert en raskere filtrering ved varmebehandling før sentrifugering av sur myse for alle filtreringer i batch 2 og 3. Det finnes en studie (Lee and Merson, 1976) som har vist til høyere flux ved å grovfiltrere sur myse med Whatman papir før UF. Lee og Merson (1976) konkluderte med at store partikler i mysen er en av årsakene til fouling og at dette kan fjernes ved grovfiltrering. I industrien blir grovfiltrering benyttet ved MF av sur myse før UF for fraksjonering av komponenter som laktose og myseproteiner. Grovfiltrering brukes for å oppnå en forhåndsrenset myse uten kasein, fett og aggregerte proteiner, som bidrar til forbedret prosessbetingelser under UF (Ganju and Gogate, 2017). Det er usikkert om større partikler har blitt felt ut under sentrifugering i hovedforsøket da dette ikke ble undersøkt nærmere. Dette arbeidet ville blitt for omfattende. Det kunne vært interessant å undersøke hvilke myseproteiner som felles ut under sentrifugering ved ulike betingelser, for å sammenlikne dette opp mot effekten dette har under UF av sur myse.

Chandrapala (2015) har undersøkt effekten av varmebehandling før sentrifugering på proteinkonsentrasjon i supernatant. I sin studie plasserte Chandrapala (2015) den sure mysen i vannbad ved 4 ulike temperaturer (15°C, 25°C, 40°C, 90°C) i 20 minutter, og sentrifugerte umiddelbart etter vannbad ved 22,000 g i 20 minutter. Resultatene viste høyere proteinkonsentrasjon i supernatant til de prøvene som hadde blitt temperert ved lav temperatur (15°C), sammenlignet med høye temperaturer. Prøvene som var temperert ved 90°C viste lavest proteinkonsentrasjon i supernatant (Chandrapala et al., 2015). Dette kan forklares med teori da myseproteiner vil denaturere ved høye temperaturer (>70°C), og derved tape sin evne til å være i løsning under sentrifugering (Fox et al., 1998). Forsøket gjennomført i vår studie viste ingen signifikant forskjell i proteinkonsentrasjon i supernatant ved ulik varmebehandling før sentrifugering. En årsak til dette kan være temperering ved for lav temperatur slik at proteinene ikke denaturerer, eller for lav differanse mellom temperaturene (RT og 50°C) brukt under forsøket. En annen faktor kan være for lav hastighet under sentrifugering. Ved sammenligning av studien til Chandrapala (2015) til forsøket er det en faktor i metoden som skiller seg ut; hastighet og tid på sentrifugeringen. Chandrapala (2015) brukte en langt høyere hastighet ved sentrifugering (22,000 g) i en lengre tid (20 minutter) enn i vår studie (3,000 g og 10 minutter). Det kan argumenteres for at effekten av sentrifugeringen i vår studie har vært for lav og dermed har ikke alle uløselige komponenter blitt felt ut under sentrifugering, noe som igjen kan bidra til liten forskjell i effekt av flux under filtrering av RT og 50°C.

Luo (2015) undersøkte effekten av filtreringstemperatur 15°C, 30°C og 50°C under UF av skummet melk ved bruk av polyethersulfone membran til CF 5 (Luo et al., 2015). Denne studien (Luo et al., 2015) viste til høyere protein- og kalsiumkonsentrasjon i retentatet og større grad av fouling ved bruk av filtreringstemperatur 50°C, sammenlignet med 15°C og 30°C. Denne teorien bekreftes i en annen studie (Méthot-Hains et al., 2016) hvor filtrering av skummet melk ved 50°C gir retentat med høyere protein- og kalsiumkonsentrasjon enn filtrering ved 10°C med CF 3,6. Proteinanalysen av retentat ved de ulike filtreringsbetingelsene under forsøket viser ingen signifikant effekt av filtreringstemperatur på forskjell i protein- og kalsiumkonsentrasjon. Basert på tidligere forskning forventes det en liten forskjell i protein- og kalsiumkonsentrasjon i retentat ved bruk av ulik filtreringstemperatur. En faktor som kan ha spilt en viktig rolle i at resultatet ikke ble som forventet, er den volumetriske konsentrasjonsfaktoren (CF) brukt under forsøket. Ved bruk av CF 2 vil oppkonsentreringen være lav og filtreringen kort. Effekten temperatur har på proteinkonsentrasjon under filtrering

kan ha vært signifikant forskjellig dersom CF hadde vært høyere, da en lengre filtrering gir større rom for påvirkning av temperatur (Luo et al., 2015, Méthot-Hains et al., 2016).

