

Afslutningsrapport

Forbedring af lavfedtholdig, halvfast ost
gennem regulering af peptidsammensætningen

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-48

Februar 2003



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for projektet
**Forbedring af lavfedtholdig halvfast ost gennem regulering af
peptidsammensætningen**
Mejeribrugets ForskningsFond og FØTEK 3

Ylva Ardö, lektor

Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet
Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole
Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C

December 2002

Projekttitle: Forbedring af lavfedtholdig halvfast ost gennem regulering af peptidsammensætningen

Projektperiode: 01.01.1999 - 31.09.2002

Projektledelse:

Lektor Ylva Ardö, projektleder

Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet (MLI)

Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole

Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C

Tlf. 3528 3193. Fax: 3528 3190. E-mail ya@kvl.dk

Projektdeltagere:

Forskningsadjunkt Jesper Spinner Madsen

Forskningsassistent Mary Sharma

Forskningsassistent Hanna M Tähtinen

Professor Karsten Bruun Qvist

Laborant Pia Skjødt Pedersen

Analysefunktionær Kristian Rotvig Kristiansen

Specialestuderende Käthe Malig Rasmussen

Specialestuderende Kristine Neldeborg Thorslund

Specialestuderende Stig Thorslund

Finansieringskilder: FØTEK 3/MFF, 50/50

Sammendrag

Forbedring af lavfedtholdig halvfast ost gennem regulering af peptidsammensætningen

Halvfaste oste, som Danbo med et højt vandindhold og kort modningstid er karakteriseret af en stor andel af de store til mellemstore peptider, der stammer fra kaseinnedbrydningen, og kun en mindre mængde af mindre peptider og frie aminosyrer. Den store mængde af mellemstore hydrofobe peptider har betydning for ostens konsistens og øger risikoen for bitter smag. Det er egenskaber der er vanskelige at undgå i forbindelse med fremstilling af lavfedtholdige oste og især dem med 20 % eller mindre fedt i tørstof. Projektets formål var at undersøge, hvorledes peptidsammensætningen kan justeres, for at give lavfedtholdig halvfast ost en god og stabil konsistens og smag, samt hvordan syrevækkere og modningskulturer kan anvendes for at opnå en fordelagtig sammensætning af peptider i ostene.

Der blev arbejdet med kortlægning af peptidprofiler i udvalgte oste med forskellige egenskaber, samt identificering af peptider og hydrolyseforsøg med de indblandede enzymer. Ostningsforsøg blev gennemført med formål at undersøge effekter på peptidnedbrydningen af kulturer og præparat af *Lactobacillus helveticus*, der blev udvalgt for deres høje aktivitet af aminopeptidaser med bred specificitet til at nedbryde forskellige ostepeptider. Det lykkedes at få de store peptider nedbrudt og at øge indholdet af frie aminosyrer drastisk i lavfedtholdige oste type Danbo med 13 % fedt (20 % fedt i tørstof). De lavfedtholdige oste fik en bedre konsistens, hvor aminosyreindholdet blev øget til mindst det dobbelte, samtidigt med at den primære nedbrydning af kaseinet ikke blev ændret. Konsistensen var mindre klæg og mere kort eller sprød, og ostene holdt formen bedre og flød ikke ud på den samme måde som kontroloste.

Ostene blev også mindre bitre ved anvendelse af varmebehandlede celler af *Lb. helveticus* eller normalt behandlede kulturer heraf, og de fik en mere moden smag. Der dannedes mere af flere vigtige aromakomponenter i ostene med varmebehandlede *Lb. helveticus*, men hvilke og hvor meget disse blev øget, var afhængigt af hvilken syrevækker der blev brugt. Effekterne var større ved brug af syrevækkere med en større andel af citratforbrugende bakterier (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc mesenteroides*). Syrevækkerbakterierne var stimuleret af tilsætningen allerede de første uger af modningen. Det er ikke klarlagt hvilken betydning en øget frigørelse af aminosyrer i osten har på smagsudviklingen, udover at det øger baggrundsmagen som ”suppeagtig”, ”salt” og ”sød”. Flere specifikke smagskomponenter dannes fra nedbrydning af aminosyrer, men der er rigeligt med aminosyrer fra denne nedbrydning i alle ostene. En tilstrækkelig tilgængelighed til aminosyrer giver dog også de tilstedeværende mikroorganismer mulighed til at bruge flere alternative metaboliske veje. Det blev for eksempel vist at i oste med syrevækkerbakterier der kan fremstille energi fra aminosyren arginin, blev flere aromakomponenter dannet som følge af øget mængde af aminosyrer end i andre oste. Resultater i projektet peger på sammenhæng mellem mikrobielle aktiviteter i begyndelsen af ostemodningen og de muligheder der er for aromadannelse senere under modningen.

Resumé in English

Improvement of low-fat semi-hard cheese through regulation of the peptide composition

Semi-hard rather soft cheeses like Danbo with high moisture content and a short ripening period, are characterized by high content of large to medium-sized peptides, which originate from the casein breakdown, and low content of further breakdown products as free amino acids. The large proportion of quite large and hydrophobic peptides influence the physical properties of the cheese and increase the risk of bitter flavour. These are critical points in the production of low-fat cheese and especially cheeses with 20 % or less fat content in dry matter. The objective of this project was to study how the composition of peptides shall be changed to give low-fat semi-hard cheese an attractive and stable texture as well as a mild and clean flavour. Methods should be evaluated for changing the peptide composition by the use of selected starter and adjunct microbial cultures.

A mapping was made of peptide profiles of selected cheese varieties with different properties, and the work also comprised identification of peptides and hydrolysis experiments using the involved enzymes. Cheese making experiments were made to examine effects of cultures and preparations of *Lactobacillus helveticus*, which had been selected for their high activity of aminopeptidases with broad specificity for different kinds of cheese peptides. Breakdown of a considerable part of the quite large peptides and a large increase in the content of free amino acids were successfully obtained in low fat cheese type Danbo with 13 % fat in cheese. With a double amount of free amino acids and at the same time no change in the primary casein breakdown, the consistency of the low-fat cheese was approved. The cheese became less adhesive and more brittle, and they kept their form better and did not flow out in the same way as control cheeses did.

