

40 -

NORGES LANDBRUKSHØGSKOLE

MEIERIINSTITUTTET

---

KJEMISKE OG BOKJEMISKE OMDANNELSER

UNDER OSTENS MODNING

VED

A. Svensen og A.H. Strand.

-----

ÅS-NLH, 1980

NORGES LANDBRUKSHØGSKOLE

MEIERIINSTITUTTET

---

KJEMISKE OG BIOKJEMISKE OMDANNELSER

UNDER OSTENS MODNING

VED

A. Svensen og A.H. Strand.

-----  
AS-NLH, 1980

## INNHOLDSFORTEGNELSE:

	side
1. INNLEDNING	
2. FORHOLD AV BETYDNING FOR ENZYMATISK AKTIVITET	1
3. OMSETNINGEN AV CITRAT OG KARBOHYDRATER	10
3.1. Omsetningen av melkesukkeret under ystingen	10
3.2. Propionsyregjæringen	12
3.3. Smørsyregjæringen	13
3.4. Karbonylforbindelser	13
4. OMSETNINGEN AV PROTEIN	16
4.1. Proteolytiske enzymer	16
4.2. Omsetningen av kasein	19
4.2.1. Omsetningen med løpe	19
4.2.2. Omsetningen med mikrobielle peptidaser	22
4.2.3. Peptiddannelse, bitre peptider	28
4.2.4. Frie aminosyrer	30
4.2.5. Omdannelse av aminosyrer	31
4.2.5.1. Dekarboksylering og deaminering	31
4.2.5.2. Spalting av serin og treonin	35
4.2.5.3. Spalting av svovelholdige forbindelser	38
4.2.5.4. Transaminering	39
4.2.5.5. Strecker degradering	39
5. OMSETNINGEN AV FETT	40
5.1. Hydrolyse av fett	40
5.2. $\beta$ -oksydasjon av fettsyre	42
6. HIPPURSYRE OG BENZOESYRE	46

## I. Innledning

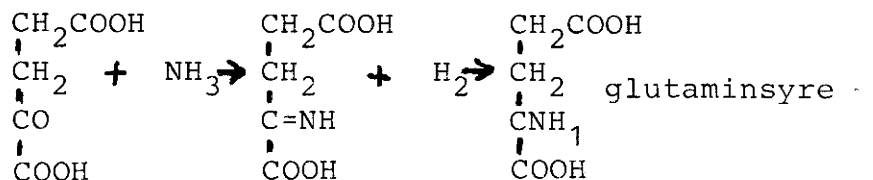
Det er svært omfattende biokjemiske og kjemiske reaksjoner som finner sted når den ferske ostemassen forandres fra å være en grovkornet lite sammenhengende masse med mild smak til å bli plastisk sammenhengende med forskjellig aroma. Det er utrolig at det er mulig å lage et så stort antall produkter som lukt og smakmessig er så vidt forskjellig med bare melk som råstoff. Melkens tre hovedkomponenter: Protein, fett og laktose spaltes under innvirkning av forskjellige bakterie- og muggarter til lavere molekylære forbindelser som både lukter og smaker sterkt.

De kjemiske forandringene som finner sted er i de fleste tilfellene katalysert av enzymer som produseres av mikroorganismer som er tilsatt ystemelken og fra løpe. Blant modningsreaksjonene er spalting og resyntese av alle de deltagende stoffene, så som protein, peptider, aminosyrer, karbohydrater, fett, nukleinsyrer, organiske syrer, forskjellige karbonylforbindelser, vekstfaktorer fra gruppen av vitaminer, prostetiske grupper i enzymene og til slutt enkle spaltingsprodukter som ammoniakk og karbondioksyd.

I det følgende skal vi se litt nærmere på en del prosesser som reduksjon, oksydasjon, dehydrering, hydrolyse, deaminering og dekarboksylering.

Det er forståelig at i et så komplisert system som i en ost med høy modningsgrad vil det skje mange forskjellige reaksjoner. Spaltingsprodukter som f.eks. peptider kan danne grunnlaget for resyntese av protein. Andre reaksjoner fører til syntese av aminosyrer, aspartinsyre dannes fra fumarisyre og ammoniakk ved hjelp av aspartase, eller glutaminsyre fra  $\alpha$ -ketoglutarsyre og ammoniakk.

*Skemmas dannelse med fig 10-9 s 309 2*



$\alpha$  ketoglutarsyre

Slike stoffomsetninger er gjerne undersøkt i modellforsøk med  $C^{14}$  isotoper. Utgangsstoffene er syntetisert med  $C^{14}$  og man isolerer og måler  $C^{14}$ -innholdet i sluttproduktet. En metode som etterhvert har blitt et meget effektivt middel for å kartlegge mellomtrinn i stoffomsetningen.

I de senere år har det funnet sted en sterk utvikling når det gjelder kjemiske analysemetoder, og dette har bidratt til større kjennskap til stoffomsetningen under modningen av osten.

Full utnyttelse av den nevnte isotopteknikken er avhengig av avanserte instrumenter som: gassfraktometer, infrarød-spektrofotometer, UV-spektrofotometer, Nuclear-Magnetic-Resonans, massespektrofotometer, elektroforesystem, osv.

Den første fasen under ostemodningen, formodningen, foregår i alle ostevariantene likt, og er i alminnelighet basert på de samme forandringene: dannelselse av melkesyre fra laktose ved hjelp av melkesyrebakterier og ingen vesentlig nedbrytning av protein eller fett. Under selve hovedmodningen som finner sted på gjæringsbua foregår det blant annet en sterk spalting av proteinet. I de vanlige faste løpeostene foregår modningen innenfra, mens andre oster som er overflatebehandlet med  $\lambda$  linens eller mugg, også vil få en modning som går utenfra og innover i osten.

## 2. FORHOLD AV BETYDNING FOR ENZYMATISK AKTIVITET.

De biologiske omdannelsene som foregår under ystingen og i osten under modningsprosessen skyldes aktiviteten til en rekke enzymer og enzymsystemer. Noen er opprinnelig tilstede i melken, andre tilføres ystemelken direkte som chymosin, eller indirekte, gjennom mikroorganismene som er tilstede i melken eller tilsettes i form av kulturer.

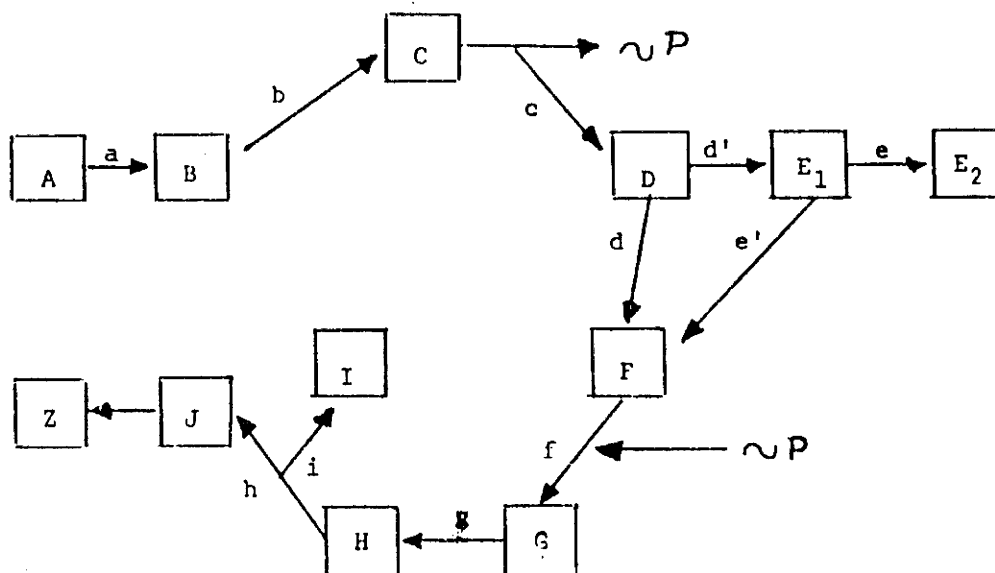
I en slik blanding av enzymer må en vente at enkelte er aktive og andre mindre aktive eller inaktive, alt etter de herskende forhold i miljøet.

De samme miljø-faktorer som har betydning for mikroorganismenes vekst og biologiske aktivitet har også betydning for enzymaktiviteten. Dette er naturlig da de biologiske prosessene i cellene er katalysert av enzymer. Cellenes veksthastighet vil være bestemt av den mest langsomme enzymreaksjonskjeden. Enzymene er imidlertid generelt mere motstandsdyktige mot ugunstige miljøbetingelser enn cellene som har produsert dem. Enzymene vil kunne være aktive selv om cellestrukturen er destruert i en slik grad at cellen ikke lenger lever.

*Ved avdøje  
kan enzymer  
overleve.*

De forskjellige kombinasjoner av miljøfaktorer som temperatur, pH, redokspotensial, salt, metalljoner etc, vil virke selekterende på enzymenes aktivitet. Det er også andre forhold som kan ha stor betydning for aktiviteten til det enkelte enzym eller enzym-system i osten. Reaksjonsproduktet fra ett enzym kan tjene som substrat for et annet. På denne måten dannes reaksjonskjeder som eventuelt kan føre til en fullstendig nedbrytning av et substrat til de enkle komponenter det er bygget opp av. (fig. 2.1).

Ostens reaksjonsmiljø kan vanskelig reproduseres in vitro. Dette miljøet er heller ikke statisk, men dynamisk, og forandres fra dag til dag. Enzymstudier utført med definerte reaksjonsblandinger på laboratoriet blir derfor bare mer eller mindre gode tilnærmelser til de prosessene som foregår i osten under lagringen.



Figur 2.1.

Et hypotetisk system av enzymer med substratene A,B,C, etc., og enzymene a,b,c, etc., der substrat A trinnvis omdannes til produkt Z med biproduktene E<sub>2</sub> og I og med dannelse og forbruk av energirike fosfat-bindinger ( $\sim P$ ). Slike enzymsystemer er vidt utbredt i mikroorganismer som har betydning for osteproduksjonen. Enzymene har, som mikroorganismene, sine optimums-, maksimums- og minimums-temperaturer og pH-verdier for aktivitet.

Temperatur- og pH-avhengigheten påvirkes av mange faktorer som enzymkonsentrasjonen, substratets art og egenskaper, nærvær av aktivatorer eller inhibitorer osv.

De fleste enzymer er stabile ved temperaturer under 45°C. destruksjonen øker sterkt når temperaturen kommer over 50°C. De fleste er irreversibelt inaktivert ved 70-80°C. Vekst og formering av mikroorganismer opphører gjerne når temperaturen kommer noen få grader under frysepunktet, slik at vannet i cellene fryser og den kolloide struktur i cellene forstyrres. Enzymene vil imidlertid likevel være aktive ved denne temperatur selv om reaksjonshastigheten blir sterkt nedsatt. Temperatur-koeffisienten for de fleste enzymreaksjoner ligger omkring 2 ( $Q_{10}=2$ ). De fleste enzymene har optimal-temperatur ved 37 - 40°C.

*Substratkons* Reaksjonshastigheten er uavhengig av substratkonsentrasjonen så lenge substratet foreligger i overskudd, slik at alt enzym er bundet i enzym-substrat-komplekset. (0-orden reaksjon). Når enzymet foreligger i overskudd, vil reaksjonshastigheten være proporsjonal med substratkonsentrasjonen og reaksjonen går over til en første ordens reaksjon.

*aw*

Enzymreaksjoner inngår vanligvis ikke når vannet i miljøet er adsorbtivt bundet til hydrofile komponenter i miljøet. Enzymreaksjoner kan imidlertid foregå selv om miljøets vannaktivitet er så lav at den hindrer mikroorganismenes vekst og formering. Tørrede grønnsaker får f.eks. en

*Tørking*

ubehagelig høy-lignende smak dersom enzymene ikke blir inaktivert før tørringen finner sted. Selv en lav enzymaktivitet kan ha markert virkning på produkt-kvaliteten om modningstiden eller lagringstiden er lang. Heller

*Dypfrysing*

ikke i dypfrosne varer vil enzymreaksjonene stoppe helt før alt vann er frosset. I hydrolytiske reaksjoner er vannet både reaktant og et middel for transport av substrat til enzymet. Enzymatiske red-oks-reaksjoner kan vanskelig finne sted eller bare foregå i begrenset omfang uten tilgang på fritt vann. Mediets vannaktivitet bestemmer diffusjonen av substratet til enzymet. Substratets diffusjonshastighet blir derfor en avgjørende faktor for reaksjonen. Store molekyler diffunderer langsommere enn små molekyler og vil hydrolysere langsomt eller slett ikke om vannaktiviteten er lav. Substratets molekylvekt og diffusjonsegenskaper er derfor faktorer av vesentlig betydning for enzymreaksjonens omfang og hastighet.

*aw*

*↓  
diffusjon*

*Stør: Sm<sup>o</sup>  
molekyl.*

*Aktiverende  
stoff*

*-syre*

*-metallion.*

Flere stoffer aktiverer enzymet eller enzymets substrat. For eksempel vil syre aktivere pepsinogen og chymosinogen til aktivt enzym. Spor av metalljoner som Co, Zn, Mn, Mg, Fe m.fl. er ofte nødvendige aktivatorer for mange enzymer. De kan enten selv være en essensiell del av selve enzymet, (metalloenzymer) eller de kan virke aktiverende ved å inaktivere hemningsstoffer. (fig. 2.2.)



Fig. 2.2.

Eksempler på enzymer som aktiviseres av følgende metallioner:

	Zn <sup>++</sup>	Mn <sup>++</sup>	Co <sup>++</sup>	Cu <sup>++</sup>	Fe <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Ba <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	Cd <sup>++</sup>	Ni <sup>++</sup>	Hg <sup>++</sup>	Sn <sup>++</sup>	Pb <sup>++</sup>
Aldolase	x		x		x								
Oksaleddiksyre-dekarboksylase	x	x	x	x	x	x	x		x	x			x
Alkalisk Fosfatase	x	x	x			x		x		x			
Alanyl/Leucyl dipeptidase	x	x		x					x			x	x
Histidindeaminase	x								x		x		
Lecitinase	x	x	x	x		x							

*Inaktivatorer*

Hemmingsstoffene kan virke på flere måter. De kan binde essensielle ko-enzymmer, blokkere essensielle virkningsgrupper og metall-aktivatorer eller de kan destruere viktige strukturer eller funksjonelle grupper i selve enzym-proteinet.

*inaktivatorer*

*Metallion*

Det kan være slike stoffer som  $H_2S$ ,  $HCN$ ,  $NH_4OH$  som inaktiverer enzymer hvor metalljoner som Fe, Cu, Zn, Co er essensielle. Vi har også en rekke eksempler på at  $Cu^{++}$  virker inaktiverende på visse enzymer. Jfr. bruk av kopper ved ysting av Jarlsberg og Emmentaler.

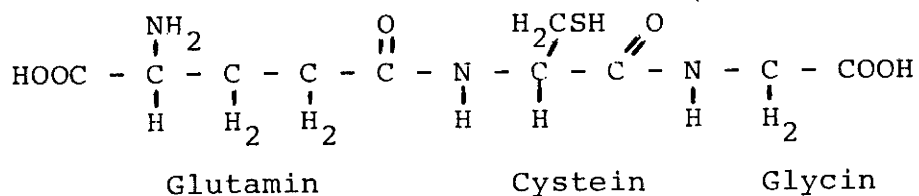
*Tunge metall*

Tunge metalljoner, derivater som inneholder tunge metalljoner (p-merkuri benzoat) og andre forbindelser som reagerer med tiol-grupper (alkyleringsmidler, jodoacetamid og oksydationsmidler) inaktiverer proteinaser hvor aktiviteten er avhengig av en eller flere tiolgrupper.