Selv om det ikke ble funnet noen signifikant forskjell i proteinkonsentrasjonen med hensyn til filtreringstemperatur, viser massebalansen av proteiner et tap på 13.31% ved filtreringstemperatur 10°C, og 0.00 % ved filtreringstemperatur 50°C. Ved oppstart av UF anlegg før filtrering ble det observert komponenter i oppsamlingskaret ved skylling av rør. Dette kan ha vært komponenter som har sittet i membranen og ikke blitt fjernet under vask etter UF. Dessverre ble det ikke notert hvilke dager denne observasjonen skjedde og kan derfor ikke settes i sammenheng med tapt protein ved filtrering 10°C. Det er sannsynlig at proteiner tapt under UF 10°C, sitter i membranen eller rørene etter avsluttet UF. Det ble også observert høyere svinn av kalsium ved UF 10°C sammenlignet med 50°C, noe som trolig skyldes interaksjoner mellom kalsium og proteiner. I tidligere forskning vises det at dannelse av fouling er forårsaket av blant annet kalsiumsalter og myseproteiner, som vil sitte i membranen (Musale and Kulkarni, 1998, Ganju and Gogate, 2017). Ved UF 50°C ble det observert lav svinn av proteiner og kalsium som kan bekrefte en sammenheng mellom protein og kalsium ved filtreringstemperatur. Samtidig kan det stilles spørsmål til kvaliteten på analysemetodene som ble brukt under forsøket, da svinn for tørrstoff ved 10°C viser 0.00 % og svinn for proteiner viser 13.31%. Massebalanse ved temperering før sentrifugering viser samme feil hvor svinn for tørrstoff ved RT viser 0.00 % og svinn for proteiner viser 8.29 %. En annen mulig årsak som kan påvirke massebalansen er feil under utregning, avvik mellom parallellene eller små variasjoner i trykk under filtrering.

En annen viktig faktor som kan ha påvirket filtreringsprosessen er membran brukt under UF. En polyethersulfone membran med porestørrelse 30 kDa ble benyttet og denne porestørrelsen kan ha bidratt til tap av proteiner til permeatet. Ved bruk av en membran med mindre porestørrelse kunne nok oppkonsentreringen av proteiner i retentatet vært høyere. Derimot vil bruk av lavere porestørrelse bidra til høyere grad av fouling, som igjen gir lavere flux sammenlignet med høyere porestørrelse (Ganju and Gogate, 2017). Av denne grunn ble det besluttet å bruke membran med porestørrelse 30 kDa da hensikten med studien var å forbedre betingelsene for UF-prosessen.

Det kan argumenteres for at filtreringstemperatur ikke har en effekt på kalsiumkonsentrasjon i retentatet. Ved filtreringstemperatur 50°C ble det i forsøket målt 0,57 til 0,67 mg kalsium per mL i retentatet, og ved filtreringstemperatur 10°C ble det i retentatet målt 0,56 til 0,65 mg kalsium per mL prøve. Massebalansen viser dermed ingen signifikant i kalsiuminnhold som effekt av filtreringstemperatur. Derimot observeres det forskjell ved kalsiumkonsentrasjon i retentat og permeat, som er gjentakende for alle prøver analysert i studien. Kalsium er en komponenten som passerer membran ved størrelse 30 kDa og det kan derfor forventes likevekt i retentatet og permeatet. I henhold til teori skal kalsiumkonsentrasjon i retentat avta med økende CF (Walstra et al., 2005). Studier (Barone et al., 2022) viser at interaksjoner mellom myseproteiner og kalsium er svært komplekse. Det kan påvirkes av flere faktorer som proteinets fysiokjemiske egenskaper, kalsiumsaltets kjemi, og utvendige faktorer som pH og ionestyrke (Walstra et al., 2005). Årsaken til de observerte forskjellene i kalsiumkonsentrasjon i retentat og permeat kan skyldes interaksjoner mellom kalsium og myseproteiner. En annen studie fikk tilsvarende resultater hvor UF av skummet melk med CF 2 viste høyere askeinnhold i retentatet (0,77%), enn i permeatet (0,47%) (SriLaorkul et al., 1989).