Less bitterness and more mature flavour were observed in cheeses with addition of heat-treated cells or selected cultures of *Lb. helveticus*. More of several important flavour compounds were produced in cheese after addition of heat-treated *Lb. helveticus*, but which components and how much their content increased, depended on which starter that was used. The effect was stronger with a starter culture containing a larger part of citrate using bacteria (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and *Leuconostoc mesenteroides*). The starter bacteria were stimulated by the addition already during the first weeks of ripening. What impact an increased release of amino acids in cheese has on the flavour development is not clear, except an increased background flavour with broth, salt and sweet components. There was not a lack of amino acids as precursors for the several aroma compounds that are produced from amino acid breakdown in any of the cheeses. An increased availability of amino acids, however, offers the cheese bacteria more possibilities to use their alternative metabolic pathways. It was for instance shown that in cheeses containing starter bacteria with the ability to produce energy from the amino acid arginine, more aroma compounds were produced in parallel to the increased amino acid content. Results of the project indicate a relation between microbial activities at the beginning of ripening and possibilities for flavour development much later during cheese ripening.

1. Baggrund og mål

Af sundheds- og ernæringsmæssige årsager har der i de senere år været en voksende efterspørgsel efter lavfedtholdige fødevarer. Desværre er produktionen af lavfedtholdige halvfaste oste præget af problemer med ustabil konsistens og uensartet kvalitet, og det er især hvis fedtindholdet skal være 20 % i tørstof eller mindre. Konsistensen bliver typisk overmoden til følge en kraftig proteolyse, inden en rig og sammensat smag er udviklet, og enkelte smagskomponenter som for eksempel fra overflademodning kan let komme til at dominere. Forudsætninger for de faktorer der regulerer smagsudviklingen i ost forandres af ostningsteknikken, og af biologiske aktiviteter allerede under den første modningstid. En øget frigørelse af aminosyrer i osten har betydning for smagsudviklingen men hvordan er der forskellige teorier om (12, 17, 19).

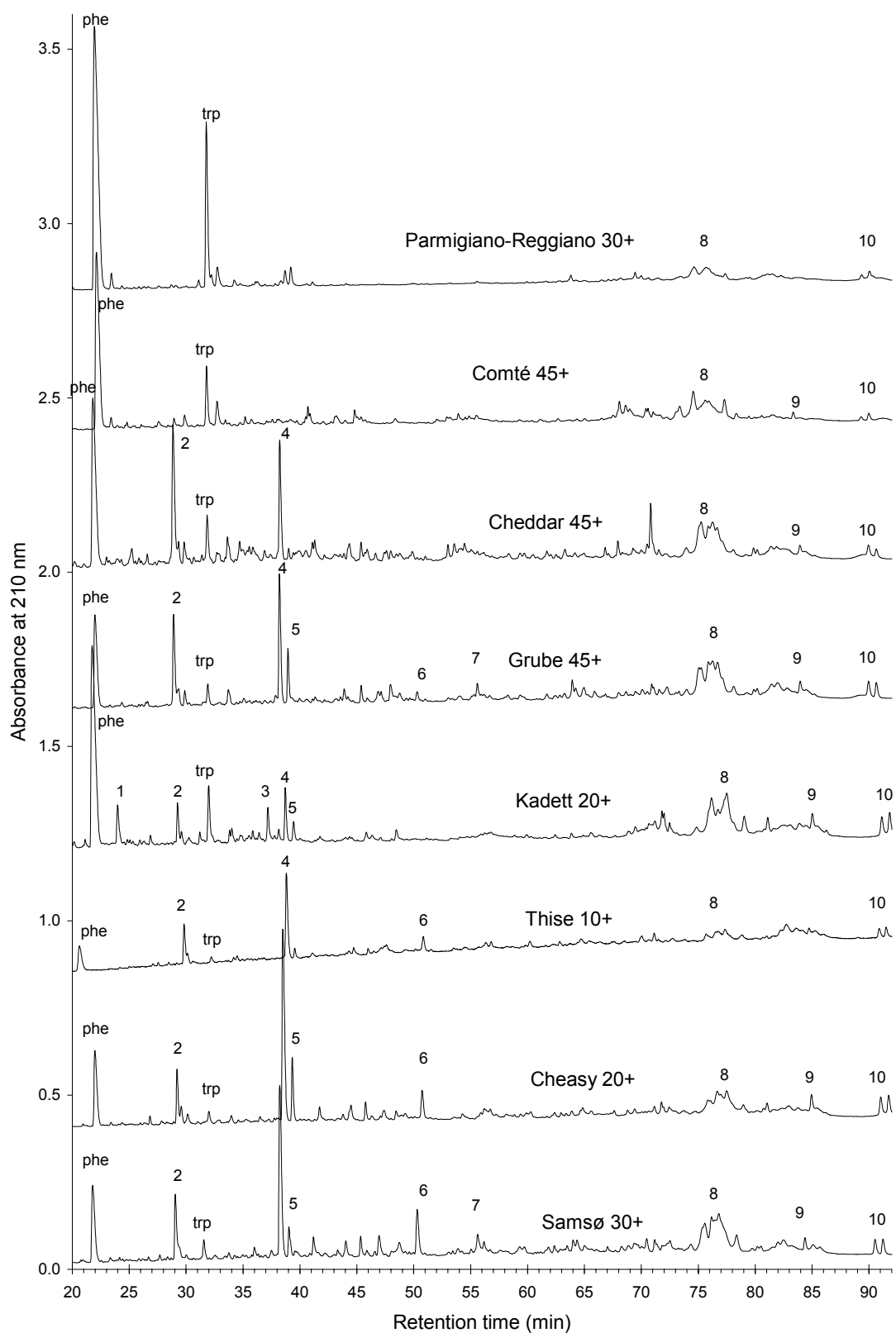
Halvfaste danske oste har typisk et højt vandindhold, en kort modningstid og lugt og smag af kit men ellers ofte mild smag. Sådanne ostesorter er karakteriseret af et højt indhold af mellemstore hydrofobe peptider af hvilke en del smager bittert, en smag der intensiveres når fedtet fjernes. Endvidere forringes konsistensen til at blive mere svampagtig, hvis en høj andel af peptiderne er relativt store og hydrofobe med begrænset evne til at binde vandmolekyler, som der er rigeligt af i de halvfaste oste. En forudsætning for en god konsistens i lavfedtholdig ost er at en del af fedtet erstattes med endnu mere vand (17, 22). Det er derfor særdeles svært at fremstille halvfast ost af typen hjemmemarkeds (Danmark) Danbo med et lavt fedtindhold. Konsistensen er afhængig af den fedtfattige osts indhold af kalciumfosfat, laktat, natrium- og ammoniumioner samt evt. fedterstatningsmidler udover vandindholdet. Desuden er der relationer mellem konsistensen og proteolysen. Den primære proteolyse under den første uge er kendt for at bidrage til at den gummiagtige friske ost bliver mere smidig. Mindre kendt er mekanismerne bag den rolle proteinnedbrydningen har på udvikling af en mere moden og sprød konsistens (23, 24).