*Metall sekvestrerende forb.*

Metall-sekvestrerende forbindelser som cystein og etylen-diamintetra-acetat hemmer aktiviteten til enzymer hvor metalljoner som  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Zn^{++}$  er essensielle for aktiviteten.

*disulfid* Mange enzymer er bare aktive når -SH-gruppen i molekylet er fri. Ved mild oksydasjon vil sulfhydrylgruppene gå over i disulfid -S-S. Enzymet vil samtidig inaktiveres. I mange tilfelle kan enzymet reaktiveres ved overdosering med reduksjonsmidler som cystein, H<sub>2</sub>S og glutation. Glutation er et fysiologisk viktig tripeptid som består av aminosyrene: glutaminsyre, cystein og glycin



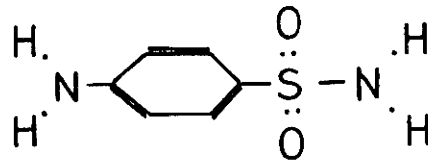
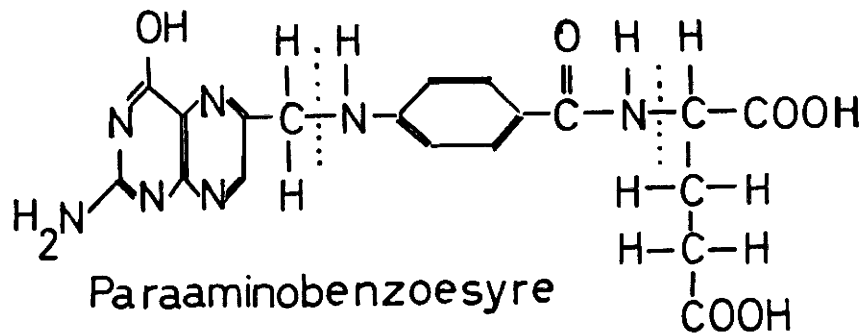
Cystin (-S-S-) og cystein (-S-H) representerer et reversibelt redoks-system (også i form av glutationet). (-S-S-forbindelsen spiller forøvrig en stor rolle i hårfiber-strukturen. Hår inneholder fra 9-17 % cystin).

*iod/hlor forb.* H-S-blokkeres av jod-eddiksyre, jodacetamid, p.klor-(eller jod) merkuribenzoat.

Cystein kan syntetiseres fra methionin, men ikke omvendt. Methionin er en "essensiell" aminosyre.

*Substrat analoge* Hemningsstoffene kan videre være substratanaloger som konkurrerer med substratet om de aktive sentre i enzymet, men som ikke påvirkes av enzymet. De aktive funksjonelle gruppene i enzymet blir dermed blokkert. Kjemo-terapeutica som sulfonamider virker på denne måten. De har en liknende struktur som p-aminobenzosyre, som er en viktig komponent til folinsyre-ko-enzymet. (fig.2.3) Syntesen av folinsyre blir blokkert og sulfonamidene blir dermed toksiske for de mikroorganismene som krever folinsyre som vekstfaktor. Sulfonamidenes hemningseffekt kan oppheves dersom en øker konsentrasjonen av p-aminobenzosyre. Den betegnes derfor som *Konkur. m. hemning* konkurransemessig hemning, da det her er et spørsmål om forholdet mellom konsentrasjonene av vekstfaktoren og hemningsstoffet. Kan hemningen ikke oppheves ved økning i substratkonsentrasjonen, betegnes den som "non-kompetativ" hemning.

## FOLINSYRE



Figur 2.3.

*denaturering* Enzymene vil selvsagt bli inaktivert av alle proteindenatureringsmidler som trikloreddiksyre, urinstoff, tunge metalljoner, varme, skumdannelse m.m., og hemningen er som oftest irreversibel.

*proteol. enz.* Proteolytiske enzymer kan også hydrolysere enzymproteinet og dermed destruere andre enzymer. Pepsin og trypsin hydrolyserer chymosin. Pepsin hydrolyserer trypsin ved pH 2,0 og trypsin hydrolyserer pepsin ved pH 8,0.

Enzymene tilføres osten a) med melken (originære enzymer), b) med mikroorganismer som er tilført melken ved tilfeldig infeksjon eller c) tilsatt i form av renkulturer eller ved direkte tilsetning av enzympreparater som oste-løpe. Det vil således kunne foreligge en kompleks enzymblanding i osten, spesielt dersom det ystes av upasteurisert melk. En må

imidlertid vente at enzymene i løpekstraktet og fra de mikroorganismene som tilsettes ystemelken vil være de viktigste under ostens modning. Men blandingens sammensetning vil variere med den mikroflora som utvikles under modningen og mikroorganismenes evne til å produsere enzymer. Mikroorganismenes enzymer kan enten være intracellulære, membranbundet eller ekstracellulære.

*Mem.b.* Membranbundne og intracellulære enzymer vil ikke kunne øve  
*intra c.* noen særlig innflytelse på produktet før etterat disse  
*enz.* frigjøres ved celleautolyse.

Relativt få mikroorganismer som nyttes har ekstracellulære enzymer, men kulturmugg og *Brevibacterium linens* er eksempler på slike *har ekstracellulære enz.*

Millioner til milliarder av bakterieceller pr. gram ost dør og autolyseres under modningen. Substrater av forskjellig slag blir dannet, og pH og temperaturen ligger generelt innenfor de grenser som passer mange forskjellige typer av enzymer. Reaksjonsproduktene som dannes vil i sin tur påvirke ostens smak, tekstur og konsistens.

Enzymene kan katalysere både ønskede og uønskede omdannelser i osten. Det gjelder derfor om å kunne kontrollere prosessene, hemme eller stoppe de uønskede prosessene, og aktivere de ønskede, slik at de går med optimal hastighet og får et riktig omfang. Dette forutsetter en god forståelse av ostemodningens biologi. De biologiske prosessene som kommer igang vil i sterk grad påvirkes av miljøfaktorene som temperatur, pH, salt, red-oks-potensial, nærvær av aktivatorer eller inhibitorer, enzymenes påvirkning av hverandre osv.

Vårekunnskaper på dette område er ikke fullstendige, men det gjøres stadig fremskritt i studiet av de biologiske prosessene som finner sted, også i et så komplisert medium som ost.

### 3. OMSETNINGEN AV CITRAT OG

#### KARBOHYDRAT

Forgjæring av melkesukkeret skjer enten ved de enzymsystemer som inngår i de såkalte Emden-Meyerhof-Parnas- gjæringsskjema (difosfat pathway) eller heterofermentativt ved den såkalte monofosfat pathway. I syringsteknikken er det gjort rede for begge prinsipper, samt for omsetningen av citrønsyre. Den detaljerte stoffomsetning vil derfor ikke bli gjennomgått her.

#### 3.1. OMSETNINGEN AV MELKESUKKERET UNDER YSTING

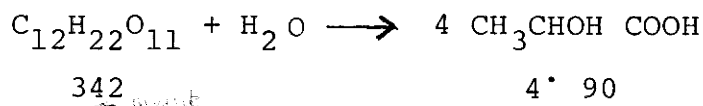
Melkesukkeret er den komponent i osten som først blir omdannet. Melkesyregjæringen innledes allerede under ystingen og når sin maksimale aktivitet under ostens forming og pressing. Under normale forhold er det en ren homofermentativ omdannelse av melkesukkeret til melkesyre. I de faste og halvfaste ostene vil alt sukkeret være omsatt til melkesyre i løpet av 24-48 timer. I bløte oster tar det betydelig lengre tid.

Antallet melkesyrebakterier og surhetsgraden i osten vil normalt nå maksimale verdier på det tidspunkt alt sukkeret er omsatt til melkesyre.

Går vi ut fra at mysa har et tørrstoffinnhold på 7% og et sukkerinnhold på 5% vil sukkerinnholdet i fersk ost med et vanninnhold på 45% bli:

$$\frac{45 \times 5}{93} = \underline{2,4\%} \quad \left( \frac{x}{45} = \frac{5}{93} \right)$$

Ved forgjæringen av sukkeret vil det bli omtrent den samme mengde melkesyre



$$\text{Faktor: } \frac{360}{342} = \underline{1,0526}$$

$$\% \text{ melkesyre i osten: } 2,4 \times 1,0526 = \underline{2,5\%}$$

I flytende kulturer vil streptokokkene i den vanlige blandingskulturen maksimalt danne 1% melkesyre under optimale dyrkingsbetingelser. Cellenes livsfunksjoner vil da stoppes på grunn *vellest stoppe pga lig pH* av syrekonsentrasjonen. Miljøets pH vil da være 4,2 - 4,5 dersom en har en aktiv kultur.

Når alt melkesukkeret kan omdannes til melkesyre i de faste og halvfaste ostene kommer dette av at hydrogenjone-aktiviteten i osten aldri når et slikt nivå at gjæringen stoppes. Dette skyldes ostens innhold av bufferstoffer.

*Bufferstoff*

Fosfater og kalsiumkaseinater er de viktigste bufferkomponentene.

Sekundære fosfater overføres til primære fosfater og kalsiumkaseinatet avkalkes.

Da fosfatene foreligger som kalsiumforbindelser, dels som kolloidalt kalsiumfosfat knyttet til kaseinkomplekset og dels som oppløselig salt, vil det dannes vesentlige mengder kalsiumlaktat under ostens syrning.

Melkesyren kan også virke hydrolyserende på fettene i osten og gi økte mengder frie fettsyrer. Når det gjelder innholdet av melkesyre i moden ost, foreligger det en del undersøkelser. Antila og Hietaranta har bestemt melkesyre i Edamerost og funnet følgende verdier, tabell 3.1.1.

Tabell 3.1.1. Melkesyre i finsk Edamer.

Ostens alder uker:	6-8		14-18		20-30	
	Skorpe	Midten	Skorpe	Midten	Skorpe	Midten
Melkesyre%	0,54	0,87	0,40	0,61	0,50	0,56

Innholdet varierer fra innerst til ytterst i osten, og med alderen. Undersøkelser som STURM og MAIR-WALDBURG har foretatt i Romadurost viser en nedgang i melkesyren fra 2,2%, i ferskost til 0,1% i 5 ukers gammel ost. Dette er en ekstrem rask nedgang i melkesyreinnholdet. De fleste modne ostene har et innhold som ligger mellom 0,1% og 1% melkesyre, hvor begge isomere

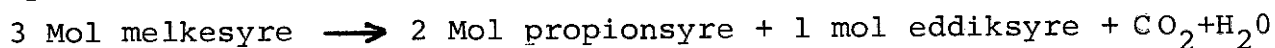
former er tilstede. Mellom 50 og 70% foreligger som L(+) melkesyre.

↑  
Arbeid isomer  
D: ⇒ diare  
Laktose

### 3.2. PROPIONSYREGJÆRING

I Emmentaler og Jarlsberg der propionsyrebakteriene spiller en vesentlig rolle under ostemodningen, omdannes laktatet til propionsyre og eddiksyre etter følgende skjema: Figur 3.2.1.

Vi har fulgt modningsforløpet i Jarlsbergost og figur 3.2.2. viser nedbrytningen av melkesyre og dannelsen av propionsyre og eddiksyre. Støkiometriske beregninger viser at:

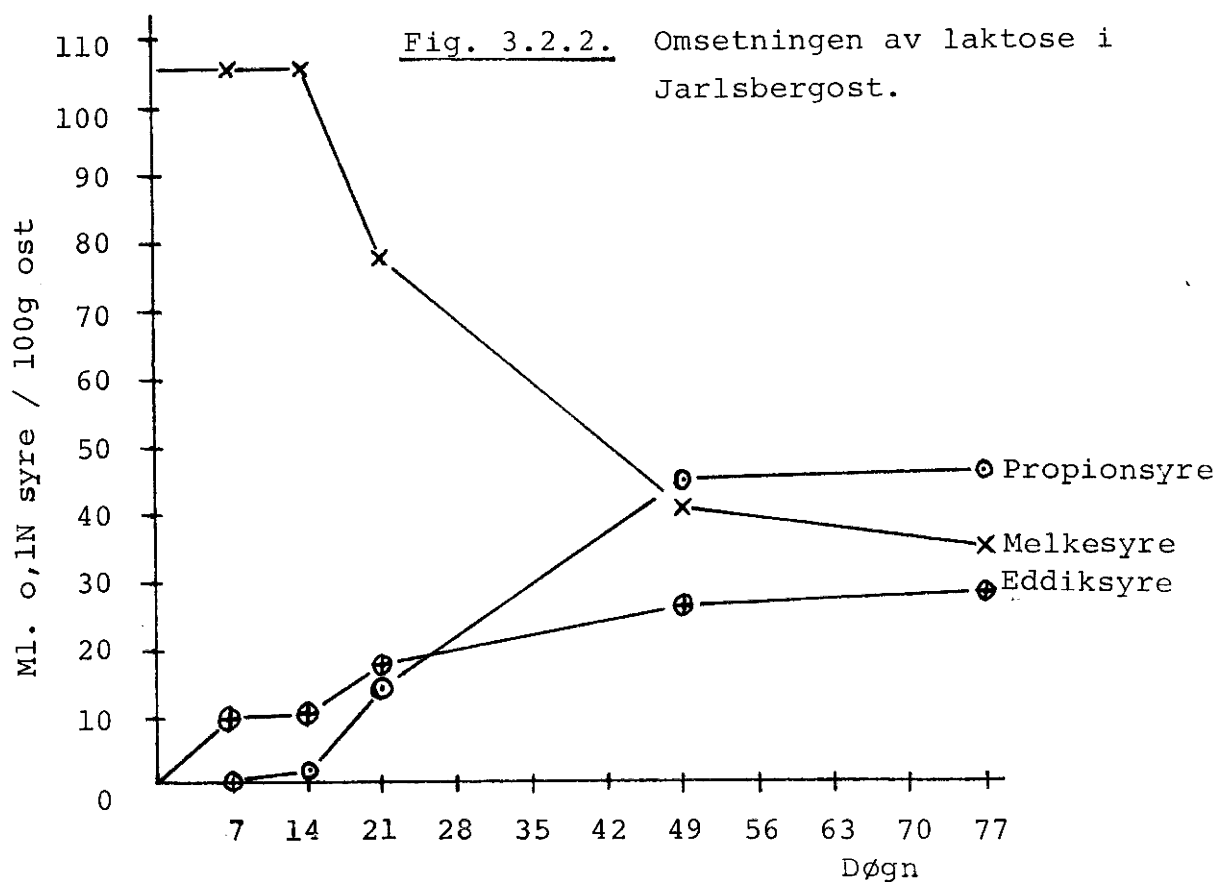


Forholdet 2 mol propionsyre og 1 mol eddiksyre er det teoretiske.

Resultatene fra forsøket viste 2,01:1 etter 3 uker, 2,31:1 etter 7 uker og 2,28:1 etter 11 uker. I et tidligere forsøk som omfattet 256 oster, fant vi et gjennomsnitt på 2,06:1). Praktisk  
relativt  
store

Nokså nær det teoretiske. WOOD og WERKMANN har imidlertid funnet forhold på opptil 14,7:1.