I hovedforsøket ble fosfatinnholdet målt for de ulike prøvene i batch 3. Formålet med måling av fosfatkonsentrasjon var å undersøke om fosfat hadde en innvirkning på de valgte prosessbetingelsene for ultrafiltrering av sur myse. Analyse av fosfat ved CE viste seg å være vanskelig, da uklare topper ble registrert under analyse. Gjentakende analyse av samme prøve ble kjørt uten hell da det ikke ble registrert fosfat og andre prøver viste ulik konsentrasjoner av fosfat ved analyse av samme prøve. Til slutt ble det besluttet å ikke bruke metoden videre i forsøket da analysene viste dårlige resultater. Resultatet fra fosfatkonsentrasjon i batch 3 er vist i vedlegg 4.

Trenden med forskyvning i likevekt i kalsiuminnhold hos retentat og permeat ble også observert i laktoseinnholdet hvor retentat har høyere laktoseinnhold enn permeatet. I alle prøver med retentat var det målt fra 1.72 –1.78 gram laktose og laktose i permeatet ble målt fra 1.48-1.55 gram. Det er blitt gjort grundig forskning på ultrafiltrering av skummet melk og forskningen viser at laktosekonsentrasjonen i permeatet øker i forhold til økende volumetriske konsentrasjonsfaktor (CF) (Premaratne and Cousin, 1991). Resultatene fra dette forsøket viser ingen tydelig forskjell i laktose- og laktatkonsentrasjon som effekt av varmebehandling før sentrifugering og filtreringstemperatur hos noen av prøvene analysert under studien. I en studie (SriLaorkul et al., 1989) ble skummet melk ultrafiltrerte for å se på sammensetningen til retentat

og permeat, og resultatet ved CF 2 viste noe høyere laktosekonsentrasjon (4,90%) i retentatet, sammenlignet med laktosekonsentrasjonene i permeatet (4,80 %). Dette bekrefter funnene i forsøket hvor det er noe høyere innhold av laktose i retentatet ved CF 2.

6. Oppsummering og videre arbeid

Funnene i studien viser til en forbedret effekt på flux ved varmebehandling før sentrifugering og høy filtreringstemperatur under UF av sur myse. Ved bruk av to ulike betingelser under UF av sur myse ga dette informasjon om hvordan dette kombinert påvirket prosessen, og til slutt proteininnholdet i retentatet. Selv om bruk av varmebehandling ved 50°C før sentrifugering og 50°C under filtrering ga høy flux, ble ikke sammensetningen i retentatet nevneverdig påvirket av de ulike betingelsene. Proteinkonsentrasjonen i retentatet viste ingen signifikant forskjell for de ulike betingelsene benyttet i studien, og en effekt av betingelsene kunne muligens vært til stede ved en høyere CF. Kalsiumkonsentrasjon ser ikke ut til å bli påvirket av varmebehandling før sentrifugering og det var ingen signifikant for de ulike betingelser brukt under studien. Det kan diskuteres om spørsmål knyttet til kvaliteten på metodene brukt under analyser av komponenter. Resultatet fra massebalansen samsvarer ikke da tørrstoff viser 0.00 % ved filtreringstemperatur 10°C og proteiner viser tap på 13.31% ved samme filtreringstemperatur.

Ved videre undersøkelser på forbehandling for UF av sur myse kunne det vært en mulighet å studere effekten av høyere varmebehandling før sentrifugering. I tillegg ville det vært interessant å studere effekten av en kraftigere sentrifugeringsprosess og finne en mulighet for alternative metoder for for-filtrering av sur myse. Det finnes få tidligere studier på UF av sur myse og hvordan sur myse påvirkes av ulike forbehandlinger. Det vil derfor være viktig å fortsette arbeidet med å studere hvordan forbehandling påvirker sammensetningen til sur myse, og hvordan dette igjen påvirker UF. Som tidligere nevnt i diskusjon kan det også være interessant å undersøke hvilke proteiner som felles ut ved ulik varmebehandling og ulik styrke under sentrifugering. Til slutt vil også forskning i bruk av nye materialer for membraner spille en viktig rolle i videre utviklingen av filtreringsteknologien, da dette kan være til stor hjelp med å redusere fouling.