Formålet med projektet var at undersøge, hvorledes peptidsammensætningen skal justeres, for at give lavfedtholdig halvfast ost en god og stabil konsistens og smag. Det blev lavet en indledende kortlægning af peptidprofiler i forskellige ostesorter, og studier af hvilke peptider der er, hvilke enzymer der er indblandet og hvilken betydning peptidsammensætningen kan have for de sensoriske egenskaber. Endvidere blev det undersøgt, hvordan starter- og modningskulturer kan anvendes for at opnå en fordelagtig sammensætning af peptider i ostene.

2. Resultat og diskussion

2.1 Kortlægning

Proteolyse og peptidindhold blev undersøgt i en række danske og udenlandske ostesorter med normalt fedtindhold og i et par lavfedtholdige oste der købtes ind i forretninger eller blev sendt til os direkte fra mejerier. Kasein blev analyseret med kapillarelektroforese (CE), peptider der er opløselige ved pH 4.6 med HPLC og indhold af frie individuelle aminosyrer med HPLC efter derivatisering. Der er givet eksempler på peptidprofiler for oste med forskellige egenskaber i Figur 1. I de hårdeste oste, dem der er øverst i figuren, er kaseinet meget nedbrudt i høj grad og for Parmigiano-Reggiano dominerer aminosyretopperne helt. Det er i Figur 1 muligt at se flere fælles toppe, der indeholder peptider (fragmenter, som herefter benævnes "f" efterfulgt af talværdier, der gengiver den aminoterminal aminosyresekvens) fra mælkesyrebakteriernes hydrolyse af peptidet α_{s1} -kasein (f1-23) (toppene 2, 4, 5 og 6) i alle oste, med undtagelse for de to øverste.



Figur 1. Eksempler på peptidprofiler i nogle forskellige ostesorter analyseret ved HPLC (ikke alle oste er analyseret). De nummererede toppe udgør de identificerede peptidfragmenter (f), der angivet nedenfor samt evt. uidentificerede fragmenter. Phe og trp er aminosyrerne phenylalanin og tryptophan.

1	α_{s1} -kasein (f4-9) og (f4-8)	6	α_{s1} -kasein (f1-16)
2	α_{s1} -kasein (f1-9) og (f1-8)	7	β -kasein (f1-28)
3	α_{s1} -kasein (f4-13)	8	Fraktioner (f1-105), (f1-107), (f29-105) og (f29-107) fra β -casein A og B
4	α_{s1} -kasein (f1-13)	9	α -lactalbumin
5	α_{s1} -kasein (f1-13)	10	β -laktoglobulin af to genetiske varianter

Disse to oste, Comté og Parmigiano-Reggiano, fremstilles af upasteuriseret rå mælk med termofile syrevækkere og eftervarmes ved så høj en temperatur at løben bliver inaktiveret. Peptidet α_{s1} -kasein (f1-23) bliver dannet af løbens aktivitet i osten og mangler således i de to øverste oste. Forholdet mellem mængderne af de fire omtalte peptider i ostene er afhængig af genetiske forskelle mellem syrevækkerstammernes proteaser, og af potentiale for deres videre nedbrydning i ostene af peptidaser fra syrevækkeren, medfølgeflora og specielt tilsat modningskultur som i Kadett-ost. Der er ikke set forskelle i peptidprofilerne som følge af overflademodning i de lavfedtholdige oste, da disse kun modnes et par uger, men dog i normalfedede oste med lang lagringstid, eftersom en kraftig øgning af pH som følge af kitmodningen påvirker proteolysen.

Peptidprofilerne (figur 1) viser to eksempler på strategier for fremstilling af oste med fedtindhold 20+ eller lavere. Den ene er kraftig begrænsning af syrevækkerens udvikling og de proteolytiske aktiviteter ved ostning og lagring (Thise 10+), og den anden er tilsætning af modningskultur for at nedbryde de dannede mellemstore og mindre peptider så meget som muligt uden at påvirke den primære kaseinnedbrydning (Kadett 20+).

Ved kortlægningen blev proteolysen også analyseret i Danbo med forskelligt fedtindhold, (45+, 30+ og 20+), der blev fremstillet på et mejeri den samme uge, gentaget tre gange. Peptidprofilerne var meget ens, men for Danbo 30+ var den signifikant forskellig fra de andre idet flere af peptiderne i intervallet mellem 40 og 52 min (se figur 1) var mere nedbrudt. Fra sensorisk synspunkt var disse oste ikke så forskellige fra Danbo 45+ som dem med det laveste fedtindhold, hvilket viser at peptiderne i en ost med lavere fedtindhold gerne må være lidt mere nedbrudt. Vand i fedtfri ost var ens i 45+ og 30+, medens den var 2 %-enheder lavere i Danbo 20+, hvis konsistens blev bedømt som fastere og mindre klæg. Disse egenskaber viste sig ved reologiske målinger som større værdier for "stress ved brud" og "arbejde til brud". Der var det samme totale indhold af aminosyrer og samme pH i Danbo-ostene med forskelligt fedtindhold. (1)