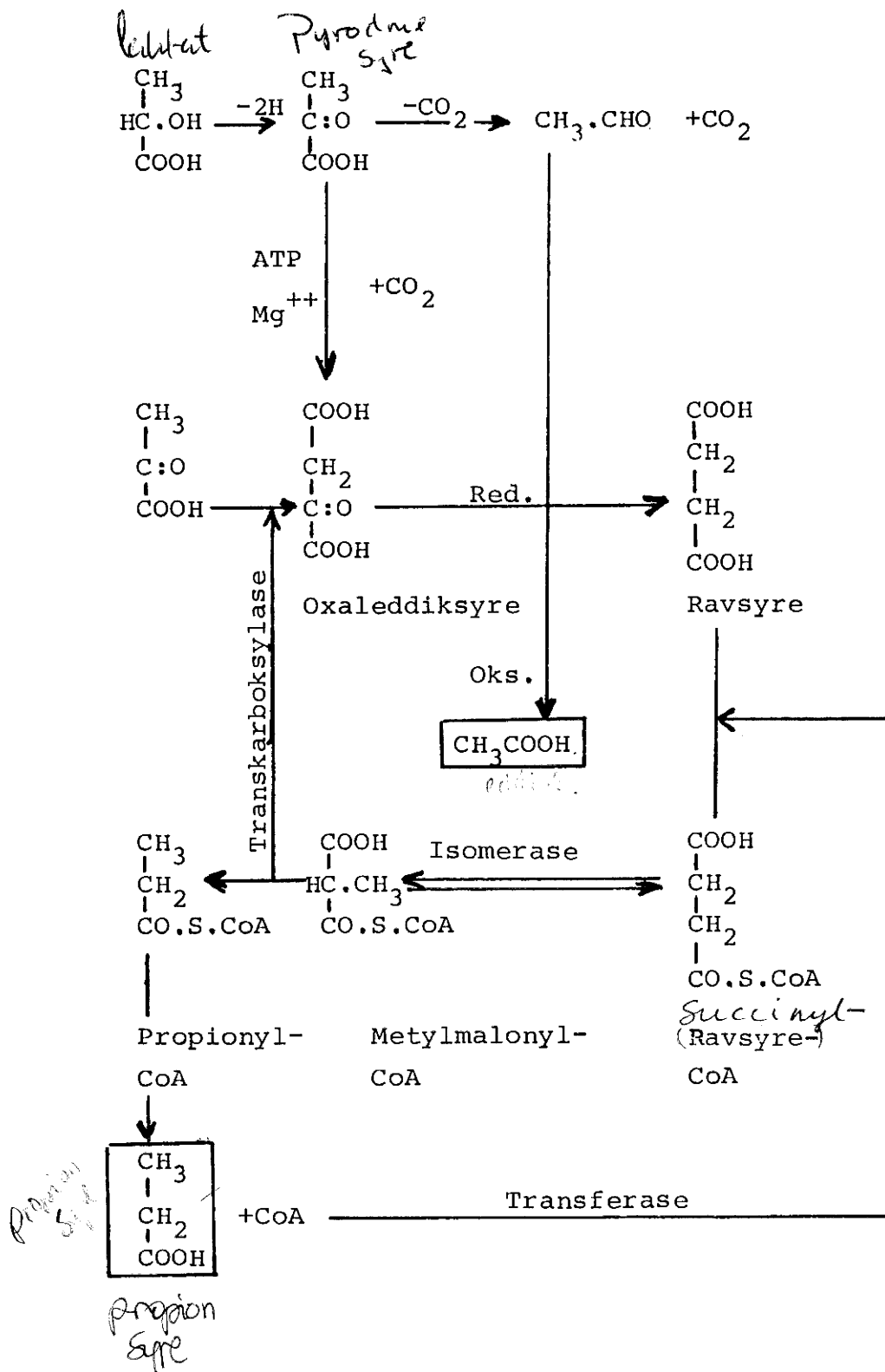
Av figuren ser vi at det er dannet en viss mengde eddiksyre i løpet av den første uka. Omlag 1/3 av denne mengden stammer sannsynligvis fra citratforgjæringen, mens resten skyldes oksydativ spalting av pyrodruesyre og oksydasjon av acetaldehyd.



Figur 3.2.1.

Propionsyregjæring med P.Shermani

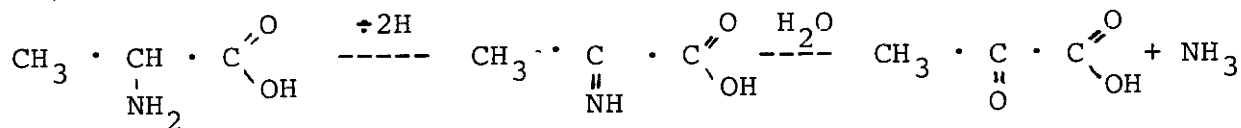
NB!



Propion Syre

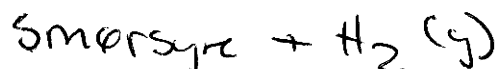


En del aminosyrer spaltes også av propionsyrebakterier og gir propionsyre som sluttprodukt. Et eksempel på dette er alanin:



Pyrodruesyren inngår så i skjemaet som vist i figur 3.2.1. Ved sterk proteolyse vil derfor en del av propionsyren og eddiksyren stamme fra proteinet i osten og ikke fra laktatet, men disse mengdene vil relativt sett være små i forhold til det som dannes fra melkesyren.

### 3.3. SMØRSYREGJÆRINGEN

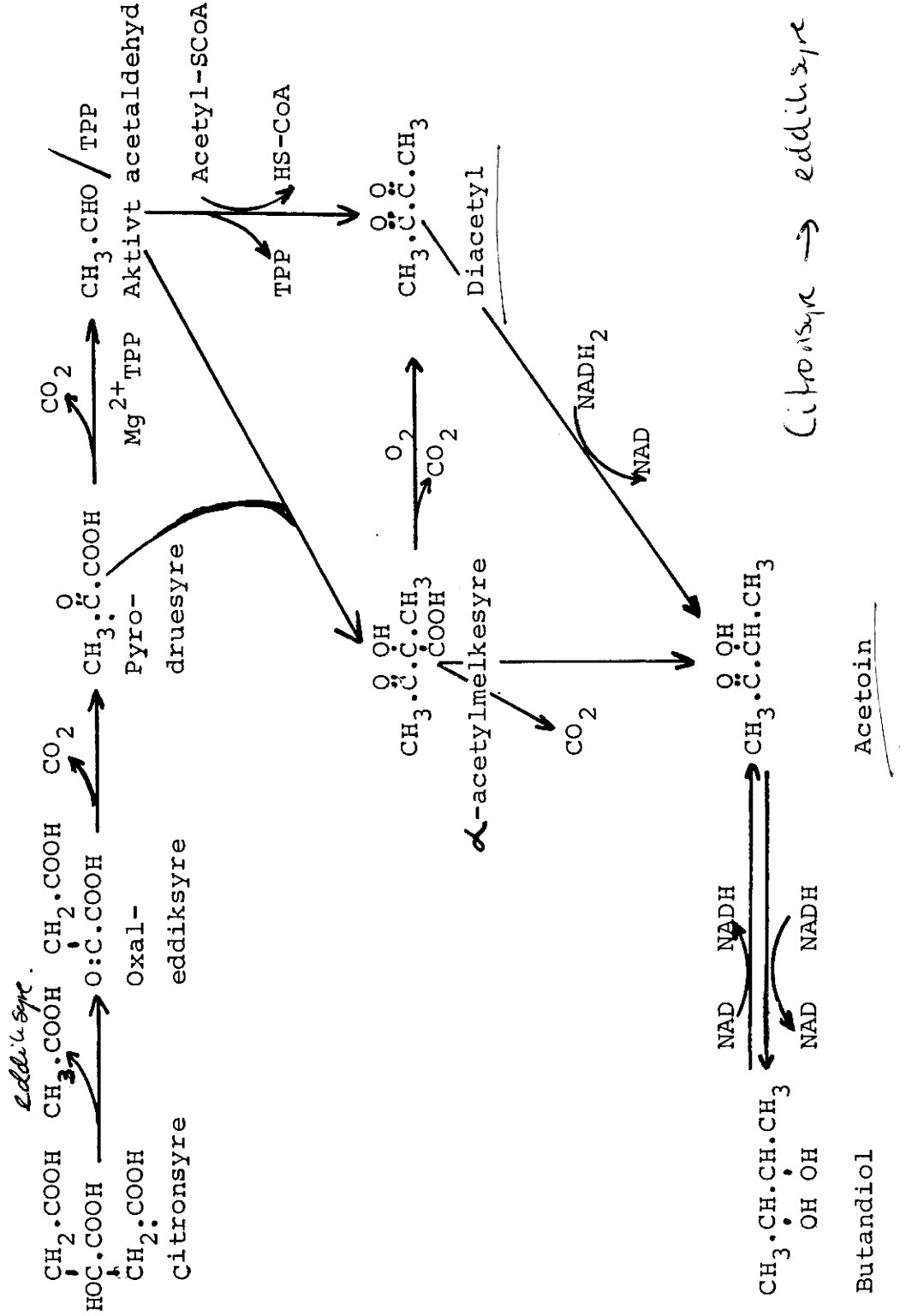


I mange tilfeller inneholder melken et stort antall clostridier. Dette skyldes som regel dårlig silofør og dårlig fjøshygiene. Ved baktofugering kan disse fjernes og melken kan bli akseptabel som ystemelk. Men i enkelte tilfelle vil vi likevel få en produksjon av smørsyre og hydrogengass i den ferdige osten. Denne gjæringen setter ofte inn på et sent tidspunkt og vi får en ost som følge av den sterke gassdannelsen. Osten får sprekker og en utpreget kvalm smak. Denne prosessen kan hindres ved tilsetning av nitrat til ystemelken. 15 g pr. 100 liter ystemelk er tillatt for enkelte ostesorter.

### 3.4. KARBONYLFORBINDELSER

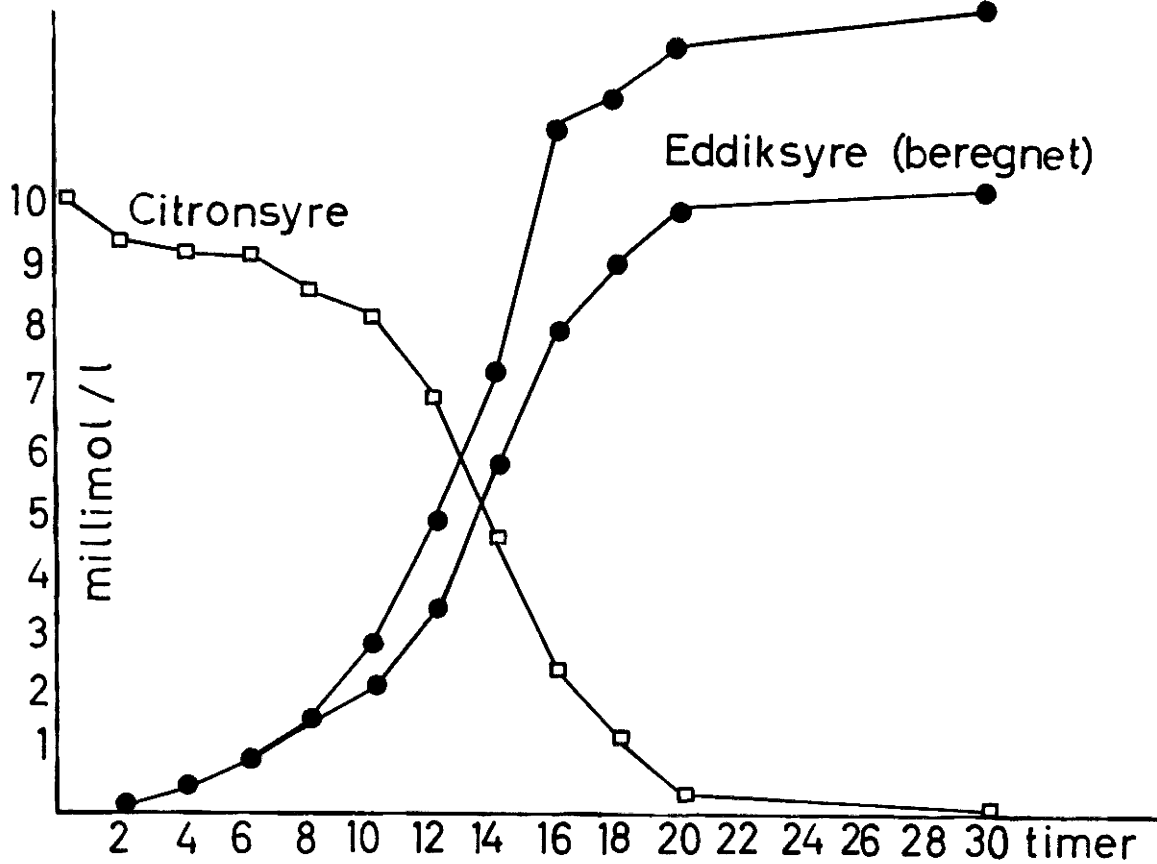
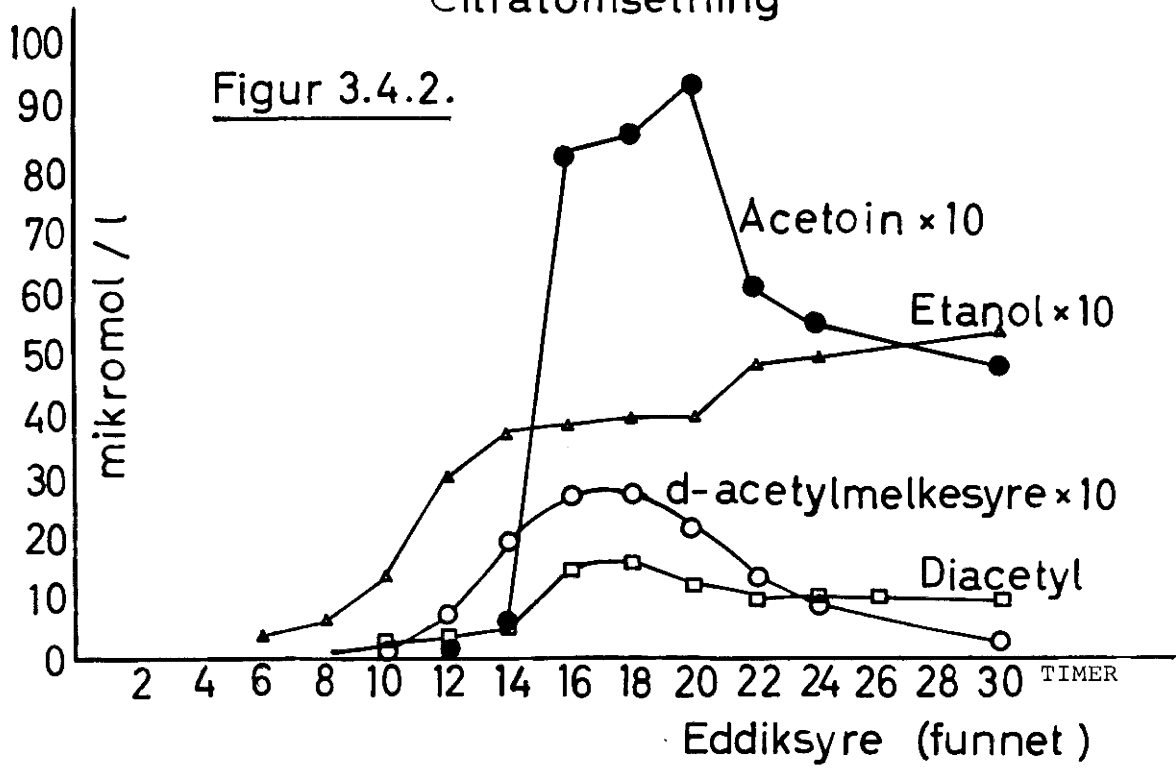
Citronsyre er utgangsstoffet for en rekke karbonylforbindelser, og det er av vesentlig betydning å kjenne til denne stoffomsetningen fordi noen av de stoffene som dannes er sterke lukt- og smaksdannere. Det dreier seg om stoff med forholdsvis labil karakter som befinner seg i likevekt. Noen av komponentene er i tillegg sterkt flyktige og dette gjør det vanskelig å få kvantifisert de forskjellige komponentene til forskjellige tider under citronsyreforgjæringen. Figur 3.4.1. viser hvordan spaltingen av citronsyre foregår.