Litteraturliste

- Ahmad, S., Gaucher, I., Rousseau, F., Beaucher, E., Piot, M., Grongnet, J. F. & Gaucheron, F. 2008. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. *Food chemistry*, 106, 11-17.
- Ahmad, T., Aadil, R. M., Ahmed, H., ur Rahman, U., Soares, B. C., Souza, S. L., Pimentel, T. C., Scudino, H., Guimarães, J. T. & Esmerino, E. A. 2019. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 361-372.
- Almécija, M., Guadix, A., Martínez-Ferez, A., González-Tello, P. & Guadix, E. 2009. A flux enhancing pretreatment for the ultrafiltration of acid whey. *Desalination*, 245, 737-742.
- Alsaed, A. K., Ahmad, R., Aldoomy, H., Abd El-Qader, S., Saleh, D., Sakejha, H. & Mustafa, L. 2013. Characterization, concentration and utilization of sweet and acid whey. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12, 172.
- Barone, G., O'Regan, J., Kelly, A. L. & O'Mahony, J. A. 2022. Interactions between whey proteins and calcium salts and implications for the formulation of dairy protein-based nutritional beverage products: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21, 1254-1274.
- Boland, M. & Singh, H. 2019. *Milk proteins: from expression to food*, Academic Press.
- Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M. & Vasiljevic, T. 2015. Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *Journal of Dairy Science*, 98, 4352-4363.
- Cheryan, M. 1986. *Ultrafiltration handbook*, Technomic Publishing Co. Inc.
- Crowley, S. V., Molitor, M. S., Kalscheuer, R., Lu, Y., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A. & Lucey, J. A. 2019. Size classification of precipitated calcium phosphate using hydrocyclone technology for the recovery of minerals from deproteinised acid whey. *International Journal of Dairy Technology*, 72, 142-151.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. & Paul, L. 1998. *Dairy chemistry and biochemistry*.
- Ganju, S. & Gogate, P. R. 2017. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering*, 215, 84-96.
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21, 601-606.

- Guo, W., Ngo, H.-H. & Li, J. 2012. A mini-review on membrane fouling. *Bioresource technology*, 122, 27-34.
- Heck, J., Olieman, C., Schennink, A., Van Valenberg, H., Visker, M., Meuldijk, R. & Van Hooijdonk, A. 2008. Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 18, 548-555.
- Ibarz, A. & Barbosa-Cánovas, G. V. 2002. *Unit operations in food engineering*, CRC press.
- IDF 1987. Milk, Cream and Evaporated Milk: Determination of total solids content. *IDF*, 21B: 1987.
- IDF 2001a. Determination of non-protein-nitrogen content. *IDF*, ISO 8968-4.
- IDF 2001b. Determination of Protein-Nitrogen Content. *IDF*, ISO 8968-5.
- Izco, J., Tormo, M., Harris, A., Tong, P. & Jimenez-Flores, R. 2003. Optimization and validation of a rapid method to determine citrate and inorganic phosphate in milk by capillary electrophoresis. *Journal of dairy science*, 86, 86-95.
- Jaywant, S. A., Singh, H. & Arif, K. M. 2022. Sensors and Instruments for Brix Measurement: A Review. *Sensors*, 22, 2290.
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E.-O., Johansen, A.-G., Schüller, R. B. & Skeie, S. B. 2016. Optimization of protein fractionation by skim milk microfiltration: Choice of ceramic membrane pore size and filtration temperature. *Journal of Dairy Science*, 99, 6164-6179.
- Kanekanian, A. 2014. *Milk and dairy products as functional foods*, John Wiley & Sons.
- Konrad, G., Kleinschmidt, T. & Faber, W. 2012. Ultrafiltration flux of acid whey obtained by lactic acid fermentation. *International Dairy Journal*, 22, 73-77.
- Lee, D. & Merson, R. 1976. Prefiltration of cottage cheese whey to reduce fouling of ultrafiltration membranes. *Journal of Food Science*, 41, 403-410.
- Luo, X., Ramchandran, L. & Vasiljevic, T. 2015. Lower ultrafiltration temperature improves membrane performance and emulsifying properties of milk protein concentrates. *Dairy science & technology*, 95, 15-31.
- Matzinos, P. & Álvarez, R. 2002. Effect of ionic strength on rinsing and alkaline cleaning of ultrafiltration inorganic membranes fouled with whey proteins. *Journal of Membrane Science*, 208, 23-30.
- Merin, U. & CHERYAN, M. 1980. Factors affecting the mechanism of flux decline during ultrafiltration of cottage cheese whey. *Journal of Food Processing and Preservation*, 4, 183-198.