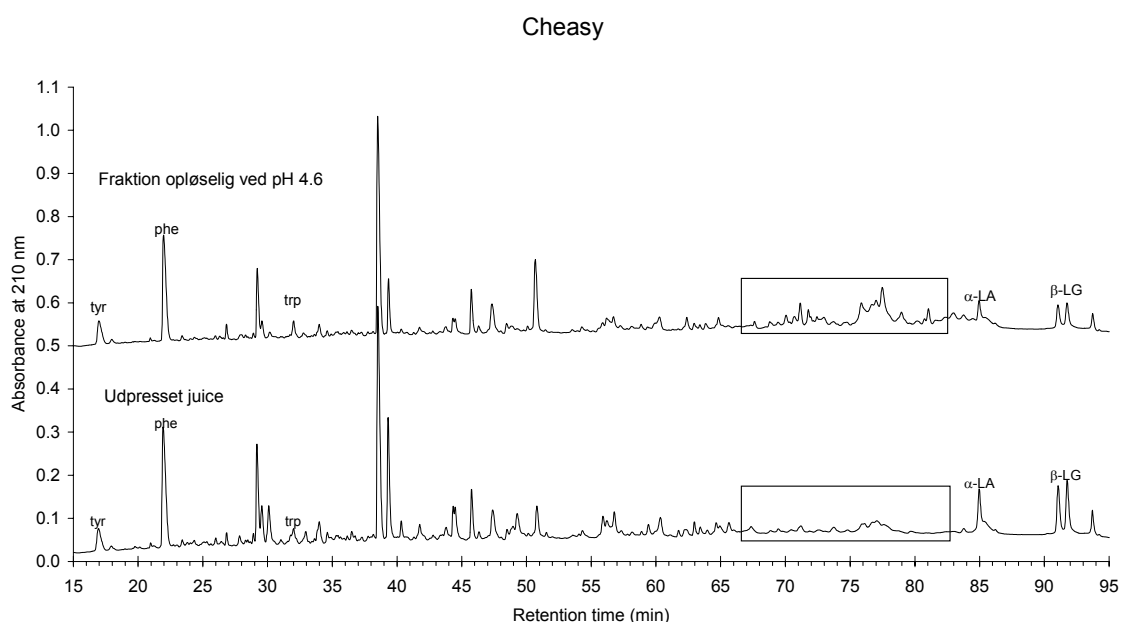
2.2 Vandbindingsevne

En stor del af kunsten ved at producere gode lavfedtholdige oste ligger i at binde meget vand i osten og i kaseinnetværket på den rigtige måde. Af stor betydning for vandbindingen er hvor meget kalciumfosfat og laktose der kommer med i osten og det bestemmes af ostningsprocessen. Ved et lavere indhold af kolloidalt kalciumfosfat i den friske ost frigøres en del af det, som er bundet til kaseinet for at ligevægt skal opnås, og det blotlægger til gengæld ladede grupper i kaseinet, der binder mere vand. Kaseinnetværket bliver hermed mere åbent og osten bliver blødere. Den ønskede effekt får man ved at fortynde vollen med vand under efterrøringen. Den som følge af vandtilsætningen fortyndede laktosekoncentration mindsker den mænde mælkesyre, der kan blive dannet og påvirker pH i den enkelte ost. Dette har betydning både for ostens endelige sammensætning og herunder hvordan kalcium, fosfat og vand er fordelt i osten. Endvidere bliver osten blødere som følge af udskiftning af kalcium med natrium ved saltningen og med ammoniumioner ved overflademodning, og disse processer er også afhængigt af pH i osten.

Nedbrydning af kasein i ost til peptider og aminosyrer øger antallet af molekyler i opløsning og blotlagte molekyleender i kaseinnetværket, der binder vandmolekyler til sig. Ved hver peptidbinding der bliver hydrolyseret forbruges et vandmolekyle, men der er mange flere vandmolekyler, der orienterer sig i et fast mønster rundt om peptidmolekylernes nye ender. Vi ville teste vor teori om at den forandring i konsistensen mod at blive sprødere (kortere) og mindre klæg, som opnås i et senere trin af modningen, og som det lykkedes os at

accelerere i lavfedtholdige oste (se afsnit 2.4), kan forklares med hvor meget vand ostene er i stand til at binde. Foreløbige resultater fra NMR-målinger (kernemagnetisk resonansspektroskopi) indikerer at en ost med kraftigere modning og et større indhold af små peptider og aminosyrer men med den samme mængde kasein nedbrudt, er i stand til at binde mere vand end en mindre moden ost af den samme alder og ellers med den samme sammensætning. Desværre var der af praktiske årsager ikke mulighed for at følge op på disse indledende interessante resultater med flere forsøg i projektet.

En sammenligning mellem vandbindingsevne i to lavfedtholdige oste med meget forskellig peptidsammensætning (Kadett og Cheasy), blev lavet ved undersøgelser af den ostejuice der er mulig at presse ud af ostene med en højtrykspresse. Det var muligt at presse 3 - 4 gange mere juice ud fra den mere modne ost (Kadett), der havde 4 - 5 gange større indhold af aminosyrer, hvor alle mellemstore peptider var nedbrudt og (bemærk) et lavere vandindhold. Forskelle mellem hvilke peptider der blev presset ud og de der er opløselige ved pH 4.6 (figur 2) indikerer at protein-proteininteraktioner forekommer mellem store hydrofobe peptider og kaseinnetværket, der holder disse peptider tilbage i osten sammen med det vand der er bundet til eller orienteret omkring dem (12).



Figur 2. Peptider fra juice der blev presset ud af osten og fra et pH 4.6-opløseligt ekstrakt analyseret med HPLC.

2.3 Enzymaktiviteter

En forudsætning for aktivt at kunne styre en forandring af peptidsammensætningen i lavfedtholdig ost i ønsket retning er viden om hvordan forskellige enzymer i osten kan bidrage. Kaseinnedbrydningen i halvfast oste begynder med specifik hydrolyse formidlet af løbe og mælkeproteasen plasmin. Det næste trin er at en del af de dannede peptider bliver nedbrudt af syrevækkerens cellevæg-proteaser. En del af de lidt mindre peptider bliver videre nedbrudt til endnu mindre peptider og aminosyrer af en lang række enzymer, herunder aminopeptidaser fra syrevækker og medfølgeflora. (18)

De vigtigste enzymer bag dannelse, akkumulering og eliminering af forskellige peptider og grupper af peptider blev studeret ved hydrolyseforsøg. Natriumkaseinat blev hydrolyseret

med løbe og plasmin og disse nedbrydningsprodukter blev videre hydrolyseret med et aminopeptidasepræparat fra mælkesyrebakterier (9). Peptidfraktioner fra ost blev også videre hydrolyseret med aminopeptidasepræparatet. Forandringer i kaseinkomponenter og peptidsammensætning blev analyseret med kapillarelektroforese og HPLC. Der blev også udført hydrolyseforsøg med oprenset kasein fra homozygot køer (der producerer enkelte genetiske varianter af kaseinerne) med henblik på bedre at kunne identificere de dannede peptider. Resultater af disse undersøgelser blev brugt ved identificering af peptider (afsnit 2.4), samt til at planlægge ostningsforsøg og evaluere forandringer i peptidsammensætningen i disse oste (afsnit 2.5).