Figur 3.4.1. Citronsyreforgjæring



Citratomsetning

Figur 3.4.2.



Ved hjelp av spektrofotometri og gasskromatografi har vi bestemt citronsyre, eddiksyre, diacetyl, *d*-acetylmelkesyre og acetoin til forskjellige tider under syrningsforløpet for forskjellige kulturer. I figur 3.4.2. gjengis resultatene for A-5- kulturen.

Av skjemaet for citronsyreforgjæringen ser vi at for hvert mol citronsyre dannes det ett mol eddiksyre. Analysene viste imidlertid at vi fant noe mere enn den forventede mengden, *eddiksyre* ca 25% mere. I Jarlsbergost har en funnet de samme forhold. I løpet av den første uken dannes det ca 10 millimol eddiksyre pr. kg ost. Bare 1/3 av dette kan være spaltet fra sitronsyren. Den resterende mengden kan komme fra acetaldehyd eller pyrodruesyre som dannes senere i sitronsyreforgjæringen. Men den kan også komme fra heterofermentativ melkesyregjæring.

Diacetyl som er den sterkeste smakskomponenten i dette skjemaet, er ikke helt lett å bestemme kvantitativt fordi *d*-acetylmelkesyre lett kan dekarboxylere ved lav pH og tilstedeværelse av O<sub>2</sub> og danne diacetyl. En må derfor destillere syrekulturen ved pH 6,6 og med N<sub>2</sub>-gjennombløsing. Ved å ta disse forholdsreglene vil en få den mest sannsynlige diacetylverdien. *d*-acetylmelkesyren + diacetyl får en ved å destillere ved pH 3,5 og boble gjennom O<sub>2</sub>. Diacetyl bestemt på denne måten minus diacetyl bestemt ved pH 6,6 kan regnes om til *d*-acetylmelkesyre. Av figur 3.4.2. ser en at mengde diacetyl samsvarer med mengde *d*-acetylmelkesyre. De har begge et maximum mellom 16-21 timer. *d*-acetylmelkesyren er da bortimot 20 ganger større. Ved å velge feil destillasjonsbetingelser kan en få altfor høye diacetylverdier. I likhet med mange andre har vi ved tidligere analyser fått tildels høye verdier av diacetyl i syrekulturen, opptil 10 ppm. Senere analyser viste mellom 1 og 3 ppm.. Men en må regne med at det fortsatt vil komme publikasjoner hvor de nødvendige forholdsregler ikke er tatt. En melding av J. HILD så sent som i 1979 beretter om tildels høye diacetylverdier i Yoghurt og Bioghurt. Metoden er basert på gasskromatografiske analyser av damprommet over kulturen. 30 minutters varming ved 60°C

med  $O_2$  i nærheten og en pH mellom 3 og 4 vil utvilsomt danne diacetyl fra  $d$ -acetylmelkesyre.

Heldigvis er ikke diacetyl det endelige produktet, i så fall ville vi fått produkter med alt for sterk smak. Diacetylet reduseres til acetoin og videre til butandiol som er smakløst.

Aceton  
Nahrlic Aceton forekommer i små mengder i melken. I de fleste tilfeller mellom 2 og 5 ppm. I de syrekulturene vi har analysert, har en ikke kunnet påvise noen stigning under syrningsforløpet.

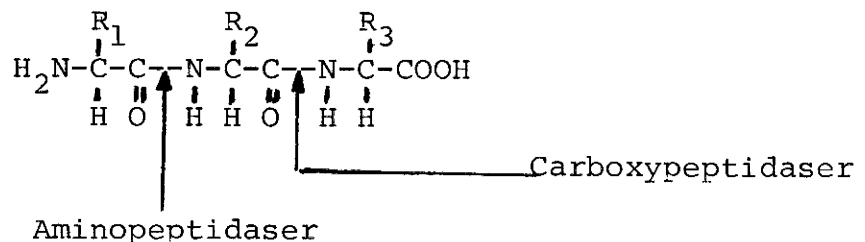
## 4. O M S E T N I N G E N A V P R O T E I N I O S T E N

### 4.1. PROTEOLYTISKE ENZYMER

Klassifikasjon av proteolytiske enzymer var lenge gjenstand for diskusjon. Tidligere var denne basert på størrelsen av det molekylet som ble hydrolysert. De enzymer som hydrolyserte proteiner som sådan ble kalt proteinaser og de som hydrolyserte peptider ble kalt peptidaser. BERGANN (1942) hevdet at alle proteolytiske enzymer hydrolyserte peptidbindingene og viste at enzymets spesifikke virkning ikke bare var avhengig av peptidkjedens lengde, men av enzymets affinitet til spesifikke peptidbindinger, karakterisert ved aminosyrer i nabostilling til bindingen og av spesielle jonegrupper i sidekjeder til peptidkjeden.

Følgende nomenklatur er vanlig brukt:

1. Eksopeptidaser (peptidaser). Ekso = utenpå *i enden*
  - a) Carboxypeptidaser, de som hydrolyserer peptidbindingen i nabostilling til alfa-karboksylogrupper i endestilling av peptidkjeden.
  - b) Aminopeptidaser, som hydrolyserer peptidbindinger i nabostilling til alfa-aminogrupper i endestilling av peptidkjeden



- c) Dipeptidaser
  - d) Diverse.
2. Endopeptidaser (proteinaser). Endo = inni. *inni peptid*  
Disse hydrolyserer sentrale, såvel som terminale peptidbindinger i molekylet.

1 og 2 svarer omtrent til den tidligere definisjon av henholdsvis peptidaser og proteinaser.

Endopeptidaser omfatter enzymer som pepsin, chymosin, trypsin og chymotrypsin i mave-tarmkanalen hos mennesker og dyr, vegetabiliske enzymer som papain og ficin., intracellulære enzymer som cathepsin og mange mikrobielle enzymer.

Mikrobielle proteinaser har vanligvis ikke den samme spesifitet som enzymene i mave-tarmkanalen. Mange hydrolyserer både proteiner og peptider.

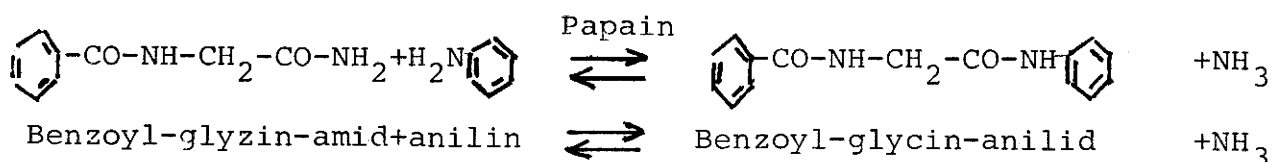
Dannelsen av proteolytiske enzymer er avhengig av at substratet inneholder assimilerbare komponenter. Selv sterkt proteolytiske mikroorganismer vokser ikke i substrat som inneholder bare uomsatt protein som eneste N-kilde. Celleveksten vil begynne når substratet tilsettes spor av assimilerbart nitrogen. Cellene i podematerialet er øyensynlig ikke i stand til å syntetisere tilstrekkelig med proteinaser når substratet er fritt for assimilerbart nitrogen.

Metalljoner, spesielt  $\text{Ca}^{++}$  og  $\text{Mg}^{++}$  synes å stimulere dannelsen av proteolytiske enzymer, enten indirekte, ved å stimulere celleveksten eller ved direkte virkning på enzymproduksjonen.

**NB** ~~Forgjærbare karbohydrater~~ i substratet hemmer cellenes produksjon av proteinaser. Hvorvidt effekten skyldes syredannelser eller andre årsaker er ikke nærmere kjent.

Ved siden av å hydrolysere peptidbindinger katalyserer de proteolytiske enzymene visse overføringsreaksjoner hvor transpeptidisering synes å være en av de viktigste reaksjonene.

Eksempel:



De proteolytiske enzymene er aktive i surt, nøytralt eller alkalisk miljø.

*aktiviseringsfaktorer*

Sulfohydryl-forbindelser som cystein og metalljoner som  $\text{Mn}^{++}$ ,

$Zn^{++}$  og  $CO^{++}$  er de prinsipielle aktiveringsfaktorene for proteolytiske enzymer. Aktivering ved metalljoner kan ha forskjellige forklaringer. Det reaktive systemet kan dannes ved <sup>aktivering: øge</sup> at (1) metalljonet danner kompleks med substratet, (2) med enzymet eller (3) med enzym-substrat komplekset.

De aktuelle proteinspaltende enzymer i ost kan deles i tre grupper etter opprinnelsen:

1. Originære proteaser i melken.
2. Tilsatte enzympreparater som løpe, etc.
3. Mikrobielle peptidaser fra kulturorganismer og tilfeldig flora.

Det er ikke funnet at ~~originære proteaser i melken spiller noen vesentlig rolle ystingsteknisk sett.~~

↓  
Det var det i emmentaler ost.



Tabell 4.1.1.  
pH-område for aktivitet av visse enzymer fra mikroorganismer som er av betydning i osteoproduksjonen.

Enzym	Substrat	Organisme	Opt.-pH	pH-grense for 50% av opt.aktivitet	Kilde
Proteinase	Kasein	Sc.liquefaciens	7,4 - 7,5	6,6 - 9,0	Dundani 1950
"	Alfa-kasein	Sc.lactis	6,5	5,5 - 8,0	Vanderzant 1953
"	Kasein	B.linens	7,0	6,5 - 8,0	Thomason 1950
"	Kasein	Lb.casei	6,0	4,0 - 8,0	Brandsæter et al 1956
Peptidase	DL-alanyl-glycin	Sc.liquefaciens	7,0	6,2 - 7,7	Dundani 1950
"	"	"	8,3	7,8 - 9,0	
"	Glycyl-4-leusin	Sc.lactis	6,5 - 7,5	5,0 - 9,0	Vanderzant et al 1954
Peptidase	DL-leucyl-glycin		8,5	5,5 - 8,3	
	DL-alanyl-glycin		8,0	5,0 - 9,2	
	glycyl-glycyl-glycin		8,0	6,7 - 8,7	
Peptidase	DL-alanyl-glycin	Lb.casei	7,0 - 7,5	5,5 - 8,3	Brandsæter et al 1956
	Glycyl-DL-alanin		8,0	7,0 - 8,5	
	Alanyl-glycyl-glycin		7,0	5,5 - 7,5	
Deaminase	Serin	Lb.casei	7,0 (52°C)	5,7 - 8,5	Kristoffersen et al 1955
"	"	"	8,3 (46°C)	7,2 - 9,3	
Lipase	Smørfett	Candida lipolytica	6,2	5,5 - 7,2	Peters et al 1948
Lipase	Kokosfett	P.fragii	7,0 - 7,2	6,3 - 8,0	Nashif et al 1953
Lipase	Smørfett	Geotricum candidum	6,0	5,0 - 8,0	Nelson 1952
Lipase	Smørfett	P.roqueforti	5,3 - 7,5	4,5 - 9,0	Thibodean et al 1942
Proteinase	Kasein	"	5,8 - 6,3	4,8 - 7,5	
Lipase	Smørfett	"	5,8 - 7,5	5,0 - 9,0	Niki et al 1966
Proteinase	Kasein	"	5,5 - 5,5	5,5 - 7,0	

oversikt, gamle.

## 4.2. OMSETNINGER AV KASEIN

Kaseinet, som utgjør hoveddelen av melkens proteiner og er det "egentlige" osteprotein, har størst interesse i denne sammenheng, selv om det ved nye teknikker nå også er mulig å produsere oster med et visst innhold av serumproteiner.

Enzymaktiviteten overfor de forskjellige kaseintypene  $\alpha_s$ ,  $\beta$ - og  $\kappa$ -kasein varierer.

### 4.2.1. OMSETNINGER MED LØPE

Løpe inneholder først og fremst chymosin, pepsin og forskjellige andre enzymer som kommer i ekstraktet under fremstillingen.

Chymosin er en endopeptidase som foruten å koagulere melken også hydrolyserer det utfelte parakasein. AMUNDSTAD (1950) fant et pH-optimum på 4,9 - 5,1 ved 30°C når en 3% kaseinat-oppløsning ble nyttet som substrat. Optimum syntes gradvis å forskyves mot høyere pH når temperaturen ble senket.

Chymosinet spaltet kaseinet til vannløselige proteoser, peptoner og peptider, men hydrolysen førte ikke til dannelse av frie aminosyrer. AMUNDSTAD fant ikke påvisbare mengder amino-nitrogen i reaksjonsblandingen. STADHOUDERS (1959) kom til samme resultat i ystingsforsøk med Goudaost.

Tabell 4.2.1.1. Løpemengdens virkning på protein-hydrolysen i ost. (STADHOUDERS, 1959).

Løpemengde	Modningstid uker	LN/TN% Albumoser og peptoner	AN/TN% <sup>1)</sup> Lavere peptider og aminosyrer
1) 30 ml/100 l melk	3	16,9	3,1
	10	25,3	7,1
	20	31,2	9,2
	30	35,2	11,9
2) 120 ml/100 l melk	3	23,8	2,9
	10	37,9	7,1
	20	42,3	9,1
	30	46,0	12,0

1) Peptidene felt med fosforwolframsyre.

Som vist i tabell 4.2.1.1. økte ostens innhold av løselig nitrogen med økende løpekonsentrasjoner. Ostens innhold av amino-nitrogen var det samme enten det var nyttet normale eller store løpemengder.

En viss mengde løpeenzym vil imidlertid også stimulere dannelsen av lavere peptider, slik som vist av AMUNDSTAD (1950), tabell 4.2.1.2.

Tabell 4.2.1.2. Proteolytisk virkning av enzympreparat fra *Sc. cremoris* stamme 24 D sammen med løpeenzym. (AMUNDSTAD 1950).

*Blanding av Bakt.enzym  
og løpeenzym +*

pH	LN/TN%			AN/TN%	
	a Bakt.- enzym	b Løpe- enzym	a+b	a Bakt- enzym	a+b
5,25	11,50	38,00	48,10	3,15	8,52
5,55	15,90	37,30	52,60	5,50	13,15
5,90	20,00	29,00	53,00	7,05	15,55
6,25	22,60	19,80	49,30	8,75	16,65
6,60	22,30	12,40	39,40	8,20	12,03
6,95	17,50	5,00	32,40	7,22	9,63

Substrat: 3% kaseinatopløsning. Temp.: 30°C. Tid: 10 dager.

En overdosering av løpeenzymet vil imidlertid ikke gi noen tilleggs-effekt utover den stimulans som oppnås ved normal dosering. En overdosering av løpe fører lett til opphoping av bitre peptider i osten.

VISSER (1976) har beskrevet en metode for fremstilling av aseptisk ost hvor effekten av løpeenzymet kan studeres isolert.

Ved å redusere ystemelkens innhold av Ca og Mg til under 0,1% (ionebyttefiltrering) koagulerer ikke melken ved enzymbehandling med løpe. Melken blir så pasteurisert, kalsiuminnholdet justert og varmet dielektrisk til 30°C for koagulering.

GRIPON et al (1975), fremstilte på denne måten løpeost uten mikrobielle proteaser.

## Kun løpeenzym

Etter 40 dagers modning var det bare vesentlig høymolekylære peptider tilstede. Løpen virket vesentlig på  $\alpha_{SI}$ -kaseinet. Etter 40 døgn fantes knapt uomsatt  $\alpha_{SI}$  tilbake, mens 65% av  $\beta$ -kaseinet var intakt.

I Tilsiterost fant KLEPACKA (1976), at 28% av  $\alpha_{SI}$  var omdannet etter 1 uke, 50% etter 4 uker og 80% etter 5 måneder.  $\beta$ -kasein etter 5 måneder var bare 50% omdannet.

I ostekornene forekom  $\alpha_{SI}$  i to fraksjoner med molvekt 38 000 og 25 000. 90% av den høymolekylære fraksjonen var omsatt etter 4 uker mens den andre ble betydelig senere omsatt.

NOOMEN (1975) fant at melkeprotease omdannet  $\beta$ -kaseinet opptil tre ganger så raskt som  $\alpha_{SI}$ -kaseinet.

### alternative løpepreparat.

I de senere år har prisen på løpeekstrakt fremstilt fra løpemaven hos kalver øket vesentlig. Dette har ført til en sterkt interesse for å fremstille alternative løpepreparater. Forsøk har vist at det er mulig å lage ost med god kvalitet dersom chymosinet delvis erstattes med pepsin i forholdet 1:1.

Enzympreparater fremstilt fra muggsopp (*Mucor pusillus* og *Miehei* og *Endothia parasitica*) synes å gi bedre resultater etterhvert som fremstillingsteknikken blir forbedret og ystingsteknikken tillempes etter preparatenes egenskaper. Som regel er enzymene i disse preparatene mer aktive enn enzymene i det tradisjonelle løpeekstraktet, figur 4.2.1.1. Dette har ofte gitt seg utslag i en mer eller mindre bitter smak i osten. For enkelte preparater har en søkt å rette på dette ved å redusere enzymmengden og kompensere den nedsatte løpningsaktiviteten med tilsetning av  $\text{CaCl}_2$ .

Det kreves fortsatt omfattende forsøk med forskjellige osteslag før en med sikkerhet kan si at en oppnår like gode resultater med disse preparatene som med det tradisjonelle løpeekstraktet.

2  
0  
Bruk av preparater fremstilt fra bakterier (B.subtilis, B.cereus, B.polymyxa, B.megatherium) har forløpig ikke kommet ut over eksperimentstadiet.

*Det vil komme nåværende ord på det.*

Det har også vært forsøkt å korte inn modningstiden ved å nytte aktive proteinaser isolert fra planteriket (Papain fra carica papaya, bromelin fra ananas, ficin fra fiken m.fl.). I de fleste tilfelle har slike forsøk vært mislykket. Proteolysen har blitt for omfattende, med anrikning av intermediære spaltningsprodukter til følge. Osten har oftest fått en mer eller mindre bitter smak.

#### 4.2.2. PROTEOLYSE VED HJELP AV MIKROBIELLE PEPTIDASER

Melkesyrebakteriene (tilsatt kulturer) har i denne forbindelse størst interesse. Men i ost som er laget av upasteurisert melk, vil også den originære flora spille en stor rolle. Eventuelle termoresistente peptidaser fra denne flora vil i alle fall ha inflytelse på proteinomsetningen i osten. For ost som er ystet av upasteurisert melk, vil en kunne ha et celletall på opptil 40-50 millioner pr. g, mens dette tallet vanligvis er mye lavere for ost som er ystet av pasteurisert melk.

Blant melkesyrebakteriene har man generelt den sterkeste proteolytiske aktivitet hos laktobasillene, men disse kommer neppe til utvikling i ost ystet av pasteurisert melk og tilsettes derfor i form av kulturer.

I kulturer av proteolytisk aktive melkesyresteptokokker kan en påvise protein-spaltningsprodukter allerede i løpet av de første 24 timene av inkubasjonen.

De proteolytiske enzymesystemene i melkesyrebakteriene og andre mikroorganismer som nyttes i osteproduksjonen er enda relativt lite undersøkt, men intensiv forskning pågår. Melkesyrebakterienes evne til å produsere proteolytiske enzymer varierer med artene og med stammene innen arten.

Det er utført mange undersøkelser over laktobasillenes proteolytiske egenskaper. I kalk-melkkulturer viser de som regel en sterk proteolytisk aktivitet. I slike kulturer når celletallet er meget høgt nivå.

TER-KASAR'YAN (1974) fant at den proteolytiske aktivitet hos Streptokokker generelt bare var halvt så stor som for Lactobaciller, men det var store variasjoner stammer imellom. SINGH & RANGANATHAN (1974) viste at den proteolytiske aktivitet hos laktobasiller kunne økes med 50-70% etter gammastråling.

*Built prod proteasas ved behov for aminosyrer.*  
 Peptidaseproduksjonen minskes når mikroorganismene ved siden av protein har tilgang på proteinspaltningsprodukter (peptider, aminosyrer). Den optimale pH for enzymenes aktivitet ligger gjerne omkring det nøytrale pH-området, men sure og alkaliske peptidaser forekommer også.

RYMAZEWSKI & POZNANSKI (1970) behandlet forskjellige kaseintyper med vaskete cellesuspensjoner av *S.lactis* og *S.lactis* var. *diacetylactis* ved forskjellig pH: 7,0, 6,0, 5,6 og 5,0. (Fosfatbuffer ble nyttet).

Førstnevnte viste størst proteolytisk aktivitet med hensyn på  $\kappa$ -kasein, men *var.diacetylactis* hadde størst aktivitet på  $\beta$ -kaseinet.

Ved alle pH verdier viste *var.diacetylactis* større proteolytisk aktivitet enn *S.lactis*.

For peptidaser fra S.lactis og cremoris fant KRISHNA & DUTTA (1974) den største enzymaktivitet i området pH 6,5 til 7,0. Disse peptidasene viste preferanse for  $\kappa$ -kaseinet.

KIKUCHI et al (1974) har også undersøkt proteolytiske enzymer hos S.lactis og virkningen av disse på helkasein. Etter en innvirkning på 80 timer ved 30°C og pH 7,0 var bare 12% av kaseinet så lite omdannet at det kunne koagulere ved pH 4,6.

Spaltningsproduktene bestod av peptider med molvekt under 1800 D + aminosyrer.

ARORA et al (1979) undersøkte intracellulære proteinaser fra S.cremoris på følgende:

<u>Substrater</u>	<u>Enzymaktivitet</u> x)
Helkasein	28
$\alpha_s$	35
$\beta$	10
$\kappa$	30
Bovin serumalbumin	12
Hemoglobin	3

x) Enzymaktiviteten er basert på måling av frigjort tyrosin ): Den enzymmengde som gir TCA-løselig fragmenter, tilsvarende 1  $\mu$ g tyrosin under gitte betingelser:

(Felling med TCA filtrering og tilsetning av fenolreagens etter FOLIN & CIOCALTEAU. Blåfargen ble bestemt spektrofotometrisk. Tyrosinverdien er et mål for aminosyrer og løselige peptider i 10% TCA-løsning. Egentlig et mål for cykliske aminosyrer.)

CARINI (1968) identifiserte 20 arter gjær fra italiensk Taleggio-ost som inneholdt  $> 80\ 000$  gjær celler/g i det indre,  $10^8$ /g på overflata). Cellefritt ekstrakt av samtlige kulturer viste størst proteolytisk aktivitet mellom pH 6 og 7 og mellom 30 og 45°C.

Proteolytiske enzymer fra gjær, mikrokokker og B.linens spiller en vesentlig rolle ved modningen av kittmodnete oster som Tilsiter, Port Salut, Ridderost m.fl.

Proteinasene som dannes av grupper av D-streptokokkene (enterokokkene) er studert med Sc.liquefaciens som modell-organisme. Organismen overlever lavpasteurisering og kan derfor være årsak til bitter smak i osten selv om ystemelken er pasteurisert. ZIMMERMANN (1964) fant at enzymet var et Zn-metalloenzym. En ekto-proteinase ble isolert av Babel. Enzymet hydrolyserte kasein. Omkring 80% av spaltningsproduktene var dialyserbare. Enzymet var mindre aktivt mot lactalbumin og lactoglobulin enn mot kasein.

For å øke innholdet av mikrobielle peptidaser i osten har det vært gjort forsøk med å øke celletallet bl.a. ved bruk av konsentrerte kulturer (tabell 4.2.2.1.) . En fremskyndet autolyse har også vært forsøkt ved lysozymbehandling av kulturene. En kan på denne måten få en raskere modning, men metodene har ikke kommet i praktisk anvendelse. *f.m.f. aliseleret ostem.*

Tabell 4.2.2.1. Celletallets effekt på hydrolysen av kaseinet i osten. Etter STADHOUDERS.

Ostens modning uker)	Ystemelken podet med 1% Sc.cremoris (F7)-kultur umiddelbart før løpning.		Ystemelken podet med 1% Sc.cremoris (F7) inkubert 10 timer ved 30°C og pH 6,6 før løpning.	
	LN/TN%	AN/TN%	LN/TN%	AN/TN%
2	16,3	2,7	25,1	9,6
15	35,5	9,8	44,5	14,7
30	43,2	13,8	50,3	19,0



Leuconostoc har en varierende evne til å spalte protein. Denne gruppen utgjør normalt bare en mindre del av mikrofloraen i osten. Det er logisk å vente at deres proteolytiske enzymsystemer har begrenset betydning for proteolysen i osten.

Foruten melkesyrebakteriene spiller også andre organismer en stor rolle for proteinomsetningen i enkelte ostesorter.

De proteolytiske enzymer som dannes av P.roqueforti har lignende egenskaper som trypsin. Enzymet er aktivt ved pH 5,3 - 7,0 med optimum omkring pH 6,0. Proteolysen av kasein er omfattende. Det dannes betraktelige mengder aminosyrer og enkle peptider i forhold til de mer komplekse peptider. P.camemberti spiller en avgjørende rolle ved proteinomsetningen i Camembert og Brie.

GUEGUEN & LENOIR (1975) har undersøkt den proteolytiske aktivitet hos 30 stammer av Geotricum candidum og 3 stammer Geotricum gracile. Førstnevnte organisme kunne deles i to grupper med hensyn til proteolytisk aktivitet i det ca 75 % av disse hadde en svakere vekst kombinert med mindre aktive ekstracellulære proteaser (60-250 µg Tyrosin pr ml og time). Resten av stammene hadde ekstracellulære proteaser med høy aktivitet (350-650 µg Tyrosin pr ml og time). De 3 stammene av G.gracile viste alle en sterk ekstracellulær proteolytisk aktivitet.

Størst enzymaktivitet for ekstracellulære proteaser var ved pH 5,5-6,0 og 55°C. Intracellulære proteaser hadde samme pH optimum, men noe lavere temperaturoptimum (50-55°C). De ekstracellulære proteaser var mer termolabile enn de intracellulære. Ingen sure proteaser er funnet.

LENOIR & AUBERGER (1977) undersøkte ekstracellulære proteaser fra Penicillium caseicolum. To pH-optimum med hensyn til kasein ble funnet ved pH 6,0 og ett ved pH 8,5-9,0. Den sure protease hadde en molvekt på 20 000 D. Optimal temperatur for dette enzymet var 50°C men ble 100% inaktivert etter 1 time ved 55°C. Enzymet spalter bare til peptider og frigjør ikke aminosyrer.

Enzymet er en endopeptidase av typen metalloproteaser. Inhiberes bl.a. av kadmium og kvikksølv.

Fra en blandingskultur kan det isoleres både raske og langsomme syredannere. Ystingsteknisk sett er det viktig å ha en kultur med aktiv syredannelse.

De raske syredannerne synes også generelt å være de mest aktive proteolyter, men en er i den senere tid blitt oppmerksom på at enkelte stammer med stor syrningsaktivitet kan være årsak til bitter smak. Når cellene mangler spesifikke endopeptidaser kan det anrikes polypeptider som gir bitter smak i osten. NB!

Tabell 4.2.2.2. Etter CZULAK et al (1961).

pH		Løselig-N mg/100 ml		Amino-N mg/100 ml	
		etter 13 dager	etter 40 dager	etter 13 dager	etter 40 dager
5,6	Sc.cremoris HP Bitter	15,97	34,60	2,80	4,58
	Sc.cremoris RI Ikke bitter.	16,18	35,90	2,90	5,62
6,0	HP	35,30	60,60	4,65	8,48
	RI	33,34	61,50	5,60	11,47

Utilstrekkelig hydrolyserte polypeptider antas å gi bitter smak.

### 4.2.3 Peptiddannelse.

I den senere tid har en viet peptidene stor oppmerksomhet. Det har vist seg at enkelte peptider medvirker til det en kan kalle grunnsmaken i en ost, mens andre peptider gir en bitter smak. Det som er avgjørende for smaken på peptidene er antall aminosyrer som danner peptidene, hvilke aminosyrer det er, rekkefølgen av dem og til slutt endegruppene i peptidene.

NB!

Det er nedlagt mye arbeid med å isolere peptidene og bestemme hvilke aminosyrer som er tilstede og rekkefølgen av dem. Særlig gjelder dette de bitre peptidene.

HUBER & KLOSTERMEYER, 1974 isolerte et bittert peptid fra Butterkäse (Italice) som viste seg å være fragmentet 61-69-sekvensen i  $\beta$ -kasein, nemlig Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-ASN-Ser.

CLEGG et al. 1974, hydrolyserte helkasein med papain og isolerte et fragment av  $\beta$ -kasein, nemlig sekvensen 53-79.

GUIGOZ & SOLMS 1974, isolerte et dipeptid fra "Alpeost" med struktur: H-Leu-Try-OH. Terskelverdi for smak var 60 ppm eller 0,2 m Mol.

SPARRER & BELITZ 1975, isolerte to bitre peptider fra et kaseinhydrolysat, behandlet med chymotrypsin og trypsin. Strukturene var henholdsvis H-Val-Glu-Val-Phe-Ala-Pro-Pro-Phe-OH og H-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-OH.

CHEBOTAREV et al. 1975, undersøkte 37 forskjellige stammer av P. roqueforti m.h.p. dannelsen av bitre kasein nedbrytingskomponenter og fant store variasjoner i denne egenskap. Enkelte stammer produserte sterkt bitre komponenter, især sammen med løpe. Andre stammer, som ikke var bitre, kunne også omsette slike bitre komponenter til "smakløse" fraksjoner.

SULLIVAN (1970) mener at den bitre smaken skyldes et cyklisk amid med lactamstruktur som ble påvist ved hjelp av infrarød spektroskopi. Når glutaminsyre, som er rikelig representert i kasein, foreligger N-terminalt, kan en spontan cyclisering forekomme, fig.

#### 4.2.3.1.

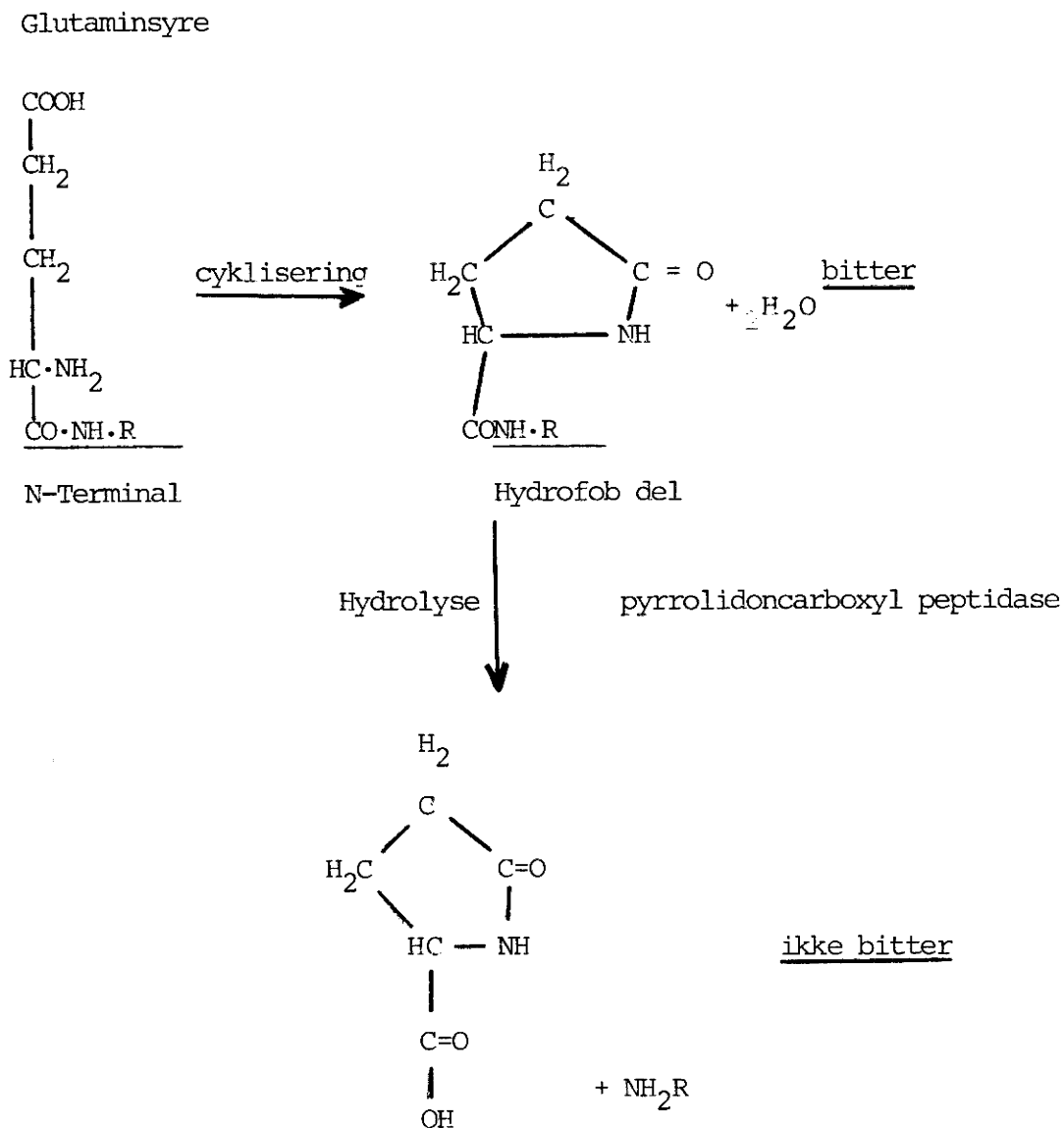


Fig.4.2.3.1.

Han mener videre at pyrrolidonyl-pepsidase er årsaken til at det ikke oppstår bitre produkter. Men etter at EXTERKATE & STADHOUDERS i 1971 påviste større mengder av dette enzymet i bitre enn i ikke bitre stammer, må en anta at det er flere ting som kan spille en viss rolle i denne sammenhengen.

PELLISSIER et al. (1974) behandlet kaseinfraksjonen  $\alpha_s_1$  med chymosin og fant 22 peptider. Spaltingen skjedde fortrinnsvis ved karbonyl-gruppen til fenylalanin og leucin. Halvparten av peptidene var bitre og felles for disse var at de var hydrofobe og at de inneholdt fenylalanin eller leucin.

BEHNKE & SCHALITONIES (1975) undersøkte 11 bitre peptider med høgt innhold av hydrofobe aminosyrer. De var svært stabile og ingen av peptidene var cycliske. Årsaken til at de bitre peptidene er stabile kommer sannsynligvis av at de er hydrofobe og

fettløselige. De unndrar seg derved en videre spaltning til ikke bitre peptider. I en undersøkelse av 35 bitre peptider fant de at aminosyrene valin, leucin og isoleucin var N-terminale grupper og prolin og tyrosin C-terminale.

rett dos.  
løpe.  
Yst. f.  
- pH  
- høy ettev.  
- modningst.  
- Salt

Det er tydelig at bittersmak i meieriprodukter forårsakes av mange forskjellige peptider. En kan unngå bitre produkter ved å selektere og velge de rette bakteriestammene og bruke en riktig dosering av løpe. En del av løperesubstituttene har også en tendens til å gi bitter ost. Ystningstekniske faktorer som kan virke inn er ystemelkens pH. Lav pH gir mindre løpe i ostemassen og mindre bitre peptider. Høy ettervarmingstemperatur virker på samme måte. Derimot vil høy modningstemperatur fremme bitter smak. Sterk salting reduserer bitter smak.

#### 4.2.4. Frie aminosyrer.

Nedbrytingen av proteinet avsluttes vanligvis med de enkelte aminosyrer. Konsentrasjoner av frie aminosyrer øker generelt med alderen og den prosentvise sammensetning av syrene varierer fra ostesort til ostesort. Med de forskjellige kromatograferings-systemene vi har i dag, er det forholdsvis enkelt å følge sammensetningen under modningen. I enkelte ostesorter øker mengden jevnt og sikkert under lagringen. Andre sorter synes å nå et maksimum på et visst tidspunkt, mens andre bare får en svært liten økning i innhold av aminosyrer. I noen oster spaltes aminosyrene umiddelbart og danner andre forbindelser. I våre norske ostesorter er det gjort lite på dette området. De frie aminosyrene er av stor betydning for smaken. En blanding av de forskjellige aminosyrene i en viss konsentrasjon, gir det en kan kalle grunnsmaken i osten, mens et stort antall andre forbindelser gir den enkelte ostetype dens særsmak. De enkelte aminosyrene er smaksbedømt og følgende grove inndelinger kan komme til anvendelse: Glycin, alanin, prolin, serin og treonin smaker mer eller mindre søtt.

Smak av  
a.s.  
Søtt

bitter

Leucin, isoleucin, fenylalanin, tryptofan, arginin, histidin, lysin og metionin smaker svakt eller sterkt bitter.

*kjøtt  
gummi  
uten sm.*

Glutaminsyre er kjøttlignende, cystin smaker gummilignende, tyrosin er nesten uten smak.

Sammensetningen av disse vil variere i de forskjellige ostene og dermed også grunnsmaken. Det er blant annet hevdet at et høyt innhold av prolin i Jarlsbergost er årsak til dens noe søte karakter.

Løseligheten av aminosyrer er forskjellig og det kan være av alminnelig interesse å vite at f.eks. tyrosin er tungt løselig og vil derfor krystallisere ut og danne hvite prikker på størrelse med knappenålshoder. Dette opptrer fra tid til annen i vellagret ost, særlig i sveitserost. øyer.

#### 4.2.5. Omdannelse av aminosyrer.

Svært mange aminosyrer brytes ned eller bygges opp av mikrobiologiske enzymsystemer. Men det er foreløpig få undersøkelser på dette feltet.

##### 4.2.5.1 Dekarboxylering og deaminering.

*adaptime*

*tyrosin  
dekarboxyl.*

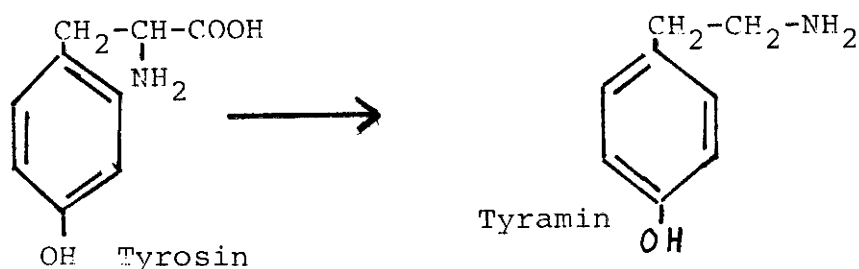
Mange mikroorganismer fører aminosyredekarboxylaser. Men selv om osten inneholder mikroorganismer som fører slike enzymsystemer, er det ikke sikkert at omdannelsen av aminosyrene finner sted. Spesielle krav til miljøet må oppfylles for at mikroorganismene skal formere seg i et tilstrekkelig antall, og videre er enzymproduksjonen avhengig av bestemte miljøfaktorer. Enzymene er adaptive og produseres bare under bestemte betingelser, men det er en lang rekke av bakterier som produserer enzymer som fører til dannelse av histamin og tyramin. Ifølge RICE et al. (1976) har følgende arter tyrosindekarboxylaser: Pediococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus, Proteus, Clostridium og Escherichia coli.

*histidin  
dekarboxyl.*

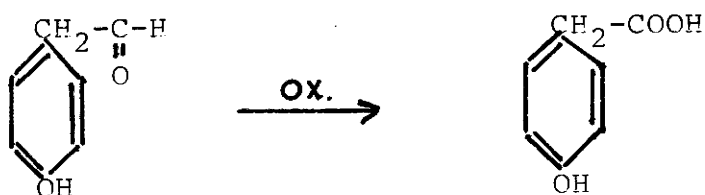
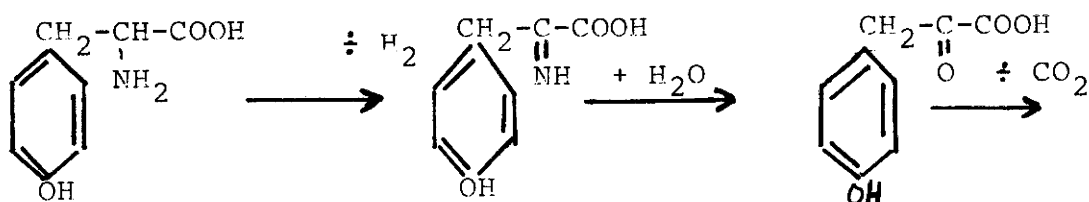
Av mikroorganismer som fører histidin dekarboxylase nevnes: Escherichia coli, Streptococcus, Lactobacillus, Pseudomonas, Aerobacter, Clostridium perfringens, Proteus morgani, Salmonella Shigella, Betabacterium og Eterobacter aerogenes.

Det er også vel kjent at forskjellige mugg- og gjærtyper produserer forskjellige aminosyrededkarboksylaser. Ved siden av de dedkarboksylerende enzymene finnes det også deaminerende. Deamineringen er ofte oxydativ og katalyseres av amino-oksydaser. I ost vil disse enzymene foreligge i forskjellige konsentrasjoner, og en må regne med å finne forskjellige sluttprodukter, alt etter hvilke enzymer som er i dominans. Vi kan se hva som skjer med f.eks. tyrosin ved forskjellige betingelser.

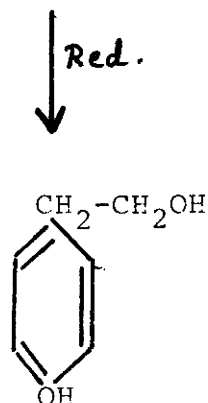
a) Dominans av tyrosindegkarboksylase



b) Dominans av deaminase

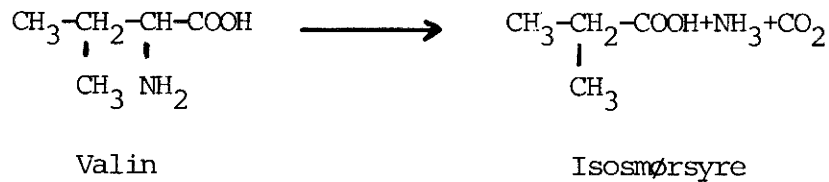


p-hydroxyfenyleddiksyre



Tyrosol

Ved dominans av deaminase og aminosyre-oksydase dannes det syre som sluttprodukt. I en del av de norske ostene forekommer det en del isosyrer som stammer fra aminosyrer. Det er isosmørsyre som kommer fra valin.



Isovaleriansyre og anteisovaleriansyre fra henholdsvis leucin og isoleucin finner vi fortrinnsvis i Pultost, Gamalost, Port Salut, Ridderost, Tilsiter og Eddaost. Innholdet varierer med modningsgraden og kan komme opp i ca. 100 mg/100 g ost. Inntak av isosyrene har imidlertid ingen negativ virkning, mens inntak av histamin, tyramin og  $\beta$ -fenyletylamin kan føre til migrene. Iflg. CHAZTOR et al. kan 3 mg  $\beta$ -fenyletylamin fremkalle anfall. Tyramin og  $\beta$ -fenyletylamin øker blodtrykket mens histamin virker dempende på blodtrykket; kapillarene utvides. Typiske reaksjoner på overdosering av histamin er kvalme, brekninger, hodepine, og også i enkelte tilfeller smerter i brystet, vanskeligheter med å svelge og oppsvulmede lepper. Toleransenivået ligger iflg. JENISTEA på ca 5 mg. For de som er allergiske overfor disse stoffene vil det være av betydning å vite hvilke oster som inneholder så mye aminer at de representerer et faremoment. Det foreligger en del analyser over amininnholdet i forskjellige oster fra forskjellige kanter av verden og i 1980 har H. EILERTSEN med sin hovedoppgave "Biologiske aktive aminer i ost" frembrakt noen resultater for spesielle norske oster. I tabell 4.2.5.1.1. gjengis resultatene for aminer sammen med hvilke kulturer en nyttet og også om vedkommende ost til vanlig også har isosyrer som stammer fra aminosyrene.



Tabell 4.2.5.1.1.1. Aminer i ost.

Ostesort	Mikro-organismer	Aminer mg/g ost			Isosyrer	
		Histamin	Tyramin	Fea x)	Isosmørsyre	Isovaleriansyre
Camembert	Str.1 St. cr. Penicillium candidum	IP	IP	IP	IP	IP
Pultost	Bl. kultur Lactobacillus lactis Gjær	IP	1,89	IP	P	P
Ridderost	Bl. kultur L. helveticus	IP IP	IP IP	IP IP	P P	P P
Normanna	Bl. kultur Penicillium roqueforti	IP	0,27		-	-
Gamalost	Bl. kultur Mucor	IP	IP	IP	P	P
Tilsiter	Bl. kultur Linens	IP	0,31	IP	P	P
Jarlsberg	Bl. kultur Propioni shermanii	IP	IP	IP	IP	IP

P = Påvist

x) Fea.=Fenyletylamin.

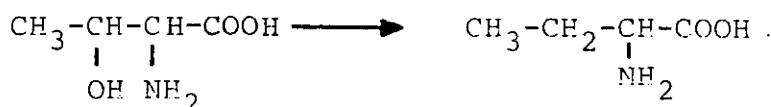
IP= Ikke påvist

Det er umulig å trekke helt klare konklusjoner av tabellen. Men det ser ut til at de ostene som i tillegg til de vanlige syrekulturene er podet med gjær, mugg og linens gir tyramin i betydelige mengder. De samme ostene gir vanligvis også isosyrer. En må her stille spørsmålet: "Er det korrelasjon mellom innholdet av tyramin og isosyrer, eller er innholdet av syrer lavt når innholdet av amin er høgt?" Spørsmål som vi håper å få klarhet i ved senere forsøk. Foruten i ost forekommer slike stoffer også i sjokolade og da særlig stoffet fenyletylamin som kommer fra fenylalanin. Og det er en kjennsgjerning at sjokolade er en hyppigere årsak til migrene enn f.eks. ost. En annen ulempe med aminene er at de er potensielle reaktanter ved dannelsen av nitrosaminer. Nitrosaminer er som kjent kreftfremkallende. Dette var bakgrunnen for at man i sin tid fikk et midlertidig forbud mot bruk av salpeter som ystingsteknisk hjelpemiddel.

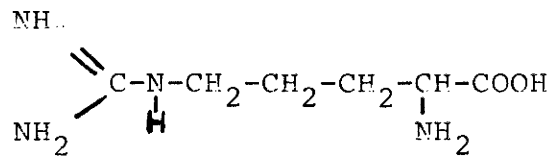
En rekke undersøkelser over nitrosamininnholdet i forskjellige oster har imidlertid vist at dette ligger helt ned mot påvisningsgrensen og viser ingen relasjon til de anvendte nitratmengder. Tilsetning av nitrat er derfor godkjent med inntil 150 mg/kg ost for svakt syrnede løpe-oster.

#### 4.2.5.2. Spalting av serin og treonin.

Disse aminosyrene foreligger i fri form i ost og er spesielt lett foranderlige gjennom mikroorganismer. I en én måned gammel surmelksost fant Schormüller at ca 20% av innholdet av serin og treonin var omdannet til alfa-amino-smørsyre og alanin:



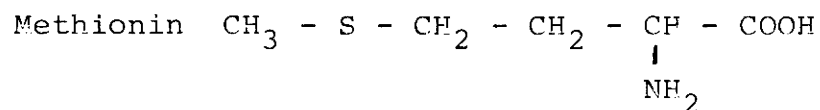
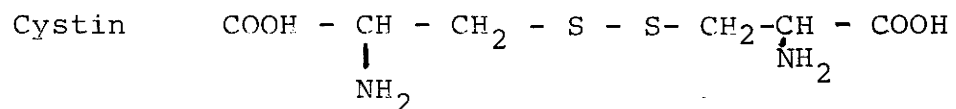
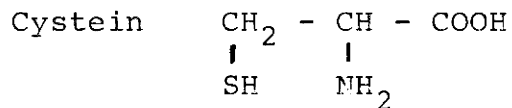
En annen aminosyre, arginin



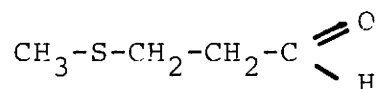
er av spesiell interesse fordi mange har observert at den har en ubehagelig bittersøt smak og er ansvarlig for en unormal aromautvikling. SCHOERMÜLLER undersøkte argininomsetningen og fant at det var en rask omsetning av denne aminosyren under modningen. Arginin spaltes via citrullin og ornitin til putrescin av arginindesimidase. Citrullin er også funnet i ferskost.

#### 4.2.5.3. Spalting av svovelholdige forbindelser. *reagerer lett.*

De svovelholdige forbindelsene som forekommer i ost stammer fra aminosyrene cystin, cystein og methionin.



Ut fra disse dannes det under forskjellige omstendigheter  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_3\text{-SH}$ ,  $\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  samt



blokkerte frigjort  $H_2S$  så det ikke fikk reagert med mesityloxyd.

#### 4.2.5.4. Transaminering.

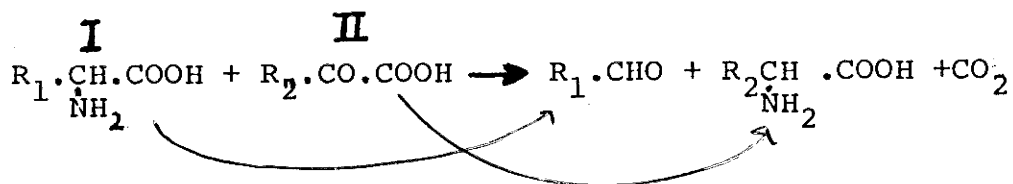
Det er mange omdannelsesmuligheter for de frie aminosyrene. De ketosyrene som oppstår ved deaminering kan dekarboxylere og gi monokarbonsyre, eller de kan inngå i en transaminering og gi andre aminosyrer. Det er et nokså komplekst system som foreligger og det vil være altfor omfattende å komme inn på alle de mulighetene som er tilstede.

Men  $\alpha$ -ketoglutarsyre spiller en sentral rolle i denne sammenheng. Den tar lett opp  $NH_3$  fra andre aminosyrer og danner glutaminsyre. Generelt kan en sette opp følgende reaksjonslikning for transaminering.



## 4.2.5.5. STRECKER degradering.

En kjemisk syntese som bygger på reaksjonen mellom en aminosyre og et diketon eller en  $\alpha$ -ketosyre kalles Strecker syntese eller Strecker degradering.



Aminosyren I går over til et aldehyd med et C-atom mindre. Ketosyren II går over til å bli en  $\alpha$ -aminosyre med samme antall C-atomer. En har ikke påvist at denne reaksjonen finner sted under ostemodning, men det er sannsynlig at den forekommer. Melk som er eksponert i sollys eller UVlys vil i løpet av kort tid få det en kaller solsmak. Dette skyldes at små mengder methionin går over til methional. I små konsentrasjoner  $\ll$  1ppm har methional en viss ostaroma. Andre aldehyder som er påvist er isovaleraldehyd. Dette stoffet finnes i malt og er ansvarlig for maltaromaen. Den kan være dannet ved en Strecker reaksjon, men det er mere sannsynlig at det skjer enzymatisk. Isovaleraldehyd forekommer vanligvis i produkter der Streptococcus lactis var maltigenes er tilstede. Dette er et aromastoff som er uønsket i meieriprodukter.

## 5. Omsetningen av Fett.

Melkefett er sannsynligvis det fettlaget som inneholder flest forskjellige fettsyrer. Det er påvist over 60 mettede og umettede syrer fra  $C_4$  til  $C_{24}$ . Fettet har en forholdsvis nøytral smak og har den egenskapen at den mildner andre smakskomponenter. Ved siden av dette har fettene en positiv virkning på konsistensen i osten og hindrer rask uttørring.

Fettet er imidlertid utgangsstoff for en rekke forskjellige kjemiske komponenter, med sterk lukt og smak. Ved hydrolyse frigjøres fettsyrene og setter smak på produktene. Det er særlig de lavere molekylære forbindelsene som setter preg på lukt og smak.

Hvis konsentrasjonen blir for stor vil produktet smake harskt. De frie syrene kan spaltes videre og gi ketoner ved  $\beta$ -oksydasjon. Ved autoksydasjon av umettede syrer oppstår det aldehyder. Dette er stoff som smaker og lukter sterkt i svært små konsentrasjoner. I tillegg til ketoner og aldehyder kan det oppstå estere mellom syrer og alkoholer.

### 5.1. Hydrolyse av fett. *enz i melk. - frie fettsyrer*

Triglyceridene er i ren form et forholdsvis stabilt stoff. Ved behandling med alkalier forsåpes det lett, mens det er langt mere bestandig mot syre. I melk og melkeprodukter skyldes heller ikke fettspaltingen ren kjemisk omsetning, men en enzymatisk prosess. Melken har et innhold av orginære lipaser som spalter melkefettet. Det ser ut til at den lipolyttiske aktiviteten er forskjellig i melk for det enkelte dyr. Som et eksempel på dette kan vi vise til at geitmelk med sterk geitsmak hadde en økning i frie syrer fra <sup>*avh. av dyr.*</sup> 1,5  $\mu\text{mol/ml}$  til ca 10  $\mu\text{mol/ml}$  mens melk med svak geitsmak kun steg fra 0,8 til 1,5 på 5 dager. De orginære lipasene ødelegges imidlertid ved vanlig lavpasteurisering og har derfor ingen betydning for hydrolysen av fett i ost som er ystet av pasteurisert melk. Den vil derimot være av betydning for modningen av oster som er ystet av upasteurisert melk. Melkelipasen synes å ha et pH-optimum ved 8,5 - 9,0. Andre mindre markerte pH-optima er også observert. Dette kan tyde på at melkens lipolyttiske egenskaper skyldes flere enzymer. Melkelipasen hydrolyserer en lang rekke estere, men aktiviteten varierer med substratets sammensetning.

De ekstra-cellulære enzymene fra gram-negative, ikke sporedannende, stav-bakterier er ofte meget varmeresistente. Mange av disse lipasene ødelegges ikke ved vanlig lavpasteurisering. Koking eller autoklavering i kortere eller lengre tid vil i mange tilfelle være nødvendig for å få fullstendig inaktivering.

Enzymer fra den psykrotrofe floraen i tankmelk kan derfor føre til uønsket fetthydrolyse i produktene.

Lipasene har varierende pH-optima, fra ca 7,0 og oppover. I surt miljø er de lite virksomme.

D-verdiene, d.v.s. tid i min. for 90% innaktivering av lipaser er undersøkt for en stamme Pseudomonas og en stamme Micrococcus. Resultatene er gjengitt i tabell 5.1.1.

Tabell 5.1.1. D-verdier for lipase ved forskjellige temperaturer.

Innaktiveringstemp.	Pseudomonas lipase	Micrococcus lipase
100°C	51 min	9 min
120°C	-	5 min
140°C	3,8 min	-
160°C	1,3 min	1 min

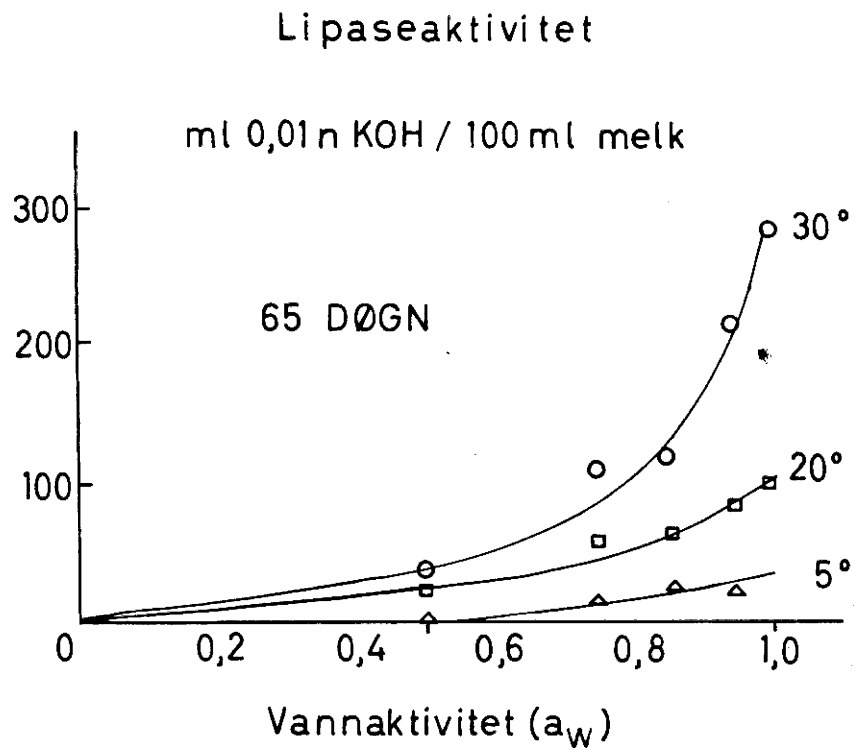
Ved siden av å være varmetolerante tåler de også kjølelagring over lang tid. Til eksempel fant en ikke noe avtagende lipaseaktivitet for Pseudomonas etter fire måneders lagring ved 4°C

Lipaseaktiviteten er sterkt avhengig av vannaktiviteten og temperaturen. Figur 5.1.2. viser denne sammenhengen.

I enkelte ostesorter er det imidlertid ønskelig med en sterk fettspalting, f.eks. i Roquefort, Normanna, Camembert og enkelte andre. En må da tilføre ostemassen mikroorganismer som produserer lipaser. De vanlige melkesyrebakteriene, propionsyrebakteriene, mikrokokkene, coli og coryne bakterier har liten lipaseaktivitet. Lipolyttiske egenskaper finner vi hos Serratia, Pseudomonas og Achromobacter. Disse er årsak til lipolyse i ost.

Sterke lipolyttiske egenskaper finner vi i Penicillium roqueforti. Den fører minst to forskjellige lipaser med optima på henholdsvis pH 6,0 og 7,5. Lipaseproduksjonen var stor når muggen ble dyrket ved pH 7,0 og ved pH 8,0, mens ved dyrking i sur myse pH 3,5 - 6 var enzymproduksjonen svak. pH i Normanna og Roquefort ligger på 6,0 i gjennomsnitt. Opptil 20% av fettene i disse ostene er spaltet.

I filtratet fra kulturer av Geotrichum Candidum er det påvist en lipase som er aktiv i pH-området 5,0 - 8,0 med optimum ved pH 6,0. Enzymet er inaktivt ved pH 4,0 og blir ødelagt ved pH 3,0.

Figur 5.1.2.



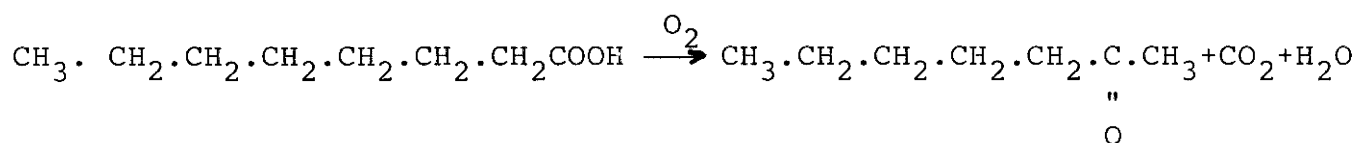
Lipase fra Candida lipolytica hydrolyserer smørfett over et vidt pH-område (5,5 - 7,2) med maksimal aktivitet ved pH 6,2 - 6,5.

Lipasepreparater fra C.lipolytica er forsøkt anvendt i ystingen for å fremme fetthydrolysen under modningen. Det viser seg imidlertid vanskelig å kontrollere hydrolysens omfang. Som regel blir osten harsk på grunn av en altfor omfattende fettspalting. Lignende erfaringer har en gjort i forsøk med andre lipolytiske enzympreparater.

Løpeekstrakt har normalt bare en svak lipolytisk aktivitet. Men løpepasta og ekstrakter fra visse animalske kjertler, Pankreas og melkekjertelekstrakt fra ku, sau og geit er aktivt lipolytiske. Slike preparater er ofte nyttet ved produksjonen av visse italienske osteslag som Romano og Provolone.

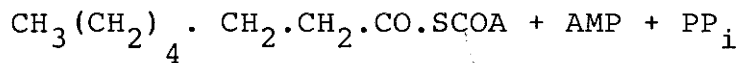
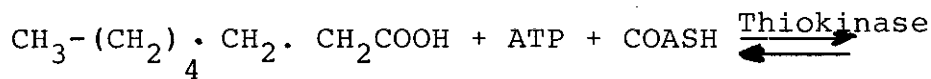
## 5.2. $\beta$ -oksydasjon av fettsyrene. - metylketon

I oster som inneholder mugg, gjær og oksydase-positive bakterier finner en ved siden av frie fettsyrer også metylketoner. Metylketonene dannes fra de frie fettsyrene under medvirkning av forskjellige enzymer. I Normanna-ost finner en forholdsvis mye metyl-amyketon eller heptanon-2. Denne ketonen er dannet fra kaprylsyren etter følgende støkiometriske formel:



Dette er imidlertid bare utgangsstoffet og sluttproduktet. Fra syre til keton er det en lang og komplisert veg, som sannsynligvis følger  $\beta$ -oksydasjonskjeden til det dannes  $\beta$ -keto-fettsyre-COA estere. Følges  $\beta$ -oksydasjonen videre vil 2 C atomer spaltes av syren. Ketonen som er dannet har bare et C-atom mindre. I det følgende vises hvordan ketondannelsen foregår.

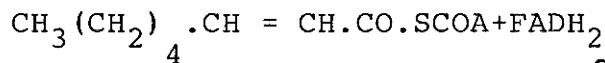
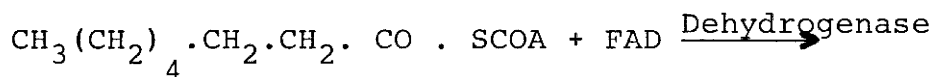
Trinn I. Dannelse av kaprylyl coenzym A.



Alyl CoA

Denne reaksjonen går over to trinn. Intermediært dannes kaprylyl-AMP som deretter reagerer med coenzym A og frigjør AMP.

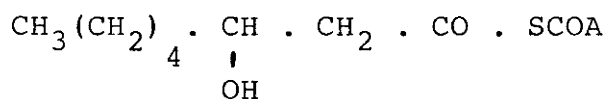
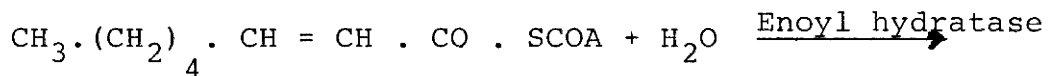
Trinn II. Dehydrogenering av kaprylylcoenzym A.



$\beta$ -Enoyl CoA

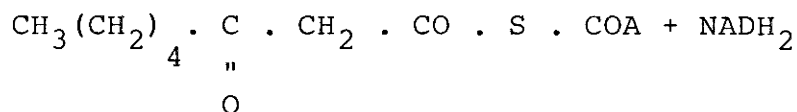
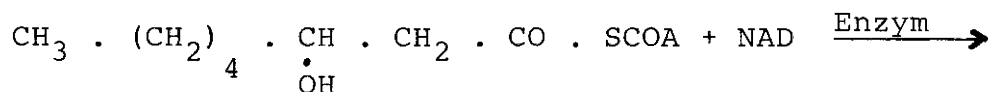
Dehydrogenasen inneholder FAD som lett tar opp to hydrogenatomer og reduseres til  $\text{FADH}_2$ .

Trinn III. Hydratisering av kaprylyl coenzym A



Denne reaksjonen er stereospesifikk. Det er bare L-isomeren av  $\beta$ -hydroxy-kaprylyl - coenzym A som dannes.

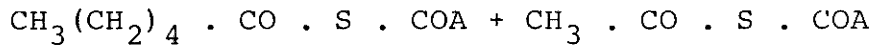
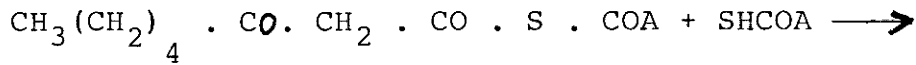
Trinn IV. Dehydrogenering av  $\beta$ -hydroxykaprylyl - coenzym A.



Hydrogenakseptor ved denne reaksjonen er NAD og enzymet kalles

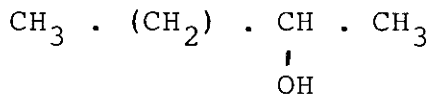
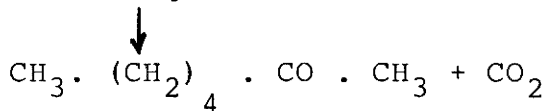
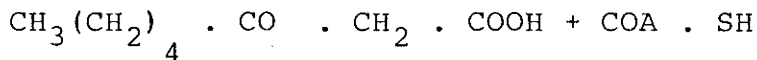
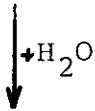
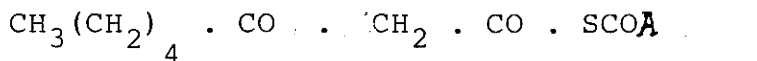
$\beta$  - hydroxyacyl coenzym A.

Trinn V. Spalting av  $\beta$  - ketokaprylyl coenzym A



Resultatet av spaltingen ved hjelp av  $\beta$ -Keto-thiolase er acetyl coenzym A og kapronylcoenzym A.

Trinn V i  $\beta$ -oksydasjonen vil foregå på en annen måte i muggostene. Sannsynligvis vil  $\beta$ -ketokaprylyl coenzym A hydrolysere og gi coenzym -A og  $\beta$ -keto oktansyre.  $\beta$ -ketosyrer er ustabile og vil dekarboxylere spontant og vi får heptanon - 2. Denne vil til en viss grad reduseres og gi sekundær alkohol heptanol - 2.



Tabell 5.2.1. gjengir resultatene av undersøkelser vi har foretatt på Normannaost.

Resultatene viser at oksydasjonstilbøyeligheten er størst for syrene med 6, 8, og 10 C atomer. Det er kun påvist små mengder av ketoner dannet av syrer med lavere eller høyere antall C atomer. Ketonene er svært utslagsgivende for aromaen i muggostene. Ved siden av ketonene finner en små mengder sekundære alkoholer. Disse dannes sannsynligvis av ketonene ved reduksjon og har nok en viss betydning i aromasammenheng.

Tabell 5.2.1.

Oversikt over ostenes alder, poeng<sup>1)</sup>, anmerkning, pH, saltinnhold, syretall og innhold av de forskjellige ketoner og sekundære alkoholer.

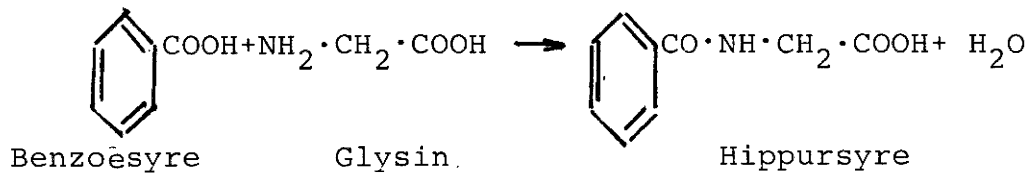
Prøve-nr.	Alder i døgn	Poeng	Anmerkning	pH	% salt	Syretall mg KOH/ g Fett	mg ketoner/200 g ost					mg alkoholer/200 g ost			
							C <sub>5</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>9</sub> =	C <sub>11</sub>	C <sub>5</sub>	iso C <sub>5</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>9</sub>
1	50	3,0	Karvet, besk	6,60	3,54	18,13	0,35	2,62	8,69	0,63	spor	spor	0,30	1,06	spor
2	63	4,0	—>—	5,75	3,54	14,40	0,26	0,96	2,04	spor	spor	spor	spor	0,26	spor
3	78	3,5	Litt muggen	6,65	3,22	20,90	0,96	5,86	14,78	1,71	spor	0,45	0,40	1,89	0,50
4	82	3,0	Dårlig muggford.	5,90	3,07	22,90	0,58	6,56	14,49	1,68	0,63	0,13	0,36	2,61	1,16
5	85	2,0	Smuldrer	—	—	22,70	28,44	19,39	16,08	3,00	0,75	1,41	0,70	0,57	spor
6	85	3,5	Ujevn muggford.	5,35	3,19	21,37	0,69	7,41	15,80	1,97	0,87	0,13	0,40	1,81	0,52
7	89	3,5	—>—	6,60	4,94	10,62	0,28	2,90	8,46	1,18	spor	0,52	0,68	2,19	1,40
8	90	4,0	—>—	5,70	3,98	22,90	12,52	16,54	19,14	3,70	1,11	1,66	0,65	2,30	0,58
9	91	4,0	—>—	—	—	35,73	7,18	13,09	17,17	2,74	1,04	0,88	0,70	1,72	1,00
10	120	3,5	—>—	6,80	4,02	13,05	0,36	2,52	9,84	0,89	spor	0,14	0,26	0,95	1,41
11	121	3,0	Besk, litt åpen	5,95	4,26	13,92	0,51	4,05	8,12	1,27	0,10	0,36	0,93	1,07	spor
12	155	3,5	—>—	6,55	4,08	26,27	0,41	2,48	8,09	0,89	spor	0,14	0,35	0,81	1,24
13	310	3,0	—>—	6,15	4,26	20,29	2,12	13,21	25,48	4,04	1,21	0,38	0,96	3,04	1,36
14	310	2,0	Bløt, salt	5,80	4,50	27,54	1,74	5,19	7,36	0,95	spor	0,36	0,10	0,80	spor
15	337	3,0	—>—	5,45	3,55	26,74	10,82	17,64	26,51	4,84	1,75	1,72	0,96	2,63	1,25
16	340	3,0	Hvitt rand, åpen	5,70	3,85	20,23	6,58	17,70	28,94	4,69	2,62	0,61	0,57	1,53	0,75
17	350	1,0	Kvalm, åpen	5,90	2,93	36,96	2,52	1,75	1,19	spor	spor	0,80	0,18	0,63	spor
18	360	3,0	Kornet, salt	5,45	4,96	37,83	0,32	8,89	31,41	4,51	4,06	spor	0,89	2,32	1,99
19 a <sup>2)</sup>	118	3,0	Bløt, uren	6,10	3,92	23,17	1,78	2,78	1,98	0,37	spor	0,59	0,15	0,51	spor
19 b	118	3,0	—>—	6,50	4,27	14,24	1,15	1,80	1,39	0,33	spor	0,43	0,10	0,45	spor
20 a	145	3,0	Bløt, salt	5,80	3,70	34,18	0,55	1,30	0,97	spor	spor	0,59	0,13	0,60	spor
20 b	145	3,0	Lite aromatisk	5,70	3,54	19,97	1,28	1,43	0,79	spor	spor	0,93	0,12	0,46	spor
21 a	150	3,5	Smuldret, salt	6,10	4,74	19,72	3,89	11,57	16,30	2,64	0,98	0,26	0,56	1,08	0,71
21 b	150	3,5	—>—	6,25	3,74	11,36	3,29	9,51	14,40	2,23	1,01	0,26	0,57	0,89	0,37
22 a	380	3,0	Besk	6,05	3,36	17,20	0,64	7,93	19,90	3,15	0,90	0,30	0,42	2,08	2,46
22 b	380	3,0	—>—	6,40	3,66	13,33	1,74	10,02	13,56	3,07	0,63	0,93	0,47	1,82	0,80
Middel				6,05	3,87	21,76	3,50	7,50	12,80	1,94	0,68	0,54	0,45	1,39	0,67

1) Karakterskala fra 0—5 med 0 som dårligste poeng og 5 som særdeles godt.

2) a = kjerne  
b = overflate

6. HIPPURSYRE OG BENZOËSYRE.

Gjennom fóret tilføres kua små mengder benzoesyre. Denne avgiftes ved hjelp av glycin etter følgende reaksjonsskjema:

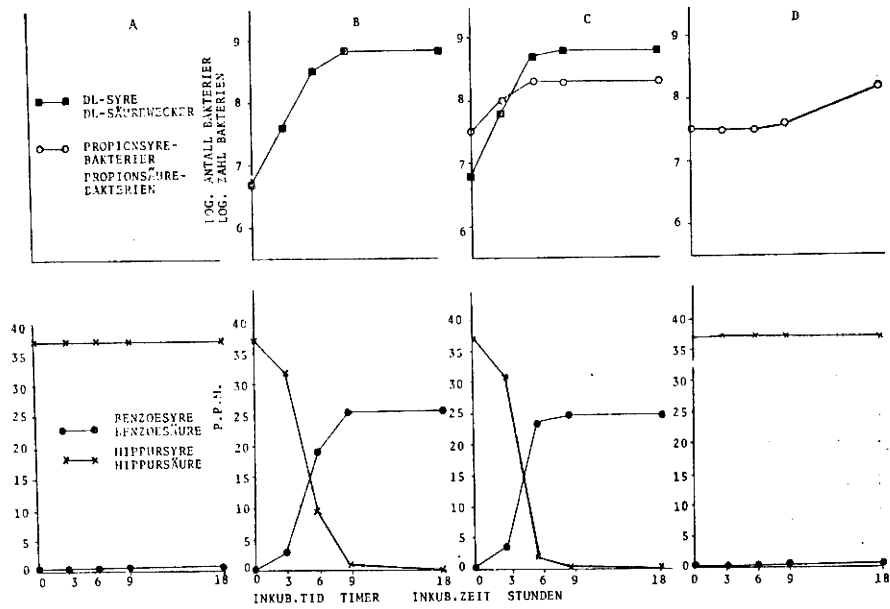


Mesteparten av hippursyra skilles ut, men noe går over i melken. Ved syrning med melkesyrebakterier oppstår et enzym, hippuricase, som er i stand til å spalte hippursyre til benzoesyre og glycin. Som en følge av dette vil alle syrnede melkeprodukter inneholde benzoesyre. Benzoesyre er et vanlig konserveringsmiddel som har vært brukt i mange år. I den senere tid har en del land strøket benzoesyre av sine lister over godkjente konserveringsmidler. Dette førte i sin tid til problemer med eksport av mysost til Japan. Mysosten inneholdt til dels store mengder benzoesyre, og de japanske helsemyndigheter regnet med at vi tilsatte benzoesyre som konserveringsmiddel. De ville stoppe enhver import av mysost og dumpe 200 tonn som lå på lager i Japan. Som en følge av dette ble melk, myse og mysost undersøkt med hensyn på naturlig innhold av hippursyre og benzoesyre. Undersøkelsene viste at det naturlige innholdet av hippursyre i melk varierte svært med årstidene. Om vinteren var innholdet lavt, ca 15 p.p.m.. Om sommeren steg innholdet til 45 p.p.m.

Ved syrning av melken ble hippursyren spaltet i løpet av 6 - 9 timer, fig. 6.1.

Arsaken til de høge verdiene av benzoesyre i mysosten skyldes en for lang henstandstid av mysa før den ble dampet inn. Etter disse undersøkelsene hvor vi påviste den støkiometriske sammenheng mellom naturlig innhold av hippursyre og avspaltet benzoesyre kunne eksporten fortsette, under forutsetning av at vi ikke overskred en grense på 100 p.p.m.

Figur 6.1.



Vekstkurver for bakteriene ved 21° C over. Hydrolyse av hippursyre under. A: Sterilmelk. B: Sterilmelk podet med DL-syre. C: Sterilmelk podet med DL-syre og propionsyrebakterier. D: Sterilmelk podet med propionsyrebakterier.