- Méthot-Hains, S., Benoit, S., Bouchard, C., Doyen, A., Bazinet, L. & Pouliot, Y. 2016. Effect of transmembrane pressure control on energy efficiency during skim milk concentration by ultrafiltration at 10 and 50 C. *Journal of dairy science*, 99, 8655-8664.
- Musale, D. A. & Kulkarni, S. S. 1998. Effect of whey composition on ultrafiltration performance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, 4717-4722.
- Ng, K. S., Dunstan, D. E. & Martin, G. J. 2018. Influence of processing temperature on flux decline during skim milk ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 195, 322-331.
- Nishanthi, M., Chandrapala, J. & Vasiljevic, T. 2017. Compositional and structural properties of whey proteins of sweet, acid and salty whey concentrates and their respective spray dried powders. *International Dairy Journal*, 74, 49-56.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F. & Rivas, J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of environmental management*, 110, 48-68.
- Premaratne, R. & Cousin, M. 1991. Changes in the chemical composition during ultrafiltration of skim milk. *Journal of dairy science*, 74, 788-795.
- Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku-Cruzado, G., Mayta-Apaza, A., Giusti, M., Jiménez-Flores, R. & García-Cano, I. 2021. Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, 104, 1262-1275.
- Rodgers, A., Allie-Hamdulay, S. & Jackson, G. 2006. Therapeutic action of citrate in urolithiasis explained by chemical speciation: increase in pH is the determinant factor. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21, 361-369.
- Siso, M. G. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource technology*, 57, 1-11.
- Spreer, E. 2017. *Milk and dairy product technology*, Routledge.
- Srilaorkul, S., Ozimek, L., Wolfe, F. & Dziuba, J. 1989. The effect of ultrafiltration on physicochemical properties of retentate. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 22, 56-62.
- Steinhauer, T., Hanély, S., Bogendörfer, K. & Kulozik, U. 2015. Temperature dependent membrane fouling during filtration of whey and whey proteins. *Journal of Membrane Science*, 492, 364-370.
- Sutherland, K. & Chase, G. 2011. *Filters and filtration handbook*, Elsevier.

- Svanborg, S., Johansen, A.-G., Abrahamsen, R. K. & Skeie, S. B. 2014. Initial pasteurisation effects on the protein fractionation of skimmed milk by microfiltration. *International Dairy Journal*, 37, 26-30.
- Swaisgood, H. E. 2007. Characteristics of milk. *Fennema's Food Chemistry*. CRC Press.
- Taddei, C., Daufin, G., Aimar, P. & Sanchez, V. 1989. Role of some whey components on mass transfer in ultrafiltration. *Biotechnology and bioengineering*, 34, 171-179.
- Tanguy, G., Siddique, F., Beaucher, E., Santellani, A.-C., Schuck, P. & Gaucheron, F. 2016. Calcium phosphate precipitation during concentration by vacuum evaporation of milk ultrafiltrate and microfiltrate. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 554-562.
- Tarapata, J., Dybowska, B. E. & Zulewska, J. 2022. Evaluation of fouling during ultrafiltration process of acid and sweet whey. *Journal of Food Engineering*, 328, 111059.
- ThermoFisher Micro BCA Protein Assay Kit *ThermoFisher*, Catalog number: 23235.
- Visser, F. 1976. Method for the manufacture of rennet-free cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 30, 41-54.
- Wagner, J. 2001. *Membrane filtration handbook: practical tips and hints*, Osmonics Cambridge.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. & Geurts, T. J. 2005. *Dairy science and technology*, CRC press.
- Wen-Qiong, W., Yun-Chao, W., Xiao-Feng, Z., Rui-Xia, G. & Mao-Lin, L. 2019. Whey protein membrane processing methods and membrane fouling mechanism analysis. *Food Chemistry*, 289, 468-481.
- Yusuf, Z., Wahab, N. A. & Sudin, S. 2019. Soft computing techniques in modelling of membrane filtration system: A review. *Desalin. Water Treat*, 161, 144-155.
- Zhao, C., Chen, N. & Ashaolu, T. J. 2022. Whey proteins and peptides in health-promoting functions—A review. *International Dairy Journal*, 126, 105269.
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C. & Gullo, M. 2020. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 2749-2764.