2.4 Peptididentificering

Peptider i ostene blev identificeret ved hjælp af hydrolyseforsøg, præparativ kromatografi og LC-MS (højtryksvæskechromatografi koblet til massespektroskopi) for bestemmelse af molekylmasse og sandsynlig aminosyresekvens. Alle de proteose-peptoner der stammer fra plasmins nedbrydning af β -kasein blev identificeret i osteekstrakt og hydrolysater. Endvidere er en række peptider foreløbigt identificeret fra aktiviteten af syrningskulturens cellevægproteaser på α_{s1} -kasein (f1-23), der stammer fra løbens aktivitet. Tre af disse, α_{s1} -kasein (f1-8), (f1-9) og (f1-13), er fundet med de tre første aminosyrer arg-pro-lys (arginin, prolin og lysin) fraspaltet af til α_{s1} -kasein f(4-8), (f4-9) og (f4-13) i oste med tilsætning af *Lactobacillus helveticus*, der blev vist at have enzymer med specificitet for at fraspalte disse terminale aminosyrer (aminopeptidasetype pepN og pepX) (25). Peptiderne er fundet i de markerede toppe i kromatogrammerne i figur 1, men peptider er ikke identificeret i alle oste i figuren, og toppene indholder også andre peptider. Evalueringen er ikke fuldført og resultaterne er foreløbige. (4, 10, 11, 25)

2.5 Ostningsforsøg med formål at ændre peptidsammensætningen

Det har været kendt en tid at den primære proteolyse i oste under især de første uger er med til at gøre ostekonsistensen mere blød og smidig, men man ved ikke ret meget om hvordan den videre nedbrydning af de først dannede peptider påvirker konsistensen, og det var den vores undersøgelser var fokuseret på at beskrive. Det er også denne videre nedbrydning der har potentiale til at fjerne bitter smag. Med formål at forandre peptidsammensætningen og studere hvordan det påvirker ostens egenskaber, blev to serier ostningsforsøg med 12 respektive 9 ostninger udført i pilotmejeriet hos Arla Foods Innovationcentre Brabrand. Forholdet mellem mælkesyrebakteriernes aktiviteter fra den cellebundne protease og de intracellulære peptidaser, blev forandret ved tilsætning af tre forskellige *Lb. helveticus* kulturer med forskellige forhold mellem disse aktiviteter. *Lb. helveticus* blev valgt til disse forsøg eftersom de har meget større potentiale til acceleration af peptidnedbrydning og frigørelse af aminosyrer end andre kulturer som f. eks. de fakultativt heterofermentative laktobaciller (for eksempel *Lb. paracasei* og *Lb. plantarum*) fra medfølgefloraen (20). Indflydelse fra syrevækkere med forskelligt forhold mellem syre- og aromadannere blev også undersøgt.

I den ene forsøgsserie blev fire ostninger i 1000 liters-tanke gentaget tre gange. To forskellige syrevækkere blev brugt med eller uden tilsætning af varmebehandlede *Lb. helveticus* (Enzobact). I den anden forsøgsserie blev tre forskellige ostninger i 1000 liters-tanke gentaget tre gange. To forskellige *Lb. helveticus* kulturer (LH-B02 og LH-32) blev testet sammen med den ene af de syrevækkere der blev brugt i den første serie. (2, 3, 4)

Effekt af syrevækkere med forskellige forhold mellem syre- og aromadannere

Forholdet mellem de forskellige grupper af syrevækkerbakterier a) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *cremoris* (syredannere), b) citrateforbrugende *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og c) *Leuconostoc*, a/b/c var. 84/11/5 for Starter A (A for aroma) and 96/3/1 for Starter S (S for syre). Disse forskelle påvirkede den mikrobielle flora i ostene under hele modningstiden. Oste med Starter A havde et større antal huller formodentlig som følge af det større indhold af citratforbrugende bakterier. Der blev nedbrudt den samme mængde kasein og dannet cirka lige så meget peptid og aminosyre i alle ostene, men der var et par kvalitative forskelle. Forholdet mellem mængden af peptider, der blev dannet af syrevækkerproteasens aktivitet på peptidet α_{s1} -kasein (f1-23) varierede, hvilket kan skyldes forskellige genetiske varianter af proteasen. Der var også signifikante forskelle mellem indholdet af arginin og de to aminosyrer der dannes ved nedbrydning af denne aminosyre, ornithin og citrullin. Af de to forskellige underarter af *Lactococcus lactis*, nemlig *lactis* og *cremoris* er det især den ene, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, der er kendt for at forbruge arginin. Det giver dem mulighed til at fremstille mere energi og opjustere et lavt pH ved nedbrydning af arginin til ornithin, ATP og ammoniumioner. Citrullin er et mellemprodukt i processen. Der blev dannet meget mere ornithin i oste med Starter A end med Starter S, og den ekstra energi det giver er måske en del af forklaringen på at der også dannedes lidt flere aromastoffer i disse oste. Smørsyre var der dog mere af i oste med Starter S, og medens mængden mindskedes i oste med Starter A mellem 3 og 9 ugers modning, øgede den i oste med Starter S. Resultater af sensorisk analyse viste at oste med Starter A var lidt mere modne i smagen, lidt mere klæg og mindre smuldrede end de andre. De reologiske målinger viste ingen forskel mellem oste med de to syrevækkere. (3, 21, 27)

Effekt af varmebehandlede laktobaciller

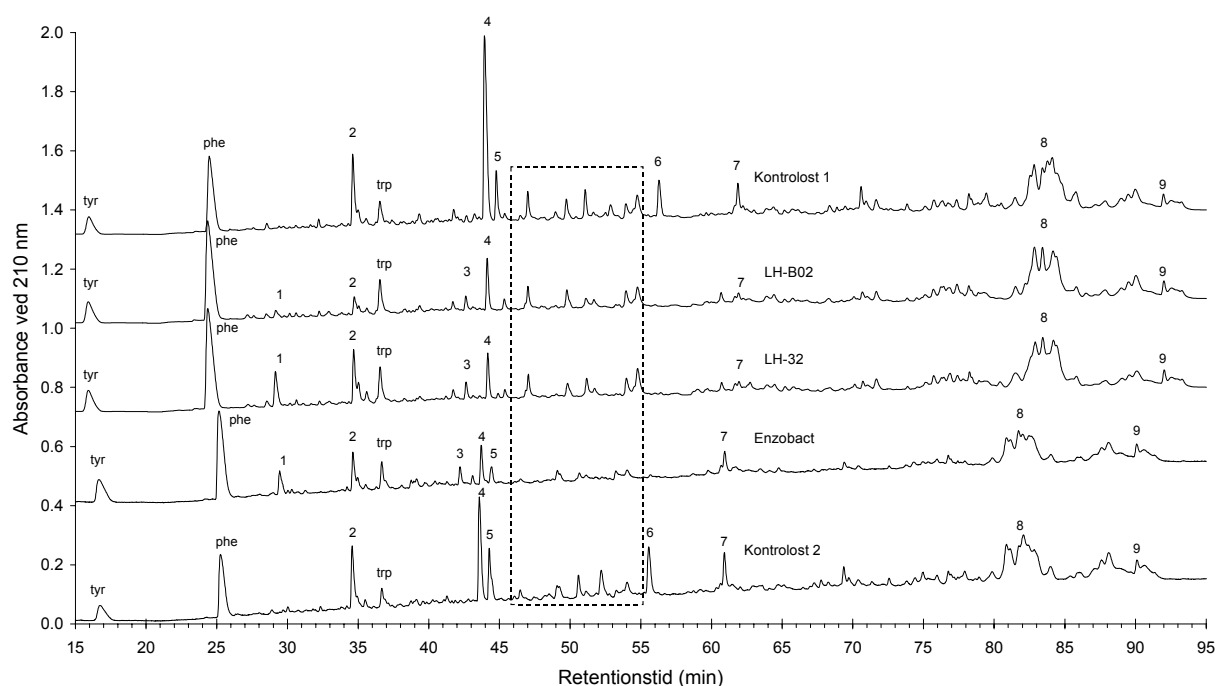
Der var ingen forskel i pH under ostningen eller i minimums-pH, men syrningen gik lidt hurtigere under presningen i oste med de varmebehandlede laktobacillerne (Enzobact, Medipharm). Der var vist et højere bakterietal for alle grupper af syrevækkerbakterier de første tre uger af modningen i oste med Enzobact end i oste uden. De varmebehandlede laktobaciller accelererede nedbrydning af peptider fra syrevækkerens hydrolyse af α_{s1} -kasein (f1-23) på den samme måde som de gør i Kadett (Se figur 1 og afsnit 2.4). Mængden af aminosyrer øgede væsentligt, til mere end det dobbelte af hvad der dannedes i referenceostene under de 9 uger, hvor modningen blev nøje analyseret. Proportionelt set øgedes mængden af glutamin, histidin, prolin og glycin medens andelen af leucin, phenylalanin, aspergin og serin mindskedes i oste med Enzobact. I de samme oste var der signifikant mere 3-methylbutanol (aromakomponent fra nedbrydning af leucin) og mindre smør- og hexansyre. Sensorisk analyse demonstrerede mindre bitter smag og mere af en smagskomponent, der betegnes som nøddesød i oste med Enzobact, som også blev bedømt som mere modne i smagen. Konsistensen i de samme oste var kortere (lettere at bryde) og mindre elastisk. Der var også signifikant forskel i de reologiske resultater fra uniaksial kompression (stress ved brud var lavere i oste med Enzobact). Oste med Enzobact, der havde højt indhold af aminosyrer og små peptider, holdt desuden formen bedre end referenceostene af samme alder, i hvilke peptiderne ikke var lige så meget nedbrudt, medens stort set den samme mængde kasein var nedbrudt i dem alle.

Der blev vist synergieffekter mellem syrevækkere og varmebehandlede laktobaciller. De positive effekter for konsistens og smag var generelt større ved brug af Starter A end Starter S både kvantitativt og kvalitativt. Der var signifikant større mængde af aminosyrer dannet og mere af flere vigtige aromakomponenter i ostene med Starter A efter tilsætning af Enzobact.

Tilsætningen påvirkede også dannelsen af aromakomponenter kvalitativt forskelligt i ostene med forskellige syrevækkere. Disse resultater peger på sammenhæng mellem mikrobielle aktiviteter i begyndelsen af ostemodningen og aromadannelsen, der især sker meget senere. Det er et meget vigtigt område for videre forskning. (3, 11, 27)

Effekt af levende kulturer af *Lb. helveticus*

I oste med tilsætning af *Lb. helveticus* kulturerne LH-B02 og LH-32 (fra Chr. Hansen A/S) udvikledes en mere moden smag og konsistensen blev kortere og mindre klæg. Effekten var tydeligst ved brug af LH-B02, som også eliminerede bitter smag til forskel fra LH-32. En vigtig forskel mellem de varmebehandlede laktobaciller og de levende kulturer er mængden af cellebundet protease, der er større i relation til aminopeptidaserne i de levende kulturer. De to testede kulturer var også forskellige på den måde at den ene er en blandingskultur med udvalgte stammer og et optimeret forhold mellem disse enzymgrupper (LH-B02), medens den anden er en enkeltstammekultur med potentiale for at danne proportionalt mere protease i forhold til mængden af aminopeptidaser (LH-32). Kulturerne blev tilsat direkte til ostekarrene som dybfrosne pellets. Bakterietal for de forskellige bakteriegrupperne i syrevækkeren blev ikke påvirket af tilsætningen af de levende kulturer indenfor de første to uger, og det blev pH-udviklingen under modningen heller ikke. Kaseinnedbrydningen var meget ens, med undtagelse af at oste med LH-32 havde en lidt hurtigere nedbrydning af β -kasein uden at der dannedes mere af γ -kasein, hvilket skulle have været tilfældet hvis det var plasmin der var mere aktivt.



Figur 3. Peptidprofiler for 6 uger gamle oste af typen Danbo med 13 % fedt, med og uden tilsætning af *Lactobacillus helveticus* i form af levende kulturer (LH-B02 og LH-32) og varmebehandlede celler (Enzobact). Osterne er analyseret ved to forskellige tidspunkter (de tre øverste henholdsvis to nederste kromatogrammer hører sammen). Retentionstiderne er ikke helt de samme, men ved hjælp af de nummererede toppe er det muligt at sammenligne dem. En del peptider i de nummererede toppe er identificeret (Se figur 1). I retentionsintervallet fra 44 til 55 min. er der vigtige forskelle i peptidprofilerne, men disse peptider er endnu ikke identificeret.

Denne forskel i proteolytisk aktivitet må således tilskrives *Lb. helveticus* LH-32. Peptidprofilerne forandredes af de levende *Lactobacillus*-kulturer på en lignende måde som ved de varmebehandlede ved at peptider fra nedbrydning af α_{s1} -kasein (f1-23) blev tre aminosyrer kortere efter hydrolyse i aminoenden (figur 3). Peptiderne med retentionstider mellem 44 og 55 min blev nedbrudt af *Lb. helveticus*, men ikke så meget med de levende kulturer som med de varmebehandlede. Den totale mængde af aminosyrer var 50 % højere i oste med *Lb. helveticus*-kulturer, hvilket kun er en halvt så stor stigning som ved tilsætning af de varmebehandlede laktobaciller (Enzobact). (4)

2.6. Bitre peptider

Bitre peptider blev fremstillet ved hjælp af at hydrolysere natriumkaseinat med mælkeproteasen plasmin og løbeenzymet chymosin efterfulgt af fældning ved pH 4.6 og centrifugering. Det pH 4.6-opløselige hydrolysat blev tilsat i stigende mængder til ostestykker udskåret af Danbo 20+, 30+ og 45+, der efter 7 dages kølig opbevaring blev analyseret sensorisk for bestemmelse af tærskelværdien for bitterhed i de tre typer ost. Peptidprofilerne i hydrolysatet og de forskellige ostestykker blev bestemt ved hjælp af HPLC. Den sensoriske bedømmelse viste at Danbo 20+ i forhold til 30+ og 45+ kun kunne indeholde den halve mængde af det bitre hydrolysat, før dommerne kunne detektere bitter smag. Det viser, at fedtet i federe oste kan maskere denne smagsfejl. To peptider i hydrolysatet, som blev genfundet i osteprøverne, blev foreløbigt identificeret som et fragment 165-199 fra chymosins nedbrydning af α_{s1} -kasein og fragment 193-209 fra chymosins nedbrydning af β -kasein. (1, 8, 26)

I ostningsforsøgene (afsnit 2.5) med tilsætning af *Lactobacillus helveticus* blev bitter smag elimineret hvis forholdet mellem aminopeptidolytisk og den proteolytiske aktivitet var høj. Den bedste effekt blev opnået i oste med varmebehandlede *Lb. helveticus* (Enzobact) og derefter i oste med den levende kultur LH-B02 (2, 4)

3. Konklusioner

Det er muligt at forbedre konsistens og smag i lavfedtholdig ost ved at accelerere den videre nedbrydning af peptider der dannes af den primære nedbrydning af kasein i osten, uden at ændre på denne primære nedbrydning.

Ved en kraftigt øget peptidnedbrydning blev den lavfedtholdige osts konsistens mindre svampet, mindre klæg og mere kort (sprød) i en retning mod konsistensen i langtidslagret ost. En fordobling af det totale indhold af frie aminosyrer i ost af type Danbo med 13 % fedt, medvirkede også til at osten holdt formen bedre og ikke flød ikke så meget ud.

En god måde at accelerere nedbrydning af de mellemstore peptider er brug af udvalgte stammer af *Lactobacillus helveticus*, og den bedste effekt blev opnået ved brug af varmebehandlede celler. *Lactobacillus* af andre arter er ikke vist at kunne overproducere så mange aminosyrer der er brug for til at forbedre konsistensen på den her måde.

En del af de mellemstore peptider giver osten en bitter smag. Det blev vist at en lavfedtholdig ost kun skal indeholde en mindre mængde af disse peptider end en ost med mere fedt, for at den smager bittert. Den øgede nedbrydning af de mellemstore peptider med hjælp af *Lb. helveticus* mindskede også bitter smag i ostene. En mere moden smag udvikledes i de lavfedtholdige oste med tilsætning af udvalgte stammer af *Lb. helveticus*, og forbedringen var afhængig af hvilken syrevækker der blev brugt. Der er brug for mere forskning i disse synergieffekter og regulering af de forskellige metaboliske veje bag smagsdannelse i ost.

4. Publikationer i projektet

4.1 Publikationer og manuskripter til publicering i internationale videnskabelige tidsskrifter

1. MADSEN, J.S. & ARDÖ, Y. 2001. Exploratory study of proteolysis, rheology and sensory properties of Danbo cheese with different fat contents. *International Dairy Journal*, 11:423-431
2. MADSEN, J.S., THORSLUND, S., THORSLUND, K.N., QVIST, K.B. & ARDÖ, Y. (In preparation) Peptide composition and physical properties of low fat semi-hard cheese.
3. ARDÖ, Y., THORSLUND, K.N., THORSLUND, S., MADSEN, J.S. AND SØRENSEN, L.K (In preparation). Interactions between heat-treated *Lactobacillus helveticus* and DL-starter in ripening of low fat cheese.
4. ARDÖ, Y, GULDAGER, H.S., MADSEN, A., SØRENSEN, N.-C., TÄHTINEN, H.M., (In preparation) Regulation of peptide composition of semi-hard low-fat cheese using *Lactobacillus helveticus* cultures.

4.2 Indlæg ved faglige kongresser, symposier

5. MADSEN, J.S., RASMUSSEN, K.M., LAUSTSEN, A.-M. & ARDÖ, Y. 2000. Bitter peptides in low-fat cheese. Poster ved LMC's Levnedsmiddelkongres 2000 i Lyngby
6. MADSEN, J.S. 2000. Bitter peptides in low-fat cheese. Foredrag ved LMC's Levnedsmiddelkongres 2000 i Lyngby
7. MADSEN, J.S. 2000. Improvement of low-fat cheese through regulation of the peptide composition. Foredrag på Center of Dairy Research, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA8. MADSEN, J.S. 2000. Properties of Danbo with different fat contents. Foredrag ved IDF symposium on Cheese Ripening and Technology, Banff, Canada, 2000
9. MADSEN, J.S. & ARDÖ, Y. 2001. Controlling quality of low-fat cheese by regulating the composition of peptides. Poster ved LMC's Levnedsmiddelkongres 2001 i Frederiksberg
10. OTTE, J., ZAKORA, M., ARDÖ, Y., KRISTIANSEN, K.R., MADSEN, J.S. AND QVIST, K.B. 2001. Analysis of milk proteins and peptides occurring in cheese by LC-MS with ion trap. Poster at the 21.st International Symposium on Separation of Proteins, Peptides & Polynucleotides, November 11-14 2001, Orlando, Florida, USA
11. MADSEN, J.S., THORSLUND, S., THORSLUND, K.N., QVIST, K.B. & ARDÖ, Y. 2002. Influence of peptide composition on physical properties of low fat cheese. Poster ved LMC's levnedsmiddelkongres 2002 i Lyngby

4.3 Faglige artikler og mødeindlæg

12. MADSEN, J.S. & ARDÖ, Y. 2000. Forbedring af lavfedtholdig ost. *Mælkeritidende*, 25: 76-79
13. ARDÖ, Y. 2000. Biokemiske ændringer i ostemodningen på grund af et lavere fedtindhold. Danmarks Mejeritekniske Selskab, Brædstrup
14. MADSEN, J.S. 2000. Forskning vedrørende gule ostetyper med lavt fedtindhold. Danmarks Mejeritekniske Selskab, Brædstrup
15. MADSEN, J.S. 2001. Teknologiske og sensoriske aspekter af fedtreduktion i fødevarer. Foredrag i Levnedsmiddelselskabet. Ingeniørsforeningen i Danmark, København
16. MADSEN, J.S. 2002. Forbedring af smag og konsistens i ost med lavt fedtindhold. Foredrag ved Osteproducenternes dag, Foreningen af Danske Osteproducenter, Odense

5. Andre referencer

17. ARDÖ, Y. 1997. Flavour and texture in low-fat cheese. In *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. 2nd ed. Ed: B.A. Law, Chapman & Hall, London, pp. 207-218
18. ARDÖ, Y. 2001. Cheese ripening. General mechanisms and specific cheese varieties. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 369:7-12
19. ARDÖ, Y., LARSSON, P.-O., LINDMARK MÄNSSON, H. & HEDENBERG, A. 1989. Studies of peptidolysis during early maturation and its influence on low-fat cheese quality. *Milchwissenschaft*, 44:485-490

20. ARDÖ, Y. & MADSEN, J.S. 1999. Evaluation of biochemical methods to analyse cheese characteristics derived from milk microflora activities. *Proceedings of symposium on Quality and Microbiology of Traditional and raw Milk Cheeses in Dijon, France 1998. European Communities* (ISBN92-828-7112-2): pp. 127-136
21. ARDÖ, Y., THAGE, B.V. & MADSEN, J.S. 2002. Dynamics of free amino acid composition in cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57:109-115
22. MISTRY, V.V. 2001. Low fat cheese technology. *International Dairy Journal*, 11:413-422
23. SKEIE, S., NARVHUS, J.A., ARDÖ, Y. & ABRAHAMSEN, R. 1995. Influence of liposome-encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli on the quality of low-fat Gouda-type cheese. *Journal of Dairy Research*, 62:131-139
24. SKEIE, S., NARVHUS, J.A., ARDÖ, Y., THORVALDSEN, K. & ABRAHAMSEN, R. 1997 The effect of reduced salt content on the function of liposome-encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli in rindless low-fat cheese. *Lait*, 77:575-585
25. TÄHTINEN, H.M. & ARDÖ, Y. 2002. Roboust aminopeptidases in heat-treated *Lactobacillus helveticus*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57:108

6. Specialer i mejeriingeniøruddannelsen

25. KÄTHE M. RASMUSSEN. 1999. Bitre peptider i lavfedtholdig ost. Specialearbejde, KVL
26. KRISTINE NELDEBORG THORSLUND. 2001. Accelereret ostemodning i lavfedtholdig halcfast gul ost ved overproduktion af aminosyrer gennem anvendelse af varmebehandlet, spraytørret *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303. Specialearbejde, KVL
26. STIG THORSLUND. 2001. Accelereret ostemodning i lavfedtholdig halcfast gul ost ved overproduktion af aminosyrer gennem anvendelse af varmebehandlet, spraytørret *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303. Specialearbejde, KVL

7. Samarbejdsrelationer

Nationalt

Arla Foods Innovationcentre Brabrand
Chr. Hansen A/S, Hørsholm

Internationalt

Medipharm, Arla Foods, Kågeröd, Sverige
INRA, Renne, Frankrig

8. Praktisk og videnskabelig betydning

Projektet har demonstreret en ny måde at forandre konsistens i lavfedtholdig ost til at blive mindre sej og mere kort (lettere at bryde), mindre klæg samt at holde formen bedre, ved at øge nedbrydning af peptider til aminosyrer drastisk, uden at forandre den primære kaseinnedbrydning. Konsistensen, og også smagen var mulig at forbedre i ost med kun 13 % fedt, ved at bruge modningskulturer med aktiviteter der øger nedbrydning af peptider til aminosyrer. Det drejer sig om at mindst fordoble disse aktiviteter og de lavfedtholdige ostesorter, der er modne efter en kort tids lagring, skal have lige så mange aminosyrer som meget gamle normalfedtholdige oste. Effekten er mulig at opnå med kulturer af *Lactobacillus helveticus* og især af dem, der er varmebehandlede så bakterierne kan tilsættes i større mængde uden at påvirke ostningen og samtidig give en god balance mellem proteolytiske og aminopeptidolytiske aktiviteter. Andre undersøgte arter af *Lactobacillus*, der kan påvirke osten på andre måder, har ikke givet den samme kraftige effekt på frigørelse af aminosyrer.

Den intensive nedbrydning af peptider er vist at have en direkte betydning for ostenes konsistens, og der er indikationer på at forandringen skyldes hvordan vand er bundet i ostene. Foreløbige resultater viste at NMR er en interessant metode at bruge til disse undersøgelser. Nye metoder er udviklet til at undersøge dannelse, akkumulering og nedbrydning af peptider i ost ved brug af

peptididentificering med LC-MS kombineret med HPLC, CE, oprensning af kaseiner fra homozygote køer og hydrolyseforsøg samt enzymfraktionering og enzymkinetiske målinger.

Det er for første gang vist at en ost med mindre fedt smager bittert med kun halvdelen af den mængde af et bittert peptidhydrolysat der kan være i en normalfedt ost før den smager bittert. Det viser at mængden af mellemstore, hydrofobe peptider er endnu vigtigere at begrænse i de lavfedtholdige oste end i andre halvfaste oste.

Smagen bliver forandret på mere end en måde ved brug af den ovenfor beskrevne teknik med tilsætning af *Lb. helveticus*. Direkte effekter er at bitter smag elimineres ved at de bitre peptider bliver nedbrudt, og at et større indhold af aminosyrer og små peptider forstærker baggrundsmagen (suppeagtig, salt, sød). Produktion af flygtige aromakomponenter er også blevet påvirket på forskellige måder, der er afhængig af syrevækkerens sammensætning. Resultater i projektet peger på at der er en relation mellem bakterielle aktiviteter i begyndelsen af ostemodningen og smagsdannelse, der sker langt senere i osten. Der er sandsynligvis fremstillet komponenter (for eksempel oxiderede co-enzymmer) eller stimuleret aktiviteter (der for eksempel regenererer co-enzymmer eller -substrater) i starten af modningen, der bliver brugt i dannelsen af smagskomponenter senere i processen, og derfor sætter grænser for smags- og konsistensmulighederne. Projektets resultater viser tydeligt hvor vigtigt det er fortsat at undersøge disse relationer, hvis man vil udvikle nye metoder til at producere mere og bedre balanceret smag i ost med rigtigt lavt fedtindhold (20+ eller mindre).

9. Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Aminosyrenedbrydning og ostaroma i hårde og faste oste (1998-2003).

Chr. Hansen/FØTEK 3, Projektleder: Ylva Ardö.