Vedlegg

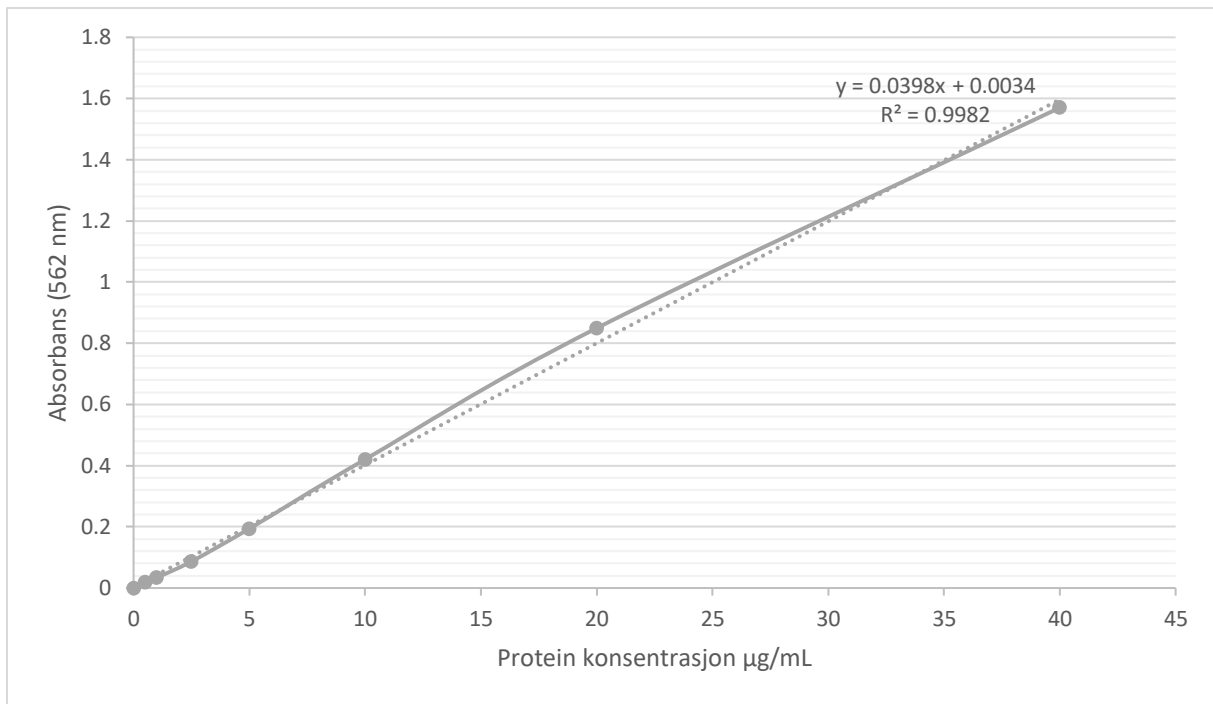
Oversikt over vedlegg

Vedlegg 1: Standardkurve for proteinkonsentrasjon

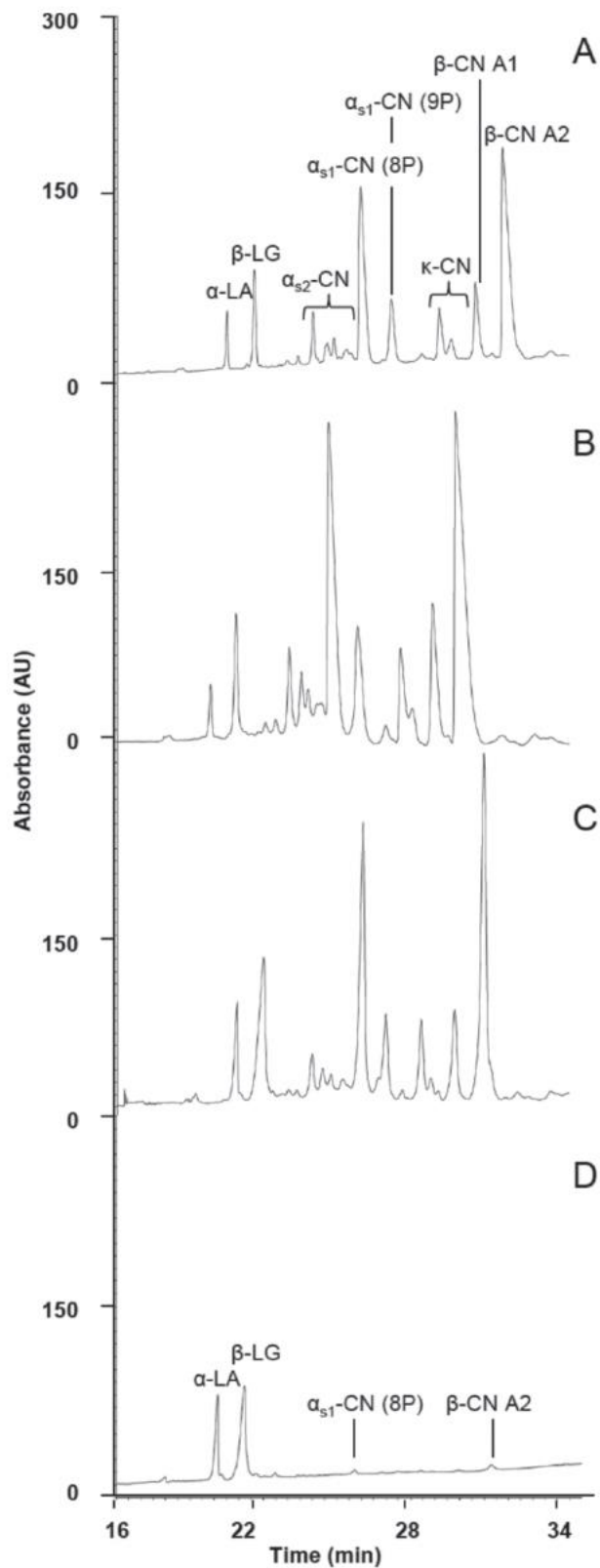
Vedlegg 2: Elektroforese med indentifisering av proteiner i melk

Vedlegg 3: Standardkurve for fosfatkonsentrasjon

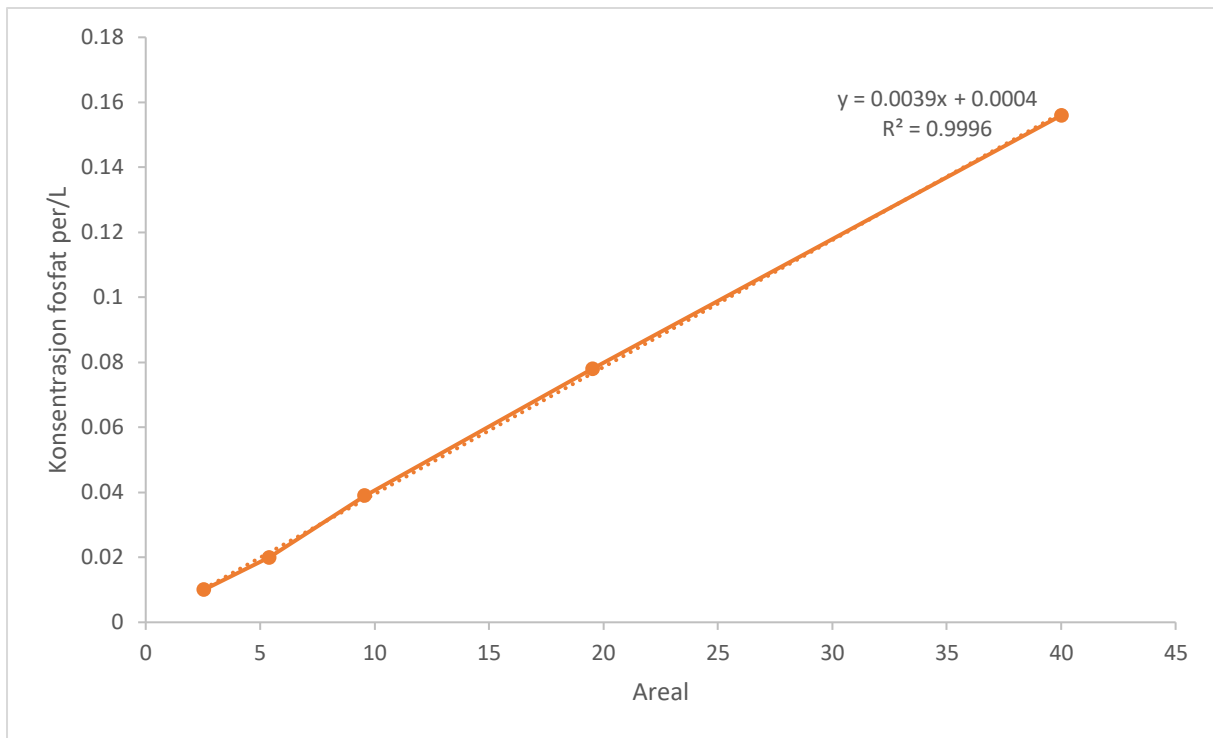
Vedlegg 4: Fosfatkonsentrasjon i prøver



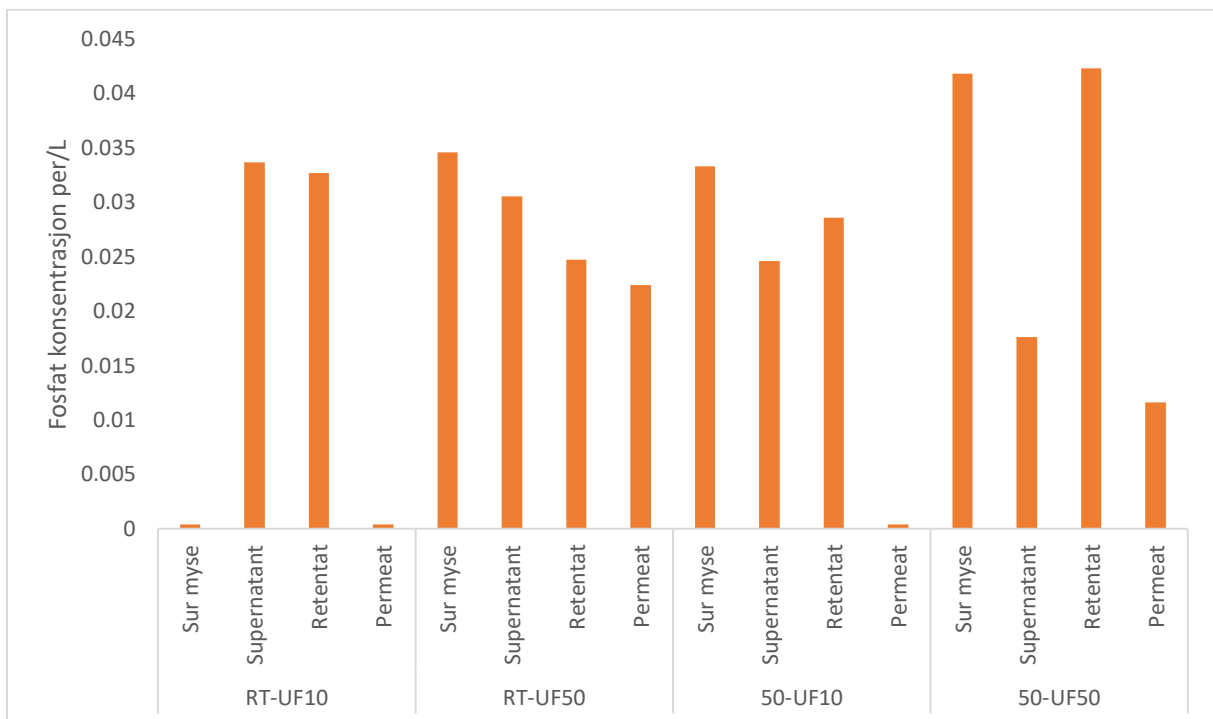
Vedlegg 1. Standardkurve for utregning av proteinkonsentrasjon ved BCA metoden.



Vedlegg 2. Elektroforese av (A) pasteurisert melk, (B) retentat fra mikrofiltrering, (C) permeat fra mikrofiltrering og (D) permeat fra mikrofiltrering. Vedlegget ble brukt til å bestemme proteiner ved CE (Jørgensen et al., 2016).



Vedlegg 3. Standardkurve for utregning av fosfatkonsentrasjon per liter.



Vedlegg 4. Fosfat konsentrasjon for Batch 3.



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway