

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## 1. Forord

Denne oppgaven er skrevet som en del av en 2-årig masterutdanning i Matvitenskap – Mat og helse. Laboratoriearbeidet er utført ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB).

Gjennom denne oppgaven har jeg lært mye om fordøyelse, nedbrytning av proteiner i ost og analyser knyttet til dette.

Denne oppgaven har ikke vært mulig uten tid og hjelp fra mange mennesker. Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min hovedveileder Gerd Vegarud som med sin veiledning, tid, tålmodighet, forståelse og ikke minst sitt gode humør har hjulpet meg gjennom hele oppgaven. En stor takk går også til Tove Devold og Siv Skeie for god veiledning. Ellen Kathrine Ulleberg som alltid er blid har vært min ekspert på proteinanalyser og bearbeiding av resultater og hjulpet meg mye. Irene Comi, Rita Nilsen, May Helene Aalberg og Kari Olsen har også vært til stor hjelp med sine kunnskaper og laborerfaring.

Erik N. Næss og Tone Aksnes Lian har vært mine dataeksperter og med deres datakunnskaper og hjelp har de spart meg for mange timer med knoting på data.

En siste takk går til familie og venner, spesielt de på Ås, som har oppmuntret meg, hjulpet meg, tatt pauser med meg og rett og slett holdt humøret mitt oppe gjennom denne perioden. Uten dere har ikke denne oppgaven blitt som den ble. Tusen Takk!

Ås, august 2012

---

Ina Aksnes Lian

## Innholdsfortegnelse

1. Forord .....	1
2. Sammendrag .....	4
3. Innledning .....	8
4. Teori.....	9
4.1 Melk og komponentsammensetning.....	9
4.2 Melkens proteiner.....	11
4.2.1 Myseproteiner.....	12
4.2.2 Kasein.....	13
4.3 Melkeproteiners biologiske funksjoner .....	18
4.4 Ost –Ysting av fast og halvfast ost.....	22
4.4.1 Løpefelling .....	22
4.5 Ost brukt i forsøket.....	23
4.6 Det humane fordøyelsessystemet og deres enzymer .....	25
4.6.1 Munn, svelg og spiserør.....	25
4.6.2 Magesekk (ventrikkel).....	26
4.6.3 Tynntarm.....	27
4.6.4 Tykktarm (Colon) .....	28
4.7 Humane mage- og tarm enzymer (HGJ og HDJ) .....	29
5. Material og Metoder .....	30
5.1 Ost.....	30
5.2 Fordøyelse .....	31
5.3 Flytskjema fordøyelse og proteinanalyser.....	33
Fordøyelse.....	33
Proteinanalyser.....	34
5.4 Analyse av total nitrogen og protein ved mikro-Kjeldahl .....	35
5.5 Protein separering ved SDS-PAGE.....	37
5.6 Trypsinering av proteiner i gel .....	39
5.7 pH 2 ekstrakt til peptid- og aminosyre analyser.....	40
5.8 nano LC-MS/MS analyse av peptider.....	41
5.9 Analyse av frie aminosyrer ved RP-HPLC.....	43
5. 10 Utstyr, løsninger og oppskrifter.....	45
5.10.1 Laboratorieutstyr .....	45

5.10.2 Kjemikalier og løsninger.....	46
5.10.3 Løsninger.....	48
6. Resultater .....	51
6.1 Proteininnhold i utgangs oster.....	51
6.2 Identifisering av ulike proteiner i ost og i human tarmsaft (HDJ) .....	52
6.3 Proteindegradering ved fordøyelse av HGJ og HDJ.....	53
6.4 Peptider identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ ved nano LC-MS/MS.....	55
6.4 Innhold av frie aminosyrer før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ .....	85
7. Diskusjon .....	88
7.1 Proteinanalyser .....	88
7.1.1 Proteininnhold i ufordøyd ost.....	89
7.1.2 Proteindegradering og identifisering av ulike proteiner ved fordøyelse av ost med HGJ og HDJ.....	89
7.1.3 Peptider identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ ....	91
7.1.4 Innhold av frie aminosyrer identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ.....	94
7.1.5 Fordøyelse.....	95
7.3 Til ettertanke og videre forsøk.....	96
8. Konklusjon .....	97
Referanseliste.....	98
Vedlegg 1: Peptider identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ ved nano LC-MS/MS – alle resultater i tabellform	
Vedlegg 2: Innhold av frie aminosyrer før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ – alle resultater	

## 2. Sammendrag

Melk er en kilde til energi, den gir essensielle aminosyrer og fettsyrer, og gir også vekstfaktorer til oppbygging av celler/membraner, nervevev og muskelvev. Kasein i melk og ost har stor betydning som næringsbestanddel fordi det inneholder alle aminosyrene som organismen trenger, og er særlig rik på essensielle aminosyrer. Melkeproteiner kan deles i to hovedgrupper: kaseiner (80 %) og myseproteiner (20 %). Kaseiner er delt inn i  $\beta$ -,  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - og  $\kappa$ -kasein og opptrer i kaseinmiceller.

Melkeproteiner har et bredt spekter av ernæringsmessige, funksjonelle og biologiske aktiviteter. Flere av melkeproteinene og deres peptider kan ha biologiske egenskaper som gjør at komponentene er potensielle ingredienser i helsefremmende mat. Disse peptidene er som oftest inaktive i det intakte proteinet og kan bli frigjort ved fordøyelse, fermentering med proteolytiske starterkulturer eller ved hydrolyse med proteolytiske enzymer.

Målet for denne oppgaven var å sammenlikne proteinnedbryting og dannelse av peptider og frie aminosyrer før og etter fordøyelse av ulike oster. *In vitro* fordøyelse ble utført på Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (2 gjentak). Det ble valgt ut 6 ulike oster for å se på om ysteprosess, proteininnhold, lagringstid og om osten var laget av ku- eller geitmelk ville påvirke proteinnedbryting og peptiddannelse før og etter fordøyelse. Under fordøyelsen ble det tatt ut prøver av ufordøyd ost, ost fordøyd i magesaft i 60 min (HGJ60) og ost videre fordøyd i tarmsaft i 60 min og 120 min (HDJ60 og HDJ120). Deretter ble proteinanalysene mikro Kjeldahl, SDS-PAGE, trypsinering av proteiner, nano LC-MS/MS og RP-HPLC utført.

Resultatene viste at allerede i ufordøyd ost hadde modning av ostene degradert noe av proteinene i osten og de hadde begynt å bli brutt opp i peptidfragmenter. Proteinbånd fra nedbrutte kaseiner ble videre raskt degradert under fordøyelse i mage og etter fordøyelse i tarm var så og si alle kaseinene og  $\beta$ -lg i osten degradert. I ostene ble det observert flere kjente biologiske aktive peptider som var antatt å kunne være blodtrykssenkende, ACE-inhiberende, opioide, antimikrobielle og

immunostimulerende. Disse var derivert fra  $\beta$ -kasein,  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein, to av disse derivert fra bovint  $\beta$ -kasein var også stabile under fordøyelsen.

Det var en generell økning i frie aminosyrer i alle ostene etter fordøyelse i mage og videre i tarm. Det var spesielt aminosyrene L-arginin, L-tyrosin, og de essensielle aminosyrene L-valin, L-fenylalanin, L-lysin og L-leucin som hadde sterkest økning fra fordøyelse i mage (HGJ60) til tarm (HDJ60). Det er da disse aminosyrene som har sterkest sjanse for å bli absorbert i tarmen. Sammenligning av Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd viser at med økende modningsgrad på osten får man et høyere innhold av frie aminosyrer i alle trinnene fra og med ufordøyd ost, til fordøyelse i mage og videre til fordøyelse i tarm.

## Abstract

Milk is a source of energy, it provides essential amino acids and fatty acids, and also provides growth factors for the development of cells /membranes, nerve tissue and muscle tissue. Casein in milk and cheese has a great nutritional value as a food ingredient because it contains all the amino acids that the organism needs, and is particularly rich in essential amino acids. Milk proteins can be divided into two main groups: caseins (80%) and whey proteins (20%).

Many milk proteins possess specific biological properties that make these components potential ingredients of health-promoting foods. These peptides can be liberated from the parent protein by gastrointestinal digestion of milk, fermentation of milk with proteolytic starter cultures or hydrolysis by proteolytic enzymes. Milk protein derived peptides have been shown to exert various activities affecting, e.g., the digestive, cardiovascular, immune and nervous systems.

The aim of this study was to compare protein degradation and the formation of peptides and free amino acids before and after digestion of different cheeses. *In vitro* digestion was performed on Norvegia stored at 3, 9 and 15 months, and Norvegia lettere, Norvegia økologisk and Snøfrisk hvitost. Another aim was to see if the cheese making process, protein content, cheese ripening, and if the cheese made from cow- or goatmilk would affect protein degradation and peptide formation before and after digestion. During digestion, it was taken out samples of undigested cheese, cheese digested in the gastric juice for 60 min (HGJ60) and cheese further digested in the duodenal juice for 60 min and 120 min (HDJ60 and HDJ120). Analyses that was performed was micro-Kjeldahl, SDS-PAGE, nano LC-MS/MS and RP-HPLC.

The results showed that already in undigested cheese there was some protein degradation. Proteinbands from degraded caseins was also rapidly degraded during digestion in the stomach and after digestion in the duodenum where virtually all the casein and  $\beta$ -lg in the cheese degraded. Several known biologically active peptides that were thought to be ACE-inhibitory, opioid, antimicrobial and immunomodulating where found in these cheeses. These were derived from  $\beta$ -casein,  $\alpha_{S1}$ -casein and  $\alpha_{S2}$ -casein.

There was a general increase in free amino acids in all cheeses after digestion in the stomach and later in the duodenum. The amino acids L-arginine, L-tyrosine, and the essential amino acids L-valine, L-phenylalanine, L-lysine and L-leucine had the greatest increase from digestion in the stomach (HGJ60) to the duodenum (HDJ60). These amino acids are then the ones with the strongest chance of being absorbed in the intestine. Comparison of Norvegia stored at 3, 9 and 15 months show that with increasing degree of cheese ripening you get a higher content of free amino acids in all the steps from undigested cheese, to digestion in the stomach and on to the duodenum.



### 3. Innledning

Melk er en kilde til energi, den gir essensielle aminosyrer og fettsyrer, og gir også vekstfaktorer til oppbygging av celler/membraner, nervevev og muskelvev. Kasein i melk og ost har stor betydning som næringsbestanddel fordi det inneholder alle aminosyrene som organismen trenger, og er særlig rik på essensielle aminosyrer (Hauge og Ore, 2009).

Målet for denne oppgaven var å sammenlikne proteinnedbryting og dannelse av peptider og frie aminosyrer før og etter fordøyelse av ulike oster. Det ble valgt ut 6 ulike oster: Norvegia lagret 3 måneder (mnd), Norvegia lagret 9 mnd, Norvegia lagret 15 mnd, Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost. Under ostemodning skjer det biokjemiske endringer som resulterer i utviklingen av smak, aroma og tekstur. Sammensetningen av ingrediensene, degradering og katabolisme som oppstår under ostemodning resulterer i et mangfold av forbindelser som gir osten sitt særpreg (Ochi *et al.*, 2012). Denne modningsprosessen vil blant annet starte proteinnedbryting i osten. Det var ønsket med denne oppgaven å se på om ysteprosess, proteininnhold, lagringstid og om osten var laget av ku- eller geitmelk ville påvirke proteinnedbryting og dannelse av peptider og frie aminosyrer før og etter fordøyelse. Ved å se på peptiddannelse ønsket man å undersøke om man kunne identifisere bioaktive peptider i ostene. Bioaktive peptider er spesifikke proteinfragmenter som har en positiv innvirkning på kroppens funksjoner eller tilstand, og som kan fremme helsen (Haque og Chand, 2008).

*In vitro* fordøyelse ble utført på Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (2 gjentak). Under fordøyelsen ble det tatt ut prøver av ufordøyd ost, ost fordøyd i magesaft i 60 min (HGJ60) og ost videre fordøyd i tarmsaft i 60 min og 120 min (HDJ60 og HDJ120). Deretter ble proteinanalysene mikro-Kjeldahl, SDS-PAGE, trypsinering av proteiner, nano-LC-MS/MS og RP-HPLC utført på de ufordøyde og fordøyde ostene.

## 4. Teori

Dette kapitlet vil gi en oversikt over hovedkomponentene i melk, spesielt vil det fokuseres på proteinene og deres biologiske funksjoner. Siden ost ble brukt i forsøket vil litt om ysting og ostenes næringsinnhold bli omtalt. Fordøyelse av ost er utført med humane enzymer slik at det humane fordøyelsessystemet og dermed funksjonen til enzymene i mage- og tarmsaft vil bli gjennomgått.

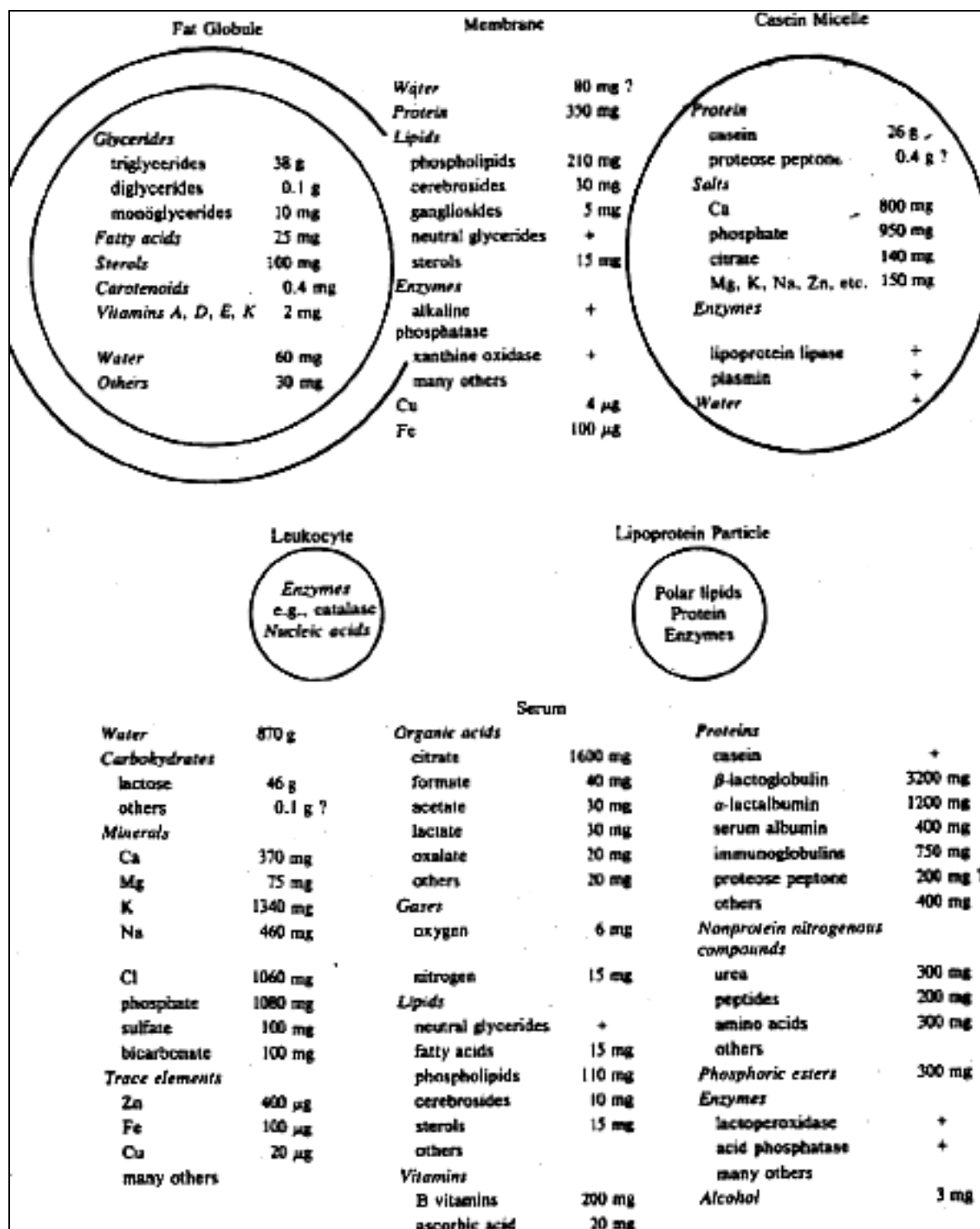
### 4.1 Melk og komponentsammensetning

Melk er en kilde til energi og dekker ernæringsbehovet for vekst hos nyfødte. Den er en viktig kilde til kalsium, styrker beinstrukturer og tenner, gir essensielle aminosyrer og fettsyrer, og gir også vekstfaktorer til oppbygging av celler/membraner, nervevev og muskelvev. Melk er utgangspunktet for tillaging av en rekke meieriprodukter som: melk, yoghurt, ost, gomme, prim, fløte, rømme, crème fraîche, cottage cheese, kesam og smør.

**Tabell 4.1: Hovedkomponentene i human-, ku- og geitmelk** (Fox & McSweeney, 1998).

Art	Total tørrstoff (%)	Fett (%)	Protein (%)	Laktose (%)	Aske (%)
Human	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
Ku	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Geit	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8

Hovedkomponentene i melk er vann, fett, protein, laktose (melkesukker) og aske (mineraler). Tabell 4.1 viser hvordan disse er fordelt i human-, ku- og geitmelk. Kaseiner utgjør ca 80 % av proteinene og disse finnes i kaseinmiceller, mens de resterende 20 % er myseproteiner. Triglyserider utgjør hoveddelen av melkefettet (98 %). Melkens innhold kan variere noe og påvirkes av art, rase, gener, sesong, laktasjonsfase, næring, fôr, helse, alder og melketidspunkt (Fox & McSweeney, 1998). Figur 4.1 viser melkens struktur og gjennomsnittlige komposisjon per 1 kg melk. Som man ser av figuren er melken organisert i kaseinmicelle, fettkule, membran og myse. Myse er den delen av melka som blir tilbake når ostestoffet er tatt ut. Den inneholder det meste av melkens vann, salter, melkesukker, noe fett og myseproteiner.



Figur 4.1: Melkens struktur og gjennomsnittlige komposisjon per 1kg melk (Walstra & Jenness, 1984).

## 4.2 Melkens proteiner

Kasein i melk og ost har stor betydning som næringsbestanddel fordi det inneholder alle aminosyrene som organismen trenger, og er særlig rik på essensielle aminosyrer (Hauge og Ore, 2009).

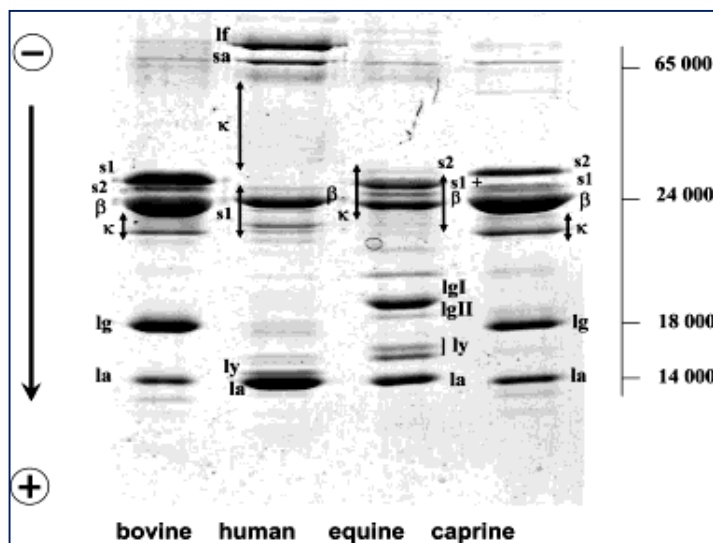
Aminosyrer kan deles inn i essensielle aminosyrer og ikke-essensielle aminosyrer. De ikke-essensielle aminosyrene kan kroppen syntetisere selv, mens de essensielle må man få tilført gjennom kosten. De ikke-essensielle aminosyrene er: alanin (A), arginin (R), asparagin (N), asparaginsyre (D), cystein (C), glutamin (Q), glutaminsyre/glutamat (E), glycin (G), prolin (P), serin (S) og tyrosin (Y). De essensielle aminosyrene er: histidin (H), isoleucin (I), leucin (L), lysin (K), metionin (M), fenylalanin (F), treonin (T), tryptofan (W) og valin (V) (Whitney & Rolfes, 2005).

Kumelk (bovin) inneholder ca 3,5 % protein, og geitmelk (caprin) inneholder ca 2,9 % protein. Melkeproteiners naturlige funksjon er å dekke næringsbehovet til ungdyr slik at de får i seg essensielle aminosyrer for utvikling av muskler og andre proteinholdige vev, biologiske aktive peptider, immunoglobuliner, vitamin- og metallbindende proteiner og proteinhormoner. Proteininnholdet i melka er forskjellig fra art til art da det reflekterer næringsbehovet til ungen. Melkeproteiner kan deles i to hovedgrupper: Kaseiner og myseproteiner. Det er også noen mindre proteiner i cellemembranen og noen iboende enzymer i melka. I bovin og caprin melk er ca 80 % av proteinene kaseiner og 20 % er myseproteiner. Kaseiner er delt inn i  $\beta$ -kasein,  $\alpha_{s1}$ -kasein,  $\alpha_{s2}$ -kasein og  $\kappa$ -kasein og opptre i kaseinmiceller. Myseproteiner befinner seg i mysa og består av  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -lg),  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -la), serum albumin, immunoglobuliner (IgA, IgG og IgM), proteose peptoner og laktoferrin (Fox & McSweeney, 1998). Tabell 4.2 viser en sammenligning av de relative mengdene og molekylvekt til kaseiner og myseproteiner i bovin, human, equin og caprin melk. Bovin melk inneholder 27,2 g kasein/liter og 4,5 g myseprotein/liter. Caprin melk inneholder 19,8 - 26,8 g kasein/liter og 3,3 g myseprotein/liter. Kasein har en molekylvekt (MW) på ca 19 - 25 kDa, mens myseproteinene  $\beta$ -lg og  $\alpha$ -la er mindre og har lavere molekylvekt (Miranda *et al.*, 2004).

**Tabell 4.2: Sammenligning av molekylvekt og de relative mengdene av kaseiner og myseproteiner i bovin, human, equin og caprin melk (Miranda *et al.*, 2004).**

	Bovine		Human		Equine		Caprine	
	g/L	$M_r$ (Da)	g/L	$M_r$ (Da)	g/L	$M_r$ (Da)	g/L	$M_r$ (Da)
$\alpha_{S1}$ -casein	10.0	23 623	0.8	20 100	2.5	21 160 to 24 100	0 to 7.0	22 736
$\alpha_{S2}$ -casein	3.7	25 240	Unknown		0.2	25 200 to 26 208	4.2	24 720
$\beta$ -casein	10.0	24 000	4.0	23 858	11.0	24 810 to 25 880	11.0	23 341
$\kappa$ -casein	3.5	19 000	1.0	35 000	0.25	25 300	4.6	19 146
$\alpha$ -lactalbumin	1.2	14 200	1.6	14 079	3.3	14 227	1.2	14 194
$\beta$ -lactoglobulin	3.3	18 281	Unknown		3.0	18 502	2.1	18 191
lysozyme C	trace	14 485	0.5	14 700	1.1	14 652	trace	14 433
Caseins (C)	27.2		5.8		14.0		19.8 to 26.8	
Major whey proteins (W)	4.5		2.1		7.4		3.3	
C/W	6.0		2.8		1.9		6.0 to 7.9	

Figur 4.2 viser hvordan bovine, humane, equine og caprine melkeproteiner fordeles etter størrelse ved SDS-PAGE. Man kan se av figuren at elektroforesemønsteret for bovine- og caprine melkeproteiner er ganske likt, mens de humane- og equine melkeproteinene skiller seg fra disse og fra hverandre. Fra katoden til anoden fordeler de bovine proteinene seg i rekkefølgen  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\beta$ -kasein,  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -lg og  $\alpha$ -la. I caprine proteiner fordeles de i rekkefølgen  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\beta$ -kasein,  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -lg og  $\alpha$ -la (Miranda *et al.*, 2004). Laktoferrin og serum albumin er ikke avmerket men befinner seg over kaseinene i gelen.



**Figur 4.2: SDS-PAGE av bovine, humane, equine og caprine melkeprøver (Miranda *et al.*, 2004).** la =  $\alpha$ -lactalbumin; ly = lysozyme C; lg =  $\beta$ -lactoglobulin (lgI og lgII for equine milk); k =  $\kappa$ -kasein; b =  $\beta$ -kasein; s1 =  $\alpha_{S1}$ -kasein; s2 =  $\alpha_{S2}$ -kasein; sa = serum albumin; lf = laktoferrin. Vertikale piler definerer migrasjonsområde der korresponderende proteiners vandring enten opptrer som overliggende atskilte band eller er mere "smørt" utover ( $\kappa$ -kasein).

#### 4.2.1 Myseproteiner

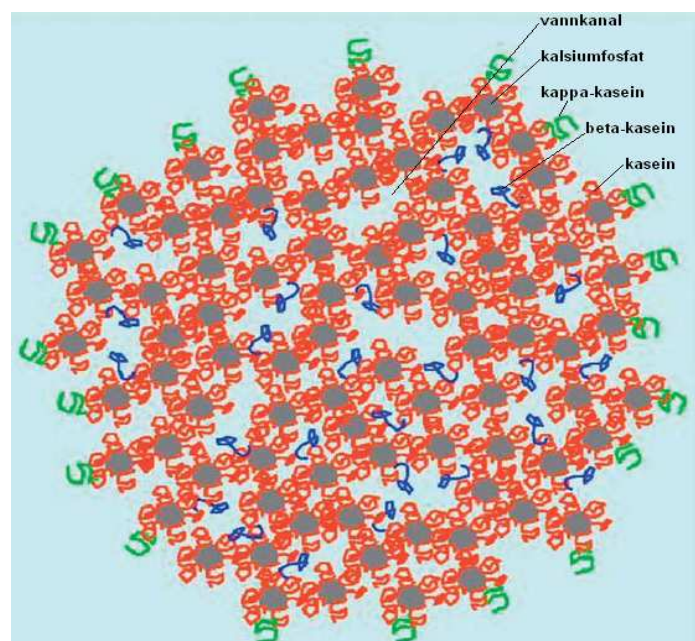
Myseproteiner ( $\beta$ -lg,  $\alpha$ -la, serum albumin, IgA, IgG og IgM, proteose peptoner og laktoferrin) er globulære, ikke amfile proteiner. De foreligger enkeltvis eller som dimere, har ulik struktur, men generelt for alle er at de inneholder cystein. Cystein

sørger for at proteinene kveiles opp ved hjelp av disulfidbindinger (S-S broer). Myseproteiner har god løselighet ved alle pH, men denatureres ved varmebehandling over 75 - 80 °C.  $\beta$ -laktoglobulin utgjør 50 % av totalt myseprotein i kumelk. Aminosyresekvensen består av 162 komponenter og inneholder en stor andel svovelrike aminosyrer (Fox & McSweeney, 1998).

#### 4.2.2 Kasein

Kaseiner er fosfoproteiner som opptrer i kaseinmiceller. De er delt inn i  $\beta$ -kasein,  $\alpha_{s1}$ -kasein,  $\alpha_{s2}$ -kasein og  $\kappa$ -kasein. I bovin melk finnes  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - og  $\kappa$ -kasein henholdsvis i forholdstallene 4: 1: 3,5: 1,5. Kaseinene er syntetisert i vesikler i de sekretoriske cellene i melkekjertlene til pattedyr. Kaseinmiceller er stabile, svært hydrerte, polydisperse kolloidale partikler som hovedsakelig består av en blanding av kaseiner og uorganisk kalsiumfosfat. Kaseinmiceller består av mange molekyler (typisk 20 000 proteinmolekyler) og har en diameter på ca 80 - 400 nm med et gjennomsnitt på ca 200 nm. Micellen består av aggregater av  $\alpha_s$ - og  $\beta$ -kasein fraksjoner med kalsiumfosfat og overflaten er stabilisert ved hjelp av  $\kappa$ -kasein. Micellene inneholder også betydelige mengder vann (3 - 4 g H<sub>2</sub>O/g protein) som er en viktig faktor for å definere den interne struktur. Størrelsen på kaseinmicellen er avhengig av mengden  $\kappa$ -kasein —laget som stabiliserer utsiden av micellen. Figur 4.3 viser Dalgleish (2012) sin kaseinmicelle-modell, en av de nyeste foreslåtte strukturene for hvordan

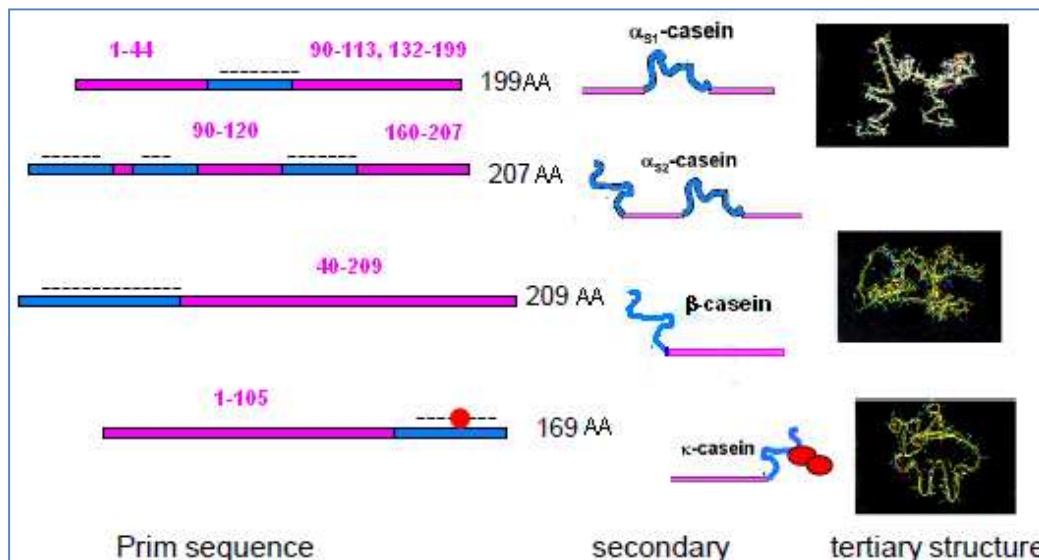
kaseinmicellen er oppbygd. Kalsiumfosfat (grå) er inkorporert med tilfestede kaseiner (rød),  $\kappa$ -kasein (grønn) med den glykoliserte halen som vender ut er lokalisert på overflaten og de hydrofob-festede mobile  $\beta$ -kasein (blå) befinner seg inni micellen og vender ut mot vannkanalene (turkis) som går gjennom micellen (Dalgleish, 2012).



**Figur 4.3: Kaseinmicelle.** På figuren ser man  $\kappa$ -kasein (grønn),  $\beta$ -kasein (blå) og kalsiumfosfat (grå) med tilfestede kaseiner (rød) og vannkanaler (turkis) (Dalgleish, 2010).

Kaseiner er varmestabile og tåler høy varmebehandling (100 °C i 24 timer) uten å koagulere. Chymosin og andre proteinaser (løpe) utfører enzymatisk koaguleringen av melkeproteiner, hvor kaseinmiceller blir destabilisert (nærmere beskrevet i kap 4.4.1). Kaseiner feller ut ved isoelektrisk punkt (pI) pH 4,6 hvor proteinet har nøytral ladning. Over pH 4,6 er proteinene negativt ladet og under pH 4,6 er proteinene positivt ladet. Sentrifugering og ultrafiltrering vil også felle ut kaseinene (Fox & McSweeney, 1998).

Figur 4.4 viser primær-, sekundær- og tertiærstruktur til de 4 kaseinene  $\alpha_{s1}$ -kasein,  $\alpha_{s2}$ -kasein,  $\beta$ -kasein og  $\kappa$ -kasein. Aminosyresammensetningen er viktig for kaseinenes egenskaper. Kaseiner er amfifile proteiner, det vil si de har lengre domener med hydrofile og hydrofobe områder.  $\alpha_{s2}$ -kasein er mest ladet, hydrofilt, av kaseinene på grunn av at det har flest serinofosfat-grupper.  $\beta$ -kasein er mest hydrofobt fordi den har en lang hale med hydrofobe syrer.  $\kappa$ -kasein er også meget hydrofilt pga den glykolyserte karbohydrathalen (Fox & McSweeney, 1998).



Figur 4.4: Primær-, sekundær- og tertiær struktur til de  $\alpha_{s1}$ -kasein,  $\alpha_{s2}$ -kasein,  $\beta$ -kasein og  $\kappa$ -kasein. Figuren viser hydrofobe områder (rosa), hydrofile områder (blå) og  $\kappa$ -kaseins karbohydratkjede (rød) (Vegarud 2012, endret av Lian 2012).

**Tabell 4.3: Egenskaper til noen melkeproteiner** (Walstra og Jenness, 1984).

	$\alpha$ S1-kasein B	$\alpha$ S2-kasein A	$\beta$ -kasein A <sup>2</sup>	$\kappa$ -kasein B	$\beta$ -lg-B	$\alpha$ -la B
<b>Amniosyrer</b>	199	207	209	169	162	123
<b>Prolin</b>	17	10	35	20	8	2
<b>Cystein</b>	0	2	0	2	5	8
<b>Antall disulfidbroer</b>	0	0	0	0	2	4
<b>Serinfosfat</b>	8	11	5	1	0	0

Tabell 4.3 viser noen egenskaper til melkeproteiner i bovin, human, equin og caprin melk. Som vi ser av tabell 4.3 er det noen viktige forskjeller i aminosyre-sammensetningen mellom kaseiner og myseproteiner. Kaseinene har lengre aminosyrekjeder enn myseproteinene og inneholder henholdsvis:  $\alpha$ S1-kasein; 199 aminosyrer (aa),  $\alpha$ S2-kasein; 207 aa,  $\beta$ -kasein; 209 aa,  $\kappa$ -kasein; 169 aa,  $\beta$ -lg; 162 aa,  $\alpha$ -la; 123 aa. Serin som serinfosfat finnes bare i kaseiner. Serinfosfat forårsaker negativ ladning og binder kalsium og sink, det øker løseligheten til kaseiner og bidrar til varmemestabilitet.  $\alpha$ S-kaseiner er de som inneholder mest serinfosfat og binder mest kalsium i micellen. Prolin er det mest av i kaseiner, det er en hydrofob aminosyre som er med på å endre kjedestrukturen ved å forhindre proteinet fra å kveile seg opp i  $\alpha$ -helikser og  $\beta$ -blad.  $\beta$ -kasein er kaseinet som inneholder mest prolin. Cystein er det hovedsakelig i myseproteiner hvor cystein danner disulfidbroer som kveiler opp myseproteinene.  $\kappa$ -kasein har en hydrofob N-ende og en svært hydrofil glykosylert C-ende. Det er det eneste av kaseinene som er glykosylert og har 0 - 4 oligosakkarider per  $\kappa$ -kasein. Kaseiner, spesielt  $\alpha$ S2-kasein, er rikt på den essensielle aminosyren lysin. På grunn av det høye innholdet av lysin er kaseiner og melkeprodukter spesielt utsatt for maillardreaksjon. Alle kaseinene har høyt innhold (35 - 45 %) av apolare aminosyrer (Val, Leu, Phe, Tyr og Pro). Til tross for dette er de relativt løselige på grunn av det høye innholdet av fosfatgrupper, det lave innholdet av svovelholdige aminosyrer og det høye innholdet av karbohydrater i  $\kappa$ -kasein som motvirker virkningen av de apolare aminosyrene (Fox & McSweeney, 1998).



Figur 4.5 viser den fulle aminosyresekvensen for bovine og caprine melkeproteiner hvor prolin (P) og serin(fosfat) (S) er uthevet i blått og rødt.

### Bovine melkeproteiner - Aminosyresekvenser

$\beta$ -kasein:

RELEELNV**P**G**E**IV**S****L****S****S****E****E**SITRINKKIEKFQ**S**EEQQQTEDELQDKIH**P**FAQTQ**S**L**V**Y**P****F****P****G****P****I****P****N****S****L****P****Q****N****I****P****P****L****T****Q****T****P****V****V****V****P****P****F****L**  
**Q****P****E****V****M****G****V****S****K****V****K****E****A****M****A****P****K****H****K****E****M****P****F****P****K****Y****P****V****E****P****F****T****E****S****Q****S****L****T****L****T****D****V****E****N****L****H****L****P****L****P****L****L****Q****S****W****M****H****Q****P****H****Q****P****L****P****T****V****M****F****P****P****Q****S****V****L****S****L****S****Q****S****K****V**  
**L****P****V****P****Q****K****A****V****P****P****Q****R****D****M****P****I****Q****A****F****L****L****Y****Q****E****P****V****L****G****P****V****R****G****P****F****P****I****I****V**

$\alpha_{S1}$ -kasein:

**R****P****K****H****P****I****K****H****Q****G****L****P****Q****E****V****L****N****E****N****L****L****R****F****F****V****A****P****F****P****E****V****F****G****K****E****K****V****N****E****L****S****K****D****I****G****S****E****S****T****E****D****Q****A****M****E****D****I****K****Q****M****E****A****E****S****I****S****S****S****E****E****I****V****P****N****S****V****E****Q****K****H****I****Q****K****E****D****V**  
**P****S****E****R****Y****L****G****Y****L****E****Q****L****L****R****L****K****K****Y****K****V****P****Q****L****E****I****V****P****N****S****A****E****R****L****H****S****M****K****E****G****I****H****A****Q****Q****K****E****P****M****I****G****V****N****Q****E****L****A****Y****F****P****E****L****F****R****Q****F****Y****Q****L****D****A****Y****P****S****G****A****W****Y****V****P****L****G****T**  
**Q****Y****T****D****A****P****S****F****S****D****I****P****N****P****I****G****S****E****N****S****E****K****T****T****M****P****L****W**

$\alpha_{S2}$ -kasein:

**K****N****T****M****E****H****V****S****S****S****E****E****I****S****Q****E****T****Y****K****Q****E****K****N****M****A****I****N****P****S****K****E****N****L****C****S****T****F****C****K****E****V****V****R****N****A****N****E****E****E****Y****S****I****G****S****S****S****E****E****S****A****E****V****A****T****E****E****V****K****I****T****V****D****D****K****H****Y****Q****K****A****L****N****E****I****N**  
**Q****F****Y****Q****K****F****P****Q****Y****L****Q****Y****L****Y****Q****G****P****I****V****L****N****P****W****D****Q****V****K****R****N****A****V****P****I****T****P****T****L****N****R****E****Q****L****S****T****E****E****N****S****K****K****T****V****D****M****E****S****T****E****V****F****T****K****K****T****K****L****T****E****E****E****K****N****R****L****N****F****L****K****K****I****S****Q****R****Y**  
**Q****K****F****A****L****P****Q****Y****L****K****T****V****Y****Q****H****Q****K****A****M****K****P****W****I****Q****P****K****T****K****V****I****P****Y****V****R****Y****L**

$\kappa$ -kasein:

**Q****E****Q****N****Q****E****Q****P****I****R****C****E****K****D****E****R****F****F****S****D****K****I****A****K****Y****I****P****I****Q****Y****V****L****S****R****Y****P****S****Y****G****L****N****Y****Y****Q****Q****K****P****V****A****L****I****N****N****Q****F****L****P****Y****P****Y****A****K****P****A****A****V****R****S****P****A****Q****I****L****Q****W****Q****V****L****S****N****T****V****P****A**  
**K****S****C****Q****A****Q****P****T****T****M****A****R****H****P****H****P****H****L****S****F****M****A****I****P****P****K****N****Q****D****K****T****E****I****P****T****I****N****T****I****A****S****G****E****P****T****S****T****P****T****T****E****A****V****E****S****T****V****A****T****L****E****D****S****P****E****V****I****E****S****P****P****E****I****N****T****V****Q****V****T****S****T****A****V**

$\beta$ -lg:

**L****I****V****T****Q****T****M****K****G****L****D****I****Q****K****V****A****G****T****W****Y****S****L****A****M****A****A****S****D****I****S****L****L****D****A****Q****S****A****P****L****R****V****Y****V****E****E****L****K****P****T****P****E****G****D****L****E****I****L****L****Q****K****W****E****N****G****E****C****A****Q****K****H****I****A****E****K****T****K****I****P****A****V****F****K****I****D****A**  
**L****N****E****N****K****V****L****V****L****D****T****D****Y****K****Y****L****L****F****C****M****E****N****S****A****E****P****E****Q****S****L****A****C****Q****C****L****V****R****T****P****E****V****D****D****E****A****L****E****K****F****D****K****A****L****K****A****L****P****M****H****I****R****L****S****F****N****P****T****Q****L****E****E****Q****C****H****I**

### Caprine melkeproteiner - Aminosyresekvenser

$\beta$ -kasein:

**R****E****Q****E****L****N****V****V****G****E****T****V****E****S****L****S****S****E****E****S****I****T****H****I****N****K****K****I****E****K****F****Q****S****E****E****Q****Q****Q****T****E****D****E****L****Q****D****K****I****H****P****F****A****Q****A****Q****S****L****V****Y****P****F****T****G****P****I****P****N****S****L****P****Q****N****I****L****P****L****T****Q****T****P****V****V****V****P****P****F****L**  
**Q****P****E****I****M****G****V****P****K****V****K****E****T****M****V****P****K****H****K****E****M****P****F****P****K****Y****P****V****E****P****F****T****E****S****Q****S****L****T****L****D****V****E****K****L****H****L****P****L****P****L****V****Q****S****W****M****H****Q****P****P****Q****P****L****S****P****T****V****M****F****P****P****Q****S****V****L****S****L****S****Q****P****K****V****L**  
**P****V****P****Q****K****A****V****P****Q****R****D****M****P****I****Q****A****F****L****L****Y****Q****E****P****V****L****G****P****V****R****G****P****F****P****I****L****V**

$\alpha_{S1}$ -kasein:

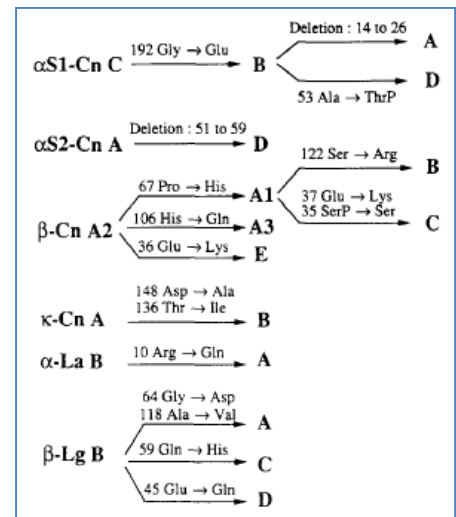
**R****P****K****H****P****I****N****H****R****G****L****S****P****E****V****P****N****E****N****L****L****R****F****V****V****A****P****F****P****E****V****F****R****K****E****N****I****N****E****L****S****K****D****I****G****S****E****S****T****E****D****Q****A****M****E****D****A****K****Q****M****K****A****G****S****S****S****S****E****E****I****V****P****N****S****A****E****Q****K****Y****I****Q****K****E****D**  
**V****P****S****E****R****Y****L****G****Y****L****E****Q****L****L****R****L****K****K****Y****N****V****P****Q****L****E****I****V****P****K****S****A****E****E****Q****L****H****S****M****K****E****G****N****P****A****H****Q****K****Q****P****M****I****A****V****N****Q****E****L****A****Y****F****P****Q****L****F****R****Q****F****Y****Q****L****D****A****Y****P****S****G****A****W****Y****L****P****L**  
**G****T****Q****Y****T****D****A****P****S****F****S****D****I****P****N****P****I****G****S****E****N****S****G****K****T****T****M****P****L****W**

$\alpha_{S2}$ -kasein:

**K****H****K****M****E****H****V****S****S****S****E****E****P****I****N****I****F****Q****E****I****Y****K****Q****E****K****N****M****A****I****H****P****R****K****E****K****L****C****T****T****S****C****E****E****V****V****R****N****A****N****E****E****E****Y****S****I****R****S****S****S****E****E****S****A****E****V****A****P****E****E****I****K****I****T****V****D****D****K****H****Y****Q****K****A****L****N****E****I****N**  
**Q****F****Y****Q****K****F****P****Q****Y****L****Q****Y****L****Y****Q****G****P****I****V****L****N****P****W****D****Q****V****K****R****N****A****G****P****F****T****P****T****N****R****E****Q****L****S****T****E****E****N****S****K****K****T****I****D****M****E****S****T****E****V****F****T****K****K****T****K****L****T****E****E****E****K****N****R****L****N****F****L****K****K****I****S****Q****Y**  
**Q****K****F****A****W****P****Q****Y****L****K****T****V****D****Q****H****Q****K****A****M****K****P****W****T****Q****P****K****T****N****A****I****P****Y****V****R****Y****L**

**Figur 4.5: Aminosyresekvens for bovine melkeproteiner ( $\beta$ -kasein,  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -lg) og caprine melkeproteiner ( $\beta$ -kasein,  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein) (UniProt, 2012). Prolin er markert i blått og serin(fosfat) er markert i rødt.**

Et kasein kan finnes i flere genetiske proteinvarianter. Polymorfismer i melkeproteiners gener kan gi opphav til enten aminosyresubstitusjoner eller innsetting/sletting av peptidsekvenser som følge av mutasjoner som oppstår i nukleotidsekvensen av transkripsjonsenheter som koder melkeproteiner. Noen spesifikke genetiske varianter er rase-spesifikke. Tekniske egenskaper, som ysteegenskaper, er sett i sammenheng med genetiske proteinvarianter av kasein. Bovine kaseiner er funnet i flere genetiske varianter (se figur 4.6) (Martin og Grosclaude, 1993). Genetiske varianter av kaseinene som er funnet er hhv:  $\alpha_{S1}$ -kasein; A, B, C, D, E, F, G og H,  $\alpha_{S2}$ -kasein; A, B, C og D,  $\beta$ -kasein; A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B, C, D, E, F, G, H<sup>1</sup>, H<sup>2</sup> og I,  $\kappa$ -kasein; A, B, C, D, E, F<sup>1</sup>, F<sup>2</sup>, G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, H, I og J.  $\beta$ -lg er funnet i de genetiske variantene A, B, C, D, E, F, G, H, I og J (Farrell *et al.*, 2004).

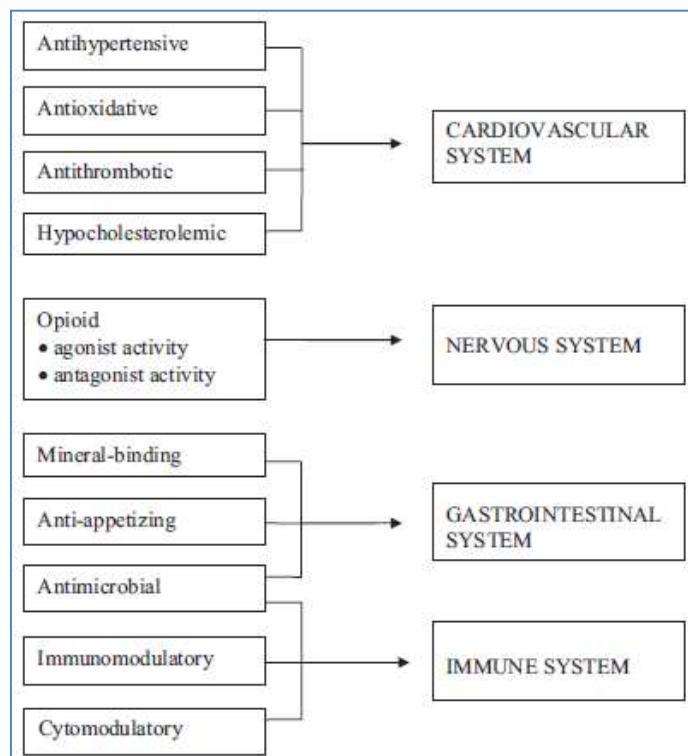


**Figur 4.6: Genetisk polymorfisme i bovine melkeproteiner** (Martin og Grosclaude, 1993).

Det har blitt demonstrert ved genetiske studier at en omfattende polymorfisme av geitmelk er under styring av minst sju autosomale alleler, kalt  $\alpha_{S1}$ -kasein A, B, C, D, E, F og O. A, B og C-alleler er assosiert med et høyt innhold (3,6 g / l) av  $\alpha_{S1}$ -kasein i melk, E allel med et medium innhold (1,6 g / l), mens D og F-alleler er assosiert med lavt innhold (0,6 g / l). O er sannsynligvis en null allel. De vanligste alleler i franske flokker er  $\alpha_{S1}$ -kasein variant E og F som sammen utgjør mellom 75 - 84 % av de totale  $\alpha_{S1}$ -kasein alleler avhengig av rasen. Undersøkelser indikerer at genetisk polymorfisme i  $\alpha_{S1}$ -kasein har ingen effekt på utbytte av melk. Variant A har høyere proteininnhold, mens E og F variantene har et høyere fettinnhold. De fysiske-kjemiske og teknologiske egenskaper viser at variant A har mindre miceller og gir et betydelig høyere ost-utbytte. Videre viser variant A en økning i ostemassens fasthet, noe som skyldes forskjeller i proteinstrukturen (Martin og Grosclaude, 1993).

### 4.3 Melkeproteiners biologiske funksjoner

Melkeproteiner har et bredt spekter av ernæringsmessige, funksjonelle og biologiske aktiviteter. Flere av melkeproteinene og deres peptider kan ha biologiske egenskaper som gjør at komponentene er potensielle ingredienser i helsefremmende mat. Studier har identifisert et stort antall av peptidsekvenser med spesifikk biologisk aktivitet (bioaktivitet). Disse peptidene er som oftest inaktive i det intakte proteinet og kan bli frigjort ved fordøyelse, fermentering med proteolytiske starterkulturer eller ved hydrolyse med proteolytiske enzymer. Disse bioaktive peptidene som er generert fra melkeproteiner har seg å ha ulike aktiviteter som påvirker fordøyelses-, hjertekar-, immun- og nervesystemet (se figur 4.7) (Korhonen og Pihlanto, 2006). Definisjonen på bioaktive peptider er spesifikke proteinfragmenter som har en positiv innvirkning på kroppens funksjoner eller tilstand, og som kan fremme helsen (Haque og Chand, 2008).



**Fig 4.7: Bioaktive proteiner og peptiders funksjon** (Korhonen og Pihlanto, 2006).

Eksempler på biologisk aktivitet hos kaseiner og  $\beta$ -lg er blodtrykkssenkning (ACE inhibering) mineralbinding, opioide egenskaper og immunomodulerende effekter (Korhonen og Pihlanto, 2006; Silva & Malcata, 2005).

**ACE inhiberende peptider er blodtrykkssenkende** peptider. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) har vært assosiert med renin-angiotensin system, som regulerer blodtrykket. Hemming av dette enzymet kan utøve en blodtrykkssenkende effekt. De best kjente ACE inhiberende peptider er IPP og VPP (Korhonen og Pihlanto, 2006). Disse er funnet i aminosyresekvensen til bovint  $\beta$ -kasein (f(74-76) IPP og f(84-86) VPP) og  $\kappa$ -kasein (f(108-110) IPP) (Jäkälä & Vapaatalo, 2010).

**Mineralbindende peptider**, også kalt kasein fosfopeptider (CPP), kan binde og løse mineraler og vitaminer (vit D, jern, sink og kalsium) og er derfor ansett som fysiologisk gunstige i forebygging av osteoporose, tannråte, høyt blodtrykk og anemi (Korhonen og Pihlanto, 2006; Silva & Malcata, 2005). De har også vist antimikrobiell aktivitet mot ulike gram-positive og gram-negative bakterier, f. eks Escherichia, Helicobacter, Listeria, Salmonella og Staphylococcus samt mot gjær og sopp (Korhonen og Pihlanto, 2006).

**Opioide peptider** er opioid reseptor ligander med agonistiske eller antagonistisk aktivitet. Opioide reseptorer er lokalisert i nervesystemet, immunsystemet, samt i mage-tarmkanalen hos pattedyr. Oralt administrerte opioide peptider kan modulere absorpsjonsprosesser i tarmen og påvirke gastrointestinal funksjon på to måter: i) ved å påvirke glatt muskulatur, noe som reduserer transittid og ii) anti-sekretoriske egenskaper ved å påvirke tarmens transport av elektrolytter (Korhonen og Pihlanto, 2006).

**Immunomodulerende/stimulerende peptider** kan påvirke immunologiske aktiviteter. Peptider frigjort i fermenterte melkeprodukter har vist seg å modulere proliferasjon av humane lymfocytter, nedregulere produksjonen av visse cytokiner og å stimulere fagocytterende aktiviteter til makrofager. Man tror også de kan virke mot mikroorganismer (*Klebsiella pneumoniae*), og lindring av allergiske reaksjoner hos atopiske mennesker og ved å forbedre slimhinnenes immunitet i mage-tarmkanalen. (Korhonen og Pihlanto, 2006).

Tabell 4.4 - 4.8 viser en oversikt over noen av de kjente bioaktive peptider derivert fra  $\beta$ -kasein,  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -lg.

**Tabell 4.4: Kjente bioaktive peptider derivert fra  $\beta$ -kasein.**

Aminosyresekvens	Fra	Til	Bioaktiv egenskap	Referanse
RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	1	25	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
RELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK	1	28	mineralbindene peptid, immunomodulerende	Silva og Malcata, 2005; Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK	2	28	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
	6	14	ACE inhiberende	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
	8	16	mineralbindene peptid	Korhonen og Pihlanto, 2006
	41	44	opioid agonist	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
	47	52	ACE inhiberende	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
	58	72	ACE inhiberende	Korhonen og Pihlanto, 2006
	58	77	mineralbindene peptid	Korhonen og Pihlanto, 2006
VYP	59	61	ACE inhiberende	Haque og Chand, 2008
VYPPFG	59	64	ACE inhiberende	Haque og Chand, 2008
	60	66	opioid	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
	60	68	ACE inhiberende, immunostimulerende	Korhonen og Pihlanto, 2006; Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
	60	70	ACE inhiberende, immunostimulerende, opioid agonist	Haque og Chand, 2008; Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
PGPIP	63	68	immunomodulerende	Silva og Malcata, 2005
	73	90	ACE inhiberende	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
IPP	74	76	blodtrykksenkende, ACE inhiberende	Nakamura <i>et al.</i> , 1995; Korhonen og Pihlanto, 2006
VPP	84	86	blodtrykksenkende, ACE inhiberende	Nakamura <i>et al.</i> , 1995; Korhonen og Pihlanto, 2006
EMPPFK	108	113	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
LHLPLP	133	138	ACE inhiberende	Jäkälä og Vapaatalo, 2010
	140	143	ACE inhiberende	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
LPP	151	153	ACE inhiberende	Jäkälä og Vapaatalo, 2010
	169	183	ACE inhiberende	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
AVYPYQR	177	183	blodtrykksenkende, ACE inhiberende	Silva og Malcata, 2005; Haque og Chand, 2008
LLY	191	193	Immunomodulerende	Silva og Malcata, 2005
	191	202	ACE inhiberende, immunostimulerende	Schmelzer <i>et al.</i> , 2007
YQEPVL	193	198	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
YQEPVLGVRGPFPI	193	202	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
YQEPVLGVRGPFPIIV	193	209	antimikrobiell, Immunomodulerende	Silva og Malcata, 2005
GPVRGPFPIIV	199	204	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005

**Tabell 4.5: Kjente bioaktive peptider derivert fra  $\alpha_{S1}$ -kasein.**

Aminosyresekvens	Fra	Til	Bioaktiv egenskap	Referanse
	1	6	ACE inhiberende	Korhonen og Pihlanto, 2006
	1	7	ACE inhiberende	Korhonen og Pihlanto, 2006
	1	9	ACE inhiberende	Korhonen og Pihlanto, 2006
RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF	1	23	immunomodulerende	Silva og Malcata, 2005
RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF (Isradicin)	1	23	antimikrobiell, immunomodulerende	Silva og Malcata, 2005; McCanna <i>et al.</i> , 2006; Haque og Chand, 2008; Clare og Swaigood, 2000
FF	23	24	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
FFVAP	23	27	ACE inhiberende, blodtrykksenkende	Haque og Chand, 2008; Silva og Malcata, 2005
FFVAPFPEVFGK	23	33	ACE inhiberende	Haque og Chand, 2008
DIGSESTEDQAMEDIK	43	58	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
GSESTEDQAME	45	55	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
QMEAESISSSEIVPNSVEQK	59	79	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
SSSEIVPN	66	74	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
RYLGY	90	94	ACE inhiberende	Jäkälä og Vapaatalo, 2010
RYLGYL	90	95	opioid	Silva og Malcata, 2005
RYLGYLE	90	96	opioid	Silva og Malcata, 2005
YLGYL	91	95	opioid	Silva og Malcata, 2005
Navn: Cp1	99	109	antimikrobiell	McCanna <i>et al.</i> , 2006; Haque og Chand, 2008
KKYKVPQ	102	109	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
VPQLEIVPNSAEER	106	119	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
LAYFYP	142	147	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
AYFYPEL	143	149	ACE inhiberende	Jäkälä og Vapaatalo, 2010
DAYPSGAW	157	164	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
TTMPLW	194	199	ACE inhiberende, blodtrykksenkende, immunomodulerende	Haque og Chand, 2008; Silva og Malcata, 2005

**Tabell 4.6: Kjente bioaktive peptider derivert fra  $\alpha_2$ -kasein.**

Aminosyresekvens	Fra	Til	Bioaktiv egenskap	Referanse
KNTMEHVSSSEESIISQETYKQEKNMMAINPSK	1	32	immunomodulerende	Silva og Malcata, 2005
NTMEHVSSSEESIISQETYK	2	21	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
NANEEEYSIGSSSEESAIVATEEVK	46	70	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
GSSSEESAIVATEEVKITVDD	55	75	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
YQKFPQY	89	95	ACE inhiberende	Jäkälä og Vapaatalo, 2010
EQLSTSEENSK	126	136	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
TVDMESTEVFTK	138	149	mineralbindene peptid	Silva og Malcata, 2005
	150	188	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008
LKKISQRYQKFPALPQY	164	179	antimikrobiell	Silva og Malcata, 2005; Haque og Chand, 2008
Cp2	164	207	antimikrobiell	McCanna <i>et al.</i> , 2006; Haque og Chand, 2008
KKISQRYQKFPALPQYLYKTVYQHQAAMKMPWIQPKTKVIPY (Casocidin)	165	203	antimikrobiell	Silva og Malcata, 2005; Clare og Swaigood, 2000
Cp2	173	207	antimikrobiell	McCanna <i>et al.</i> , 2006
FALPQY	174	179	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
FALPQYLK	174	181	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
	175	207	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008
	181	207	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008
VYQHQAAMKMPWIQPKTKVIPYVRYL	183	207	antimikrobiell	Silva og Malcata, 2005; Haque og Chand, 2008
AMKPW	189	193	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
AMKPWIQPK	189	197	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
MKPWIQPK	190	197	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005
TKVIP	198	202	blodtrykksenkende	Silva og Malcata, 2005

**Tabell 4.7: Kjente bioaktive peptider derivert fra  $\kappa$ -kasein.**

Aminosyresekvens	Fra	Til	Bioaktiv egenskap	Referanse
	18	24	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008
YIPIQYVLSR	25	34	opioid	Silva og Malcata, 2005
	30	32	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008
YPSYGLN	35	41	opioid	Silva og Malcata, 2005
YPYY	58	61	opioid	Silva og Malcata, 2005
	106	109	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008
IPP	108	110	blodtrykksenkende	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
	139	146	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008
EINTVQV	156	164	opioid	Silva og Malcata, 2005

**Tabell 4.8: Kjente bioaktive peptider derivert fra  $\beta$ -laktoglobulin.**

Aminosyresekvens	Fra	Til	Bioaktiv egenskap	Referanse
	15	20	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008; Szwajkowska, 2011
LAMA	22	25	ACE inhiberende, immunomodulerende	Haque og Chand, 2008
	25	40	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008; Szwajkowska, 2011
IPA	78	80	ACE inhiberende, immunomodulerende	Haque og Chand, 2008
	78	83	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008; Szwajkowska, 2011
VFK	81	83	ACE inhiberende, immunomodulerende	Haque og Chand, 2008
	92	100	antimikrobiell	Haque og Chand, 2008; Szwajkowska 2011
ALPMH	142	146	ACE inhiberende, immunomodulerende	Haque og Chand, 2008

## 4.4 Ost — Ysting av fast og halvfast ost

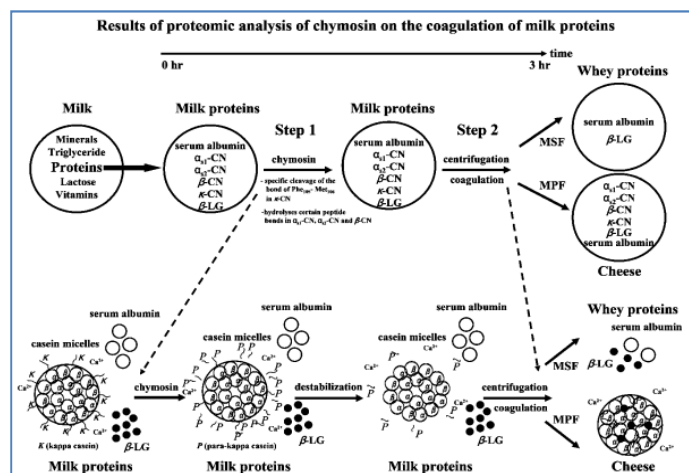
Ost er et produkt som er laget av melk, løpe og melkesyrebakterier.

Ysting av fast og halvfast ost innebærer en rekke viktige stadier. Melk blir forbehandlet, muligens premodnet etter tilsetning av en bakteriekultur som passer til typen ost, og blandet med løpe. Enzymene i løpe (chymosin og pepsin) får melken til å koagulere til en solid gel kjent som koaglum. Dette blir kuttet med spesielle skjæreverktøy til små terninger av ønsket størrelse — i første omgang for å legge til rette for utskilling av myse. Under resten av ysteprosessen øker bakterieantallet og melkesyre dannes. Ostemasse utsettes for mekanisk behandling ved omrøring, mens den samtidig blir oppvarmet. Den kombinerte effekten av disse tre handlingene resulterer i synerese, dvs. separasjon av myse fra ostemassen. Den ferdige ostemassen plasseres i osteformer og blir så presset. Til slutt blir osten lagret og pakket. Behandling under ysting, pressing og lagringstiden bestemmer egenskapene til osten (Bylund, 1995).

### 4.4.1 Løpefelling

I kaseinmiceller er  $\kappa$ -kasein konsentrert på overflaten av micellen og kolloidalt kalsiumfosfat knytter sammen kaseinene inni micellen. Under ysteprosessen er et viktig skritt den enzymatiske koaguleringen av melkeproteiner, hvor kaseinmiceller blir enzymatisk destabilisert, dette skjer vanligvis ved bruk av enzymet chymosin. Reaksjonen skjer i to trinn (se figur 4.8), hvorav den første er den enzymatiske hydrolyse av kaseiner. Chymosin hydrolyserer  $\kappa$ -kasein ved den spesifikke spaltning av Phe105-Met106 båndet, slik at det dannes to peptider som reaksjonsprodukter. Dette resulterer i destabilisering av kaseinmiceller (mister sin negative ladning).

Chymosin hydrolyserer også visse peptidbindinger i  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S2}$ -kasein og  $\beta$ -kasein. Det andre steget innebærer aggregering av kaseinmiceller som blir induisert av kalsiumioner ( $\text{Ca}^{2+}$ ), dette oppstår etter at en tilstrekkelig mengde av  $\kappa$ -kasein har blitt hydrolysert. Myse skilles da ut fra den koagulerte ostemassen (Hsieh og Pan, 2012).



Figur 4.8: Koagulering av melkeprotein ved hjelp av chymosin (Hsieh og Pan, 2012).

#### 4.5 Ost brukt i forsøket

Det ble bestemt at følgende 6 oster skulle benyttets i forsøket: Norvegia lagret 3, 9 og 15 måneder (mnd), samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (se figur 4.9).

**Norvegia lagret 3 mnd:** Osten er lagret i ca tre måneder. Den er Norges mest spiste ost og har en mild og rund smak. Osten består av 27 % fett og 27 % protein (Tine.no, 2012a).

**Norvegia vellagret 9 mnd og 15 mnd:** Norvegia vellagret 9 mnd er lagret i minimum ni måneder og er mild og rund i smaken, med en fyldig, litt syrlig smak. Norvegia ekstra vellagret er lagret i minimum 15 måneder og har en betydelig fyldigere smak enn Norvegia lagret 3 og 9 mnd, men er likevel ikke skarp i smaken. Ostene produseres som tradisjonelle ostehjul med en sort skorpe. De består av 28 % fett og 27 % protein (Tine.no, 2012b; Tine.no, 2012d).

**Norvegia lettere:** Osten har en mild smak, som Norvegia lagret 3 mnd, den er lettere med kun 16 % fett og 32 % protein (Tine.no, 2012c).

**Norvegia økologisk:** Osten er laget med økologisk melk fra kyr som kun får økologisk produsert fôr som er produsert uten bruk av kunstgjødsel og sprøytemidler. Kuene får mer beite og høy, mindre kraftfôr, og de får mer mosjon og frisk luft. Som Norvegia 3 mnd inneholder den 27 % fett og 27 % protein (Tine.no, 2012e).

**Snøfrisk hvitost:** Snøfrisk hvitost er laget av geitmelk. Det er en hvit skorpeost med små runde hull. Smaken er ren, svakt syrlig, fyldig og artstypisk. Den består av 30 % fett og 24 % protein (Tine.no, 2012g).



Figur 4.9: Ost brukt i forsøket (Tine.no, 2012f).



Tabell 4.9 viser næringsinnhold i Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd, Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost. Man ser av tabellen at protein- og fettinnhold i Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd og Norvegia økologisk er nesten helt likt (27 % protein, 27 - 28 % fett), mens Norvegia lettere har høyere innhold av protein (32 %) og lavere innhold av fett (16 %): Snøfrisk hvitost har det høyeste fett-innholdet (30 %) og lavere innhold av protein (24 %).

**Tabell 4.9: Næringsinnhold i Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd, Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (Tine.no, 2012).**

	Norvegia lagret 3 mnd	Norvegia vellagret 9 mnd	Norvegia vellagret 15 mnd	Norvegia lettere	Norvegia økologisk	Snøfrisk hvitost
Ingredienser	Pasteurisert melk, salt, løpe, E 509 og E 251	Pasteurisert melk, salt og løpe	Pasteurisert melk, salt og løpe	Pasteurisert melk, salt, løpe og E 509	Pasteurisert økologisk melk, salt og løpe	Pasteurisert geitmelk, salt, mikrobiell løpe, E 509, E 251, E 202
Energi	1458 kJ	1495 kJ	1495 kJ	1136 kJ	1458 kJ	1518 kJ
Protein	27 g	27 g	27 g	32 g	27 g	24 g
Fett	27 g	28 g	28 g	16 g	27 g	30 g
Karbohydrat	0 g	0 g	0 g	0 g	0 g	0 g
Vitamin A	300 µg	310 µg	310 µg	160 µg	290 µg	320 µg
Riboflavin	0,32 mg	0,3 mg	0,3 mg	0,3 mg	0,29 mg	0,21g
Vitamin B12	1,7 µg	-	-	1,8 µg	2,6 µg	-
Kalsium	800 mg	830 mg	830 mg	830 mg	800 mg	950 mg
Fosfor	550 mg	600 mg	600 mg	560 mg	550 mg	690 mg
Sink	4,0 mg	4,1 mg	4,1 mg	3,9 mg	4,0 mg	4,4 mg
Jod	50 µg	-	-	50 µg	50 µg	110 µg

## 4.6 Det humane fordøyelsessystemet og deres enzymer

Fordøyelsessystemet har to anatomiske inndelinger, fordøyelseskanalen og de tilhørende organer (figur 4.10). Fordøyelseskanalen er et 9 meter langt rør som strekker seg fra munn til anus. Den inkluderer munnhulen, svelget, spiserøret, magesekken, tynntarmen og tykktarmen. Magen og tarmene utgjør den gastrointestinale-kanalen. De tilhørende organene er tennene, tunge, spyttkjertler, lever, galleblære og bukspyttkjertel. Fordøyelsessystemet behandler mat i fire stadier: Svelging, inntak av mat; fordøyelse, nedbrytning av mat; absorpsjon, opptak av næringsstoffer; defekasjon; eliminering av ufordøyd rester (Saladin, 2003).

Fordøyelsen kan deles i mekanisk og kjemisk fordøyelse. Den mekaniske fordøyelsen er den fysiske nedbrytningen av mat i mindre deler. Dette starter med at tennene tygger maten og fortsetter videre med "churning" sammentrekninger i mage og tynntarmen. Den mekaniske fordøyelsen gjør at en større overflate av mat blir eksponert for fordøyelsesenzymer. Kjemisk fordøyelse er en serie hydrolyse-reaksjoner som bryter makromolekyler ned til sine monomere. Dette skjer ved hjelp av fordøyelsesenzymer. Bevegeligheten og sekresjon i fordøyelseskanalen styres av nerver, hormoner, og parakrine mekanismer (Saladin, 2003).

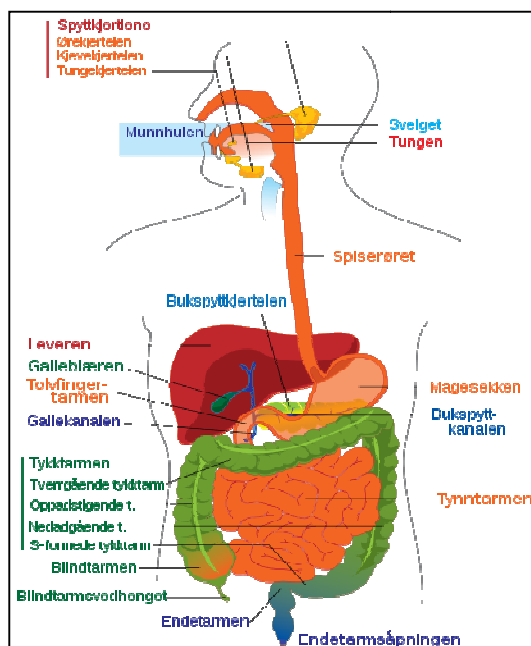
### 4.6.1 Munn, svelg og spiserør

Munnens funksjon er inntak av mat, smak, tygging, kjemisk fordøyelse, svelging, tale, og respirasjon. Spytt blir produsert av spyttkjertler og har en pH på 6.8 - 7.0. Spytt fukter munnen, fordøyer noe stivelse og fett, renser tennene, hemmer bakterievekst, fukter mat og binder partiklene sammen. Det er en løsning av 97 - 99,5 % vann og følgende løsninger: spytt amylase, enzym som starter fordøyelse av stivelse; lingual lipase, enzym som fordøyer fett når det aktiveres av magesyre; slim, binder og smører maten; lysozym, bakteriedrepende enzym; immunoglobulin A, antistoff som hemmer bakterievekst; elektrolytter (Na, K, Cl, P og bikarbonationer). Svelgets muskler tvinger maten nedover i spiserøret ved svelging. Spiserøret er 25 - 30 cm langt og fører mat nedover mot magesekken ved hjelp av peristaltiske muskelbevegelser (Saladin, 2003).

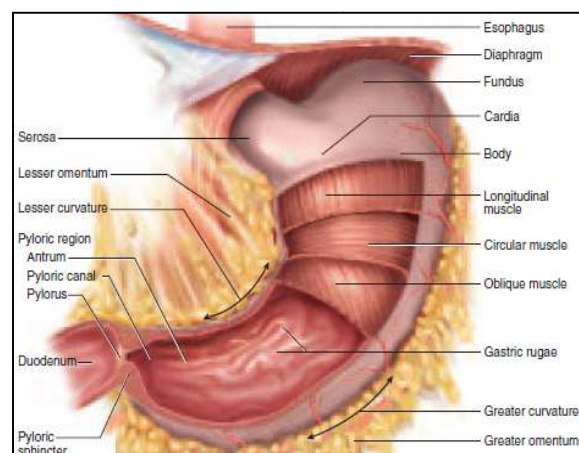
#### 4.6.2 Magesekk (ventrikkel)

Magesekken er en muskulær sekk i øvre venstre abdomen hulrom og dens primære funksjon er oppbevaring av mat. Den har et internt volum på ca 50 ml når den er tom og 1 - 1,5 l etter et typisk måltid. I celleveggene til magesekken er det små celler/kjertler som skiller ut 2 - 3 l magesyre hver dag bestående av saltsyre (HCl), fordøyelsesenzymmer (pepsin) og slim. Magesekken bryter mekanisk opp matrester, gjør maten flytende og starter den kjemiske fordøyelsen av proteiner og en liten mengde fett. Dette gir en velling delvis fordøyd mat kalt kymus. Magesekken (figur 4.11) er delt inn i fire regioner: Kardia, fundus, korpus og antrum. Antrum ender i pylorus ringmuskelen som regulerer passeringen av kymus til duodenum (Saladin, 2003). pH i magesekken ved faste er målt til pH 1 - 3,5 (Ekmekcioglu, 2002) og pH 1 - 2,5 (McConnell *et al.*, 2008). Ved inntak av mat øker pH og den kan øke helt opp til pH 7 ved inntak av basisk mat, for deretter å synke ned mot pH 2 igjen etter en stund (Ekmekcioglu, 2002).

**Kjemisk fordøyelse i magesekken:** Magesyre (HCl) folder ut proteiner og aktiverer fordøyelsesenzymene i magen. Pepsin spalter proteiner til polypeptider og også noen frie aminosyrer. Lingual lipase initierer fordøyelse av fett ved å hydrolysere triglyserider til diglyserider og frie fettsyrer. En gastrisk lipase hydrolyserer også svært små mengder av fett. Magesyre aktiverer fordøyelsesenzymmer fra spytt som starter fordøyelse av karbohydrater (Whitney og Rolfes, 2005).



Figur 4.10: Fordøyelsessystemet (Bakke, 2007).



Figur 4.11: Magesekk (Saladin, 2003).

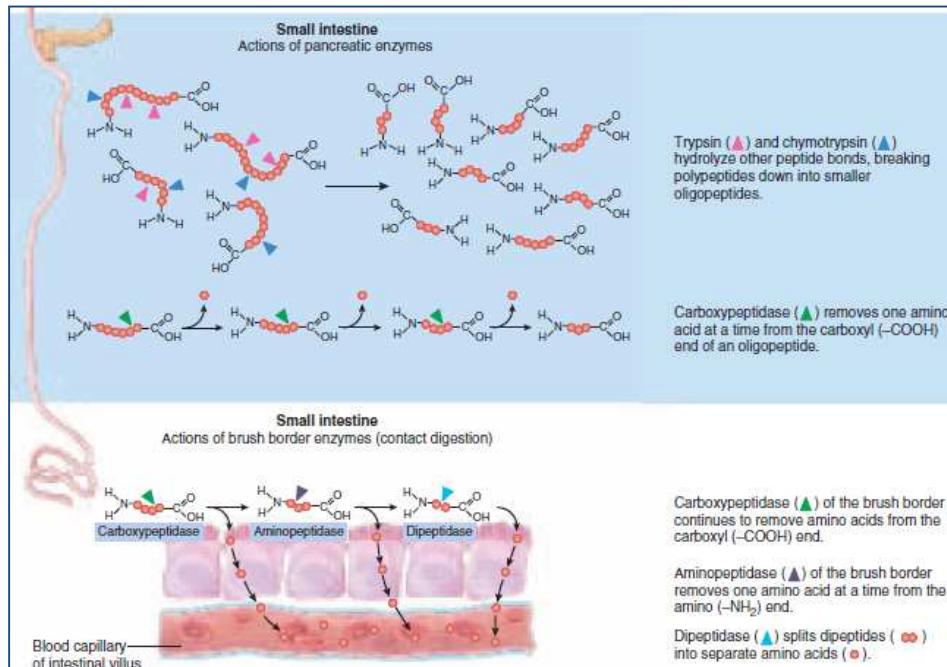
### 4.6.3 Tynntarm

Nesten all kjemiske fordøyelse og næringsopptak skjer i tynntarmen. For å utføre dette effektivt må tynntarmen ha en stor overflate som utsettes for kymus. I en levende person er tynntarmen ca 2 m lang og har en diameter på ca 2,5 cm. For å øke sitt overflateareal er slimhinnene i tynntarmen foldet, sirkulære folder kalt villi og mikroskopiske mikrovilli danner en børstesøm på de absorberende cellene. Gjennom disse tarmtottene blir fordøyd mat overført til blodet. Tynntarmen er delt inn i tre deler. Tolvfingertarmen (duodenum) utgjør de første 25 cm. Den begynner ved pylorus ringmuskelen, buer rundt hodet på bukspyttkjertelen og slutter ved en skarp sving kalt duodenojejunal flexuren. Tolvfingertarmen mottar kymus fra magesekken, galle fra galleblæren og bukspyttkjerteljuice. Her blir magesyren nøytralisert, fett blir emulgert av gallesyrer, pepsin inaktiveres av den forhøyede pH, og pankreas enzymer tar over den kjemiske fordøyelsen. Jejunum utgjør andre del av tynntarmen som videre går til ileum, den tredje delen. Ileum ender der den møter cecum, første del av tykktarmen (Saladin 2003). Duodenum har en pH på 5,7-6,4, i jejunum er pH opp til 7,4 og i ileum er pH opp til 7,7 (Ekmekcioglu, 2002).

**Kjemisk fordøyelse av proteiner i tynntarm:** Pankreatiske enzymer fra bukspyttkjertelen og intestinale enzymer spalter polypeptider i tripeptider, dipeptider og aminosyrer. Deretter vil enzymer på overflaten av de intestinale cellene hydrolysere disse peptidene til frie aminosyrer og absorbere dem (se figur 4.12). I duodenum virker flere enzymer. Enteropeptidase omdanner pankreatisk trypsinogen til trypsin. Trypsin spalter peptidbindinger ved aminosyrene lysin og arginin. Trypsin hindrer trypsinogensyntese og det omgjør også prokarboksypeptidaser til karboksypeptidaser og pankreatisk kymotrypsinogen til kymotrypsin. Kymotrypsin spalter peptidbindinger ved aminosyren fenylalanin, tyrosin, tryptofan, methionin, aspargin og histidin. Elastase og kollagenase spalter polypeptider til mindre polypeptider og tripeptider. Intestinale tripeptidaser spalter tripeptider til dipeptider og intestinale dipeptidaser spalter dipeptider til aminosyrer. Intestinale aminopeptidaser spalter aminosyrer fra aminoenden av oligopeptider (Whitney og Rolfes, 2005).

**Kjemisk fordøyelse av fett:** Galle fra galleblæren emulgerer fett. Pankreatisk lipase og intestinal lipase spalter sammen emulgert fett til monoglyserider, glyserol og frie fettsyrer som kan bli absorbert i tarmen (Whitney og Rolfes, 2005).

**Kjemisk fordøyelse av karbohydrater:** Pankreatisk amylase spalter stivelse i små poly- og disakkarider. Intestinale disakkaridaser (maltase, sukrase og laktase) hydrolyserer disakkarider til monosakkarider (glukose, fruktose og galaktose) som kan bli absorbert gjennom intestinale celler (Whitney og Rolfes, 2005).



**Figur 4.12: Proteinfordøyelse og absorpsjon i tyntarm** (Saladin, 2003).

#### 4.6.4 Tykktarm (Colon)

Tykktarmen mottar ca 500 ml ufordøyelig matrester per dag og reduserer det til ca 150 ml avføring ved å absorbere vann og salter. Tykktarmen er ca 1,5 m lang og 6,5 cm i diameter i kadaver. Det begynner med cecum en blind pose i nedre høyre abdominal kvadrant. Festet til nedre enden av cecum er blindtarmen. Tykktarmen er delt inn i colon ascendens (oppadstigende), colon transversum (tverrgående), colon descendens (nedadgående) og colon sigmoideum (S-formet). De siste 3 cm av tykktarmen er endetarmen, som ender ved anus. Tykktarmen er tett befolket med flere arter av bakterier. Bakteriefloreaen gjærer cellulose, andre ufordøyde karbohydrater og fett og syntetiserer vitamin B og K som absorberes av tykktarmen. Den reabsorberer vann og elektrolytter (spesielt NaCl). Det tar ca 12-24 timer for å redusere rester av et måltid til avføring. Avføring består av ca 75 % vann og 25 % tørrstoff. Tørrstoffet er ca 30 % bakterier, 30 % ufordøyd kostfiber, 10 - 20 % fett, og mindre mengder protein, epitelceller, salter, slim og andre sekret. Fettet er ikke fra dietten, men fra nedbrutte epitelceller og bakterier (Saladin, 2003).

#### 4.7 Humane mage- og tarm enzymer (HGJ og HDJ)

*In vitro* fordøyelsesmodeller er utviklet som et alternativ til human- og dyrestudier. For best å etterligne *in vivo* forsøk er det viktig å etterligne forholdene (pH, fordøyelses- enzymer, komposisjonen av HGJ/HDJ) i den humane gastrointestinale-kanalen (Ekmekcioglu, 2002). Fordøyelsesforsøk kan gjøres med kommersielt produserte enzymer eller med human mage- og tarmsaft. Forsøk har sammenlignet *in vitro* fordøyelsen av caprine myseproteiner ved hjelp av fordøyelsesenzymer fra svin eller mennesker på forskjellige gastriske pH verdier. Det ble funnet at det ble produsert ulike peptider i fordøyelsen avhengig om man brukte enzymer fra svin eller mennesker. Funnene indikerte at humane fordøyelsesenzymer bør foretrekkes fremfor rene kommersielle enzymer fra andre arter ved etterligning av menneskelige fordøyelse (Eriksen *et al.*, 2010). Det er ikke en "normal person", i enhver er fysiologien forskjellig, fra mage innhold til cellulære mekanismer (McConnell *et al.*, 2008). Mage- og tarmjuice har store individuelle forskjeller i komposisjon, pH og volum under fordøyelse, derfor er sammenslåtte batcher fra flere individer å foretrekke til bruk i forsøk. Sammenslåtte bidrag av mage og duodenal safter fra 18 frivillige ble karakterisert av Ulleberg *et al.* i henhold til pepsin aktivitet (26,7 U / ml), total proteolytisk aktivitet (14,8 U/ml), lipase aktivitet (951,0 U / ml), amylase aktivitet (26,8 U/ml) og gallesyrer (4,5 mM). Både pepsin og lipase aktiviteten reduseres i løpet av fryselagring, selv når konserveringsmidler blir tilsatt, derfor er fersk juice eller juice frosset i en kort periode (1-2 måneder) å foretrekke (Ulleberg *et al.*, 2011).

Human magesaft (HGJ) og human tarmsaft (HDJ) blir hentet opp ved hjelp av en treløpet slange som blir ført gjennom munn/nese ned i magesekk og tolvfingertarm på friske frivillige. Aspiratene blir oppbevart på is, sentrifugert for å fjerne slim og celler og deretter lagret ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Enzymaktiviteten blir målt i mage- og tarmsaften (Eriksen *et al.*, 2010).

## 5. Material og Metoder

I dette kapitlet vil det bli sett på metodene brukt under forsøket. Først riving av ost og fordøyelse av ostene. Deretter proteinanalysene Kjeldahl, SDS-PAGE, trypsinering av proteiner, tillaging av pH 2 ekstrakt, nano-LC-MS/MS og RP-HPLC. I kap 5.10 er det detaljerte opplysninger om laboratorieutstyr, kjemikalier og oppskrifter til løsninger brukt under forsøkene.

### 5.1 Ost



**Figur 5.1: Norvegia 3, 9 og 15 mnd, Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost.** (Tine.no 2012f).

**Følgende oster ble benyttet i forsøket:** Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd, Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost

**Utstyr:** Rivemaskin for ost, hansker.

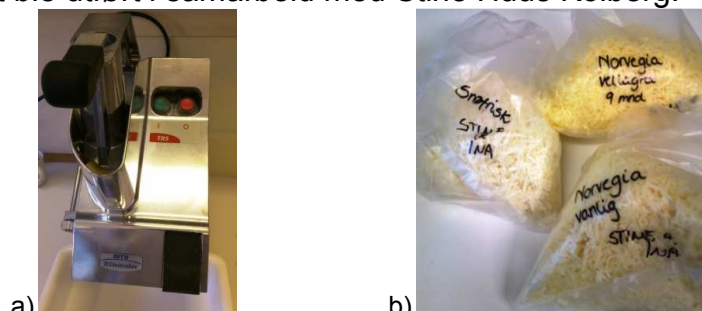
**Tabell 5.1: Protein, fett og karbohydratinnhold i Norvegia 3,9 og 15mnd, Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost.** (Tine.no 2012a-g).

	Norvegia lagret 3 mnd	Norvegia vellagret 9 mnd	Norvegia vellagret 15 mnd	Norvegia lettere	Norvegia økologisk	Snøfrisk hvitost
Protein	27 g	27 g	27 g	32 g	27 g	24 g
Fett	27 g	28 g	28 g	16 g	27 g	30 g
Karbohydrat	0 g	0 g	0 g	0 g	0 g	0 g

Ost ble kjøpt inn i en lokal butikk i Ås sentrum, Akershus, Norge.

Snøfrisk, Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere og Norvegia økologisk ble innkjøpt hhv. 20.02.12 og 21.02.12. Disse ble revet med rivemaskin samme eller påfølgende dag. Den revne osten ble oppbevart i lukkede poser på kjølerom 4 °C.

Riving av ost ble utført i samarbeid med Stine Huus Kolberg.



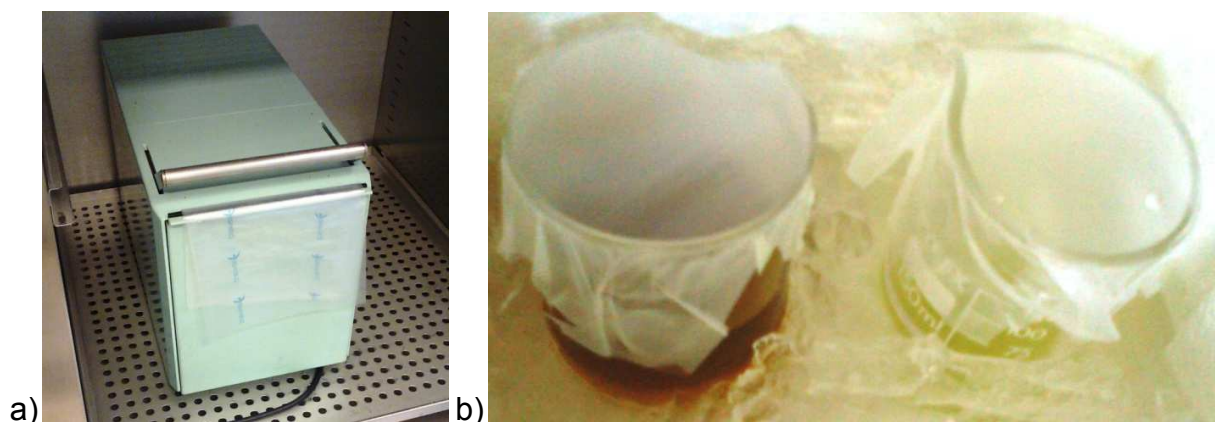
**Figur 5.2: a) Rivemaskin for ost b) Revet ost** (Foto: Lian 2012).

## 5.2 Fordøyelse

De 6 utvalgte ostene ble fordøyd med gjentak dvs 2 ganger (6\*2) over en 5-dagers periode. Fordøyelsen ble utført i samarbeid med Stine Huus Kolberg.

**Utstyr:** 2M HCl, 2M NaOH, human gastric juice (HGJ) (pepsin aktivitet 315 U/gram protein), human duodenal juice (HDJ) (proteolytisk aktivitet 267 U/g protein), 0,9 % NaCl, revet ost (6 oster \*2), destillert vann, pH-meter, vannbad 37 °C, inkubatorskap 37 °C, stomacher (inni inkubatorskap), ultra turrax, stomacherposer, vekt, tørkepapir, pipetter, pipettespisser, plastikk pasteur pipetter, begerglass, eppendorfrør, 15 ml plastrør, hansker, klesklyper, linjal, isoporboks med is, isoporboks med isvann.

**Metode:** En stomacherpose ble tilsatt 4 gram revet ost og 6 gram 0,9 % NaCl. Til hver fordøyelse ble det benyttet 4 separate stomacherposer for å kunne ta ut representative analyser fra hver prøve i hvert trinn av fordøyelsen. Prøvene ble ristet i stomacher (37 °C) i 10 min til en osteslurry (figur 5.3 a). En kontrollprøve, dvs en pose, ble tatt ut før fordøyelsen startet (ufordøyd ost). De gjenværende 3 prøvene ble så tilsatt magesaft (HGJ) (315 U/g protein) og pH ble sakte justert ned til 2,5 ( $\pm 0,1$ ) med 2M HCl. Prøvene ble videre ristet i stomacher i 60 min. Prøve nr. 2 (en pose) ble tatt ut til analyse (HGJ60). I de resterende prøver ble pH justert opp til 7,0 ( $\pm 0,1$ ) med 2M NaOH og det ble tilsatt tarmsaft (HDJ) (267 U/g protein). Prøven ble satt tilbake i stomacher i hhv. 60 min og 120 min og det ble tatt ut prøve 3 (HDJ60) og prøve 4 (HDJ120).



**Figur 5.3:** a) Stomacher med stomacherpose. b) Mage- (HGJ) og tarmsaft (HDJ)  
(Foto: Lian, 2012).



Til analyse ble alt innhold i stomacherposen skrapet ut og helt over i et begerglass, deretter homogenisert med en ultra turrax på hastighet 6 i 1 min. De homogeniserte prøvene ble fordelt på 4-5 rør og satt på is før frysing ved -20 °C. Under hele forløpet både ved tilsetning av HGJ, HDJ, HCl og NaOH sto prøven i vannbad 37 °C.

Det ble under hele fordøyelsen nedskrevet i hvilken mengde de forskjellige løsningene ble tilsatt (fortynningsfaktor).

HGJ og HDJ ble tint og oppbevart i isvann (se figur 5.3 b).

Som kontroll ble det benyttet flere prøvoforsøk med fordøyelse uten enzym og også et med enzym.

Flytskjema over fordøyelsen og proteinanalysene kan ses i figur 5.4 og figur 5.5.

Basert på aspirasjonsstudier (Ulleberg *et al.*, 2011; Ekmekcioglu, 2002; McConnell *et al.*, 2008) og enzymenes aktivitet ble det bestemt at det i dette forsøket skulle brukes en pepsinaktivitet på 315 U/gram protein for HGJ og en proteolytisk aktivitet på 267 U/gram protein for HDJ. Det ble benyttet 3 forskjellige batcher av HGJ og HDJ.

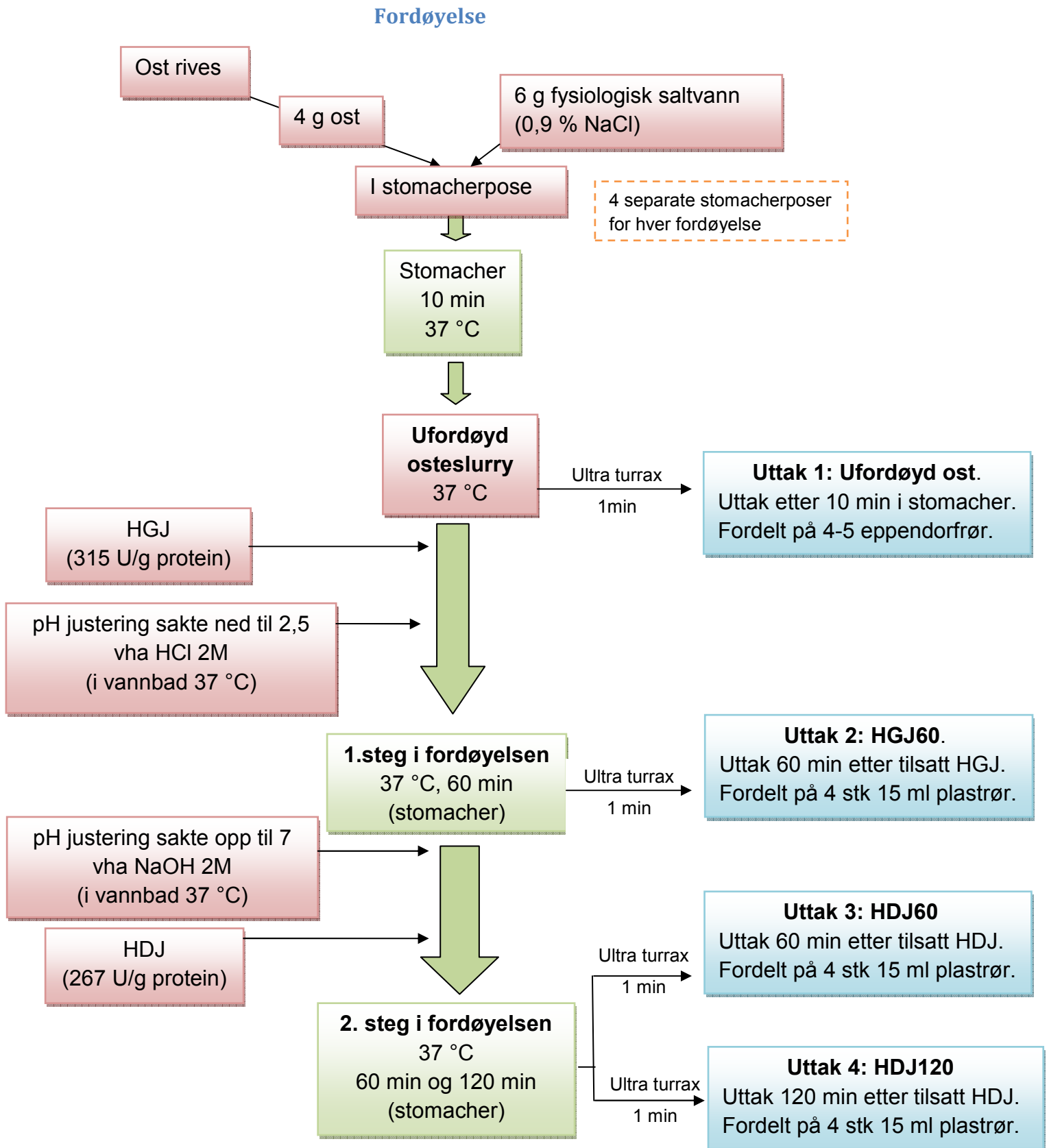
Beregninger ble gjort ut ifra at alle ostene inneholdt 0,3 gram protein/gram ost, slik at alle ostene ble tilsatt HGJ/HDJ ut ifra dette. Tabell 5.2 viser hvilke mengder HGJ og HDJ som ble tilsatt de forskjellige ostene under fordøyelsen.

**Tabell 5.2: HGJ og HDJ tilsetning ved fordøyelse av ost.**

FORDØYD OST	HGJ	HDJ
Norvegia 3mnd I	17,2 ml	20,0 ml
Norvegia 3 mnd II	17,2 ml	26,5 ml
Norvegia 9 mnd I	17,2 ml	20,0 ml
Norvegia 9 mnd II	17,2 ml	26,5 ml
<i>Norvegia 15 mnd *</i>	9,25 ml	26,5 ml
Norvegia 15 mnd I	36,4 ml	23,0 ml
Norvegia 15 mnd II	36,4 ml	23,0 ml
Norvegia Lettere I	9,25 ml	26,5 ml
Norvegia Lettere II	36,4 ml	23,0 ml
Norvegia Økologisk I	9,25 ml	26,5 ml
Norvegia Økologisk II	36,4 ml	23,0 ml
Snøfrisk I	17,2 ml	20,0 ml
<i>Snøfrisk *</i>	9,25 ml	26,5 ml
Snørisk II	36,4 ml	23,0 ml

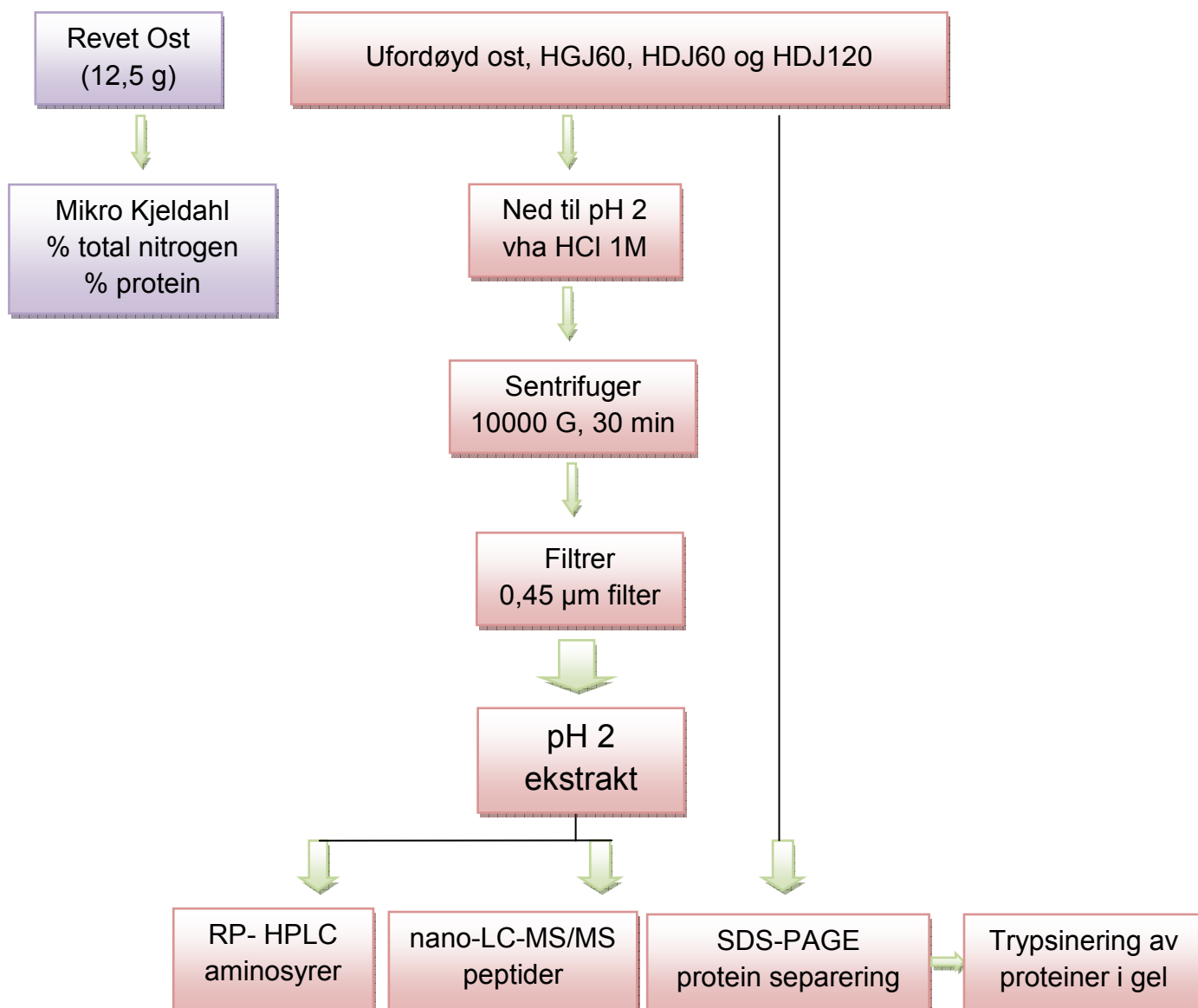
- Snøfrisk I HDJ120 ble tilsatt bare 17 ml HDJ da det var for lite HDJ. Men det ble bestemt at prøven likevel kunne brukes videre.
- Snøfrisk\** HDJ120 ble tilsatt bare 13 ml HDJ da det var for lite HDJ. Det ble derfor gjort en ny fordøyelse.
- Norvegia 15 mnd\** HDJ120 ble tilsatt bare 5 ml HGJ og 14,5 ml HDJ da det var for lite juice. Det ble derfor gjort en ny fordøyelse.

### 5.3 Flytskjema fordøyelse og proteinanalyser



Figur 5.4: Flytskjema for fordøyelse.

## Proteinanalyser



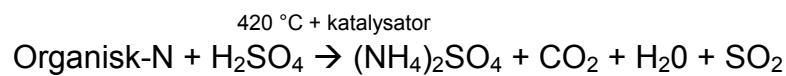
Figur 5.5: Skjematisk oversikt over analyser før og etter fordøyelse.

## 5.4 Analyse av total nitrogen og protein ved mikro-Kjeldahl

Kjeldahl er en metode for å bestemme mengde organisk nitrogen og protein i en organisk prøve. Analysen gjennomføres ved at prøven kokes i konsentrert svovelsyre før den dampdestilleres og titreres. Mikro-Kjeldahl analysen gjør at man kan detektere frigjort nitrogen i proteinene som er i prøven. Det skjer gjennom en serie reaksjoner som foregår i 4 trinn.

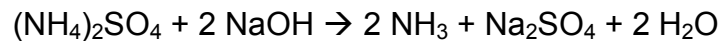
1. Nedbrytning av organiske N-forbindelser.

Organiske N-forbindelser brytes ned til ammoniumsulfat i varm konsentrert svovelsyre tilsatt KjelTabs (fungerer som katalysator).



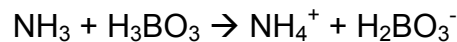
2. Tilsetning av natriumhydroksid og dannelse av ammoniakk.

Løsningen tilsettes et overskudd av 33 % NaOH som fører til dannelsen av ammoniakk.



3. Destillasjon av ammoniakk og dannelse av ammonium-ioner

Ammoniakken som er flyktig destilleres over i en kolbe med borsyreløsning og bromkresolgrønt. Ammonium- og borat-ioner dannes og indikatoren skifter fra rød til grønn farge som følge av at pH stiger.



4. Bestemmelse av mengden borat-ioner v.h.a. titrering med saltsyre.

Mengde borat-ioner er lik mengde ammoniakk. Mengde borat-ioner bestemmes med titrering med HCl



Mengde HCl (lik opprinnelig mengde N) benyttes til å regne ut innhold av N.

For å regne om N-innhold til proteininnhold må man multiplisere med Kjeldahl faktor.

For ost er denne 6,38. % Protein = % N \* 6,38

(Eijsink *et al.*, 2012).

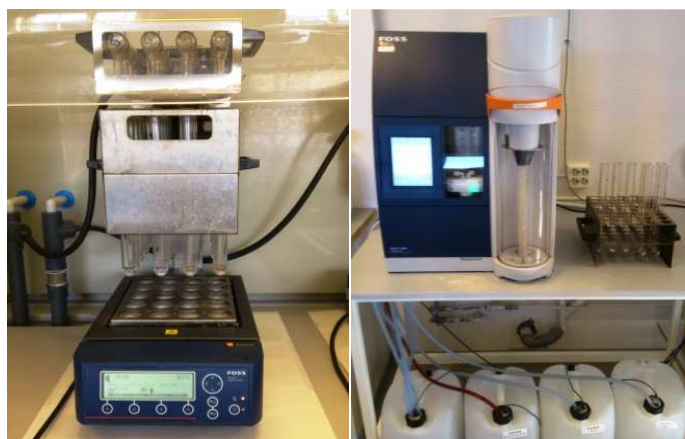
**Løsninger og utstyr:** 0,5 M trinatriumcitratløsning, destillert vann, isopropylalkohol, 0,05 M HCl, 33 % NaOH, KjelTabs, svovelsyre, Kjeldahl utstyr (Kjeltec 8400), omni-mixere, målekolber, trakt, pipette, pipettespisser, gummispattel, vannbad 50 °C.

### Prøveopparbeidelse

Ost (Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost) ble veid opp, 12,5 g, direkte i omni-mixere. Deretter ble de tilsatt 50 ml 0,5 M trinatriumcitratløsning og 50 ml destillert vann som begge holdt 50 °C. Omni-mixeren ble kjørt i 1 min/hastighetstrinn 5 før osteslurryen og ost som satt på sidene ble skapt ned med gummispattel og det spyltes etter med destillert vann. Omni-mixeren ble kjørt videre i 1 min. Løsningene ble overført til 250 ml målekolber og tilsatt 7-10 dråper isopropylalkohol for å hemme skumdannelse. Etter at prøvene hadde nådd romtemperatur, ble målekolbene fylt opp til 250 ml med destillert vann og ristet. Deretter ble 50 ml av løsningen tatt ut og overført til en 100 ml målekolbe. Kolben ble så fylt opp til 100 ml med destillert vann og ristet. 1 ml av denne løsningen ble veid inn i oppslutningsrør i 3 paralleller. Itillegg var to rør blank prøver.

### Oppslutning til Kjeldahl og destillering

En KjelTab og 3 ml konsentrert svovelsyre ble tilsatt hvert av oppslutningsrørene før stativet med oppslutningsrør ble satt i varmeblokken. Avsugget ble satt på rørene og prøvene ble kokt til det ble en vannklar prøve (420 °C i 1 time). Oppslutningsrørene ble videre satt i destillasjonsapparatet hvor det automatisk ble tilsatt 10 ml destillert vann og 15 ml 33 % NaOH. Etter en liten forsinkelse begynte destilleringsprosedyren. Da prosedyren var slutt ble prøvesvar avlest. Destilleringen ble gjentatt for alle oppslutningsrørene.



Figur 5.6: Kjeldahl utstyr –Kjeltec 8400 (Foto: Lian, 2012).

## 5.5 Protein separering ved SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) er en metode som separerer proteiner i henhold til molekylvekt i et elektrisk felt. Til dette benyttes geler som består av ulike mengder kryssbundet akrylamid (tetthet) i form av en konsentrerende gel som konsentrerer proteinene i skarpe bånd og en separerende gel som videre skiller de ulike proteinene i godt adskilte bånd (Eijsink *et al.*, 2012). Prøvene behandles på forhånd i en prøvebuffer med merkaptoetanol som reduserer disulfidbroer og den anioniske detergenten SDS som binder sterkt til proteinene og denaturerer dem. Proteinene i løsningen er derfor fullstendig denaturert og åpnet til en stavformet struktur med negativt ladde SDS molekyler langs polypeptidkjeden (Watson *et al.*, 2008). Ved elektroforesen settes det på en spenning over gelen, da vil de negativt ladde protein-SDS kompleksene vandre mot anoden. Små proteiner vil vandre raskere gjennom gelen da de store vil gå saktere gjennom gelnettverkets porer (se figur 5.7). Man kan estimere molekylvekten til ukjente proteiner ved å applisere en molekylvektstandard (Eijsink *et al.*, 2012).

**Løsninger:** Akrylamid/bisakrylamid, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS løsning, 10 % ammonium persulfat, tetrametyletylendiamin, 10x elektrode running buffer, 2x prøvebuffer, molekylvektsmarkører (i prøvebuffer), fikseringsløsning, fargeløsning, avfargingsløsning, preserveringsløsning, 70 % etanol

**Utstyr:** Bio-Rad SDS-PAGE utstyr, varmeblokk, pipetter, pipettespisser, nitrilhansker, vortex, 50 ml plastrør, eponscanner.

### Prøvetillaging

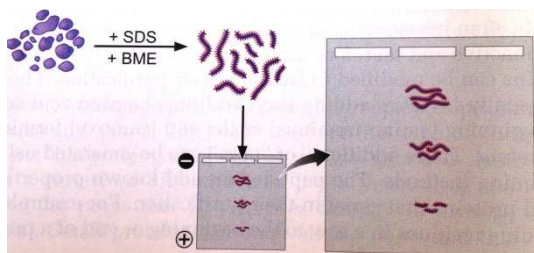
Ufordøyde osteprøver og HGJ60 prøvene til hver enkelt ost ble fortynnet med destillert vann slik at de ble likt fortynnet som HDJ prøvene av samme ost. 40 µl prøve ble så fortynnet med 40 µl prøvebuffer i et eppendorfrør og ristet med en vortex. Det ble stukket hull i lokket og prøven ble varmet på varmeblokk ved 95 °C i 5 min. Deretter ble prøvene fryst ved -20 °C til de skulle brukes.

## Tillaging av SDS polyakrylamidgel og elektroforese

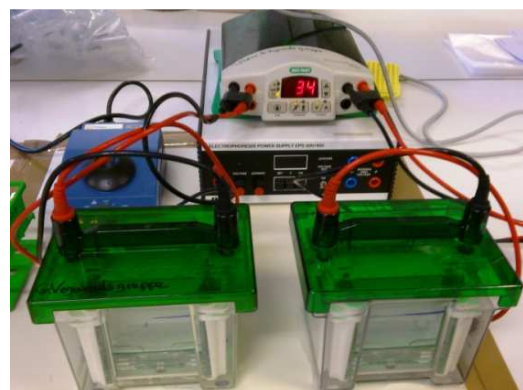
12,5 % akrylamid geler ble tillaget etter oppskrift (se oppskrifter kap 5.10.3). Gelene ble plassert i gelkammeret og 1x running buffer ble fylt på i midten og til halvveis opp i kammeret. 7  $\mu$ l molekylvektsmarkører (proteinstandard) ble applisert i den første brønnen. Deretter ble prøve tilsatt i de neste 8 brønnene. Etter utprøving av protein mengde til applisering av prøve for hver ost (se detaljer under) ble følgende prøvevolum applisert.: 4  $\mu$ l: Norvegia 9 mnd; 3  $\mu$ l: Norvegia 15 mnd og Snøfrisk; 2  $\mu$ l: Norvegia 3 mnd, Norvegia økologisk og Norvegia lettere. Kammeret ble så fylt opp med 1x running buffer. Lokket ble satt på og elektroforese ble kjørt ved konstant spenning på 200 V i ca 40 min (se figur 5.8).

Etter elektroforese ble glassplatene tatt ut og skilt. Den konsentrerende gelen ble fjernet og den separerende gelen ble lagt i en plastboks. Deretter ble proteinene i gelen fiksert (fikseringsløsning, 10 min), farget (fargeløsning, 10 min) og bakgrunnsfargen fjernet (avfargingsløsning, 20 min og deretter over natten). Løsningene holdt 50 °C og gelen sto på ristebrett mens den lå i de forskjellige løsningene. Gelen ble lagt i conserveringsløsning påfølgende dag. For å få bilde av gelene ble de scannet med eponscanner.

Screening av prøvevolum ( $\mu$ l) til applisering på gelene ble utført i et egne prøveforsøk for å oppnå en god separering og farge av proteinbåndene. Først ble osteprøver testet i volum av: 20, 17, 15, 12, 10, 7, 5 og 3  $\mu$ l og geler ble farget og evaluert. Deretter ble hver enkelt prøve innskrenket til volumer hhv. 6, 5, 4 og 3  $\mu$ l. Det ble det funnet at prøvevolum på 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l eller 4  $\mu$ l ga beste resultat avhengig av type ost (se resultat del kap 6.2).



**Figur 5.7: SDS gel elektroforese. 3 forskjellige peptider fordeles i gelen etter molekylvekt (Watson *et al.*, 2008).**



**Figur 5.8: Bio-Rad SDS-PAGE utstyr (Foto: Lian, 2012).**

## 5.6 Trypsinering av proteiner i gel

For å finne identiteten til proteiner i de ulike gelbåndene ble det utført trypsinering av proteiner i gel. Det ble analysert 5 gelbånd fra Norvegia 3 mnd I ufordøyd ost (figur 6.3) og gelbånd fra human tarmsaft (figur 6.4). Proteiner ble separert på en 12,5 % SDS-PAGE gel. Hvert bånd ble skåret ut av gelen, og utsatt for i-gel reduksjon, alkylering, og tryptisk fordøyelse. I korte trekk ble 10 mM ditioneitol i 100 mM ammonium bikarbonat (Ambic) tilført for å redusere cysteiner (56 °C, 45 min). Cystein alkylering ble gjennomført i mørket i en løsning av 55 mM-iodoacetamid i 100 mM-Ambic (romtemperatur, 30 min). I-gel fordøyelse ble utført med 6 ng / µl trypsin (V511A; Promega Corp, Madison, WI, USA) i 50 mM-Ambic med 5 mM-CaCl<sub>2</sub> (37 °C, over natten). Før massespektrometer analyser ble trypsinerte proteiner avsaltet og konsentrert ved bruk av C18 ZipTips (OMIX, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. Eluering ble utført med 2 µl 0,1 % maursyre i 60 % acetonitril og fortynnet i 8 µl 0,1 % maursyre. MS analysene ble utført av Morten Skaugen og Ellen Kathrine Ulleberg.



## 5.7 pH 2 ekstrakt til peptid- og aminosyre analyser

Kaseiner felles ut ved sitt isoelektriske punkt (pI) som er pH 4,6. Ved å senke pH til ytterligere til pH 2 i prøvene, sentrifugere og filtrere supernatanten vil man få et pH 2 ekstrakt hvor kaseinene og mange av myseproteinene er fjernet. Dette inneholder peptider og aminosyrer.

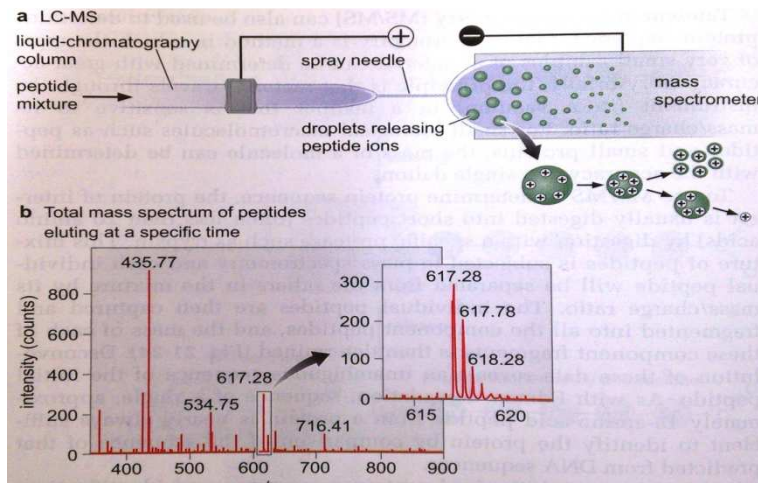
**Utstyr og løsninger:** Prøver av ufordøyd- og fordøyd ost, 1 M HCl, destillert vann, pH meter, 50 ml plastrør, sentrifuge, 20 ml sprøyte, 5 ml nunc rør, 0,45 µm filter, isoporboks med isvann.

### Metode

Prøver av ufordøyd- og fordøyd ost (tilsvarende ca 2 g revet ost) ble overført til et 50 ml plastrør. Ufordøyd ost ble tilsatt 1 ml destillert vann i plastrøret for å få en mer homogen løsning. pH i prøvene ble målt med pH-meter og justert ned til pH 2 ( $\pm 0,1$ ) ved hjelp av 1 M HCl. Videre ble prøvene sentrifugert i 30 min ved 10000 G. Supernatanten ble overført til en sprøyte og filtrert gjennom et filter på 0,45 µm og overført til 5 ml rør. pH 2 ekstrakt prøvene ble fryst på -20 °C inntil videre bruk. Prøvene var plassert i isvann inntil de ble analysert.

## 5.8 nano LC-MS/MS analyse av peptider

Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) er en metode for påvisning av forbindelser (her: peptider) basert på molekylvekt og struktur. Peptider blir utsatt for væskechromatografi (LC) etterfulgt av massespektrometri (MS) hvor peptidene blir separert etter masse (se figur 5.9). Metoden gjør det mulig å identifisere og kvantifisere forbindelser med et høyt nivå av kvalitativ sikkerhet (Watson *et al.*, 2008)



**Figur 5.9:** a) LC-MS. b) Peptider separert etter masse (Watson *et al.*, 2008).

**Utstyr:** pH 2 ekstrakt prøver av ufordøyd og fordøyd ost, Nanodrop, micropipette tips, kolonnemateriale, sprøyte, eppendorfrør, vortex, hansker, pipetter, pipettespisser, 100 % metanol, 0,1- 5,0 % maursyre (FA), 70:30 % ACN: 0,1 % FA, LC-MS instrument.

**Tillaging av kolonner:** Kolonner ble tillaget ved at C18 kolonne materiale ble stanset ut og applisert ned i micropipette spisser, se figur 5.10.



**Figur 5.10:** Tillaging av kolonne, applisering av kolonne materiale i micropipette spisser (Foto: Lian, 2012).

### **Opparbeidelse av peptidprøve**

Ved hjelp av Nanodrop måling ble det funnet mg protein/ ml i hver prøve av pH 2 ekstraktene. 100 µl prøve ble fortynnet med 100 µl 0,2 % maursyre (1:1). Deretter ble hver enkelt prøve fortynnet med 0,1 % maursyre til en løsning som ga maks 5 µg protein /10 µl peptidprøve.

### **Avsalting og konsentrering av peptider til nano LC-MS/MS**

Kolonnen ble aktivert ved å kjøre gjennom 10 µl metanol. En sprøyte fylt med luft ble brukt for å påføre trykk og presse gjennom løsninger. Kolonnen ble så ekvibrert med 2\*20 µl 0,1 % FA og deretter tilført 10 µl peptidprøve. Den tilførte peptidprøven ble deretter avsaltet ved å vaske kolonnen med 2\*10 µl 0,1 % FA. Til slutt ble peptidene eluert med 3 µl 70 % ACN i 0,1 % FA. Den konsentrerte prøven ble samlet i et eppendorfrør og fryst ved -20 °C. Dette ble gjentatt for alle prøvene (2 paralleller).

### **nano-LC-MS/MS**

Konsentrerte avsaltede blandinger av peptider ble fortynnet i 10 µl 1 % (v / v) maursyre før de ble lastet opp på en nanoACQUITY™ Ultra Performance LC® (Waters Corp), med en 3 mm Symmetry C18 Trap kolonne (180mm x 22 mm; Waters) foran en 3 mm Atlantis™ C18 analyse kolonne (100 µm x 100 µm). Peptider ble separert med en gradient på 5-90 % (v / v) ACN, 0,1% (v / v) maursyre, med en hastighet på 0,4 ml / min eluert til et Q-TOF Ultima Global massespektrometer (Micromass / Waters) og utsatt for data-avhengige tandem MS analyse. Peak-lister ble generert av Protein-Lynx Global server programvare (versjon 2.1), og de resterende pk1 filene ble søkte mot National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant protein sekvens databaser ved hjelp av søkemotoren MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Peptid masse toleransen brukt i søket var 100 deler per million (ppm), og fragment masse toleranse var 0,1 Da. Taksonomi brukt i søket var mammalia. Data ble samlet inn over et masse:ladning område på 400 - 1500 Da hvor peptider med to eller tre ladninger oppdages. Derfor ble bare peptider med masse 800 - 4500 Da utsatt for kollisjons-indusert fragmentering og videre behandling.

## 5.9 Analyse av frie aminosyrer ved RP-HPLC

Reversed phase-High-performance liquid chromatography (RP-HPLC) er en analysemetode basert på at stoffene som skal atskilles fordeler seg kontinuerlig mellom en stasjonær og en mobil fase. Ved bruk av et HPLC instrument kan dette prinsippet brukes til separasjon av aminosyrer.

**Utstyr:** pH 2 ekstrakt prøver av ufordøyd og fordøyd ost, ultralydbad, eppendorfsentrifuge, eppendorfrør, kjølerom 4 °C, pipette med pipettespisser, rør til RP-HPLC analyse, vortex, destillert vann, isoporboks med is, 2 ml sprøyter, sprøytespisser, 0,2 µm filter, L.Norv/ PICA standardløsning, TCA 4 % og boratbuffer.

**HPLC instrument og tilhørende kjemikalier:** Pumpe, autoinjektor, termostat, kolonneovn, fluoriscensdetektor, LC-terminal, kolonne, aminosyrestandard, OPA, natriumacetat-trihydrat, titriplex III, tetrahydrofuran, L-aminosyrer-kit.

### Prøvetillaging

400 µl prøve og 400 µl L.Norv/ PICA standardløsning ble tilsatt i et eppendorfrør og ristet med en vortex (1:1). Prøvene sto i ultralydbad i 30 min før de ble sentrifugert ved 3000 G i 40 min ved 4 °C. 500 µl av supernatanten ble tatt ut og tilsatt 500 µl TCA 4 % (1:1) før det ble ristet med en vortex. Etter å ha stått i et is/vannbad i 30 min på kjølerom ble prøvene sentrifugert ved 15700 G i 5 min ved 4 °C. Ved hjelp av en sprøyte ble supernatanten tatt ut og filtrert med et 0,2 µm filter. Av den filtrerte prøven ble 2\*50 µl tatt ut til to rør for aminosyreanalyse (2 paralleller) og ca 400 µl ble tatt over til et back-up rør. Prøvene ble fryst ved -20 °C til dagen for RP-HPLC.

### RP-HPLC

Prøvene ble tilsatt 350 µl borat buffer. Separasjon av aminosyrene ble utført ved RP-HPLC, Autoinjector 1200-serien, termostat 1200-serien, Column Oven serien 200, fluorescensdetektor 1200-serien, data-systemer: EZChrom Elite, 3.3.2. Kolonne med OPA og FMOC derivasjon og ble gjennomført ved 42 °C.

### Kromatografibetingelser:

Mobilfase A: 30 mmol/l NaOAc pH 7,20+0,25 % tetrahydrofuran + 0.1 mol/l titriplexIII

Mobilfase B: 100 mmol/l NaOAc pH 7,20 + 80 % acetonitril + 0.1 mol/l titriplex III.

#### Primære aminosyrer:

Det blir kjørt en lineær gradient fra 3,3 % til 20.7 % B over 12 min., 20.7 % til 30 % B over 12 min., 30 % til 100 % B over 4 min, kolonnen ble holdt ved 100 % B i 7 min, tilbake til 3.3 % B over 7 min.

Flow : 0.7 ml/min. Kolonnetemp.: 42°C. Detektorbølgelengde: OPA-derivatene (primære aminosyrer) ble detektert ved excitation 340 nm og emission 455 nm.

#### Sekundær aminosyre:

Det ble kjøret en lineær gradient fra 3,3 % til 40 % B over 28 min., 40 % til 100 % B over 4 min., kolonnen ble holdt ved 100 % B i 7 min, tilbake til 3.3 % B over 7 min.

Flow : 0.8 ml/min. Kolonnetemp.: 42°C. Detektorbølgelengde: FMOC-derivatene (sekundære aminosyrer) ble detektert ved excitation 266 nm og emission 313 nm.

## 5. 10 Utstyr, løsninger og oppskrifter

Dette delkapitlet gir detaljerte opplysninger om laboratorieutstyr, kjemikalier og oppskrifter til løsninger brukt under forsøkene.

### 5.10.1 Laboratorieutstyr

<b>Utstyr</b>	<b>Navn</b>	<b>Produsent</b>
0,20 µm filter	25 mm syringefilter w 0.2 cellul.	VWR
0,45 µm filter	Filterpour S 0.45	Sarstedt
5 ml rør	Cryo tube vials	Nunc
15 ml plastrør	Cellstar tubes 15 ml	Greiner bio-one
50 ml plastrør	Cellstar tubes 50 ml	Greiner bio-one
Eppendorfrør	Microtubes MCT-150-C	Axygen
Eppendorfsentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
Epson skanner	Epson perfection V750 pro	Epson
HPLC Pumpe	Pumpe series 410	Perkin Elmer
HPLC Autoinjektor	Autoinjektor 1200 series	Agilent Technologies
HPLC Termostat	Termostat 1200 series	Agilent Technologies
HPLC Kolonneovn	Kolonneovn series 200	Perkin Elmer
HPLC Fluoriscensdetektor	Fluoriscensdetektor 1200 series	Agilent Technologies
HPLC LC-terminal	EZChrom Elite	Agilent Technologies
HPLC Kolonne	XTerra RP 18, 150 x 4,6 mm id, partikkelstr. 3.5 µm	Waters
Inkubatorskap 37 °C	Thermax (310078)	Thermax
Kjeldahl utstyr	Kjeltec 8400	Foss
(Oppslutningsrør, destillasjonsapparat, oppslutningsblokk ++)		
Kolonnemateriale	3M Empore C18 extraction disks	Bioanalytical Tech
LC-MS instrument		Waters
Micropipette tips	GELoader micropipette tips	Eppendorf
Nanodrop	Nanodrop	Thermo scientific
Nitrilehansker	Nitrile disposable gloves	VWR
Omni-mikser	Omni-mixer homogeniser	Sorvall
pH-meter	PHM210	Radiometer Copenhagen
Pipetter	Finpipette	Thermo Labsystems
Pipettespisser	Pipette tip reload	VWR

Plastikk pasteur pipetter	Pasteur pipett 3 ml	VWR
Ristebrett	Orbital shaker OS-10	Brosnan
Rivemaskin	Rivemaskin for ost	Electrolux
SDS-PAGE utstyr		Bio-Rad
(elektroforeseutstyr, plater, kammer, kam ++)		
Sentrifuge	Multifuge X3R	Thermo Scientific
Sprøyte 2 og 20 ml	Syringe	BD Plastipack
Sprøytespisser	Needle	BD Plastipack
Stomacher	Stomacher 400	Colworth
Stomacherposer	BA 6041 standard bags	Seward Limited
Tørkepapir	Delicate Task Wieps	Kimberly Clarck
Ultralydbad	Branson 2510	VWR
Ultra turrax	Yellow line D118 basic	IMLAB
Vannbad 37 °C	Julabo 7A	Julabo
Vannbad 50 °C	AQUA Aline AL 18	LADA
Varmebløkk 95 °C	Thermolyne type 17600	Thermolyne
Vekt	Mettler PJ 300	VWR
Vinylhansker	Vinyl examination gloves	VWR
Vortex	MS1 Minishaker	IKA working INC

### 5.10.2 Kjemikalier og løsninger

<b>Kjemikalie/løsning</b>	<b>Produsent</b>
2-merkaptøetanol	Sigma
Akrylamid/bisakrylamid	Sigma
Acetonitril (ACN)	Merck
Aminosyrestandard	Pierce
Bromfenolblått	Merck
Boratbuffer 0,4 N	Agilent Technologies
Coomassie R-250	LKB somma
Destillert vann	Millipore
Eddiksyre (HAc) 100 %	Merck
Etanol	Hjelle kjemi
Glycerol 85 %	VWR International

Hydrogenkloridsyre (HCl) 37 %	Merck
Human Gastric Juice – Magesaft (HGJ)	IKBM ved UMB
Human Duodenal Juice – Tarmsaft (HDJ)	IKBM ved UMB
Isopropylalkohol	Ren såpeindustri AS
KjelTabs Auto	Thompson & Copper
L-aminosyrer-Kit	Sigma
L. Norvaline	Sigma
Maursyre 98-100 % (FA)	Merck
Metanol (MeOH)	Merck
Milli-Q vann	Millipore
Molekylvektsmarkør, Protein mixture	Pharmacia Biotec
Natriumhydroksid-løsning (NaOH)	Fluka
Natriumacetat-trihydrat, titriplex III	Merck
Natriumklorid (NaCl)	Merck
OPA	Agilent Technologies
Piperdine-4-carboxylicacis (PICA)	Fluka
Sodium dodecylsulfat 99% (SDS)	Sigma
Tetrametyletylendiamin (TEMED)	Sigma
Tetrahydrofuran	Merck
Trinatriumcitratløsning 0,5 M	Merck
Tris (Mw 121,1 g/mol)	Sigma
Trichloroacetic acid (TCA)	Merck



### 5.10.3 Løsninger

#### Fysiologisk saltvann 0,9 %

NaCl	8,1 g
Destillert vann	900 ml

#### L.Norv/ PICA standardløsning 0.4 $\mu\text{mol mL}^{-1}$

L.Norvalin	0,004684 g
PICA	0,005166 g
0,1 M HCl	til 100 ml

#### 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (4x separerende gel buffer)

Tris (Mw 121,1 g/mol)	1,5 M	181,6 g
4 N HCl		til pH 8.8
Destillert vann		til 1000 ml

Lagres ved 4 °C.

#### 0,5 M Tris-HCL, pH 6.8 (4x konsentrerende gel buffer)

Tris (Mw 121,1 g/mol)	0,5 M	30,3g
4 N HCl		til pH 6.8
Destillert vann		til 500 ml

Lagres ved 4°C.

#### 10 % SDS løsning (100 ml)

Sodium dodecylsulfat (SDS) (Mw 288,4 g/mol)	10g
Destillert vann	til 100 ml

Lagres i romtemperatur.

#### 10 % Ammonium persulfat (APS)

Ammonium persulfat	1 g
Destillert vann	10 ml

Fryst ned i 400  $\mu\text{l}$  alikvoter ved -20 °C.

**10x Elektrode running buffer** (1x 0,025 M Tris, 0,192 M glycine, 0,1% SDS, pH 8,3)

Tris (Mw 121,1 g/mol)	0,25 M	30,2 g
Glycine (Mw 75,07 g/mol)	1,92 M	144 g
SDS (Mw 288,4 g/mol)	34,7 mM	10 g
Destillert vann		til 1000 ml pH

100 ml løses i 900 ml destillert vann før bruk.

**2x Prøvebuffer**

0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	0,125 M	2,5 ml
10% SDS, 0,35 M	0,14 M	4,0 ml
Glycerol (Mw 92,09 g/mol)	20 % v/v	2,0 ml
2-merkaptoetanol (Mw 78,13 g/mol)	2 % v/v	0,2 ml
Bromfenolblå (Mw 691,9 g/mol)	0,03 mM	0,2 mg
Destillert vann		til 10 ml

Tilsett 20 µl 2-merkaptoetanol per ml før det skal tilsettes prøver

**Fikseringsløsning:**

Metanol	200 ml
Destillert vann	800 ml

**Fargeløsning:**

Coomassie R-250	1 g
Metanol (95 %)	420 ml
Eddiksyre	100 ml
Destillert vann	480 ml

420 ml 95 % MeOH og 100 ml HAc tilsettes 480 ml destillert vann under omrøring.

Tilsett 1 g coomassie R-250.

**Avfargingsløsning:**

Eddiksyre	100 ml
Metanol	100 ml
Destillert vann	800 ml

**Preserveringsløsning:**

Glycerol	100 ml
Metanol	100 ml
Destillert vann	800 ml

**Gel til SDS-PAGE:**Separerende Gel12,5 % akrylamid (6 stk):

Akrylamid/ Bisakrylamid	12,5 ml
Destillert vann	9,56 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	7,5 ml
10 % SDS	300 µl
10% APS	150 µl
TEMED	15 µl

Konsentrerende Gel4,0 % akrylamid (6 stk):

Akrylamid/ Bisakrylamid	2,67 ml
Destillert vann	12,11 ml
0.5 M Tris, pH 6.8	5,0 ml
10 % SDS	200 µl
10% APS	75 µl
TEMED	7,5 µl

**5,0 % maursyre (FA)**

Milli-Q vann	950 µl
Maursyre (98 %)	50 µl

**0,2 % maursyre (FA)**

Milli-Q vann	960 µl
5 % maursyre	40 µl

**0,1 % maursyre (FA)**

Milli-Q vann	980 µl
5 % maursyre	20 µl

**70 % acetonitril (ACN)**

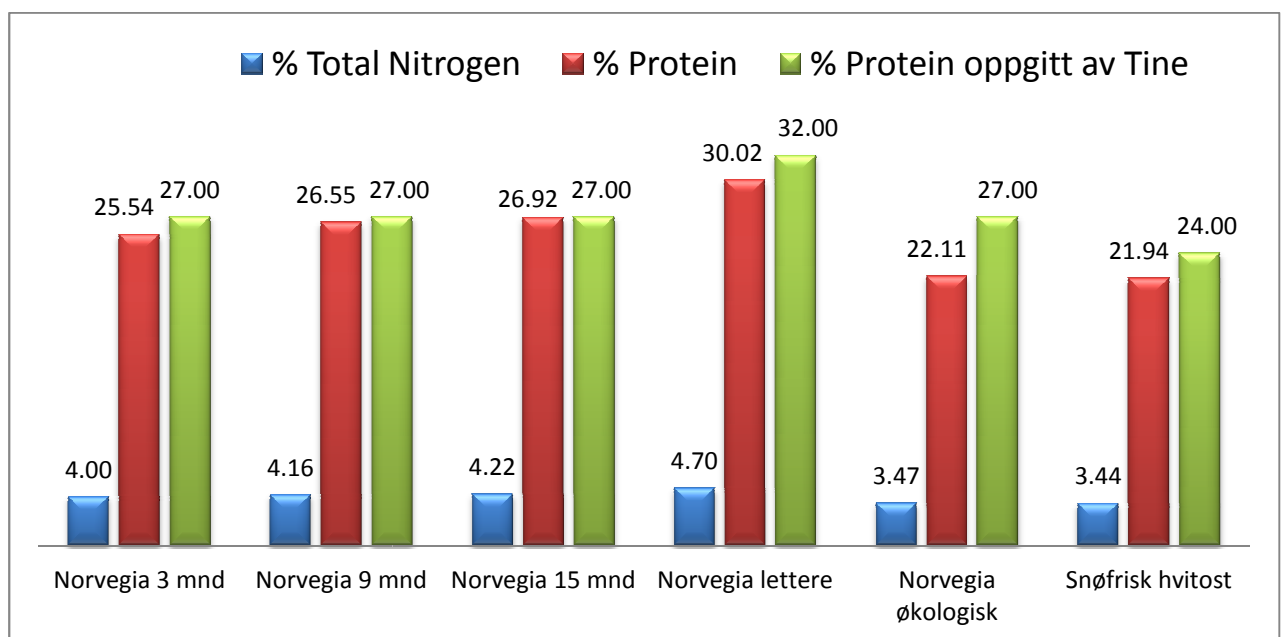
ACN	350 µl
0,1 % maursyre	150 µl

## 6. Resultater

Følgende 6 oster ble analysert: Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost. Analyser av proteiner, peptider og aminosyrer ble utført på ufordøyde og fordøyde oster.

### 6.1 Proteininnhold i utgangs oster

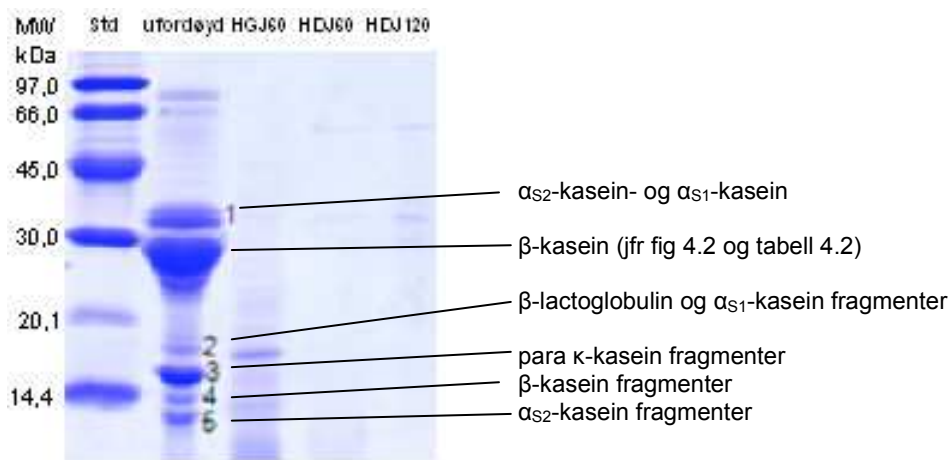
Det ble utført mikro-Kjeldahl analyse for å finne proteininnholdet i de forskjellige ostene (3 paralleller). Som vist i figur 6.1 ble proteininnholdet i ostene målt til henholdsvis 25,5 % for Norvegia 3 mnd, 26,5 % for Norvegia 9 mnd, 26,9 % for Norvegia 15 mnd, 30,0 % for Norvegia lettere, 22,1 % for Norvegia økologisk og 21,9 % for Snøfrisk hvitost. Til sammenligning oppgir Tine at proteininnhold i ostene skal være 27 % for Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia økologisk, for Norvegia lettere er det oppgitt et proteininnhold på 32 % og for Snøfrisk hvitost er det 24 %. Det målte proteininnholdet er for alle ostene lavere enn hva Tine oppgir (0,5-5 % lavere).



**Figur 6.1: Total nitrogen- og proteininnhold i Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (gjennomsnittsverdi av 3 paralleller).**

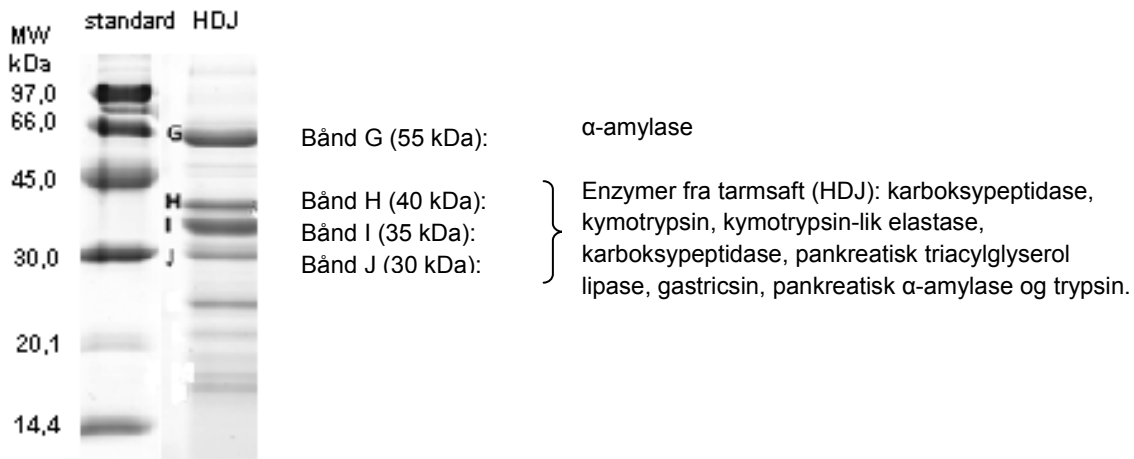
## 6.2 Identifisering av ulike proteiner i ost og i human tarmsaft (HDJ)

For å finne identiteten til de ulike proteinene i ost etter separering ved SDS-PAGE ble utvalgte bånd i gelen skåret ut og analysert etter ekstraksjon og trypsinering. Det ble valgt ut 5 gelbånd fra Norvegia 3 mnd og alle båndene ble identifisert som aminosyresekvenser av ulike melkeproteiner (figur 6.2). I bånd 1 ble  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein identifisert, i bånd 2 ble  $\beta$ -lg og  $\alpha_{S1}$ -kasein identifisert og i bånd 3 ble para  $\kappa$ -kasein, et spaltningsprodukt fra k-kasein ved bruk av løpe identifisert. Videre ble det i bånd 4 og 5 identifisert aminosyresekvenser fra henholdsvis  $\beta$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein.



**Figur 6.2: Identifisering av utvalgte protein bånd fra Norvegia 3 mnd I ufordøyd ost ved SDS-PAGE.**

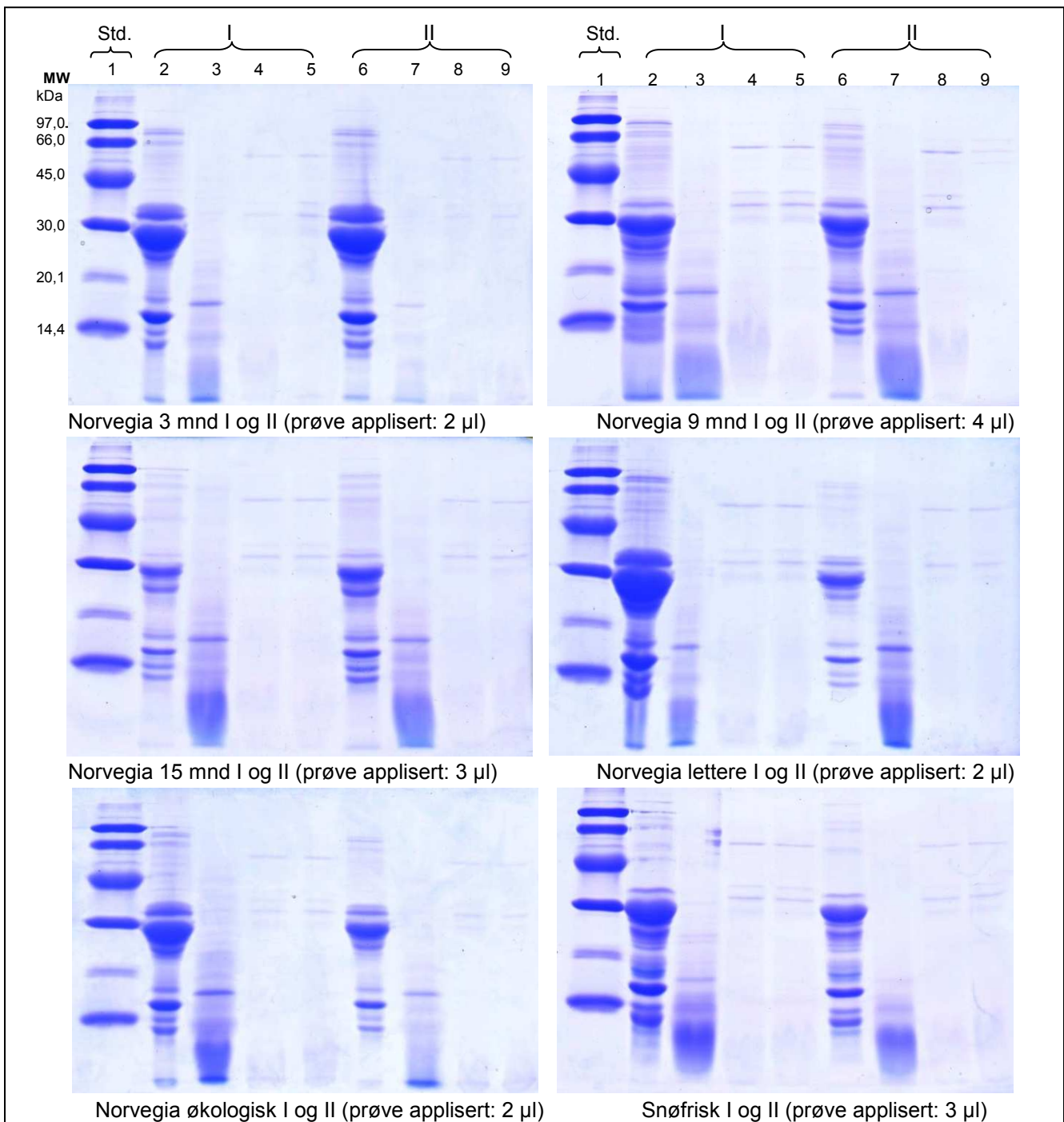
Proteinbåndene som ble analysert og identifisert i human tarmsaft (HDJ) (figur 6.3) var hhv.  $\alpha$ -amylase (bånd G) og i bånd I, J og H ble funnet en blanding av: karboksypeptidase, kymotrypsin, kymotrypsin-lik elastase, karboksypeptidase, pankreatisk triacylglycerol lipase, gastricsin, pankreatisk  $\alpha$ -amylase og trypsin.



**Figur 6.3: Identifisering av ulike enzymer i human tarmsaft (HDJ) ved SDS-PAGE.**

### 6.3 Proteindegradering ved fordøyelse av HGJ og HDJ

For å undersøke nedbrytningen av proteiner under fordøyelse i mage etter 60 min (HGJ60) og i tarm etter 60 og 120 min (HDJ60 og HDJ120) ble SDS-PAGE utført på prøver fra alle de ulike ostene (Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (2 gjentak)). Figur 6.4 viser resultatet av SDS-PAGE. Resultatene viser at allerede i ufordøyd ost har modning av ostene degradert noe av proteinene i osten og de har begynt å bli brutt opp i peptidfragmenter (figur 6.2). Gelene viser at proteinene blir videre raskt degradert etter fordøyelse i mage (HGJ60) og man ser kun et markert peptidbånd ved ca 18 kDa. Etter fordøyelse i tarm (HDJ60 og HDJ120) er så og si alle proteinene i osten er degradert. Ved å sammenligne båndene fra human tarmsaft (figur 6.3) med gelbånd fra fordøyde oster (figur 6.4), ser man at i de fordøyde osteprøvene (brønn nr. 4, 5, 8 og 9, figur 6.4) finner man bånd som ser ut til å komme fra de tilsatte tarmenzymene identifisert i båndene G, I, J og H i figur 6.3.



**Figur 6.4: SDS-PAGE geler av ufordøyd og fordøyd Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (2 gjentak, I og II).** I alle gelene ble det applisert 7 µl molekylvektstandard i brønn 1. Prøve som ble applisert i de resterende brønnene var: brønn 2 og 6, ufordøyd ost; brønn 3 og 7, HGJ60; brønn 4 og 8 HDJ60; brønn 5 og 9, HDJ120.

## 6.4 Peptider identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ ved nano LC-MS/MS

Peptider ble identifisert ved nano-LC-MS/MS i ufordøyd ost og etter fordøyelse av ost med magesaft i 60 min (HGJ60) og deretter med tarmsaft i 60 og 120 min (HDJ60 og HDJ120). Bare peptider med masse 800 – 4500 Da ble identifisert og av disse ble bare de med rank 1 eller 2 (høyeste treff) fra Mascot-søket (<http://www.matrixscience.com>) tatt med i resultatene.

Tabell 6.1 og 6.2 viser hvilke peptidfraksjoner som ble funnet med opprinnelse fra de ulike kaseiner og myseproteiner i ufordøyd ost og i de forskjellige trinn av fordøyelsen. I Norvegia ostene ble det funnet peptider fra alle kaseinene og i tillegg fra  $\beta$ -lg. Peptider fra  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -lg ble kun funnet i den fordøyde osten. I Snøfrisk ble det funnet peptidfraksjoner fra  $\beta$ -,  $\alpha_{S1}$ - og  $\alpha_{S2}$ -kasein. Her ble peptider fra  $\alpha_{S1}$ - og  $\alpha_{S2}$ -kasein kun funnet i den fordøyde osten.

**Tabell 6.1: Oversikt over hvilke peptidfraksjoner som er funnet med opprinnelse fra de ulike melkeproteinene i Norvegia ostene (kuost).**

	$\beta$ -kasein	$\alpha_{S1}$ -kasein	$\alpha_{S2}$ -kasein	K-kasein	$\beta$ -lg
Ufordøyd ost	X	X			
HGJ60	X	X	X	X	
HDJ60	X	X	X	X	X
HDJ120	X	X	X	X	X

**Tabell 6.2: Oversikt over hvilke peptidfraksjoner som er funnet med opprinnelse fra de ulike melkeproteinene i Snøfrisk hvitost (geitost).**

	$\beta$ -kasein	$\alpha_{S1}$ -kasein	$\alpha_{S2}$ -kasein	K-kasein	$\beta$ -lg
Ufordøyd ost	X				
HGJ60	X	X	X		
HDJ60	X	X	X		
HDJ120	X		X		



Det ble identifisert mange peptider i alle ostene før og etter fordøyelse.

Figur 6.5 - 6.16 viser alle de ulike peptidfraksjoner fra de ulike melkeproteinene som ble funnet fra ufordøyd ost og fra de forskjellige trinnene av fordøyelsen (HGJ60, HDJ60 og HDJ120) for hver enkel ost (6 forskjellige oster med 2 gjentak, 2 paralleller for hvert gjentak). Resultatene kan også sees i tabellform i vedlegg 1. For alle ostene ble det funnet flest peptidfraksjon fra  $\beta$ -kasein. Norvegia-ostene inneholdt også mye peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein, mens i Snøfrisk ble det funnet et mye lavere innhold av dette.

I Norvegia-ostene dekker peptider som opprinnelig stammer fra bovint  $\beta$ -kasein alle områder i aminosyresekvensen (36-209) bortsett fra området 15-35. For Snøfrisk-ostene ble det funnet peptider som opprinnelig stammer fra caprint  $\beta$ -kasein i hele  $\beta$ -kasein aminosyresekvensen bortsett fra i området 1-6 og 15-35. Peptider fra bovint  $\alpha_{S1}$ -kasein ble funnet i områdene 1-40, 53-60, 80-114, 124-143, 150-156 og 155-159 i aminosyresekvensen. Peptider fra caprint  $\alpha_{S1}$ -kasein ble funnet i områdene 99-114, 121-142 og 150-156 i aminosyresekvensen. Peptider fra bovint  $\alpha_{S2}$ -kasein ble funnet i områdene 42-52, 71-79, 89-96, 99-125 og 147-163 i aminosyresekvensen. Peptider fra caprint  $\alpha_{S2}$ -kasein ble funnet i områdene 17-27, 70-127, 149-164 og 172-181 i aminosyresekvensen. Peptider fra bovint  $\kappa$ -kasein ble funnet i området 18-105 i aminosyresekvensen. Peptider fra bovint  $\beta$ -lg ble funnet i området 41-55 i aminosyresekvensen.

I ostene ble det observert flere kjente biologiske aktive peptider (ref:se tabell 4.4-4.6):

Peptidsekvens opprinnelig fra  $\beta$ -kasein:

- f(58-72): ACE inhiberende: Funnet i Norvegia 9 mnd II, Norvegia 15 mnd II og Norvegia økologisk I og II.
- f(60-66): Opioid: Funnet i Norvegia 3 mnd I, Norvegia 15 mnd I og II, Norvegia lettere I og II og Norvegia økologisk I og II.
- f(60-68): ACE inhiberende og immunostimulerende: Funnet i Norvegia 3 mnd II, Norvegia 15 mnd I, Norvegia lettere I og Norvegia økologisk I.
- f(70-86): ACE inhiberende: Funnet i Norvegia 3 mnd I og II, Norvegia 15 mnd I og Norvegia økologisk II.
- f(74-86): ACE inhiberende: Funnet i Norvegia 3 mnd I og II, Norvegia 15 mnd I, Norvegia lettere I og II og Norvegia økologisk I og II.
- f(193-198): Blodtrykkssenkende: Funnet i Norvegia økologisk II.
- f(193-202) Blodtrykkssenkende: Funnet i alle Norvegia-ostene, tilsvarende peptid ble også funnet i Snøfrisk I f(191-200).
- f(193-209): Antimikrobiell og immunomodulerende: Funnet i alle Norvegia-ostene.
- f(80-86) (caprint  $\beta$ -kasein): Funnet i Snøfrisk I.

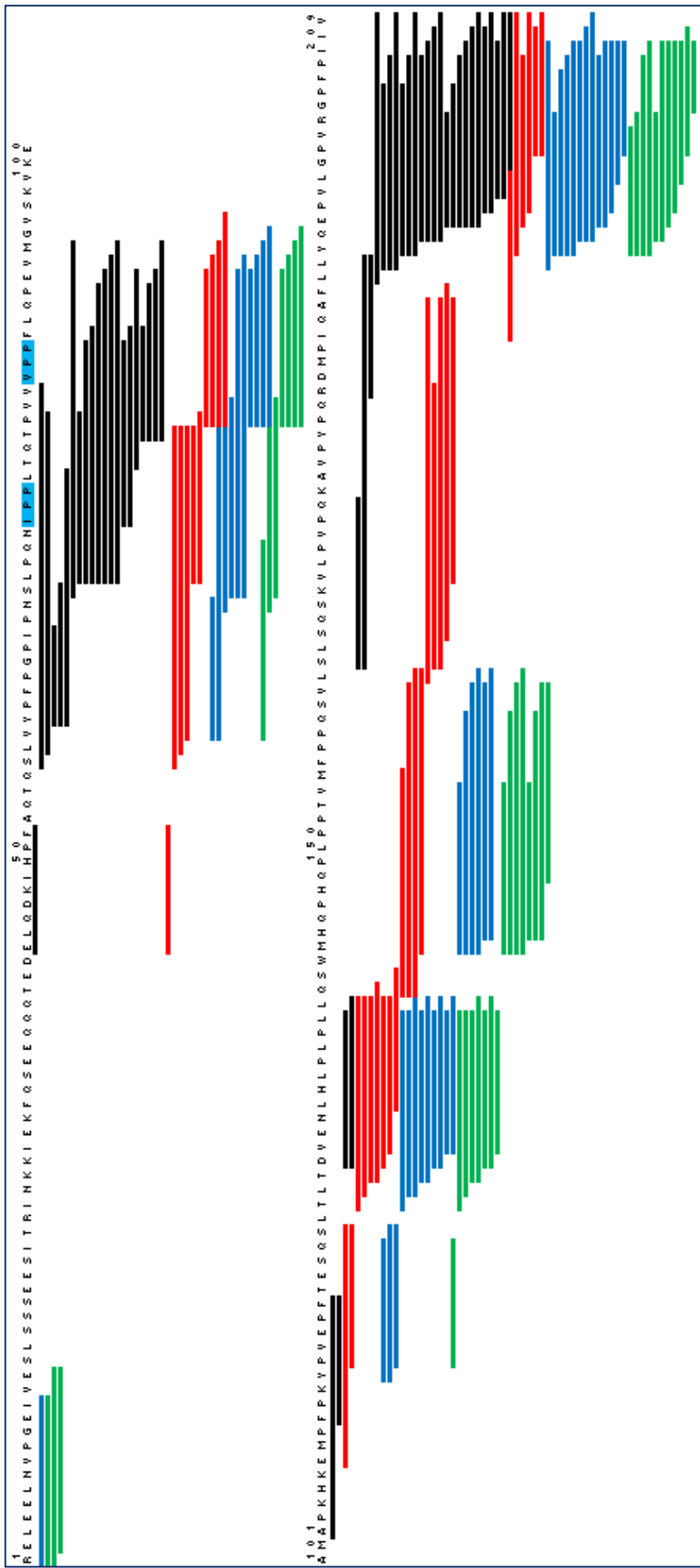
Peptidsekvens opprinnelig fra  $\alpha_{S1}$ -kasein:

- f(23-33): ACE inhiberende: Funnet i Norvegia 3 mnd I og II.
- f(99-109): Antimikrobiell: Funnet i alle Norvegia-ostene.

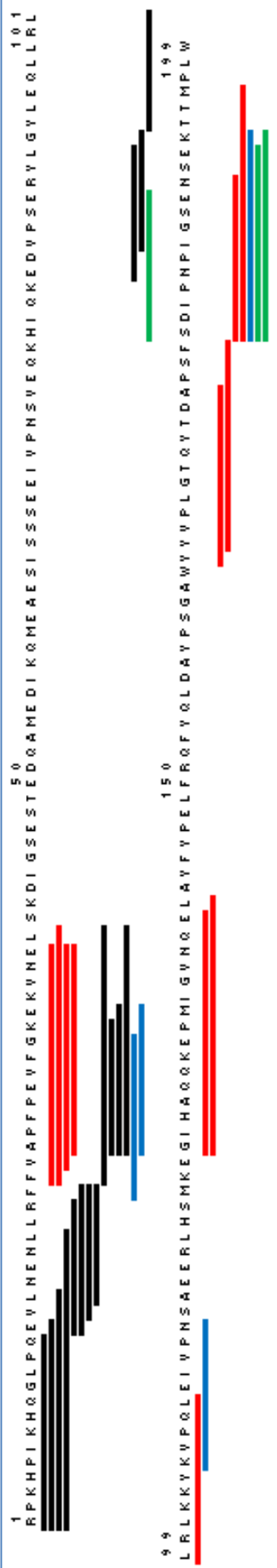
Peptidsekvens opprinnelig fra  $\alpha_{S2}$ -kasein:

- f(89-95): ACE inhiberende: Funnet i Norvegia 9 mnd II, Norvegia 15 mnd II, tilsvarende peptid er også funnet i Snøfrisk II f(90-96).

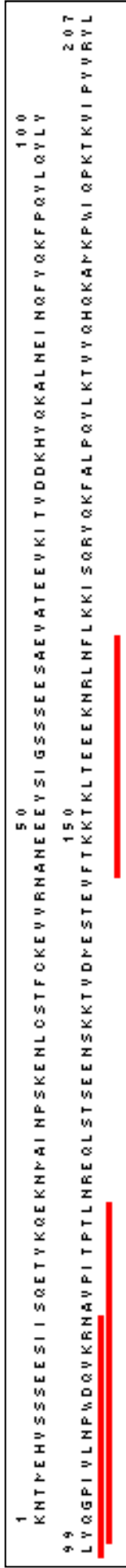
Ingen kjente bioaktive peptider fra  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -lg ble funnet i ostene.



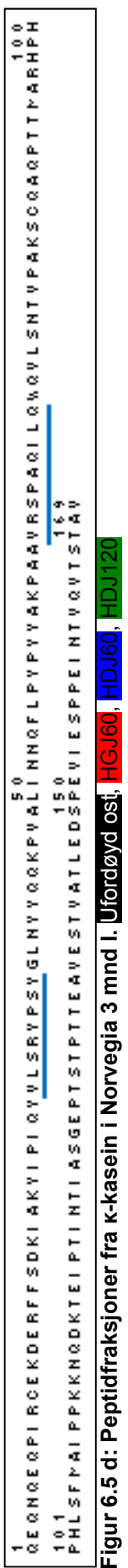
Figur 6.5 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norvegia 3 mnd i. Ufordøyd ost, HGJ60, FDJ60, FDJ120



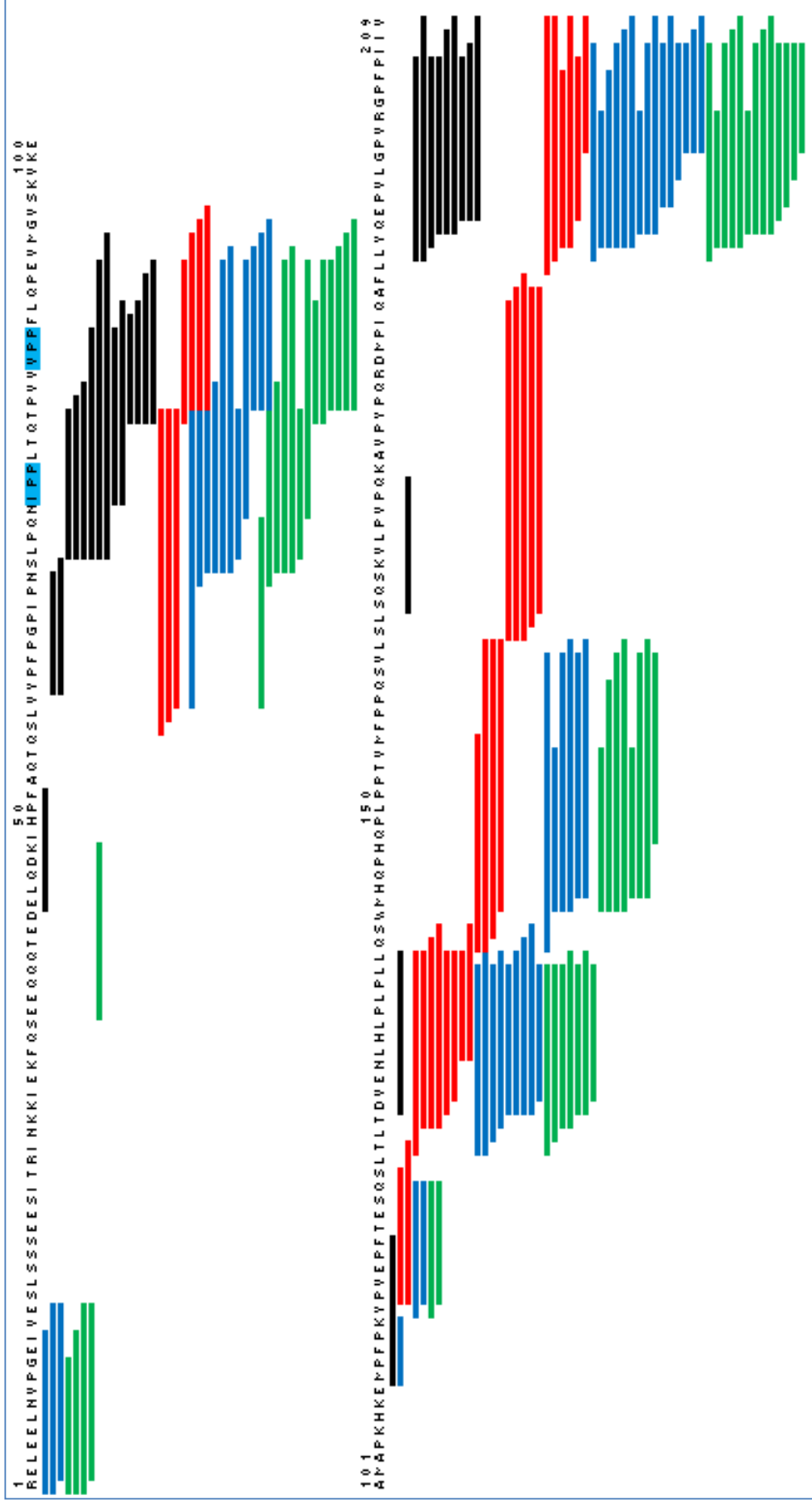
Figur 6.5 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norge og i Ufordøyd ost. **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



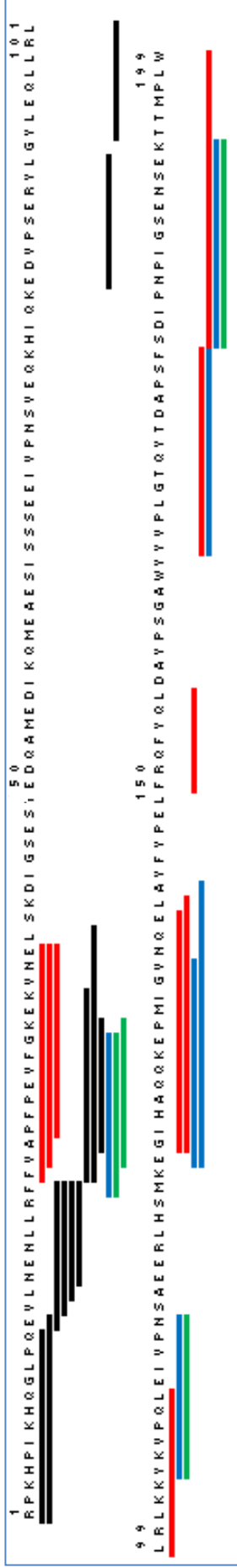
Figur 6.5 c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norge og i Ufordøyd ost. **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



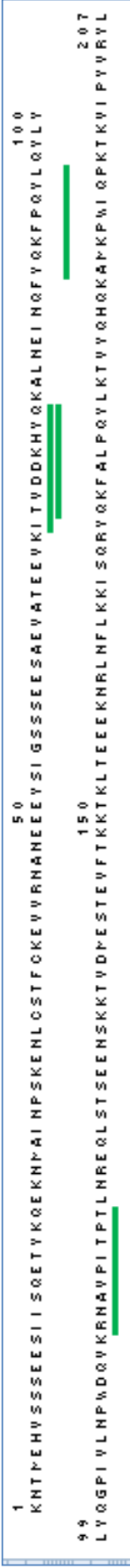
Figur 6.5 d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norge og i Ufordøyd ost. **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



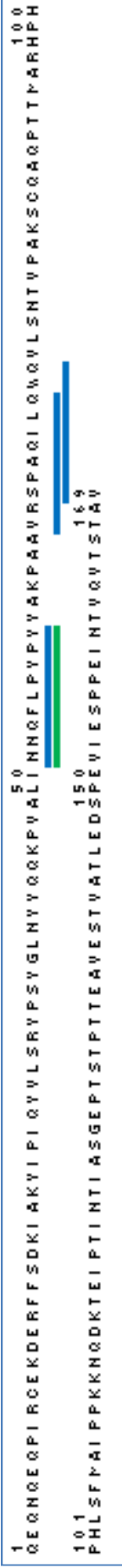
Figur 6.6 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norvegia 3 mnd II. Ufordøyd ost. **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



Figur 6.6 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norvegia 3 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120



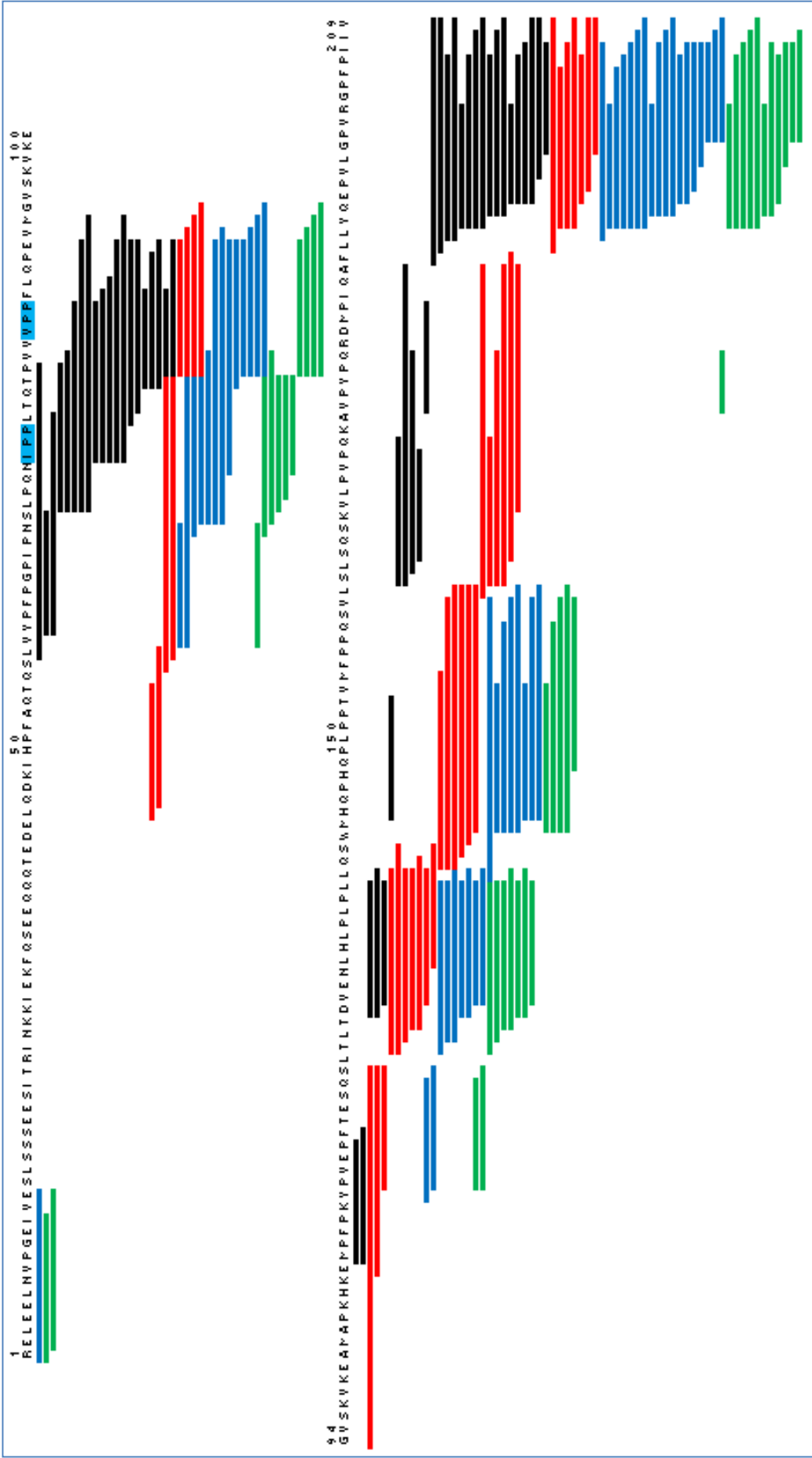
Figur 6.6 c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norvegia 3 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120



Figur 6.6 d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norvegia 3 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120



Figur 6.6 e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norvegia 3 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120



Figur 6.7 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norvegia 9 mnd I. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> RPKHPI KHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNEL SKDI GSESTEDQAMEDI KOMEAESI SSSEEI VPNSVEQKHI QKEDVPSERYLGYLEQLRL <sup>50</sup>  
<sup>9 9</sup> LRLKKYKVPQLEI VPNSAEERLHSMKEGI HAQQKEPMI GVNQELAYFYPELFRQFYQDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDI PNPI GSENSEKTIIMPLW <sup>199</sup>

Figur 6.7 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia 9 mnd I. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120

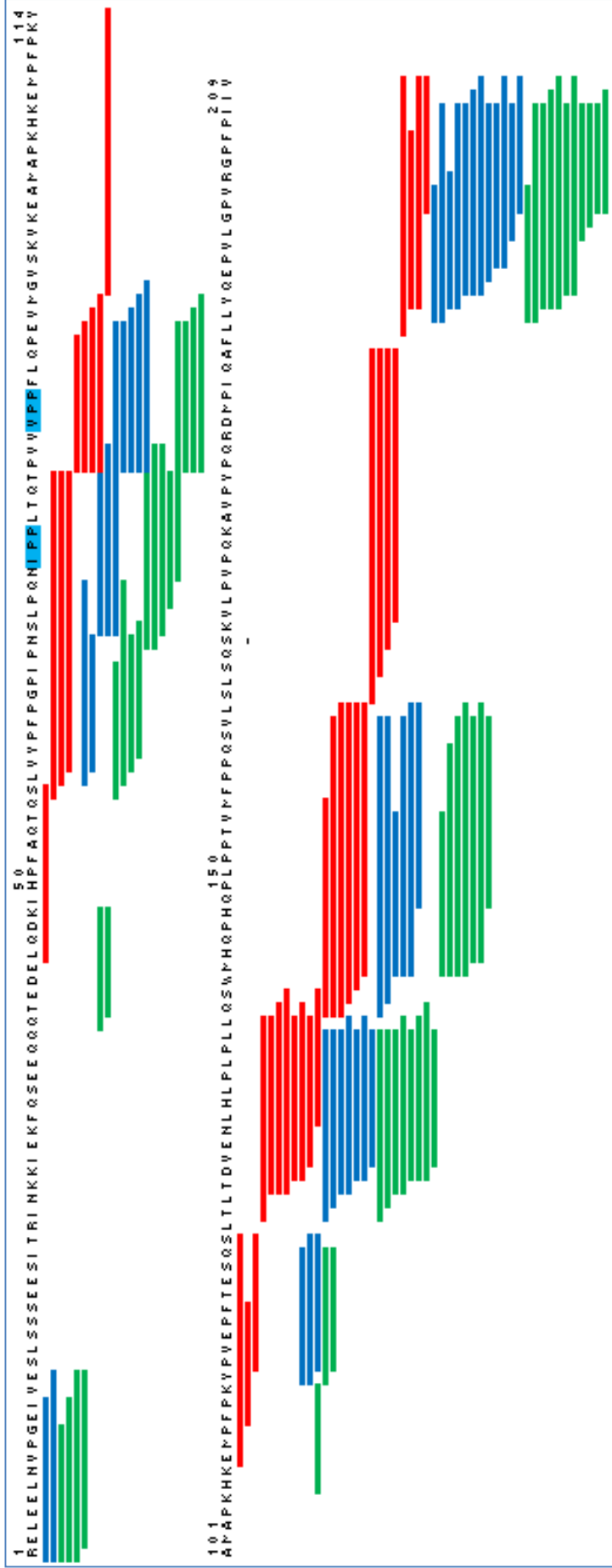
<sup>1</sup> QEQNQEQPI ROEKDERFFSDKI AKYIPI QYVLSRYPSYGLNYQQKPVALINNOFLPYPYAKPAAVRSPAQI LQWQVLSNTVPKSCQAQPTT<sup>50</sup>MARHPHPLLSF <sup>105</sup>  
<sup>101</sup> PHLSPAI PPKKHQDKTEI PTINTI ASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVI ESPPEINTVQYVSTAV <sup>169</sup>

Figur 6.7 c: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia 9 mnd I. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120

<sup>1</sup> LI V T Q T P K G L D I Q K V A G T W Y S L A P A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L O K W E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A V F K I D A L N E N K V L V L D T D Y K <sup>50</sup>  
<sup>101</sup> KYLLFCPENSAPPEQSLAQCCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPPI RLSPNPTQLLEEQCHI <sup>162</sup>

Figur 6.7 d: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia 9 mnd I. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120





Figur 6.8 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norvegia 9 mnd II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> RPKHPI KHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKYNELSKDIGSESTEDQAMEDIKOMEAESISSSEEVVNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLRL <sup>101</sup>  
<sup>50</sup>  
<sup>99</sup> LRLKVKVPOLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNOELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYVPLGTQYTDAPFSFDI PNPI GSENSEKTI MPLW <sup>199</sup>

Figur 6.8 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{s1}$ -kasein i Norgeia 9 mnd II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> KNTMEHVSSSEESIISOETVKQEKNPAINPSKENLQSTFCKEVVRNANEEYSIGSSSEESAEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQFYQKFPQYLVLY <sup>100</sup>  
<sup>50</sup>  
<sup>99</sup> LYQGPIVLNPWQVKNNAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTYDMESTEVEFTKKTLEEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQKAMPKI QPKTKVIPPYRYL <sup>207</sup>

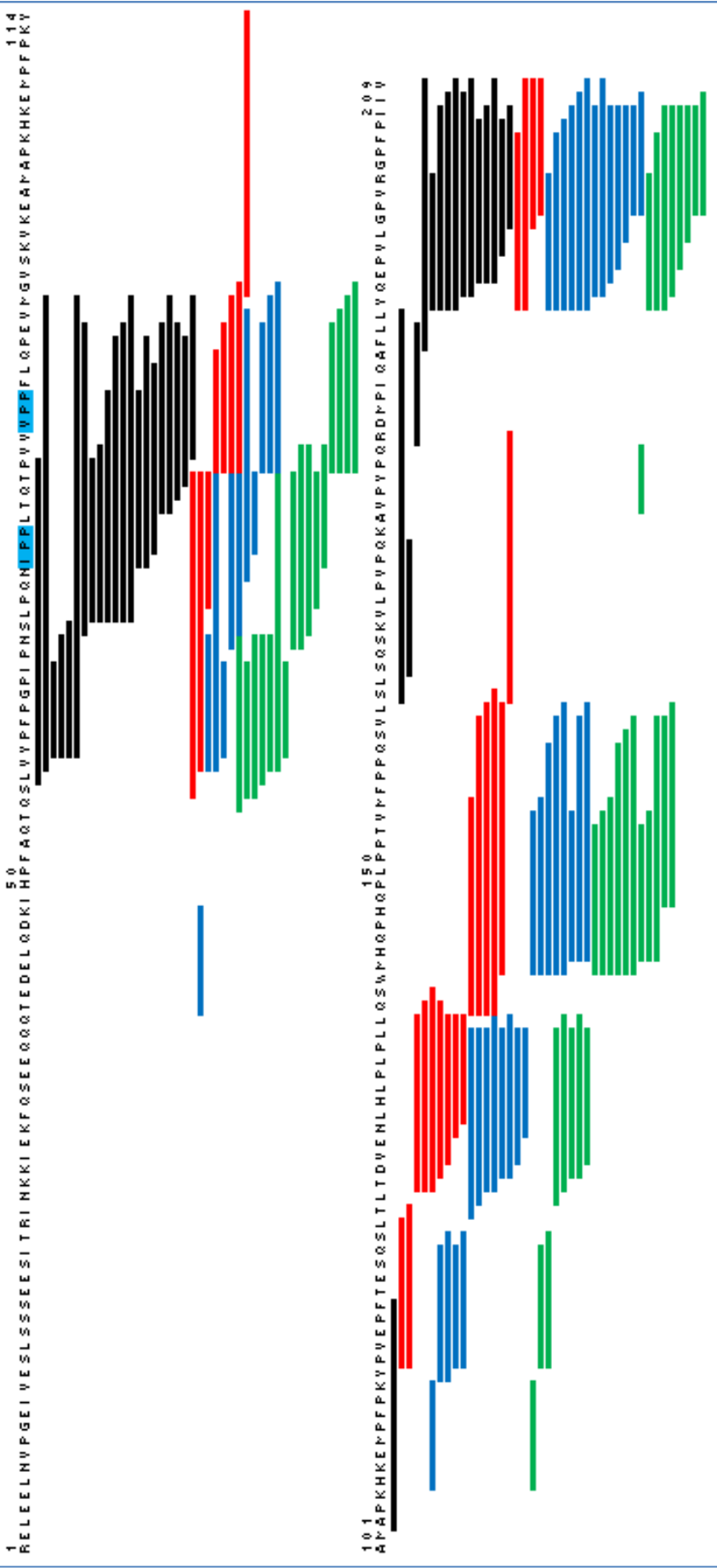
Figur 6.8 c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{s2}$ -kasein i Norgeia 9 mnd II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> QEQNQEQPIROEKDERFFSDKI AKYIPIQVVLRSYPSYGLNYQKPPVALI NNQFLPYPYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTVPKSCQAQPTTMMARHPHLSF <sup>105</sup>  
<sup>50</sup>  
<sup>101</sup> PHLSPFAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV <sup>169</sup>

Figur 6.8 d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia 9 mnd II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> LIVTQTPKGLDIQKVAGTWYSLAPAAASDILLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWENGEQAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYK <sup>100</sup>  
<sup>50</sup>  
<sup>101</sup> KYLLFQENSAEPEQSLACQOLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPNHIRLSFNPTQLEEQCHI <sup>162</sup>

Figur 6.8 e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia 9 mnd II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



Figur 6.9 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norvegia 15 mnd i. **Ufordøyd ost**, **HGJ160**, **HDJ160**, **HDJ120**

<sup>1</sup> RPKHPI KHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFFPEVFGKEKYNEL SKDI GSESTEDQAMEDI KQMEAESI SSSEEI VPNSVEQKHI QKEDVPSERYLGYLEQLRL <sup>50</sup>  
<sup>99</sup> LRLKKYKVPQLEI VPNSAEERLHSMKEGI HAQQKEPMI GVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYVPLGTQYTDAPSFSDI PNPI GSENSEKTTMPLW <sup>101</sup>

Figur 6.9 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norvegia 15 mnd i. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> QEQNGEQPI ROEKDERFFSDKI AKYI PI QYVLSRYPSYGLNYVQKPVALINNOFLPYVYAKPAVRSPAQI LQWQVLSNTVPAKSOQAQPTT<sup>50</sup>VARHPH <sup>100</sup>  
<sup>101</sup> PHLSFYAI PPKKNQDKTEI PTINTI ASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVI ESPPEINTVQVTSTAV <sup>150</sup>  
<sup>169</sup>

Figur 6.9 c: Peptidfraksjoner fra k-kasein i Norvegia 15 mnd i. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> LI VTQTPKGLDI QKVAGT<sup>50</sup>WYSLAPAAASDI SLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEI LLOKWENGECAQKKI IAEKTKI PAVFKI DALNENKVLVLDTOYK <sup>100</sup>  
<sup>101</sup> KYLLFQMPNSAEPEQSLAQOCLVRTPEYDDEALEKFDKALKALP<sup>150</sup>PHI RLSFNPTQLEEQCHI <sup>162</sup>

Figur 6.9 d: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norvegia 15 mnd i. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



<sup>1</sup> RPKKHP I KHQGLPQEV L NENLLRFFVAPFFPEVFGKEKVMEL SKDI GSESTEDQAMED I KQMAESI SSSEEI VFNHVEQKHI QKEDVPSERYLGYLEQLLRL <sup>50</sup>  
<sup>99</sup> LRLKKYKVPQLEI VVNSAEERLHSMKEGI HAQQKEPMI GVNQELAYFYPELFRQFYQOLDAYPSGAWVYVPLGTQYTDAPSFSDI PNPI GSENSEKTIIMPLW <sup>101</sup>  
<sup>150</sup>

Figur 6.10 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia 15 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120

<sup>1</sup> KNTMEHVSSSEESI I SOETYKQEKHPAI NPSKENLQSTFOKEVVRNANEEYYSI GSSSEESAEVATEEVKI TVDDKHYOKALNEI NQFYQKFPQYLOYLY <sup>50</sup>  
<sup>99</sup> LYQGP I VLNFWQVQRNAVPI TPTLNREQLSTSEENSKKTVDPESTEVEFTKTKL TEEKRNLF LKKI SORYOKFALPOYLKTVQHQKAKPWI QPKTKVI PVVRYL <sup>207</sup>

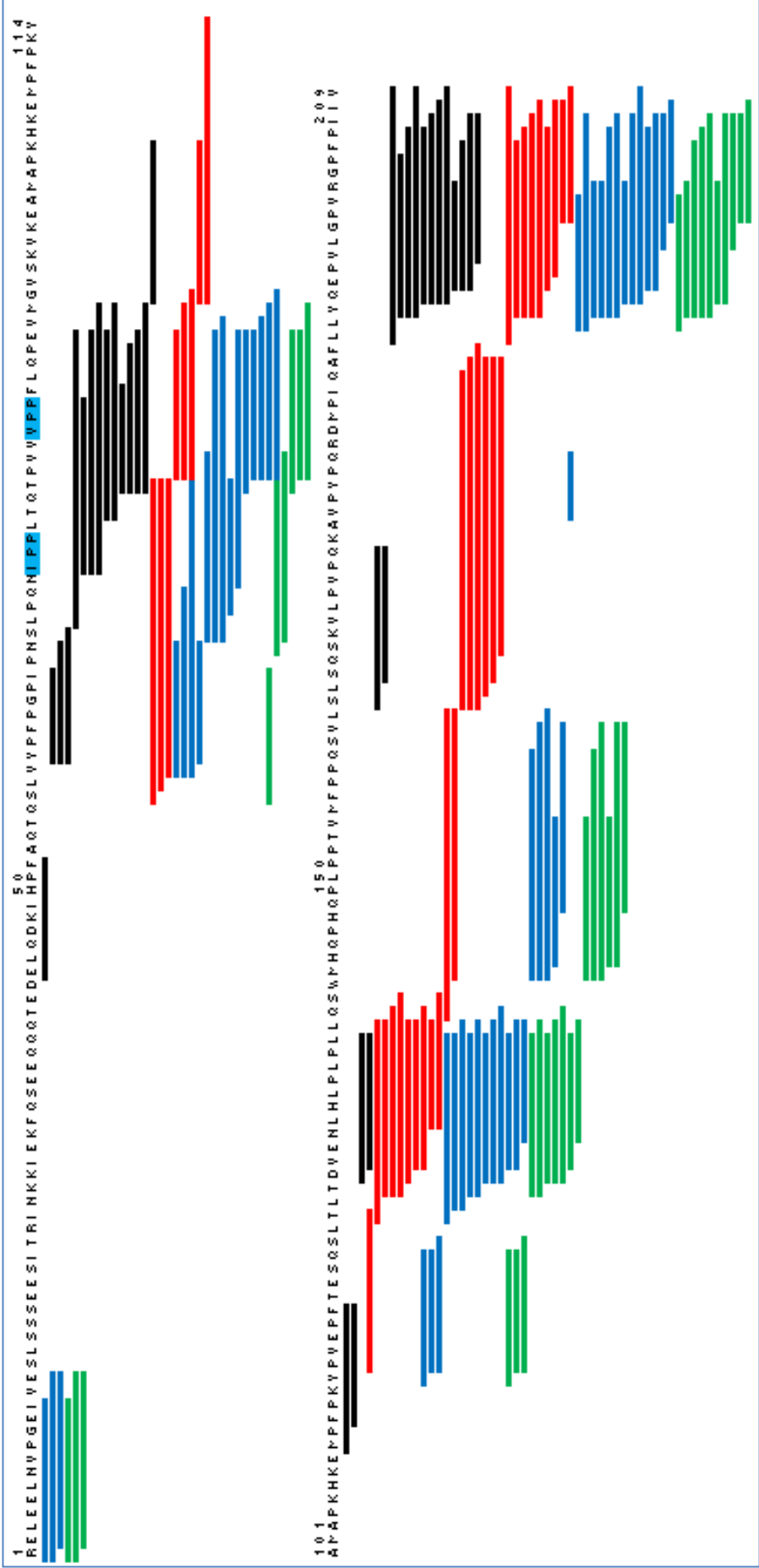
Figur 6.10 c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norgeia 15 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120

<sup>1</sup> QEQNQEQPI RCEKDERFFSDKI AKYI PI QYVLSRYPYGLNYYQKPPVALI NNQFLPYPYVAKPAVRSQACI LQWQVLSNTVPAKSCCAQOPTTMRHPH <sup>50</sup>  
<sup>101</sup> PHLSFMAI PPKKNQDKTEI PTINTI ASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVI ESPPEI NTVQVTSTAV <sup>169</sup>

Figur 6.10 d: Peptidfraksjoner fra k-kasein i Norgeia 15 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120

<sup>1</sup> LI V TQTPKGLDI QKVAGT WYSLAPAAASDI SLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEI LLOKWENGECAQKKI I AEKTKI PAVFKI DALNENKVLVLDTDYK <sup>50</sup>  
<sup>101</sup> KYLLFCPENSAAEPEQSLAQOCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPPIH I RLSFNPTQLEEQCHI <sup>162</sup>

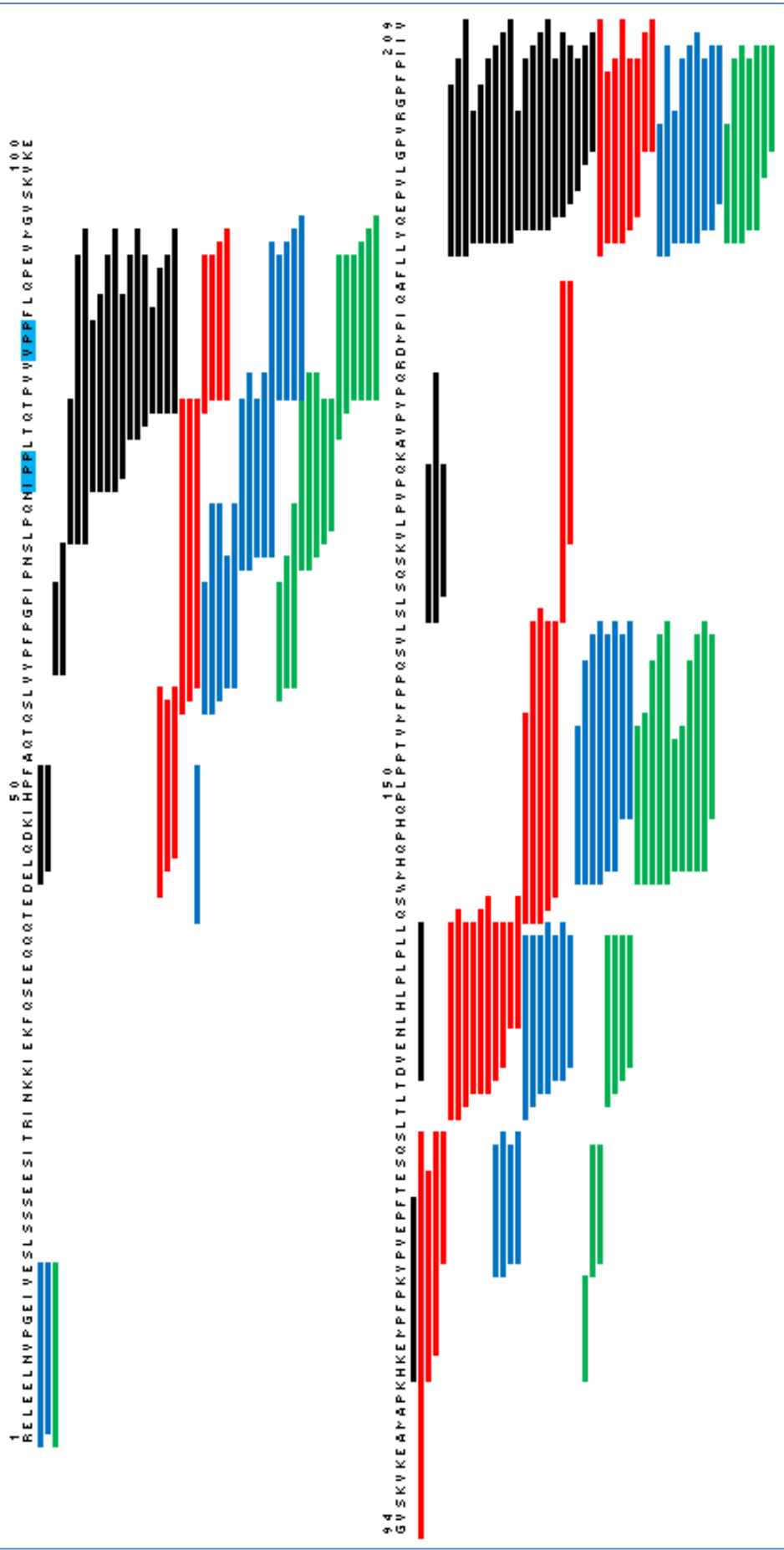
Figur 6.10 e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia 15 mnd II. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120



Figur 6.11 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norvegia lettere i. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**







Figur 6.12 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norvegia lettere II. Ufordøyd ost, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> RPKHPI KHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFFPEVFGKEKVNELSKDI GSESTEDQAMEDI KQMEAESI SSSEEI VPNSVEQKHI QKEDVPSERYLGYLEQLRL <sup>50</sup>  
<sup>99</sup> LRLKKYKVPQLEI VPNSAEERLHSMKEGI HAQQKEPHI GVNQELAVFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYVYPLGTQYDAPFSFSDI PNPI GSENSEKTTMPLW <sup>101</sup>

Figur 6.12 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norvegia lettere II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> KNTMEHVSSSEESI <sup>50</sup> SOETVYKQEKNP<sup>AI</sup> NPSKENLQSTFCKEYVRNANEEYYSI <sup>100</sup> GSSEESAEVATEEVKI TYDDKHYQKALNEI NQFYQKFPQYLOYLY <sup>150</sup>  
<sup>99</sup> LYQGPI VLNPMQOVKRN<sup>AVPI</sup> TPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKKTKLTEEEKNRLN<sup>FLKKI</sup> SORYQKFA<sup>LPQV</sup>LKTVYQHOKAK<sup>KPMI</sup> QPKTKVI PVVRYL <sup>207</sup>

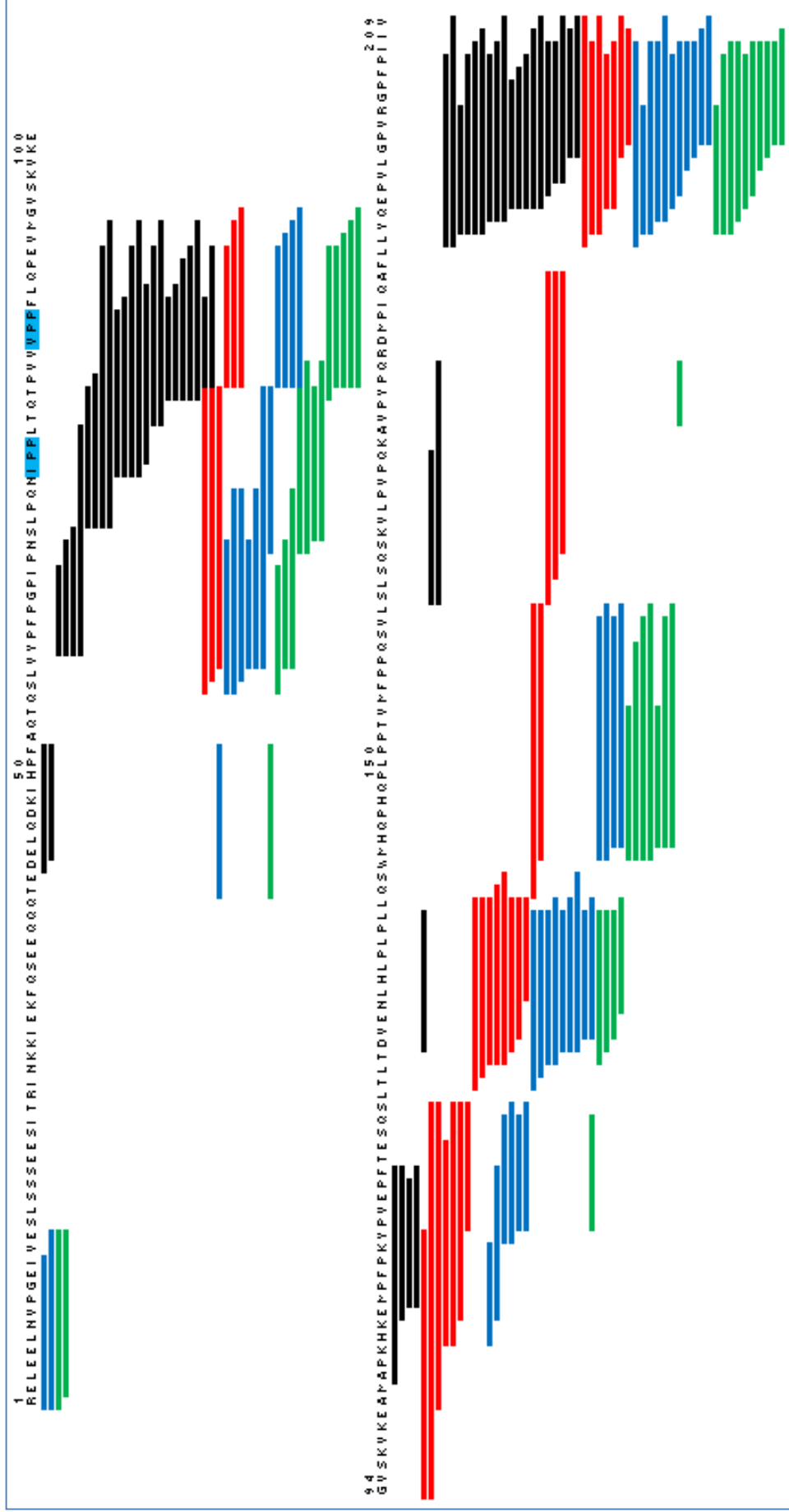
Figur 6.6 12: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norvegia lettere II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> QEQNQEQPI ROEKDERFFSDKI AKYIPI QVVL<sup>SRYP</sup>SVGLNVYQKPV<sup>ALI</sup> NNQFLPYPYVAKPAVRS<sup>PAQI</sup> LQWQVLSNTVPAKSCQAOPTT<sup>MAR</sup>HPH <sup>50</sup>  
<sup>101</sup> PHL<sup>SF</sup>MAI PPKKNQDKTEI<sup>PTI</sup>NTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVI <sup>169</sup> ESPPEI<sup>NT</sup>VQVTSTAV

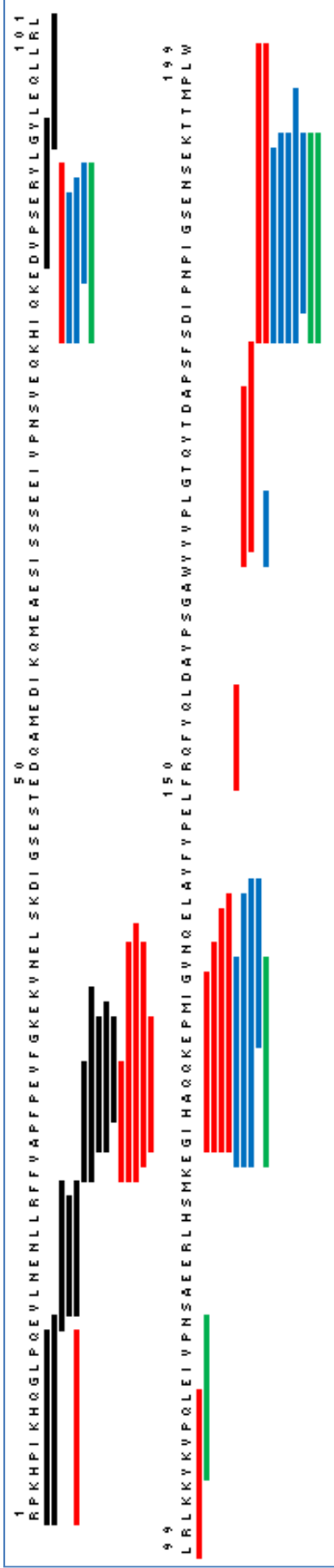
Figur 6.12 d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norvegia lettere II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> LIVTQTYKGLDI QKVAGT<sup>WYSL</sup>APAA<sup>SDI</sup> SLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEI <sup>50</sup> LLOK<sup>WENGE</sup>CAQK<sup>KI</sup> IAEKTKI PAVFKI DALNENK<sup>V</sup>LVLD<sup>T</sup>DYK <sup>100</sup>  
<sup>101</sup> KYLLFQENSAEPEQSLAQOOLV<sup>R</sup>TPEV<sup>DD</sup>EAL<sup>E</sup>KFDK<sup>AL</sup>PHI RLSFNPTOLEEQCHI <sup>162</sup>

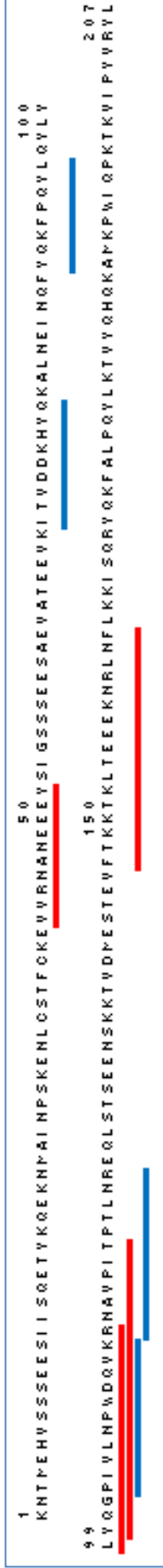
Figur 6.12 e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norvegia lettere II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



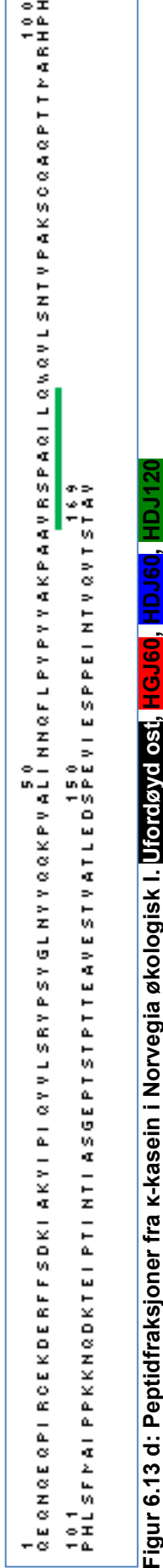
Figur 6.13 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norgeia økologisk i. Ufordøyd ost, HGJ60, HDJ60, HDJ120



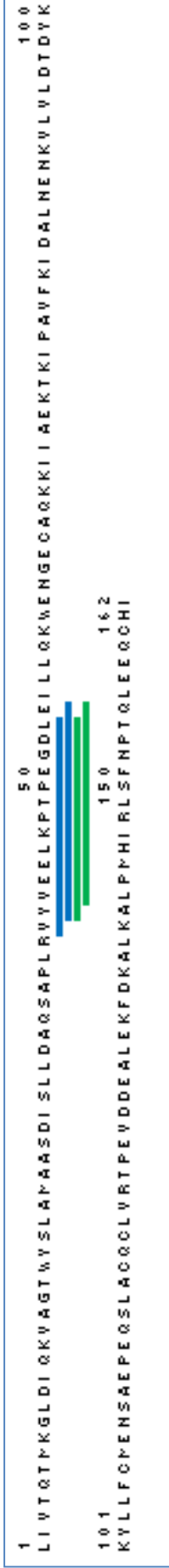
Figur 6.13 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia økologisk i. Ufordøyd ost, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



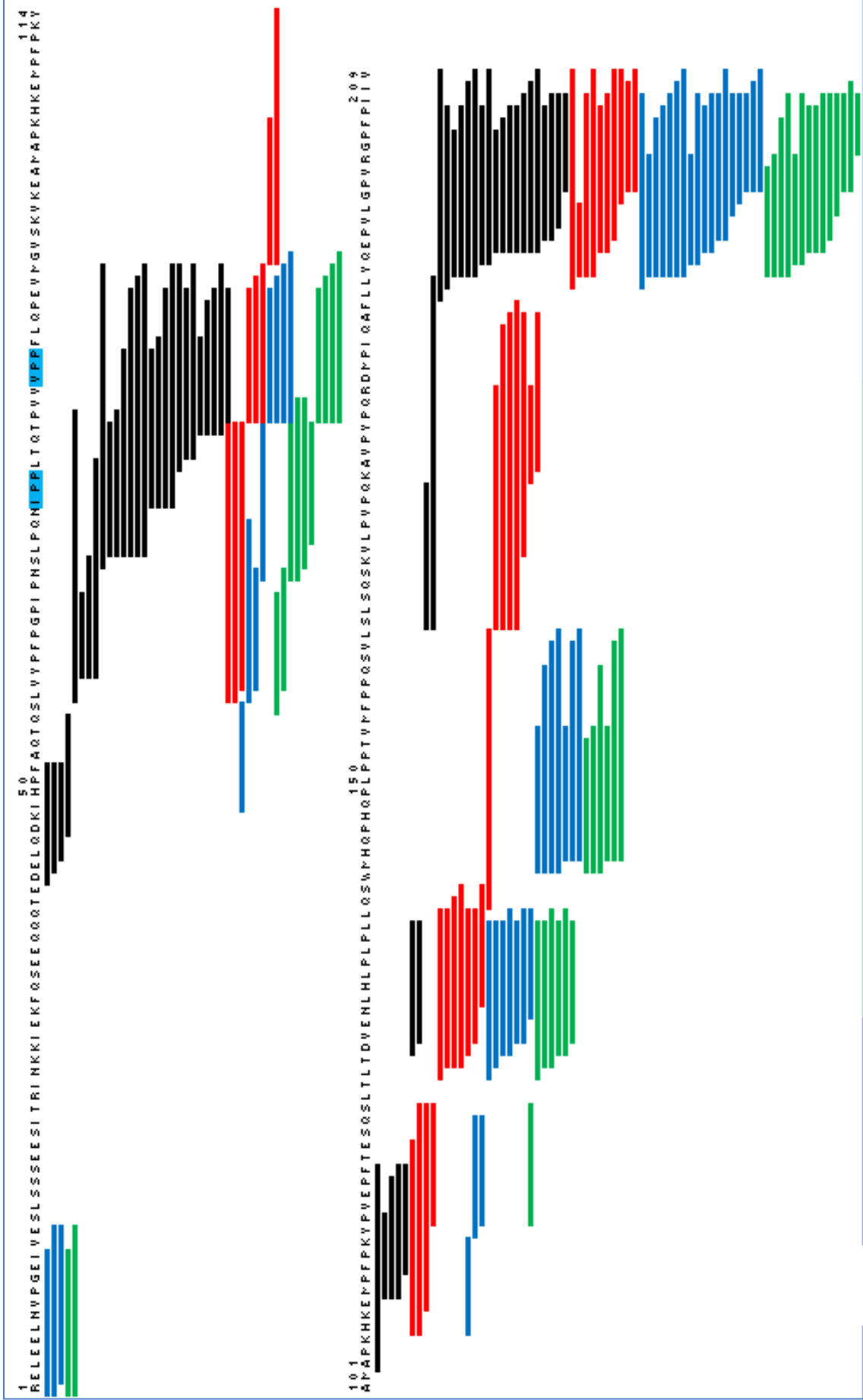
Figur 6.13 c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norgeia økologisk i. Ufordøyd ost, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



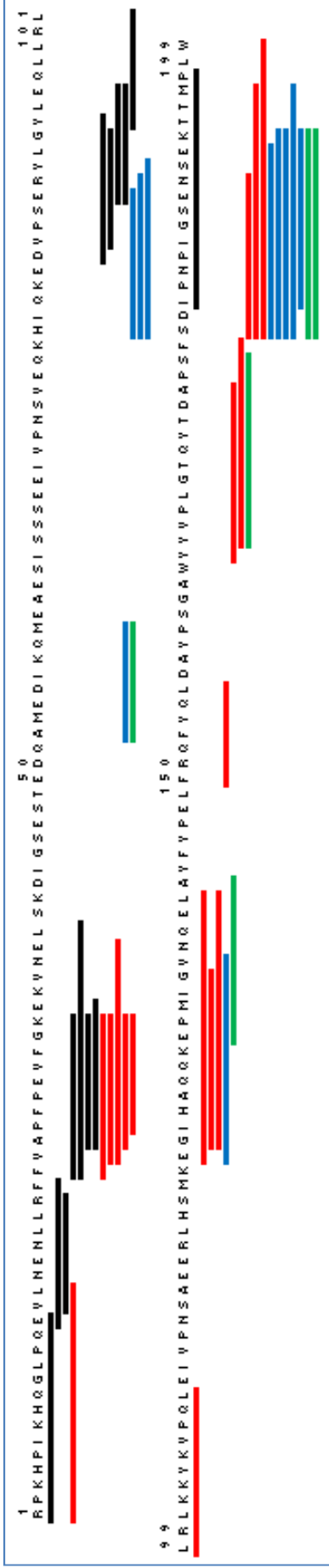
Figur 6.13 d: Peptidfraksjoner fra k-kasein i Norgeia økologisk i. Ufordøyd ost, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



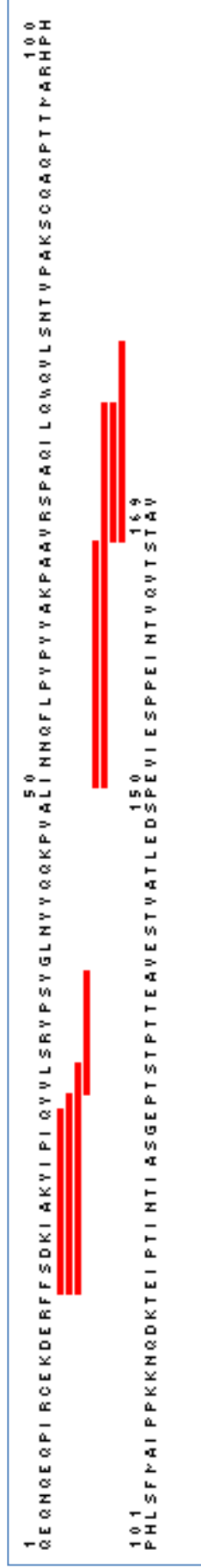
Figur 6.13 e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia økologisk i. Ufordøyd ost, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



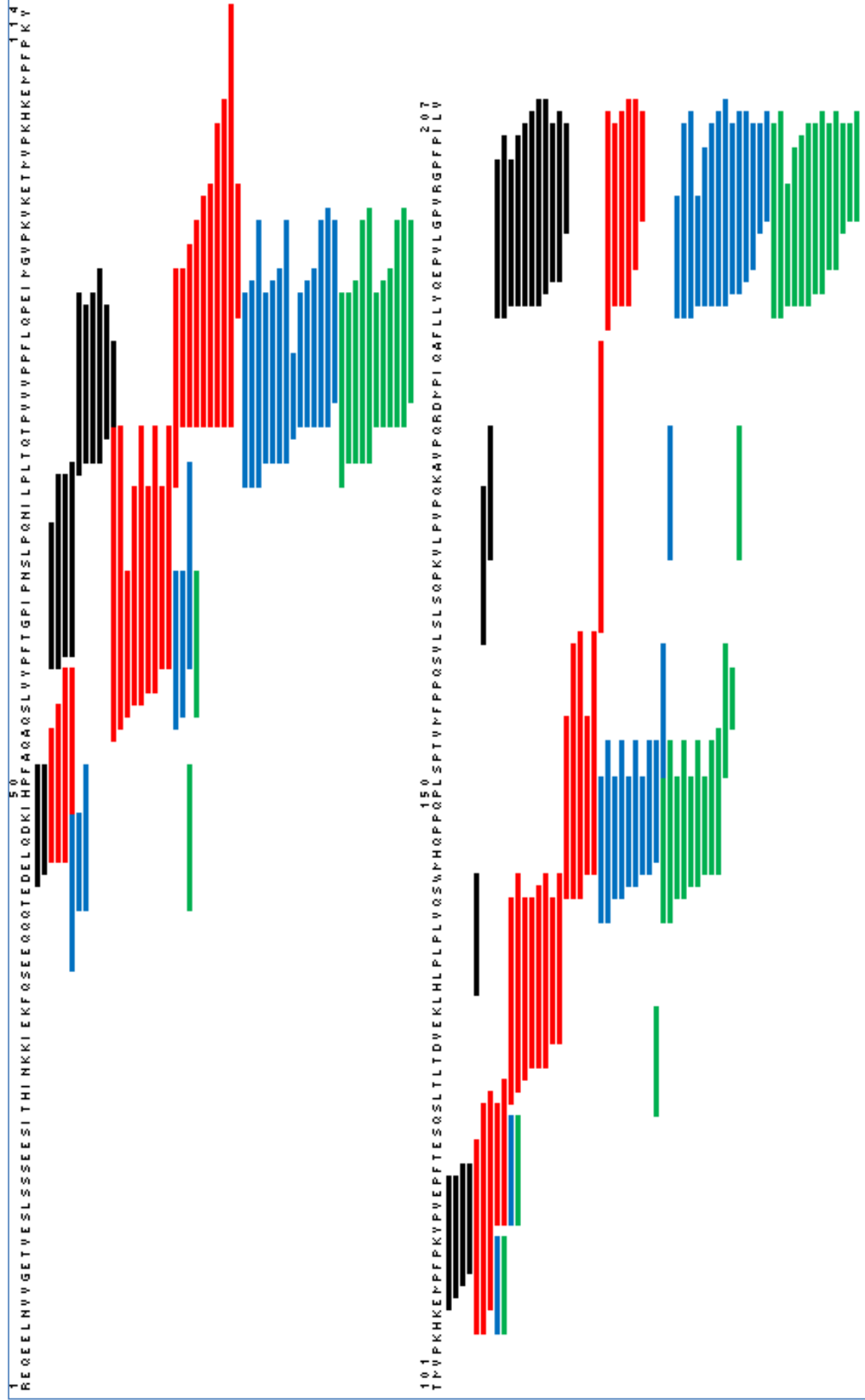
Figur 6.14 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norgeia økologisk II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



Figur 6. 14 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_1$ -kasein i Norvegia økologisk II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



Figur 6. 14 c: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norvegia økologisk II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**



Figur 6.15 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Snøfrisk hvitost i. Ufordøyd ost, HG-J60, HD-J60, HD-J120

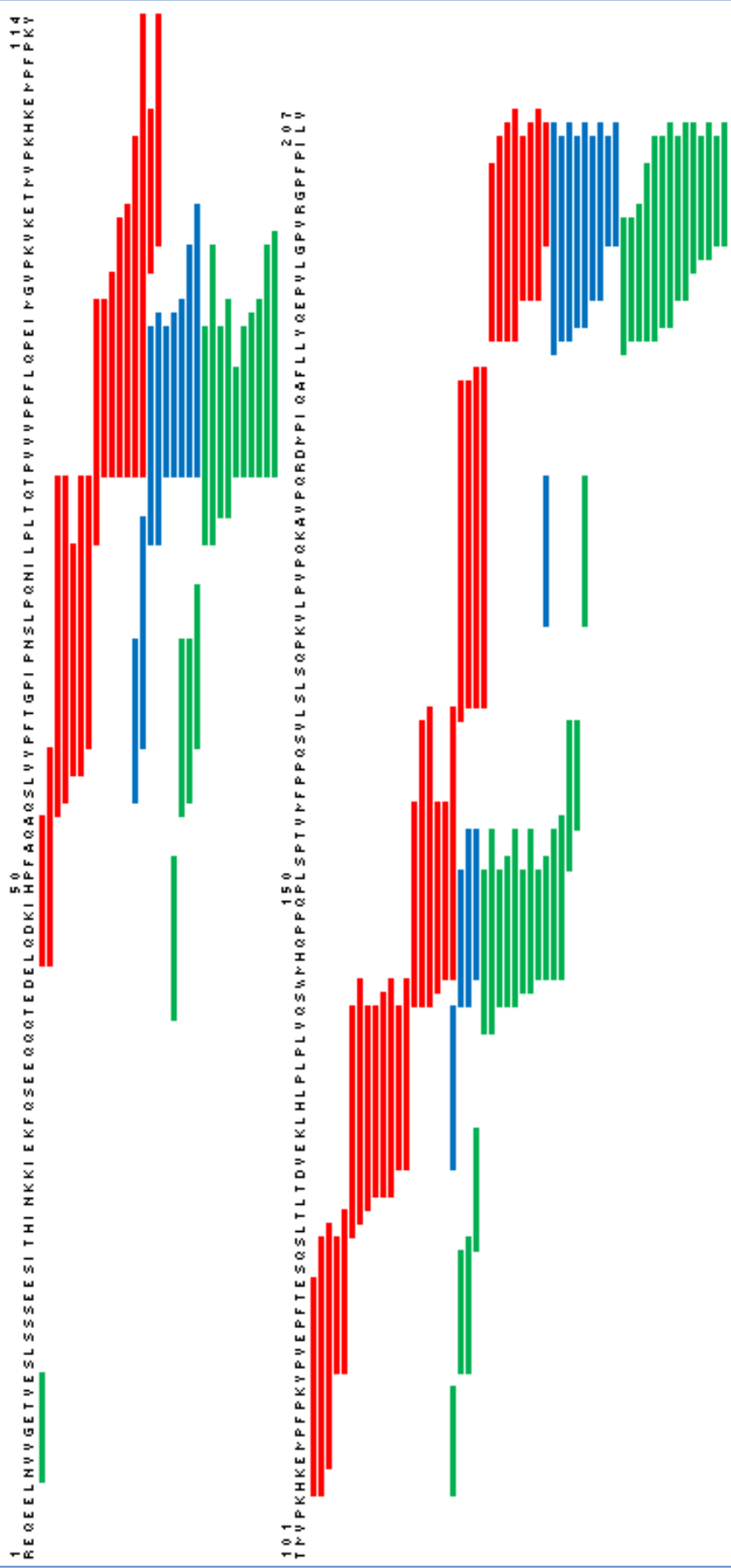
<sup>1</sup> RP KHP I NHRGLSPEV PNE NLLRFV VAPFPEVFRKENI NELS KDI GSESTEDQAMEDAKOMKAGSSSSSEE I VPNSAEQKY I QKEDVPSEERYLGYLEQLLR <sup>50</sup> <sup>100</sup>  
<sup>99</sup> LRLKKYVPOLE I VPKSAEEQLHSMKEGNPAHQKOPMI AVNQELAYFY PQLFRQFYQLDAYPSGAWYYLPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGKTTMPLW <sup>150</sup> <sup>199</sup>

Figur 6. 15 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Snøfrisk hvitost i. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> KHKMEHYSSSEEPINIFQELVKQEKNNMAI HPRKEKLCOTTSCEEVVRNANEEEEYSIRSSSEESA EVAPEEIKITVDDKHYOKALNEINQFYOKFPQYLYPP <sup>50</sup> <sup>100</sup>  
<sup>97</sup> LQVPYQGP I VLNPFWDQV KRNAGPFTPTV NREQLSTSEENSKKTI DMESTE VFTKKTKL TEEKNRLNFKKISQYVQKFAWPOYLKTV DQHQKAMKFWTQPKTNAI P Y V R Y L <sup>150</sup> <sup>200</sup>

Figur 6. 15 c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Snøfrisk hvitost i. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**





Figur 6.16 a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Snøfrisk hvitost II. Ufordøyd ost, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**

<sup>1</sup> RPKHPINHRGLSPVPNENLLRFVVAPFFPEVFRKENINELSKDIGSESTEDQAMEDAKQMKAGSSSSSEEEIVPNSAEQKYIQKEDVPSERYLGYLEQLLR<sup>100</sup>  
<sup>99</sup> LRLKKYNVPOLEIVPKSAEEQLHSMKEGPNFAHQKQPMIAVNQELAYFPQLFRQFYQLDAYPSGAWYYLPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGKTTMPLW<sup>199</sup>

Figur 6.16 b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Snøfrisk hvitost II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**.

<sup>1</sup> KHKMEHVSSSEEPINIFQEIYKQEKNMAIHPRKEKLOTTSCQEEVVRNANEEVYSIRSSSEESAELVAPPEEKITVDDKHVQKALNEINQFYQKFPQYLQVP<sup>100</sup>  
<sup>97</sup> LQYPYQGPVILNPNWDQVKKRNAGPFTPTVYNREQLSTSEENSKKTI DMESTE VFTKKTKLTEEEKNRLNFKKISQYYQKFAWPQYLKTYDQHQKAMKFWTQPKTNAIPYVRYL<sup>208</sup>

Figur 6.16 c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Snøfrisk hvitost II. **Ufordøyd ost**, **HGJ60**, **HDJ60**, **HDJ120**.

Noen peptider var stabile under hele fordøyelsen. Tabell 6.3 og 6.4 viser peptider som opprinnelig stammer fra bovint og caprint  $\beta$ -kasein som er stabile gjennom fordøyelsen. Resultatene viser at de stabile peptidene for Norvegia-ostene ligger i områdene 59-94, 115-119, 128-142, 144-163 og 193-208 i aminosyrerekken til  $\beta$ -kasein. I Snøfrisk-ostene ligger de stabile peptidene i områdene 57-68, 78-97, 170-180 og 191-206 i aminosyrerekken til  $\beta$ -kasein. Peptidene YQEPVLGPVRGPFPI og PVLGPVRGPFPI (markert i gult) er stabile peptider i både Norvegia-ostene og Snøfrisk-ostene. De stabile peptidene YQEPVLGPVR f(193-202) og YQEPVLGPVRGPFPIIV f(193-209) (markert i rosa) er også kjente bioaktive peptider. Peptidet YQEPVLGPVR er antatt for å være blodtrykkssenkende og peptidet YQEPVLGPVRGPFPIIV har en antatt immunomodulerende og antimikrobiell virkning.

**Tabell 6.3: Stabile peptider som stammer fra bovint  $\beta$ -kasein i Norvegia-ostene.**

Peptider markert i rosa er kjente bioaktive peptider. Peptider markert i gult finner man også igjen som stabilt peptid i Snøfrisk.

Peptid	Fra	Til	Ost	ufordøyd ost	HGJ 60	HDJ 60	HDJ 120
VYPPFGPIHNSLPQNIPPLTQT	59	80	Norvegia 15 mnd I		X	X	X
SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEV	69	92	Norvegia 15 mnd II	X		X	X
TPVVVPPFLQPE	80	91	Norvegia 3 mnd II	X	X		X
			Norvegia lettere I	X		X	X
			Norvegia lettere II	X	X		X
PVVVPPFLQPE	81	91	Norvegia 3 mnd I, Norvegia 9 mnd II, Norvegia 15 mnd I og II, Norvegia lettere I og II		X	X	X
			Norvegia 9 mnd I, Norvegia økologisk I og II	X	X	X	X
PVVVPPFLQPEV	81	92	Norvegia 3 mnd I, Norvegia 9 mnd I og II, Norvegia lettere II, Norvegia økologisk II		X	X	X
PVVVPPFLQPEVM	81	93	Norvegia 3 mnd II, Norvegia 9 mnd I og II, Norvegia 15 mnd I, Norvegia lettere I og II, Norvegia økologisk I og I		X	X	X
PVVVPPFLQPEVMG	81	94	Norvegia 3 mnd II, Norvegia 9 mnd I, Norvegia 15 mnd I, Norvegia økologisk I		X	X	X
PVEPFTESQS	115	124	Norvegia 9 mnd I		X	X	X
TDVENLHLPLLL	128	140	Norvegia 3mnd II, Norvegia 9 mnd II, Norvegia 15 mnd I og II, Norvegia lettere I		X	X	X
DVENLHLPLPL	129	139	Norvegia lettere I, Norvegia økologisk I og II	X		X	X
DVENLHLPLLL	129	140	Norvegia 3 mnd I og II	X	X	X	X
			Norvegia 15 mnd II, Norvegia lettere I, Norvegia økologisk II		X	X	X
			Norvegia lettere II	X	X	X	
VENLHLPLPL	130	139	Norvegia økologisk II	X		X	X
VENLHLPLLL	130	140	Norvegia 15 mnd I og II		X	X	X
NLHLPLLL	132	140	Norvegia 15 mnd II	X		X	X
MHQPHQLPPTVMFPPQSVL	144	163	Norvegia 3 mnd II, Norvegia 9 mnd I og II, Norvegia økologisk I		X	X	X
YQEPVLGPVR	193	202	Norvegia 9 mnd I, Norvegia 15 mnd I, Norvegia økologisk I	X		X	X
YQEPVLGPVRGPF	193	205	Norvegia 15 mnd I		X	X	X
YQEPVLGPVRGPF	193	206	Norvegia 9 mnd I	X		X	X
			Norvegia lettere I og II	X	X	X	X
YQEPVLGPVRGPFPI	193	207	Norvegia 9 mnd I, Norvegia lettere I, Norvegia økologisk II		X	X	X
			Norvegia 15 mnd II, Norvegia lettere II	X		X	X
			Norvegia økologisk I	X	X	X	X
YQEPVLGPVRGPFPII	193	208	Norvegia 9 mnd I	X		X	X
YQEPVLGPVRGPFPIIV	193	209	Norvegia 3 mnd II		X	X	X
			Norvegia 9 mnd I	X	X	X	X
			Norvegia 15 mnd I og II, Norvegia økologisk II	X	X	X	
QEPVLGPVRGPF	194	206	Norvegia lettere II	X	X	X	X
QEPVLGPVRGPFPI	194	207	Norvegia lettere II, Norvegia økologisk I	X		X	X
QEPVLGPVRGPFPIIV	194	209	Norvegia 3 mnd II	X		X	X
EPVLGPVRGPF	195	206	Norvegia 3 mnd I	X	X	X	
			Norvegia 9 mnd I, Norvegia økologisk I og II	X	X	X	X
PVLGPVRGPFPI	196	207	Norvegia økologisk I og II	X		X	X
PVRGPFPI	200	207	Norvegia økologisk II	X		X	X
PVRGPFPII	200	208	Norvegia lettere I, Norvegia økologisk I og II		X	X	X

**Tabell 6.4: Stabile peptider som stammer fra caprint  $\beta$ -kasein i Snøfrisk-ostene.** Peptider markert i gult finner man også igjen som stabilt peptid i Norvegia-ostene.

Peptid	Fra	Til	Ost	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
SLVYPFTGPIPN	57	68	Snøfrisk I		X	X	X
TQTPVVVPPFLQPE	78	91	Snøfrisk I	X		X	X
PVVVPPFLQPEIM	81	93	Snøfrisk I og II		X	X	X
PVVVPPFLQPEIMGVPK	81	97	Snøfrisk I		X	X	X
VLPVPQKVVPQ	170	180	Snøfrisk I	X		X	X
YQEPVLGPVRGPFPI	191	205	Snøfrisk I	X	X	X	X
			Snøfrisk II		X	X	X
YQEPVLGPVRGPFPII	191	206	Snøfrisk I	X	X	X	
YQEPVLGPVRGPFPIV	191	207	Snøfrisk I	X	X	X	
PVLGPVRGPFPI	194	205	Snøfrisk II		X	X	X
PVLGPVRGPFPII	194	206	Snøfrisk II		X	X	X
GPVRGPFPI	197	205	Snøfrisk I	X		X	X
PVRGPFPII	198	206	Snøfrisk I og II		X	X	X

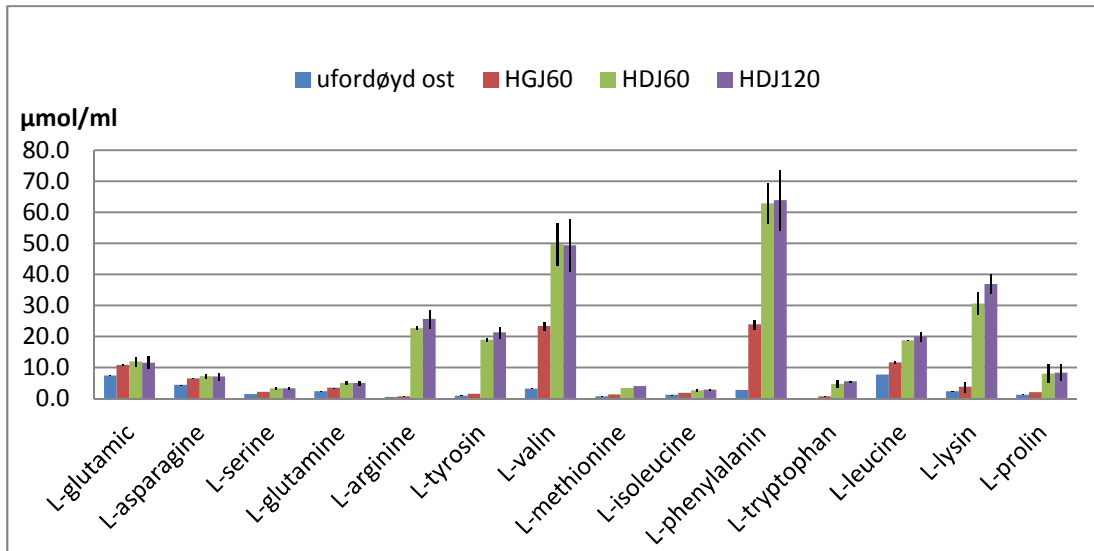
## 6.4 Innhold av frie aminosyrer før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ

Innholdet av frie aminosyrer i ufordøyd og fordøyd Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost ble undersøkt ved RP-HPLC analyse. Figur 6.17- 6.22 viser resultatene av analysen (gjennomsnitt av 2 gjentak) med standardavvik, kun aminosyrene hvor man ser en forskjell mellom de forskjellige trinnene fra ufordøyd- til fordøyd ost er tatt med i tabellene. Resultatene viser en generell økning i frie aminosyrer i alle ostene etter fordøyelse i mage (HGJ60) og i tarm (HDJ60 og HDJ120), spesielt i aminosyrene L-arginin, L-tyrosin, og de essensielle aminosyrene L-valin, L-fenylalanin, L-lysin og L-leucin. Det er en mest økning i konsentrasjonene av L-fenylalanin.

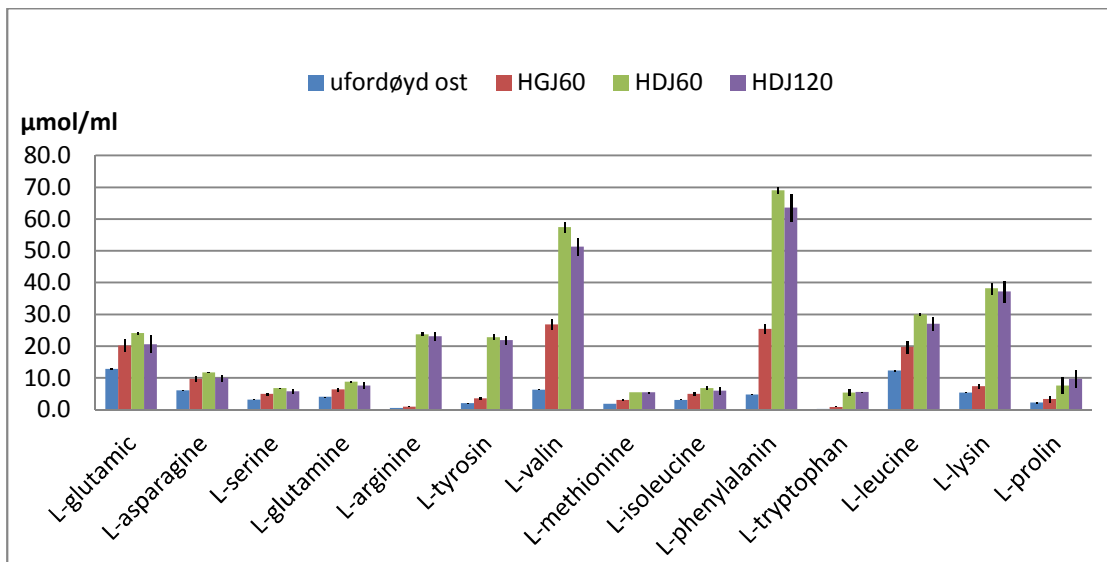
Den største endringen i frie aminosyrer finnes mellom magefordøyelse (HGJ60) og fordøyelse i tarm etter 60 min (HDJ60). Fra 60 min i tarm (HDJ60) til 120 min i tarm (HDJ120) ser det ut til å være liten forskjell i innhold av frie aminosyrer.

Sammenligning av Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd viser at med økende modningsgrad på osten får man et høyere innhold av frie aminosyrer i alle trinnene fra ufordøyd ost til fordøyd ost.

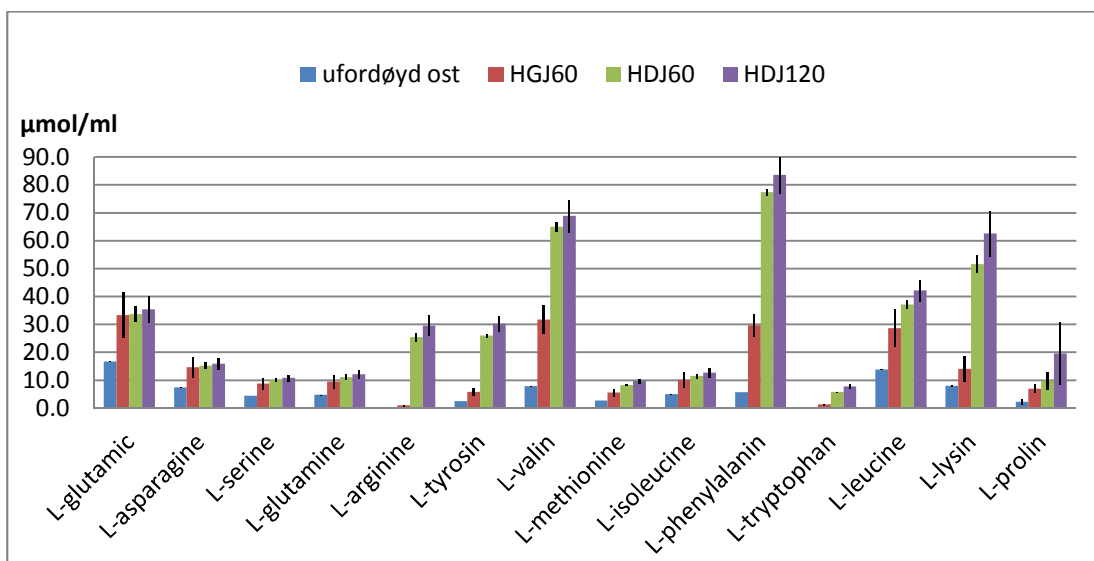
Resultater for hver enkelt ost (6 oster\* 2 gjentak) med resultat for alle frie aminosyrer kan sees i vedlegg 2.



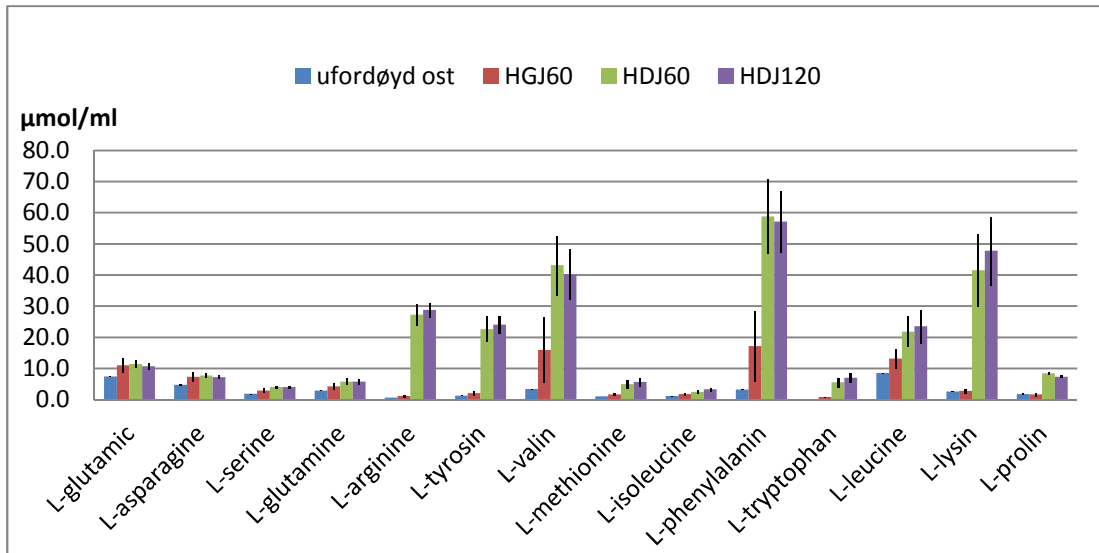
Figur 6.17: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia 3 mnd.



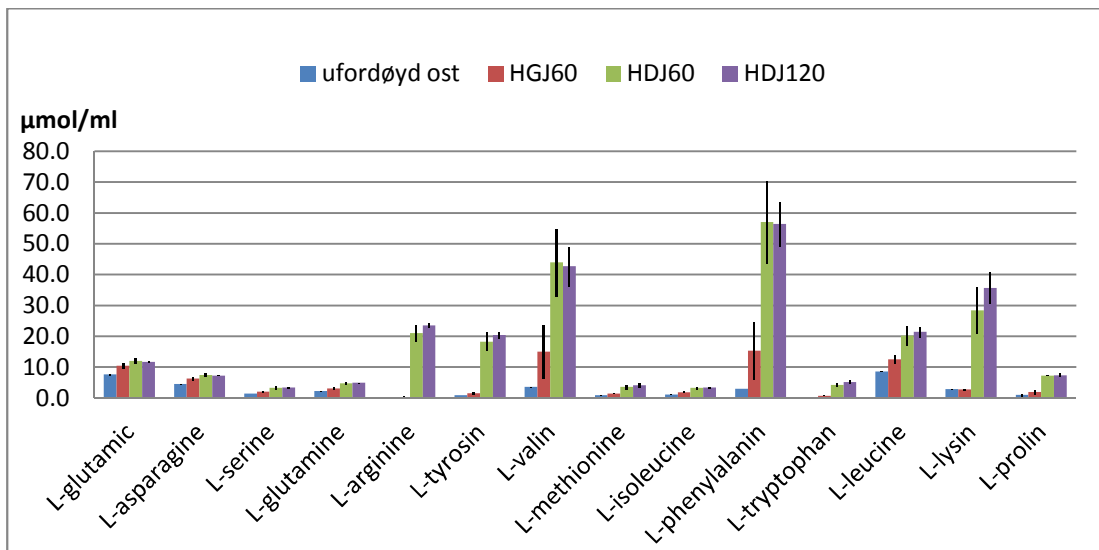
Figur 6.18: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia 9 mnd.



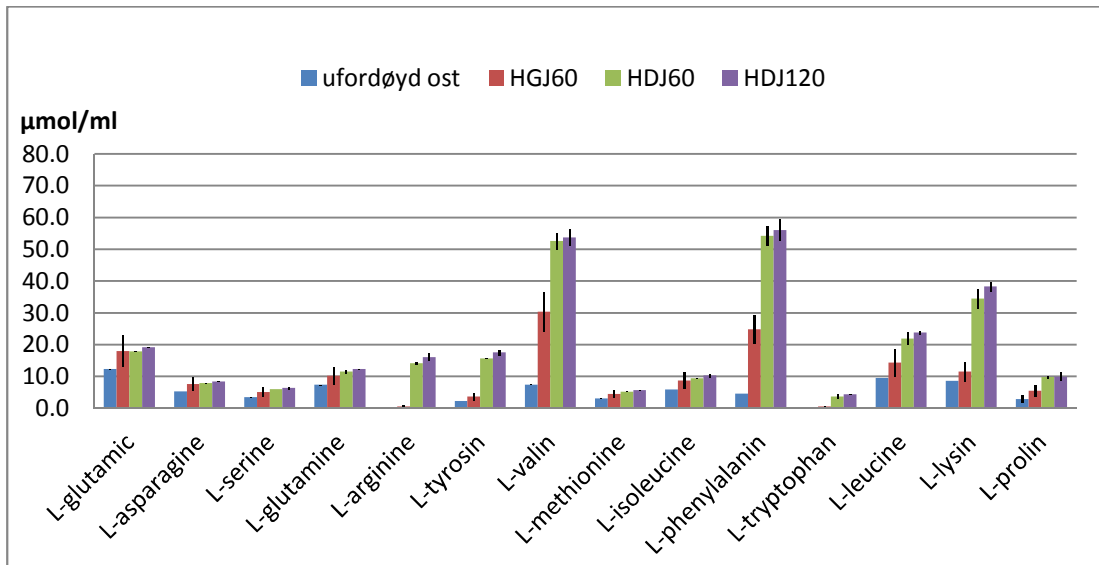
Figur 6.19: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia 15 mnd.



Figur 6.20: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia lettere.



Figur 6.21: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia økologisk.



Figur 6.22: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Snøfrisk hvitost.



## 7. Diskusjon

Målet for denne oppgaven var å sammenlikne proteinnedbryting og dannelse av peptider og frie aminosyrer før og etter fordøyelse av ulike oster. *In vitro* fordøyelse ble utført på Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (2 gjentak). Det ble valgt ut 6 ulike oster for å se på om ysteprosess, proteininnhold, lagringstid og om osten var laget av ku- eller geitmelk ville påvirke proteinnedbryting og peptiddannelse før og etter fordøyelse. Under fordøyelsen ble det tatt ut prøver av ufordøyd ost, ost fordøyd i magesaft i 60 min (HGJ60) og ost videre fordøyd i tarmsaft i 60 min og 120 min (HDJ60 og HDJ120). Deretter ble proteinanalysene mikro Kjeldahl, SDS-PAGE, trypsinering av proteiner, nano-LC-MS/MS og RP-HPLC utført på de ufordøyde og fordøyde ostene.

### 7.1 Proteinanalyser

På bakgrunn av funnene til Parrot *et al.* (2003), Lignitto *et al.* (2010) og Qureshi *et al.* (2012) ble det bestemt hvilke proteinanalyser som skulle utføres. Parrot *et al.* så på *in vitro* fordøyelse av peptider fra Emmentaler (sveitser ost). *In vitro* fordøyelse ble utført på en kaseinløsning og et vannløselig ekstrakt (pH 2) av Emmentaler. Det ble funnet at SDS-PAGE og RP-HPLC var de mest relevante metodene for å overvåke endringer induisert av fordøyelsesenzymene på Emmentaler. I de vannløselige ekstraktene var resultatene fra Kjeldahl for lave og variable til at de kunne betraktes som gode metoder for å finne endringer i total nitrogen, ikke-protein nitrogen og protein nitrogen (Parrot *et al.*, 2003). Qureshi *et al.* (2012) fant også ut at Kjeldahl var en uegnet metode for dette i analyser av Norvegia og Gammalost, men fant at LC-MS/MS var en god analysemetode til å identifisere peptidsekvenser i vannløselig ekstrakt. Lignitto *et al.* utførte fordøyelse av vannløselig Asiago-ost ekstrakt (pH 2). Gjennom LC / ESI-MS analyse ble det identifisert mange peptider (mw <10) i Asiago-ostene (Lignitto *et al.*, 2010). På bakgrunn av funnene til Parrot *et al.* (2003), Lignitto *et al.* (2010) og Qureshi *et al.* (2012) ble det derfor bestemt at proteinanalysene som skulle utføres var mikro-Kjeldahl for å finne proteininnhold i utgangs-ostene (ufordøyd) og SDS-PAGE for å se på nedbrytningen av proteiner før og under fordøyelsen. Det ble videre bestemt at det skulle tillages et pH 2 ekstrakt hvorav

nano LC-MS/MS analyse skulle utføres for å identifisere peptider og RP-HPLC for å finne innholdet av frie aminosyrer før og under fordøyelsen.

### 7.1.1 Proteininnhold i ufordøyd ost

Mikro-Kjeldahl analyse ble utført for å finne proteininnholdet i ostene. Dette ble målt til henholdsvis 25,5 % for Norvegia 3 mnd, 26,5 % for Norvegia 9 mnd, 26,9 % for Norvegia 15 mnd, 30,0 % for Norvegia lettere, 22,1 % for Norvegia økologisk og 21,9 % for Snøfrisk. Det målte proteininnholdet var for alle ostene lavere enn hva Tine oppgir (0,5-5 % lavere). Kumelk skal ha et gjennomsnittelig innhold av 3,7 % fett og 3,4 % protein, men melkens innhold kan variere noe og påvirkes av art, rase, gener, sesong, laktasjonsfase, næring, fôr, helse, alder og melketidspunkt (Fox & McSweeney, 1998). Næringsinnholdet oppgitt av Tine er en gjennomsnittsverdi og ostens tørrstoff kan variere med 1 % på standardverdien. Dette forklarer avviket. Proteininnhold kan altså være forskjellig fra ostebatch til ostebatch. På bakgrunn av dette vil det bli antatt at det målte proteininnholdet ved mikro-Kjeldahl er riktig da dette er en anerkjent målemetode for proteininnhold. Eventuelle målefeil som kan komme av menneskelige feil er f. eks at kolbene ikke ble ristet godt nok før prøvemengde til analysen ble tatt ut.

### 7.1.2 Proteindegradering og identifisering av ulike proteiner ved fordøyelse av ost med HGJ og HDJ

Resultatene fra SDS-PAGE viste at allerede i ufordøyd ost hadde modning av ostene degradert noe av proteinene i osten og de hadde begynt å bli brutt ned til peptidfragmenter (figur 6.2). Dette ble videre bekreftet ved at proteinbånd fra nedbrutte kaseiner ble raskt degradert under fordøyelse i mage (HGJ60) og man så kun et markert peptidbånd ved ca 18 kDa. Etter fordøyelse i tarm (HDJ60 og HDJ120) var så og si alle kaseinene og  $\beta$ -lg i osten degradert.

Etter ekstraksjon og trypsinering av gelbånd ble proteiner identifisert som aminosyresekvenser i båndene fra Norvegia 3 mnd i ufordøyd ost (figur 6.2). Disse var hhv: bånd 1,  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein; bånd 2,  $\beta$ -lg og  $\alpha_{S1}$ -kasein som sannsynligvis er degraderingsprodukter etter modning av osten; bånd 3, para  $\kappa$ -kasein et spaltingsprodukt fra  $\kappa$ -kasein ved bruk av løpe under ystingen; bånd 4,  $\beta$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein er sannsynlige degraderingsprodukt. Siden  $\alpha_{S1}$ -kasein ble identifisert i bånd 2 som ligger ved ca 18 kDa er dette trolig degraderingsprodukter

fra  $\alpha_{S1}$ -kasein da dette proteinet har en molekylvekt på ca 23,6 kDa.  $\beta$ -kasein identifisert i bånd 4 som ligger ved ca 14,4 kDa er trolig degraderingsprodukter fra  $\beta$ -kasein da dette proteinet har en molekylvekt på ca 24 kDa.  $\alpha_{S2}$ -kasein identifisert i bånd 5 som ligger rett under 14,4 kDa er trolig degraderingsprodukter fra  $\alpha_{S2}$ -kasein siden dette proteinet har en molekylvekt på ca 25,2 kDa. Det store proteinbåndet mellom bånd 1 og 2 ved ca 24 kDa er mest sannsynlig  $\beta$ -kasein.  $\beta$ -kasein har en molekylvekt på rundt 24 kDa og ved å sammenligne med figur 4.2 stemmer også beliggenheten i gelen med  $\beta$ -kasein. De andre ufordøyde ostene (figur 6.4) har et likt proteinnedbrytningsmønster som Norvegia 3 mnd I og man vil anta at proteinene og fragmenter av disse fordeler seg ganske likt som for Norvegia 3 mnd I.

I HGJ60 var det for alle ostene et markert proteinbånd ved ca 18 kDa, dette er mest sannsynlig  $\beta$ -lg som har en molekylvekt på 18,2 kDa. Forsøk har vist at *in vitro* gastrisk fordøyelse fører til at kasein raskt brytes ned av pepsin,  $\beta$ -lg derimot viser seg å være relativt pepsin motstandsdyktig og viser svært lite/ingen degradering (Defernez *et al.*, 2010; Mandalari *et al.*, 2009; Picariello *et al.*, 2010). Denne relative motstand er trolig p.g.a den svært kompakte beta-tønne konformasjonen til  $\beta$ -lg og tilstedeværelsen av 2 intramolekulære disulfidbroer som kveiler proteinet sammen.  $\beta$ -lg er resistent mot peptisk hydrolyse p.g.a at de hydrofobe eller aromatiske aminosyresidekjedene hvor pepsin kutter aminosyrekjeden er godt begravd inne i proteinets hydrofobe kjerne (Picariello *et al.*, 2010). Man kunne også se en skygge nederst på gelen (under 14,4 kDa) som mest sannsynlig er peptidfragmenter av degraderte proteiner.

Etter fordøyelse i tarm (HDJ60 og HDJ120) var så og si alle proteinene i osten degradert. Ved å sammenligne båndene fra human tarmsaft (figur 6.3) med gelbånd fra fordøyde oster (figur 6.4), så man at i de fordøyde osteprøvene (brønn nr. 4, 5, 8 og 9, figur 6.4) finner man bånd som ser ut til å komme fra de tilsatte tarmenzymene identifisert i båndene G, I, J og H i figur 6.3. Tidligere forsøk har også vist at ved *in vitro* duodenal fordøyelse ble fragmenter av kasein og  $\beta$ -kasein raskt brutt helt ned og  $\beta$ -lg ble også degradert av tarmsaft-enzymene (Defernez *et al.*, 2010; Mandalari *et al.*, 2009; Picariello *et al.*, 2010). SDS-PAGE analyse utført av Defernez *et al.* (2010) viste at ved *in vitro* duodenal fordøyelse (pH 7) ble  $\beta$ -kasein raskt brutt ned og etter 5 minutter var så og si alle spor av  $\beta$ -kasein og  $\beta$ -kasein fragmenter borte.  $\beta$ -lg

ble også raskt nedbrutt og etter 15 minutter var det bare observert et svakt bånd i gelen (MW under 14 kDa) (Defernez *et al.*, 2010). I gelene (figur 6.4) kunne man også se en slik svak skygge nederst på gelen (under 14,4 kDa) som mest sannsynlig er peptidfragmenter av degraderte proteiner, mest sannsynlig fra  $\beta$ -lg.

SDS-PAGE viser relative mengder og er ikke en kvantitativ analyse. Det er derfor vanskelig å si noe om mengden protein og proteinfragmenter i hver gel. Det var forventet å se en forskjell i proteinnedbrytningen for Norvegia 3, 9 og 15 mnd, da økende modning av osten vil gi økende proteindegradering i utgangs- ostene, men dette ble ikke observert. Det at alle ostene er forskjellig fortynnet og at det er applisert forskjellige mengder prøve gjør det også vanskelig å si noe om mengden protein og proteinfragmenter som er nedbrutt.

### 7.1.3 Peptider identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ

Peptider ble identifisert ved nano-LC-MS/MS. I Norvegia-ostene ble det funnet peptider fra alle kaseinene og i tillegg fra  $\beta$ -lg. Peptider fra  $\alpha_{S2}$ -kasein og  $\kappa$ -kasein ble kun funnet i den fordøyde osten.  $\beta$ -lg peptider ble bare funnet i ost fordøyd i tarmsaft. Dette er fordi  $\beta$ -lg ikke blir fordøyd i magesaft (se tidligere kap 7.1.2) på grunn av dens hydrofobe kjerne og disulfidbroer som kveiler sammen proteinet. Identifiseringen av  $\beta$ -lg peptider kan også bli komplisert av disulfidbindinger. S-S kryssbindinger fra det opprinnelige proteinet kan krysskoble peptider, hvor opptil tre eller fire partier kan bindes sammen slik at de ikke blir identifisert (Picariello *et al.*, 2010).

I Snøfrisk ble det funnet peptidfraksjoner fra  $\beta$ -,  $\alpha_{S1}$ - og  $\alpha_{S2}$ -kasein. Her ble peptider fra  $\alpha_{S1}$ - og  $\alpha_{S2}$ -kasein kun funnet i den fordøyde osten. Ved å se på SDS-PAGE gelen for Snøfrisk hvitost (figur 6.4) ser det ut som det er bånd som tilsvarer para  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -lg i gelen. Det er derfor vanskelig å si hvorfor det ikke ble funnet peptider som opprinnelig stammer fra disse proteinene. Det kan hende at det var så mange av de andre peptidene at de ikke ble fanget opp ved nano-LC-MS/MS analysen. Eller at størrelsen/Mw på fragmentene var større eller mindre enn det området det søkes i ved denne nano LC-MS/MS analysen. I alle ostene ble det funnet flest peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein. Dette kan forklares av at  $\beta$ -kasein er et av kaseinene

det er høyest andel av, i tillegg er det vist at  $\beta$ -kasein raskt blir brutt ned i fordøyelsen (Defernez *et al.*, 2010). Norvegia-ostene inneholdt også mange peptider fra  $\alpha_{S1}$ -kasein, mens i Snøfrisk ble det funnet et mye lavere innhold av dette. Syv polymorfe former innen  $\alpha_{S1}$ -kasein har blitt identifisert i de norske geiterasene. Undersøkelser har vist at mer enn 70 % av geitmelk inneholdt  $\alpha_{S1}$ -kasein O allelet, 5 %  $\alpha_{S1}$ -kasein A variant, 1 %  $\alpha_{S1}$ -kasein C-variant, 7 %  $\alpha_{S1}$ -kasein E variant, 11 %  $\alpha_{S1}$ -kasein BF varianter og 0,8 %  $\alpha_{S1}$ -kasein DF varianter (Vegarud *et al.*, 1999). A, B og C-alleler er assosiert med et høyt innhold (3,6 g/l) av  $\alpha_{S1}$ -kasein i melk, E allel med et medium innhold (1,6 g/l), D og F-alleler er assosiert med lavt innhold (0,6 g/l), mens O sannsynligvis er et null allel (Martin og Grosclaude, 1993). Variant O av  $\alpha_{S1}$ -kasein er den vanligste i norske geiter (70 %) og dette forklarer det lave innholdet av  $\alpha_{S1}$ -kasein i Snøfrisk-ostene.

Figur 6.5 - 6.16 viser alle de ulike peptidfraksjonene fra de ulike melkeproteinene som ble funnet fra ufordøyd ost og fra de forskjellige trinnene av fordøyelsen (HGJ60, HDJ60 og HDJ120) for hver enkel ost. I ostene ble det observert flere kjente biologiske aktive peptider som var derivert fra  $\beta$ -kasein,  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein. De bioaktive peptidene som ble funnet var peptider som var antatt å kunne være blodtrykkssenkende (ACE inhiberende), opioide, antimikrobielle og immunomodulerende.

Det er i tynntarmen absorpsjon av peptider foregår. Enzymer på overflaten av de intestinale cellene hydrolyserer tripeptider, dipeptider og aminosyrer til frie aminosyrer og absorberer dem (Whitney og Rolfes, 2005). Men det har også blitt observert at store polypeptider eller proteolyse-resistente hele proteiner kan gå inn, om enn i små mengder, i blodsirkulasjonen (Gardner, 1988). De observerte bioaktive peptidene kan virke i, eller bli absorbert i, tarmen hvor de kan ha helsefremmende effekter. De fleste kjente bioaktive peptidene ble observert i Norvegia 3 mnd, Norvegia 15 mnd, Norvegia lettere og Norvegia økologisk, noe som kan indikere at det er disse ostene som har høyest andel av biologisk aktive peptider i området 800 - 4500 Da. Dette er basert på hittil oppnådd forskning på bioaktive peptider i melk. Det kan også hende at det finnes andre og mer aktive fragmenter i ostene som vi ikke kjenner til.

Noen peptider fra bovint og caprint  $\beta$ -kasein var stabile under fordøyelsen (tabell 6.3 og 6.4). To stabile peptider fra bovint  $\beta$ -kasein YQEPVLGPVR f(193-202) og YQEPVLGPVRGPFPIIV f(193-209) er også kjente bioaktive peptider (Silva og Malcata, 2005). Peptidet YQEPVLGPVR er antatt å ha en blodtrykkssenkende virkning og peptidet YQEPVLGPVRGPFPIIV antas å ha en immunomodulerende og antimikrobiell virkning (Silva og Malcata, 2005). Det at et peptid er stabilt gjennom fordøyelsen gjør at det har en større sjanse til å virke og bli absorbert i tarmen. Basert på dette vil de stabile og kjente bioaktive peptidene YQEPVLGPVR f(193-202) og YQEPVLGPVRGPFPIIV f(193-209) være blant peptidene med størst sjanse til å bli absorbert i tarmen av de som er identifisert i dette forsøket.

Det er bare peptider i området 800 – 4500 Da som blir identifisert ved den LC-MS analysen som ble benyttet her. Små peptider som IPP og VPP vil ikke bli identifisert med dette utstyret. Peptider som har IPP/VPP i endeposisjon er derfor avmerket i resultatene for å vise at disse kan senere bli spaltet til IPP/VPP og dermed kan få en ACE- inhiberende effekt.

De fleste forsøk gjort på peptiders bioaktivitet er gjort ved forsøk som ikke optimalt klarer å etterligne et vanlig menneskets matinntak og fordøyelse. Picariello *et al.* (2010) sier at den effektive *in vivo* produksjon av biologisk aktive peptider gjenstår å bli etablert, det har heller ikke blitt konstatert om de "funksjonelle" domenene til melkeproteinene overlever fordøyelsesprosessen og oppnår konsentrasjoner av fysiologisk betydning. Om peptider frigjort fra melkeproteiner kan ha en gunstig effekt på helsen, eller omvendt er derfor fremdeles et åpent spørsmål. Picariello *et al* påpeker også at selv om *in vivo* fordøyelsen er en mye mer kompleks prosess, er det sannsynlig at mange av de bioaktive peptidene ikke vil overleve fordøyelsen, noe som tyder på at de kan trenge beskyttelse mot mage- eller tarmdegradering til å utøve sine funksjonelle effekter som bioaktive peptider i kroppen (Picariello *et al.*, 2010).

#### 7.1.4 Innhold av frie aminosyrer identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ

Innholdet av frie aminosyrer i ufordøyd og fordøyd ost ble undersøkt ved RP-HPLC analyse. Resultatene viste en generell økning i frie aminosyrer i alle ostene etter fordøyelse i mage (HGJ60) og i tarm (HDJ60 og HDJ120).

Absorpsjon av frie aminosyrer skjer i tynntarmen. Pankreatiske enzymer og intestinale enzymer spalter polypeptider til tripeptider, dipeptider og aminosyrer. Deretter vil enzymer på overflaten av de intestinale cellene hydrolysere disse peptidene til frie aminosyrer og absorbere dem (Whitney og Rolfes, 2005). Det er altså bare aminosyrene vi finner igjen i tarmsaft-trinnet (HDJ60 og HDJ120) som kan bli absorbert i tarmen og tatt opp i kroppen. Aminosyrene det er høyest andel av og som har sterkest økning fra fordøyelse i mage (HGJ60) til tarm (HDJ60) er L-arginin, L-tyrosin, og de essensielle aminosyrene L-valin, L-fenylalanin, L-lysin og L-leucin. Det er da disse aminosyrene som har sterkest sjanse for å bli absorbert i tarmen.

Fra 60 min i tarm (HDJ60) til 120 min i tarm (HDJ120) ser det ut til å være liten forskjell i innhold av frie aminosyrer. For de fleste ostene er det en liten økning av aminosyrer fra HDJ60 til HDJ120, mens Norvegia 9 mnd viser en motsatt trend hvor innholdet av de fleste aminosyrene synker litt fra HDJ60 til HDJ120. Dette har trolig en sammenheng med ostens modning og dens nedbrytning av frie aminosyrer gjennom fordøyelsen.

Hvis man hadde gjort forsøket *in vivo* i tarm istedenfor *in vitro* kan det hende at man ville sett en større nedbrytning av aminosyrer og flere aminosyrer ville blitt frigjort på grunn av at det i *in vitro* forsøk kan det bli "mettet" med frie aminosyrer da man ikke har noen absorpsjon.

Sammenligning av Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd viser at med økende modningsgrad på osten får man et høyere innhold av frie aminosyrer i alle trinnene fra ufordøyd ost, til fordøyelse i mage og videre til fordøyelse i tarm. Under ostemodning skjer det biokjemiske endringer som resulterer i utviklingen av smak, aroma og tekstur. Sammensetningen av ingrediensene, degradering og katabolisme som oppstår under ostemodning resulterer i et mangfold av forbindelser som gir

osten sitt særpreg (Ochi *et al.*, 2012). Modningsprosessen vil starte noe proteinnedbrytning i osten. Jo lengre modningsprosess, jo sterkere grad av proteinnedbrytning i osten vil forekomme, noe som forklarer hvorfor det er flere frie aminosyrer allerede i ufordøyd ost i Norvegia 9 mnd og 15 mnd enn i Norvegia 3 mnd.

### 7.1.5 Fordøyelse

Basert på aspirasjonsstudier (Ulleberg *et al.*, 2011; Ekmekcioglu, 2002; McConnell *et al.*, 2008) og enzymenes aktivitet ble det bestemt at det skulle brukes en pepsinaktivitet på 315 U/g protein for HGJ og en proteolytisk aktivitet på 267 U/g protein for HDJ i dette forsøket. Beregninger av pepsinaktivitet og proteolytisk aktivitet ble gjort ut ifra at alle ostene inneholdt ca 0,3 g protein/g ost, slik at alle ostene ble tilsatt HGJ/HDJ ut ifra dette. Siden ostene hadde et varierende proteininnhold fra 0,24-0,32 g protein/g ost ble ikke denne bergningen nøyaktig. Nøyaktig beregning (med utgangspunkt i oppgitt proteininnhold fra Tine) viser at pepsinaktivitet brukt for Norvegia lettere ble 296 U/g protein, for Norvegia 3, 9 og 15 mnd samt Norvegia økologisk 350 U/g protein og for Snøfrisk 390 U/g protein. Proteolytisk aktivitet brukt for Norvegia lettere ble 250 U/g protein, for Norvegia 3, 9 og 15 mnd samt Norvegia økologisk 296 U/g protein og for Snøfrisk 333 U/g protein. Snøfrisk I HDJ120 ble tilsatt bare 17 ml HDJ, 3 ml for lite HDJ, men det ble bestemt at prøven likevel kunne brukes videre. Dette viser at det ble brukt forskjellig pepsinaktivitet og total proteolytisk aktivitet ved fordøyelse av de ulike ostene. Disse faktorene kunne påvirket fordøyelsen noe slik at det ble noen flere/færre spaltningsprodukter av proteiner for de individuelle ostene, men det er vanskelig å si hvor mye og det har troligvis ikke en veldig stor betydning.

Det ble benyttet 3 forskjellige batcher av human magesaft (HGJ) og human tarmsaft (HDJ). Det at det ble benyttet 3 forskjellige batcher gjorde at prøvene av ufordøyde og fordøyde oster ble forskjellig fortynnet fra ost til ost. Sammensetning av enzymer kan også variere, f.eks trypsin:lipase forholdet. Ideelt sett skulle man slått sammen de forskjellige batchene til en batch med HGJ og en batch med HDJ slik at sammensetningen av enzymer var lik i HGJ/HDJ og at alle prøvene fikk mest mulig lik fortynningsfaktor.



Batchene med HGJ og HDJ var gamle batcher som hadde vært fryst i flere måneder. Mage- og tarmsaft skal helst være fersk eller ikke fryst i mer enn 1-2 mnd da både pepsin og lipase aktiviteten reduseres i løpet av fryselagring, selv når konserveringsmidler blir tilsatt (Ulleberg *et al.*, 2011). Enzymaktivitet ble derfor målt like før bruk slik at man fikk tilsatt mage-/tarmsaft ut ifra riktig U/gram protein.

### 7.3 Til ettertanke og videre forsøk

Selv om det er funnet biologiske aktive peptider og stabile peptider under fordøyelsen i dette forsøket er det vanskelig å si hvilken effekt de faktisk vil ha i kroppen og i hvilken grad de blir absorbert i tarmen og tatt opp i kroppen.

*In vitro* og *in vivo* fordøyelse for å finne bioaktive peptider i matvarer som meieriprodukter er et populært forskningsemne og det foregår mye god forskning på dette emnet. Et problem med denne forskningen er at det ikke er noen standardiserte metoder for fordøyelse, for å måle enzymaktiviteter og om man skal bruke human mage-/tarmsaft eller kommersielle enzymer for å nevne noe. Dette kan gjøre det vanskelig å sammenligne resultater fra et forsøk til et annet.

Ved fremtidige lignende forsøk på dette emnet ville jeg anbefalt å bare ha en batch med magesaft og en batch med tarmsaft slik at det ikke ville blitt en så stor forskjell i fortynningsfaktor på prøvene. Også ferskere magesaft og tarmsaft ville vært å foretrekke. Når man nå har sett på peptidene med masse 800 – 4500 Da ville det vært spennende å utført nano-LC-MS/MS analyse på peptider med mindre masse slik at man kunne fanget opp små peptider som IPP og VPP. Det hadde også vært interessant å gjøre kvantitative analyser fore å se hvor mye som dannes av ulike peptider.

## 8. Konklusjon

Målet for denne oppgaven var å sammenlikne proteinnedbryting og dannelse av peptider og frie aminosyrer før og etter fordøyelse av ulike oster. *In vitro* fordøyelse ble utført på Norvegia 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost (2 gjentak). Det ble valgt ut 6 ulike oster for å se på om ysteprosess, proteininnhold, lagringstid og om osten var laget av ku- eller geitmelk ville påvirke proteinnedbryting og peptiddannelse før og etter fordøyelse. Under fordøyelsen ble det tatt ut prøver av ufordøyd ost, ost fordøyd i magesaft i 60 min (HGJ60) og ost videre fordøyd i tarmsaft i 60 min og 120 min (HDJ60 og HDJ120). Deretter ble proteinanalysene mikro Kjeldahl, SDS-PAGE, trypsinering av proteiner, nano-LC-MS/MS og RP-HPLC utført.

Resultatene viste at allerede i ufordøyd ost hadde modning av ostene degradert noe av proteinene i osten og de hadde begynt å bli brutt opp i peptidfragmenter.

Proteinbånd fra nedbrutte kaseiner ble videre raskt degradert under fordøyelse i mage og etter fordøyelse i tarm var så og si alle kaseinene og  $\beta$ -lg i osten degradert. I ostene ble det observert flere kjente biologiske aktive peptider som var antatt å kunne være blodtrykssenkende (ACE-inhiberende), opioide, antimikrobielle og immunostimulerende. Disse var derivert fra  $\beta$ -kasein,  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\alpha_{S2}$ -kasein, to av disse derivert fra bovint  $\beta$ -kasein var også stabile under fordøyelsen.

Det var en generell økning i frie aminosyrer i alle ostene etter fordøyelse i mage og videre i tarm. Det var spesielt aminosyrene L-arginin, L-tyrosin, og de essensielle aminosyrene L-valin, L-fenylalanin, L-lysin og L-leucin som hadde sterkest økning fra fordøyelse i mage (HGJ60) til tarm (HDJ60). Det er da disse aminosyrene som har sterkest sjanse for å bli absorbert i tarmen. Sammenligning av Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd viser at med økende modningsgrad på osten får man et høyere innhold av frie aminosyrer i alle trinnene fra og med ufordøyd ost, til fordøyelse i mage og videre til fordøyelse i tarm.

Selv om det er funnet biologiske aktive peptider og stabile peptider under fordøyelsen i dette forsøket er det vanskelig å si hvilken effekt de faktisk vil ha i kroppen og i hvilken grad de blir absorbert i tarmen og tatt opp i kroppen. Det er derfor viktig med videre forskning på emnet.

## Referanseliste

- Bakke, S. (2007). *Fordøyelsesystemet*: no.wikipedia.org. Tilgjengelig fra:  
[http://no.wikipedia.org/wiki/Fil:Digestive\\_system\\_diagram\\_no.svg](http://no.wikipedia.org/wiki/Fil:Digestive_system_diagram_no.svg).
- Bylund, G. (1995). Dairy processing handbook. I, s. 288-290: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Clare, D. A. & Swaigood, H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83 (6): s.1187-1195.
- Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, 7 (6): s.2265-2272.
- Defernez, M., Mandalari, G. & Mills, E. N. C. (2010). Quantitative assessment of multi-laboratory reproducibility of SDS-PAGE assays: Digestion pattern of b-casein and b-lactoglobulin under simulated conditions. *Electrophoresis Journal*, 31: s.2838–2848.
- Eijsink, V., Devold, T. & Kokkim, E. (2012). Labhefte. I.
- Ekmekcioglu, C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, 76 (2): s.225-230.
- Eriksen, E. K., Holm, H., Jensen, E., Aaboe, R., Devold, T. G., Jacobsen, M. & Vegarud, G. E. (2010). Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition*, 104 (3): s.374-381.
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87 (6): s.1641–1674.
- Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (1998). Dairy chemistry and biochemistry. I, kap 1: s.1-3, kap 4: s.146-191: Blackie Academic & Professional.
- Gardner, M. L. G. (1988). Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Ann. Rev. Nutr.*, 8: s.329-350.
- Haque, E. & Chand, R. (2008). Antihypertensive and antimicrobial peptides from milk proteins. *European Food Res Technology*, s.227: 7-15.
- Hauge, J. G. & Ore, S. (2009). *Kasein*: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra:  
<http://snl.no/kasein>.

- Hsieh, J.-F. & Pan, P.-H. (2012). Proteomic Profiling of the Coagulation of Milk Proteins Induced by Chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (8): s.2039-2045.
- Jia, S., Kang, Y. P., Park, J. H., Lee, J. & Kwon, S. W. (2011). Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218 (51): s.9174-9182.
- Jäkälä, P. & Vapaatalo, H. (2010). Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Journal of Pharmaceuticals*, 3: s.251-272.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: s.945-960.
- Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E., Sforza, S. & Segato, S. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese. *International Dairy Journal*, 20: s.11-17.
- Lopez-Fandino, R., Otte, J. & van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16: s.1277-1293.
- Mandalari, G., Adel-Patient, K., Barkholt, V., Baro, C., Bennett, L., Bublin, M., Gaier, S., Graser, G., Ladics, G. S., Mierzejewska, D., et al. (2009). In vitro digestibility of b-casein and b-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55: s.372-381.
- Martin, P. & Grosclaude, F. (1993). Improvement of milk protein quality by gene. *Livestock Production Science*, 35: s.95-115.
- McCanna, K. B., Shiell, B. J., Michalski, W. P., Leec, A., Wanc, J., Roginskia, H. & Coventry, M. J. (2006). Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine aS1-casein. *International Dairy Journal*, 16: s.316-323.
- McConnell, E. L., Fadda, H. M. & Basit, A. W. (2008). Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2): s.213-226.
- Miranda, G., Mahe, M.-F., Leroux, C. & Martin, P. (2004). Proteomic tools to characterize the protein fraction of Equidae milk. *Proteomics Journal*, 4: s.2496-2509.

- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. & Takano, T. (1995). Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated. *Journal of Dairy Science*, 78: 1253-1257.
- Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T. & Fukusak, E. (2012). Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatographytime-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113 (6): s.751–758.
- Parrot, S., Degraeve, P., Curia, C. & Martial-Gros, A. (2003). In vitro study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung/Food*, 2: s.87-94.
- Picariello, G., Ferrantia, P., Fierroa, O., Mamonea, G., Cairaa, S., Di Lucciaa, A., Monicaa, S. & Addeo, F. (2010). Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. *Journal of Chromatography*, 878: s.295-308.
- Qureshi, T. M., Vegarud, G. E., Abrahamsen, R. K. & Skeie, S. (2012). In vitro digestion of Gamalost and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptic digests. *Upublisert*.
- Saladin, K. S. (2003). *Anatomy & Physiology - The Unity of Form and Function*. I, kap 25: s. 943 - 952, 964-965, 970-971: The McGraw–Hill Companies.
- Schmelzer, C. E. H., Schops, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H. & Raith, K. (2007). Peptic digestion of b-casein: Time course and fate of possible bioactive peptides. *Journal of Chromatography*, 1166: s.108-115.
- Silva, S. V. & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15: s.1-15.
- Szwajkowska, M., Wolanciuk, A., Barłowska, J., Król, J. & Litwińczuk, Z. (2011). Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system – a review. *Animal Science*, 29: s.269-280.
- Tine.no. (2012a). *Norvegia*: Tine. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia>.
- Tine.no. (2012b). *Norvegia Ekstra Vellagret m/skorpe*: Tine. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-ekstra-vellagret-m-skorpe>.
- Tine.no. (2012c). *Norvegia Lettere*: Tine. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-lettere>.

- Tine.no. (2012d). *Norvegia Vellagret m/skorpe*: Tine. Tilgjengelig fra:  
<http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-vellagret-m-skorpe>.
- Tine.no. (2012e). *Norvegia Økologisk*: Tine. Tilgjengelig fra:  
<http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-%C3%B8kologisk>.
- Tine.no. (2012f). *Ost: Gulost*: Tine. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost>.
- Tine.no. (2012g). *Snøfrisk Hvitost*: Tine. Tilgjengelig fra:  
<http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/sn%C3%B8frisk-hvitost>.
- Ulleberg, E. K., Comi, I., Holm, H., Herud, E. B., Jacobsen, M. & Vegarud, G. E. (2011). Human Gastrointestinal Juices Intended for Use in In Vitro Digestion Models. *Food Digestion*, 2 (1-3): s.52-61.
- UniProt. (2012). *Protein Knowledgebase*: UniProt. Tilgjengelig fra:  
<http://www.uniprot.org/>.
- Vegarud, G. E., Devold, T. G., Opheim, R., Loeding, E., Svenning, C., Abrahamsen, R. K., Lien, S. & Langsrud, T. (1999). Genetic variants of Norwegian goats milk composition, micellar size and renneting properties. *International Dairy Journal*, 9: s.367-368.
- Vegarud, G. E. (2012). *Melkens Proteiner*. Ås. 1-76 s.
- Walstra, P. & Jenness, R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. I, kap 1: s.1-11: John Wiley & Sons.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*. I, kap 21: s.768-769, 771-773: Pearson Education.
- Whitney, E. & Rolfes, S. (2005). *Understanding nutrition*. I, kap 4: s.112; kap 5: s.151; kap 6: s.182 - 186, 194 - 195: Thomson Learning.

## Vedlegg 1: Peptider identifisert i ostene før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ ved nano LC-MS/MS – alle resultater i tabellform

Tabell I-XII viser alle peptidfraksjonene fra de ulike melkeproteinene som ble funnet i ufordøyd ost og under de forskjellige trinnene av fordøyelsen (HGJ60, HDJ60 og HDJ120) for hver enkel ost (6 forskjellige oster med 2 gjentak, 2 paralleller for hvert gjentak). Kjente bioaktive peptider er markert i **rosa** og peptider som har aminosyrene IPP/VPP i enden er markert i **turkis**. Peptidsekvenser i **rød skrift** er en genetisk variant av proteinet og har en aminosyre byttet ut fra den oppgitte aminosyresekvensen.







**Tabell I c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norgeia I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
LYQGPVLPWDDQVQRN	99	115		X		
YQGPVLPWDDQVQRNAVPIPTPL	100	123		X		
FTKKTLEEEKNRLNF	147	163		X		

**Tabell I d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VLSRPSY	31	38			X	
VRSQAQLQ	67	75			X	

**Tabell II a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norgeia II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RELEELNVPG	1	10				X
RELEELNVGEEI	1	12			X	X
RELEELNVGEEI	1	14			X	X
ELEELNVGEEI	2	14			X	X
EEQQTEDELQDK	36	48				X
ELQDKIHPF	44	52	X			
SLVYPPGPIHNSLPQNIPLLTQT	57	80		X		
LVYPPGPIHNSLPQNIPLLTQT	58	80		X		
VYPPGPIHNSLPQ	59	72				X
VYPPGPIHNSLPQNIPLLTQT	59	80		X		
YFPGPIHN	60	68	X			
YFPGPIHNS	60	69	X			
HNSLPQNIPLLTQT	68	80			X	X
SLPQNIPLLTQT	69	80			X	
SLPQNIPLLTQTPV	69	82			X	X
SLPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPE	69	91			X	X
SLPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPEV	69	92			X	X
LPQNIPLLTQT	70	80	X		X	X
LPQNIPLLTQTP	70	81	X			
LPQNIPLLTQTPV	70	82	X			
LPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPE	70	86	X			
LPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPE	70	91	X			
LPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPEVM	70	93	X			
NIPPLTQTPVVVPPFLQPE	73	91			X	X
IPPLTQTPVVVPPFL	74	86	X			
IPPLTQTPVVVPPFL	74	88	X			
TPVVVPPF	80	87	X			
TPVVVPPFL	80	88	X			X
TPVVVPPFLQP	80	90	X			
TPVVVPPFLQPE	80	91	X	X		X
PVVVPPFLQPE	81	91				X
PVVVPPFLQPEV	81	92			X	X
PVVVPPFLQPEVM	81	93		X	X	X
PVVVPPFLQPEVMG	81	94		X	X	X
PVVVPPFLQPEVMGV	81	95		X		
MPPFK	109	113				X
MPPFKYVEPF	109	119	X			
YVPEFTESQ	114	123			X	X
PVEPFTESQ	115	123			X	X
PVEPFTESQS	115	124		X		



**Tabell II b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RPKHPIKHQGLPQ	1	13	X			
RPKHPIKHQGLPQE	1	14	X			
EVLNENLLRF	14	23	X			
VLNENLLRF	15	23	X			
LINENLLRF	16	23	X			
NENLLRF	17	23	X			
FVAPFVEFGKEK	24	36	X			
<b>FVAPFVEFG</b>	23	33			X	X
FVAPFVEFGKEKVNE	24	39		X		
FVAPFVEFGKEKVNEL	24	40	X			
VAPFVEFGK	25	34				X
VAPFVEFGKEKVNE	25	39		X		
APFVEFGK	26	34	X			
PPEFVEFGKEKVNE	27	39		X		
EDVPSERYL	84	92	X			
YLEQLLRL	94	101	X			
<b>LRLKYYVPQL</b>	99	109		X		
YKVPQLV/PN	104	114			X	X
EGHAQQKEPMIGV	125	138			X	
EGHAQQKEPMIGVNOELA	125	143			X	
GIHAQQKEPMIGVNOE	126	141		X		
GIHAQQKEPMIGVNOEL	126	142		X		
FRQFYQL	150	156		X		
YVPLGTQYTDAPSF	166	179		X	X	
SDIPNPIGSENSGK	<b>180</b>	<b>193</b>			X	X
SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	<b>180</b>	<b>199</b>		X		

**Tabell II c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norgeia II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
ITVDDKHYQ	71	79				X
TVDDKHYQ	72	79				X
YQKFPQYL	89	96				X
RNAVPIPT	114	122				X

**Tabell II d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
NNQFLPYPY	52	60			X	X
VRSPAQILQ	67	75			X	
SPAQILQWQ	69	77			X	

**Tabell II e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VEELKPTPEGDL	43	54			X	



SQSKVLVPPQ	166	175	X						
SQSKVLVPPQKAVPYQDRDMPQAF	166	190		X					
VLPVQKAVPYQDRDMPQIA	170	189		X					
VYPYQ	178	182							X
VYPQRDMP	178	186	X						
FLYQEPVLGVRGPFPIIV	190	209	X						
LLYQEPVLGVRGPFPIIV	191	209	X						
LYQEPVLGVRGPFPII	192	206	X						
LYQEPVLGVRGPFPII	192	207						X	
LYQEPVLGVRGPFPIIV	192	209	X						
YQEPVLGVRGPFPII	193	202	X				X		X
YQEPVLGVRGPFPII	193	205		X			X		
YQEPVLGVRGPFPII	193	206	X				X		X
YQEPVLGVRGPFPII	193	207		X			X		X
YQEPVLGVRGPFPII	193	208	X				X		X
YQEPVLGVRGPFPII	193	209	X				X		X
QEPVLGVR	194	202					X		X
QEPVLGVRGPFPII	194	206	X						
QEPVLGVRGPFPII	194	207					X		X
QEPVLGVRGPFPII	194	208	X				X		
QEPVLGVRGPFPIIV	194	209	X				X		
EPVLGVR	195	202	X						
EPVLGVRGPFPII	195	206	X		X		X		X
EPVLGVRGPFPII	195	207	X				X		
EPVLGVRGPFPIIV	195	209	X						
PVLGVRGPFPII	196	207					X		
PVLGVRGPFPIIV	196	209					X		
VLGVRGPFPIIV	197	209	X						
LGVVRGPFPII	198	207					X		X
GPVRGPFPII	199	207	X						
GPVRGPFPIIV	199	209					X		
PVRGPFPII	200	207						X	X
PVRGPFPII	200	208					X		X
PVRGPFPIIV	200	209					X		

Tabell III b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norvegia 9 mnd I

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGI60	HDJ60	HDJ120
RPKHPIKHQGLPQ	1	13	X			
RPKHPIKHQGLPQE	1	14	X			
EVLINELLRF	14	23	X			
FFVAPPEVFG	23	33			X	
FVAPPEVFGKEKVNEL	24	40	X			
VAPPEVFGKEKVNEL	25	39		X		
APPEVFGKE	26	35	X			
PFPEVFGKEKVNEL	27	39		X		
HIQKEDVPSERY	80	91		X		
DVPSERYLGY	85	94	X			
VPSERYLGY	86	93	X			
VPSERYLGY	86	94	X			
LRLKYYKVPQL	99	109		X		
YKVPQLEIVPN	104	114			X	
GIHAQQKEPMIGVN	126	139		X		
GIHAQQKEPMIGVNQE	126	141		X		
GIHAQQKEPMIGVNQEL	126	142		X		
AQQKEPMIGV	129	138			X	
YVPLGTQYTD	165	176		X		
YVPLGTQYTDAPSF	166	179		X		
SDIPNPIGSEN	180	190		X		
SDIPNPIGSENSE	180	192			X	
SDIPNPIGSENSEK	180	193			X	X
SDIPNPIGSENSEK	180	193			X	X
SDIPNPIGSENSEKTTM	180	196		X		
SDIPNPIGSENSEKTTM	180	196		X		
SDIPNPIGSENSEKTTM	180	196		X		
NPIGSENSEKTTMP	184	197	X			

**Tabell III c: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia 9 mnd I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FSDKIAYIPIQY	18	30	X			
FSDKIAYIPIQYVL	18	32	X			
VLSRYPSY	31	38	X			
YYQQKPVAL	42	50	X			
INNOFLPYPYAKPAA	51	66	X			
INNOFLPYPYAKPAAVRS	51	69	X			
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQLQ	51	75	X			
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQLQW	51	76	X			
VRSPAQLQ	67	75	X			
VRSPAQLQWQVL	67	79	X			
ARHPPHLSF	96	105	X			

**Tabell III d: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia 9 mnd I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VYVEELKPTPEGDL	41	54			X	
YVEELKPTPEGDL	42	55				X
YVEELKPTPEGDL	42	55			X	X
VEELKPTPEGDL	43	54			X	
VEELKPTPEGDL	43	55				X

**Tabell IV a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norgeia 9 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RELEELNVPG	1	10				X
RELEELNVGGEI	1	12			X	X
RELEELNVGGEIVE	1	14			X	X
ELEELNVGGEIVE	2	14				X
QTEDELQDK	40	48				X
TEDELQDK	41	48				X
LQDKIHFFAQTQS	45	57		X		
SLVYPPGPI	57	66				X
SLVYPPGPIHNSLPQNIPLLTQT	57	80		X		
<b>LVYPPGPIHNSLPQ</b>	<b>58</b>	<b>72</b>			X	X
LVYPPGPIHNSLPQ	58	72				
LVYPPGPIHNSLPQNIPLLTQT	58	80		X		
YVPPGPIHN	59	68			X	X
YVPPGPIHNSLPQNIPLLTQT	59	80		X		
YVPPGPIHNSLPQNIPLLTQT	60	69				X
HNSLPQNIPLLTQT	68	80				X
HNSLPQNIPLLTQTPV	68	82				X
SLPQNIPLLTQT	69	80			X	
SLPQNIPLLTQTPV	69	82			X	X
SLPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPE	69	91			X	
PQNIPLLTQT	71	80				X
NIPPLTQTPVVVPPFLQPE	73	91				X
PVVVPPFLQ	81	90		X		
PVVVPPFLQPE	81	91		X	X	X
PVVVPPFLQPEV	81	92		X	X	X
PVVVPPFLQPEVM	81	93		X	X	X
PVVVPPFLQPEVMG	81	94			X	
PVVVPPFLQPEVMGV	81	95				
GVSKVKEAMAPKHKEMPPPKY	94	114		X		
HKEMPPK	106	113				X
EMPPPKYVPEFTESQS	108	124		X		
FPKYVPEPF	111	119		X		
YVPEFTESQ	114	123			X	X
YVPEFTESQS	114	124			X	
PVEPFTESQ	115	123				X
PVEPFTESQS	115	124		X	X	
TLTDVENLHPLPL	126	139			X	X
TLTDVENLHPLPLL	126	140		X		
LTDVENLHPLPL	127	139			X	X
TDVENLHPLPL	128	139			X	X





**Tabell IV c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norgeia 9 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VVRNANEEY	43	52		X		
YQKFPQY	89	95		X		
LYQGPVLPW/DQVVRN	99	115		X		
LYQGPVLPW/DQVVRNAVPI	99	120		X		
LYQGPVLPW/DQVVRNAVPIPTL	99	123		X		
FTKTKLITEEKNRLNF	147	163		X		

**Tabell IV d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia 9 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FSDKIAYPIQY	18	30		X		
VLSRPSY	31	38		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRS	51	69		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRSPAQ	51	72		X		X
NNQELPYPY	52	60				
VRSPAQILQ	67	75		X		
ARHPPHLSF	96	105		X		

**Tabell IV e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia 9 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VYVEELKPTPEGDL	41	54			X	
YVEELKPTPEGDL	42	54				X
YVEELKPTPEGDL	42	55				X
VEELKPTPEGDL	43	54			X	
VEELKPTPEGDL	43	55				X

**Tabell V a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norgeia 15 mnd I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
TEDELQDK	41	48			X	
OSLYVPPGGPIPN	56	68				X
SLVYVPPGPI	57	66				X
SLVYVPPGPIPN	57	68				X
SLVYVPPGPIHNSLPQNIPLTQT	57	80		X		
LVYVPPGPIPN	58	68				X
LVYVPPGPIHNSLPQNIPLTQT	58	81	X			
VYVPPGPIHN	59	68			X	X
VYVPPGPIHNSLPQNIPLTQT	59	80		X	X	X
VYVPPGPIHNSLPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVM	59	93	X			
YVPPGPIH	60	66	X		X	X
YVPPGPIHN	60	68	X			
YVPPGPIHNS	60	69	X			
YVPPGPIHNSLPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVM	60	93	X			
HNSLPQNIPLTQT	68	80			X	X
HNSLPQNIPLTQTPV	68	82				X
SLPQNIPLTQT	69	80			X	
SLPQNIPLTQTPV	69	82				X
SLPQNIPLTQTPVVVPPFLQPE	69	91	X			
LPQNIPLTQTP	70	81	X			
LPQNIPLTQTPV	70	82	X			
LPQNIPLTQTPVVVPP	70	85	X			
LPQNIPLTQTPVVVPPFLQ	70	90	X			
LPQNIPLTQTPVVVPPFLQPE	70	91	X			
LPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVM	70	93	X			
PQNIPLTQT	71	80		X		X
NIPPLTQTPVVVPPFLQPEV	73	92			X	
IPPLTQTPV	74	82				X
IPPLTQTPVVVPP	74	86	X			
IPPLTQTPVVVPPFLQ	74	90	X			
PPLTQT	75	80			X	
PPLTQTPVVVPPFL	75	88	X			
TQTPVVVPPFLQPE	78	91	X			
TQTPVVVPPFLQPEVM	78	93	X			
QTPVVVPPFLQPE	79	91	X			
TPVVVPPFLQ	80	90	X			
PVVVPPFLQ	81	89		X		
PVVVPPFLQPE	81	91		X	X	X
PVVVPPFLQPEV	81	92				X
PVVVPPFLQPEVM	81	93		X	X	X



**Tabell V b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia 15 mnd I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RPKHPIKHQGLPQ	1	13	X			
FVAPPFVFGK	24	34	X			
FVAPPFVFGKVKVEL	24	40	X			
HIQKEDVPSERY	80	91		X		
VPSERYLVG	86	94	X			
ERYLVGYLEQL	89	98	X			
GYLEQLRL	93	101	X			
YLEQLRL	94	101	X			
<b>LRKKYKVPQL</b>	99	109		X		
EGHAQQKEPMIG	125	137			X	
EGHAQQKEPMIGVNOEL	125	142		X		
GIHAQQKEPMIGV	126	138			X	
GIHAQQKEPMIGVNOE	126	141		X		
GIHAQQKEPMIGVNOEL	126	142		X		
YVPLGTQY	165	173		X		
YVPLGTQYDAPSF	166	179		X		
SDIPNPIGSENS	180	191		X		
SDIPNPIGSENSE	180	192				X
SDIPNPIGSENSGK	<b>180</b>	<b>193</b>			X	X
SDIPNPIGSENSEK	180	193			X	X
SDIPNPIGSENSGKTTM	<b>180</b>	<b>196</b>		X		

**Tabell V c: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia 15 mnd I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FSDKIAYIPIQ	18	29		X		
IAYIPIQY	22	30		X		
VLSRPSY	31	38		X		
INNQLFLPYPAKPA	51	66		X		
INNQLFLPYPAKPAAVRSPAQI	51	73		X		
VRSPAQIL	67	74		X		
VRSPAQILQ	67	75		X		

**Tabell V d: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia 15 mnd I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VYVEELKPTPEGDL	41	54			X	
YVEELKPTPEGDL	42	55				X
VEELKPTPEGDL	43	54			X	X
VEELKPTPEGDL	43	55				X

**Tabell VI a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norgeia 15 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RELEELNVGGEI	1	12			X	
RELEELNVGGEIVE	1	14			X	
ELEELNVGGEIVE	2	14			X	X
TEDELQDK	41	48				X
SLVYFPGPI	57	66				X
SLVYFPGPIP	57	68				X
SLVYFPGPIHNSLPQNIPLLTQT	<b>57</b>	<b>80</b>		X		
LVYFPGPIP	58	68				X
LVYFPGPIHNS	<b>58</b>	<b>69</b>	X			
<b>LVYFPGPIHNSLPQ</b>	<b>58</b>	<b>72</b>			X	
LVYFPGPIHNSLPQNIPLLTQT	<b>58</b>	<b>80</b>		X		
LVYFPGPIHNSLPQNIPLLTQTP	<b>58</b>	<b>81</b>	X			
VYFPGPIHNS	<b>59</b>	<b>68</b>			X	
VYFPGPIHNSLPQ	<b>59</b>	<b>72</b>				X
VYFPGPIHNSLPQNIPLLTQT	<b>59</b>	<b>80</b>		X		
VYFPGPIHNSLPQNIPLLTQTPVVPFLQPEVM	<b>59</b>	<b>93</b>	X			
<b>VYFPGPIH</b>	<b>60</b>	<b>66</b>			X	
VYFPGPIHNS	<b>60</b>	<b>69</b>	X			X
VYFPGPIHNSLPQNIPL	<b>60</b>	<b>76</b>	X			
VYFPGPIHNSLPQNIPL	<b>60</b>	<b>77</b>	X			
VYFPGPIHNSLPQNIPLLTQTPVVPFLQPEVM	<b>60</b>	<b>93</b>	X			
HNSLPQNIPLLTQT	<b>68</b>	<b>80</b>			X	X
HNSLPQNIPLLTQTPV	<b>68</b>	<b>82</b>			X	
SLPQNIPLLTQT	69	80			X	
SLPQNIPLLTQTPV	69	82			X	X
SLPQNIPLLTQTPVVPFLQPE	69	91			X	X
SLPQNIPLLTQTPVVPFLQPEV	69	92	X		X	X
LPQNIPLLTQTP	70	81	X			
LPQNIPLLTQTPVVPFLQPE	70	86	X			
LPQNIPLLTQTPVVPFLQPE	70	91	X			
LPQNIPLLTQTPVVPFLQPEVM	70	93	X			
PQNIPLLTQT	71	80				X
NIPPLTQTPVVPFLQPE	73	91			X	
NIPPLTQTPVVPFLQPEV	73	92			X	
IPPLTQ	74	79	X			
IPPLTQTPVVPFLQPE	74	86	X			
IPPLTQTPVVPFLQPE	74	87	X			
PPLTQTPVVPFLQPE	75	88	X			
LTPVVPFLQPE	77	91	X			

TQTPVVVPPFLQPE	78	91	X						
TPVVVPPF	80	87	X						
TPVVVPPFLQP	80	90	X						
TPVVVPPFLQPE	80	91	X						
PVVVPPFLQPE	81	91		X					X
PVVVPPFLQPEV	81	92		X					X
PVVVPPFLQPEVM	81	93		X					X
PVVVPPFLQPEVMG	81	94		X					X
PVVVPPFLQPEVMGV	81	95		X					X
GSKVKEAMAPKHKEMFPFKY	94	114		X					
HKEMFPKYVEPFTESQS	106	124		X					
EMPFKYVEPFTESQS	108	124		X					
MPFKYVEP	109	118	X						
FKYVEP	111	119		X					
YPVEPFTESQ	114	123			X				
YPVEPFTESQS	114	124			X				
PVEPFTESQ	115	123			X				X
PVEPFTESQS	115	124		X					X
PVEPFTESQSL	115	125		X					
TLTDVENLHLP	126	139			X				X
TLTDVENLHLP	126	140			X				
LTDVENLHLP	127	139			X				X
LTDVENLHLP	127	140			X				X
TDVENLHLP	128	139			X				X
TDVENLHLP	128	140			X				X
TDVENLHLP	128	141			X				
TDVENLHLP	128	142			X				
DVENLHLP	129	139	X						X
DVENLHLP	129	140		X					X
DVENLHLP	129	141		X					
VENLHLP	130	139			X				X
VENLHLP	130	140			X				X
NLHLP	132	140	X						
LHLP	133	141			X				
LHLP	133	142			X				
QSWMHQHP	141	156		X					
QSWMHQHP	141	162		X					
QSWMHQHP	141	163		X					
QSWMHQHP	141	164		X					
SWMHQHP	142	163		X					
MHQHP	144	154							X
MHQHP	144	155							X
MHQHP	144	160							X
MHQHP	144	161							X

MHQHP	144	162							X
MHQHP	144	163						X	X
HQHP	145	155							X
HQHP	145	162							X
HQHP	145	163							X
QPLP	149	162							X
QPLP	149	163							X
LSLSQSKVLP	163	189						X	
LSLSQSKVLP	164	189						X	
LSLSQSKVLP	164	192	X						
SQSKVLP	166	189						X	
VLVPQKAVP	170	189						X	
AVYPQRDMPIQA	177	189						X	
FLYQEPVLP	190	209						X	
LLYQEPVLP	191	206						X	
LLYQEPVLP	191	209						X	
LYQEPVLP	192	201							X
LYQEPVLP	192	207						X	
LYQEPVLP	192	209						X	
YQEPVLP	193	202						X	
YQEPVLP	193	204							
YQEPVLP	193	205						X	
YQEPVLP	193	206						X	
YQEPVLP	193	207						X	X
YQEPVLP	193	208						X	
YQEPVLP	193	209						X	X
QEPVLP	194	206						X	
QEPVLP	194	207						X	X
QEPVLP	194	208						X	
QEPVLP	194	209						X	X
EPVLP	195	206						X	
EPVLP	195	209						X	
PVLP	196	209						X	X
PVLP	197	209						X	
LGPVLP	198	207							
GPVLP	199	206						X	
GPVLP	199	207						X	
GPVLP	199	209							
PVRGFP	200	207						X	
PVRGFP	200	208						X	
PVRGFP	200	209						X	

**Tabell VI b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia 15 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RPKHPIKHQGLPQ	1	13	X			
VAPPEVFGK	25	34	X			
VAPPEVFGKE	25	35		X		
VAPPEVFGKEKYNE	25	39		X		
APPEVFGK	26	34	X			
PPPEVFGKEKYNE	27	39		X		
HIQKEDVPSE	80	89			X	
HIQKEDVPSEKY	80	91		X		
EDVPSEKY	84	91			X	
EDVPSEKYL	84	92	X			
GYLEQLLRL	93	101	X			
LRKKYKVPQL	99	109		X		
EGHAQQKEPMIGV	125	138			X	
GIHAQQKEPMIG	126	137		X		
GIHAQQKEPMIGVNQE	126	141		X		
GIHAQQKEPMIGVNQEL	126	142		X		
YVPLGTQYTDA	165	176		X		
YVPLGTQYTDAPSF	166	179		X		
SDIPNPIGSEN	180	190		X		
SDIPNPIGSENSE	180	192			X	
SDIPNPIGSENSEK	180	193				X
IPNPIGSENSEKTTMP	182	197	X			

**Tabell VI d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia 15 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FSDKIAYIPIQ	18	29		X		
FSDKIAYIPIQY	18	30		X		
VLSPYPSY	31	38		X		
YYQQKPVVAL	42	50		X		
LINNQLFLPYYPYAKPAA	50	66		X		
INNQLFLPYYPYAKPAA	51	66		X		
INNQLFLPYYPYAKPAAVRS	51	69		X		
INNQLFLPYYPYAKPAAVRSQAQ	51	72		X		
INNQLFLPYYPYAKPAAVRSQAQILQ	51	75		X		
INNQLFLPYYPYAKPAAVRSQAQILQW	51	76		X		
VRSPAQILQ	67	75		X		
VRSPAQILQWQVL	67	79		X		

**Tabell VI e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia 15 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
YVEELKPTPEGDLE	42	54				X
YVEELKPTPEGDLE	42	55				X
YVEELKPTPEGDLE	43	55				X

**Tabell VI c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norgeia 15 mnd II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
YQKFPQY	89	95		X		
LYQGPVILNPWDQVKRN	99	115		X		
YQGPVILNPWDQVKR	100	114		X		
TKKTKLITEEKRLNF	148	163		X		





**Tabell VII c: Peptidfraksjoner fra κ-kasein i Norvegia lettere I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FSDKIAYIPIQ	18	29		X		
FSDKIAYIPIQY	18	30		X		
VLSRYPSY	31	38		X		
INNOFLPYPYAKPAA	51	66		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRS	51	69		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQ	51	72		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQI	51	73		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQIL	51	74		X		
NNQFLPYPY	52	60			X	
VRSQAQILQ	67	75		X		
VRSQAQILQWQVL	67	79		X		

**Tabell VII d: Peptidfraksjoner fra β-laktoglobulin i Norvegia lettere I**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VYVEELKPTPEGDL	41	54			X	
VEELKPTPEGDL	43	54			X	

**Tabell VIII a: Peptidfraksjoner fra β-kasein i Norvegia lettere II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RELEELNVGGEIVE	1	14			X	X
ELEELNVGGEIVE	2	14			X	
TEDELQDKIHPF	41	52			X	
DELDQDKIHPFAQTQSL	43	58		X		
ELQDKIHPF	44	52	X			
LQDKIHPF	45	52	X			
LQDKIHPFAQTQS	45	57		X		
QDKIHPFAQTQSL	46	58		X		
SLVYFPFGPI	57	66			X	
SLVYFPFGPIHNSLPQ	57	72			X	
SLVYFPFGPIHNSLPQNIPLLTQT	57	80		X		
LVYFPFGPI	58	66				X
LVYFPFGPIHNSLPQ	58	72			X	
LVYFPFGPIHNSLPQNIPLLTQT	58	80		X		
VYFPFGPIHN	59	68			X	X
VYFPFGPIHNSLPQ	59	72			X	X
VYFPFGPIHNSLPQNIPLLTQT	59	80		X		
YFPGPIH	60	66	X			
YFPGPIHNS	60	69	X			
HNSLPQNIPLLTQT	68	80			X	X
HNSLPQNIPLLTQTPV	68	82			X	X
SLPQNIPLLTQT	69	80			X	
SLPQNIPLLTQTPV	69	82			X	X
SLPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPEV	69	92			X	
LPQNIPLLTQT	70	80	X			X
LPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPE	70	91	X			
LPQNIPLLTQTPVVVPPFLQPEVM	70	93	X			
PQNIPLLTQT	71	80				X
IPPLTQTPVVVPP	74	86	X			
IPPLTQTPVVVPPFL	74	88	X			
IPPLTQTPVVVPPFLQPE	74	91	X			
IPPLTQTPVVVPPFLQPEVM	74	93	X			
PPLTQTPVVVPPFL	75	88	X			
TQTPVVVPPFLQPE	78	91	X			X
TQTPVVVPPFLQPEVM	78	93	X			
QTPVVVPPFLQPE	79	91	X			
TPVVVPPF	80	87	X			
TPVVVPPFLQPE	80	90	X			
TPVVVPPFLQPE	80	91	X	X		X
TPVVVPPFLQPEVM	80	93	X			





Tabell VIII b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia lettere II

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RPKHPIKHQGIQPE	1	14	X			
RPKHPIKHQGIQPEVL	1	16	X			
VLNENLLR	15	22	X			
VLNENLRF	15	23	X			
FVAPPEVFGK	24	34	X			
FVAPPEVFGKEKVN	24	39		X		
VAPPEVFGKEKVN	25	39		X		
APPEVFGK	26	34	X			
APPEVFGKE	26	35	X			
HIQEDVPSEY	80	91			X	
VPSERYLG	86	93	X			
VPSERYLGL	86	97	X			
<b>LRKKYKVPQL</b>	99	109		X		
EGHAQQKEPMIGVNOEL	125	142		X		
GIHAQQKEPMIGVN	126	139		X		
GIHAQQKEPMIGVNOE	126	141		X		
GIHAQQKEPMIGVNOEL	126	142		X		
EPMIGVNOELA	133	143			X	
FRQFYQL	150	156		X		
YVPLGTQYTDA	165	176		X		
YVPLGTQYTDAPSF	166	179		X		
SDIPNPIGSEN	180	190		X		
SDIPNPIGSENSE	180	192			X	X
SDIPNPIGSENSE	180	192				
SDIPNPIGSENSEK	180	193			X	X
SDIPNPIGSENSGK	<b>180</b>	<b>193</b>			X	X
SDIPNPIGSENSGKTTM	<b>180</b>	<b>196</b>			X	
SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	<b>180</b>	<b>199</b>			X	
IPNPIGSENSEKTTMP	182	197	X			

Tabell VIII c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Norgeia lettere II

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
LYQGPVILNPWDQVKR	99	114		X		
YQGPVILNPWDQVKRNAVPIT	100	120		X		
YQGPVILNPWDQVKRNAVPITPTL	100	123		X		
FTKTKLTTEEEKRLNF	147	163		X		

Tabell VIII d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia lettere II

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FSDKIAKYPIQ	18	29		X		
FSDKIAKYPIQY	18	30		X		
FSDKIAKYPIQYVL	18	32		X		
VLSRYPYS	31	38		X		
YYQQKPVAL	42	50		X		
INNOFLPYPYAKPAA	51	66		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRS	51	69		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQ	51	72		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQILQ	51	75		X		
NNQFLPYPY	52	60			X	
VRSPAQILQ	67	75		X	X	
VRSPAQILQWQVL	67	79		X	X	

Tabell VIII e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia lettere II

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
VYVEELKPTPEGDL	41	54			X	
VEELKPTPEGDL	43	55				X



SLSQSKVLPVQKAVPYQ	164	182	X			
SLSQSKVLPVQKAVPYQRDMPPIQA	164	189		X		
SQSKVLPVQKAVPYQRDMPPIQA	166	189		X		
SKVLPVQKAVPYQRDMPPIQA	168	189		X		
VYPYQ	178	182				X
LYQEPVLPVVRGPPF	192	206	X			
LYQEPVLPVVRGPPFI	192	207			X	
LYQEPVLPVVRGPPPII	192	209	X	X		
<b>YQEPVLPVVR</b>	193	202	X	X		X
YQEPVLPVVRGPPF	193	206	X	X		X
YQEPVLPVVRGPPFI	193	207	X	X		X
YQEPVLPVVRGPPPII	193	208	X			
<b>YQEPVLPVVRGPPPII</b>	193	209		X		
QEPVLPVVRGPPF	194	206	X			
QEPVLPVVRGPPFI	194	207	X	X		X
QEPVLPVVRGPPPII	194	209	X	X		X
EPVLPVVRGP	195	204	X			
EPVLPVVRGPF	195	205	X			
EPVLPVVRGPPF	195	206	X	X		X
EPVLPVVRGPPFI	195	207		X		
EPVLPVVRGPPPII	195	208	X			
EPVLPVVRGPPPII	195	209	X			
PVLGPVVRGPPFI	196	207	X	X		X
VLGPVVRGPPFI	197	207	X			
VLGPVVRGPPPII	197	209	X			
LGPVVRGPPFI	198	207		X		X
GPVVRGPPFI	199	207		X		X
GPVVRGPPFI	199	208	X			
GPVVRGPPPII	199	209	X	X		
PVRGPPFI	200	207				X
PVRGPPFI	200	208		X		X
PVRGPPPII	200	209				X

Tabell IXb: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norvegia økologisk I

Peptid	Ufordøyd		HG160	HD160	HD1120
	Fra	Til			
RPKHPIKHQGLIQ	1	13	X		
RPKHPIKHQGLIQE	1	14	X		
EVLNLLRF	14	23	X		
VLNENLLR	15	22	X		
VLNENLLRF	15	23	X		
FVAPFPEV	24	31	X	X	
FVAPFPEVFGK	24	34			

FVAPFPEVFGKEK	24	36	X			
FVAPFPEVFGKEKVE	24	39		X		
FVAPFPEVFGKEKVNEL	25	40		X		
VAPFPEVFGKEKVE	25	39		X		
APFPEVFGK	26	34	X	X		
APFPEVFGKE	26	35	X			
FPEVFGK	28	34	X			
HIQKEDVPSE	80	89			X	
HIQKEDVPSE	80	90			X	
HIQKEDVPSE	80	91		X		X
EDVPSERY	84	91			X	
DVPSERYLGY	85	94	X			
GYLEQLLRL	93	101	X			
<b>LRKKYKVPQL</b>	99	109		X		
YKVPQLEIVPN	104	114			X	X
EGHAQQKEPMIGV	125	138			X	X
EGHAQQKEPMIGVNQEL	125	142			X	
EGHAQQKEPMIGVNQELA	125	143			X	
GIHAQQKEPMIG	126	137		X		
GIHAQQKEPMIGVN	126	139		X		
GIHAQQKEPMIGVNQE	126	141		X		
GIHAQQKEPMIGVNQEL	126	142		X		
EPMIGVNQELA	133	143			X	
FRQFYQL	150	156		X		
YVYPL	165	169			X	
YVYPLGTQYTD	165	176			X	
YVYPLGTQYTDAPSF	166	179		X		
SDIPNPIGSENSE	180	192			X	
SDIPNPIGSGNSEK	<b>180</b>	<b>193</b>			X	X
SDIPNPIGSENSEK	180	193			X	X
SDIPNPIGSENSEKTTM	180	196			X	
SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	<b>180</b>	<b>199</b>			X	
SDIPNPIGSENSEKTTMPLW	180	199			X	
IPNPIGSENSEK	182	193				X

**Tabell IX c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{s2}$ -kasein i Norgeia økologisk I**

Peptid	Fra	Til	Ufordøyd ost	HG160	HDJ60	HDJ120
VVRNANEYY	43	52		X		
ITVDDKHYQ	71	79			X	
YQKFPQYL	89	96			X	
LYQGPVILNPW/DQVKR	99	114		X		
YQGPVILNPWDQVKR/NAVPI	100	120		X		
PIVLNPW/DQVK	103	113			X	
NAVPI/TPLNR	115	125			X	
FTKTKLITEEKNR/LNF	147	163		X		

**Tabell IX d: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia økologisk I**

Peptid	Fra	Til	Ufordøyd ost	HG160	HDJ60	HDJ120
VRSPAQILQ	67	75				X

**Tabell IX e: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -laktoglobulin i Norgeia økologisk I**

Peptid	Fra	Til	Ufordøyd ost	HG160	HDJ60	HDJ120
VYVEELKPTPEGDL	41	54			X	
YVEELKPTPEGDL	42	54				X
YVEELKPTPEGDL	42	55			X	
VEELKPTPEGDL	43	55				X

**Tabell X a: Peptidfraksjoner fra  $\beta$ -kasein i Norgeia økologisk II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HG160	HDJ60	HDJ120
RELEELNVPGEI	1	12			X	X
RELEELNVPGEI	1	14			X	X
ELEELNVPGEI	2	14			X	
DELODKIHPF	43	52	X			
ELQDKIHPF	44	52	X			
LQDKIHPF	45	52	X			
DKIHPFAQTQ	47	56	X			
IHPFAQTQS	49	57			X	
SLVYPPGPI	57	66				X
<b>LVYPPGPIHNSLIPQ</b>	<b>58</b>	<b>72</b>			X	
LVYPPGPIHNSLIPQ/NIPPLTQT	<b>58</b>	<b>80</b>		X		
LVYPPGPIHNSLIPQ/NIPPLTQT	58	80		X		
LVYPPGPIHNSLIPQ/NIPPLTQT	<b>58</b>	<b>81</b>	X			
VYPPGPIHN	<b>59</b>	<b>68</b>			X	X
VYPPGPIHNSLIPQ/NIPPLTQT	59	80		X		
<b>YPPGPIH</b>	<b>60</b>	<b>66</b>	X			
YPPGPIHNS	<b>60</b>	<b>69</b>	X			
YPPGPIHNSLIPQ/NIPPL	<b>60</b>	<b>77</b>	X			
HNSLIPQ/NIPPLTQT	<b>68</b>	<b>80</b>			X	X
HNSLIPQ/NIPPLTQTPV	<b>68</b>	<b>82</b>				X
SLPQ/NIPPLTQTPV	69	82				X
SLPQ/NIPPLTQTPVVVPPFLQPEVM	69	93	X			
LPQ/NIPPLTQT	70	80	X			
LPQ/NIPPLTQT	70	81	X			
<b>LPQ/NIPPLTQTPVVVPP</b>	70	86	X			
LPQ/NIPPLTQTPVVVPPFLOPE	70	91	X			
LPQ/NIPPLTQTPVVVPPFLOPEV	70	92	X			
LPQ/NIPPLTQTPVVVPPFLOPEVM	70	93	X			
PQ/NIPPLTQT	71	80				X
<b>IPPLTQTPVVVPP</b>	74	86	X			
IPPLTQTPVVVPPF	74	87	X			
IPPLTQTPVVVPPFLOPE	74	91	X			
IPPLTQTPVVVPPFLOPEVM	74	93	X			
LTPQTPVVVPPFLOPEVM	77	93	X			
TQTPVVVPPFLOPE	78	91	X			
TQTPVVVPPFLOPEVM	78	93	X			
TPVVVPPF	80	87	X			
TPVVVPPFLOPE	80	90	X			
TPVVVPPFLOPE	80	91	X			
TPVVVPPFLOPEVM	80	93	X			

PVVVPELQPE	81	91	X	X	X	X	X	X
PVVVPFLQPEV	81	92		X	X	X	X	X
PVVVPFLQPEVM	81	93		X	X	X	X	X
PVVVPFLQPEVMG	81	94		X	X	X	X	X
GVSKVKEAMAPK	94	105		X	X	X	X	X
GVSKVKEAMAPKHKEMFPFKY	94	114		X	X	X	X	X
APKHKEMFPFKYVEPF	103	119	X					
HKEMFPFK	106	113				X		
HKEMFPFKYVEPFTE	106	121		X	X			
HKEMFPFKYVEPFTEQS	106	124		X	X			
EMFPFKYVEPFTEQS	108	124		X	X			
MPFPKYP	109	115	X					
MPFPKYVEP	109	118	X					
MPFPKYVEPF	109	119	X					
FKYVPEPF	111	119	X					
YVPEPFESQ	114	123			X			
PVEPFTEQS	115	123			X			
PVEPFTEQS	115	124		X			X	
LTDVENLHLP	127	139			X		X	
LTDVENLHLP	127	140		X				
TDVENLHLP	128	139			X		X	
TDVENLHLP	128	140		X			X	
TDVENLHLP	128	141		X				
TDVENLHLP	128	142		X				
DVENLHLP	129	139	X		X		X	
DVENLHLP	129	140		X	X		X	
VENLHLP	130	139	X		X		X	
VENLHLP	130	140		X	X			
NLHLP	132	140			X			
LHLP	133	142		X				
QSWMHQHP	141	163		X				
MHQHP	144	154					X	
MHQHP	144	155			X		X	
MHQHP	144	160			X			
MHQHP	144	162			X		X	
MHQHP	144	163			X		X	
HQHP	145	155			X		X	
HQHP	145	162			X		X	
HQHP	145	163			X		X	
SLSQSKVLPVQ	164	175	X					
SLSQSKVLPVQKAVVPQR	164	183		X				
SLSQSKVLPVQKAVVPQRDMPIQ	164	188		X				
SLSQSKVLPVQKAVVPQRDMPIQA	164	189		X				
SLSQSKVLPVQKAVVPQRDMPIQAF	164	190		X				

SLSQSKVLPVQKAVVPQRDMPIQAFILL	164	192	X					
VLPVQKAVVPQRDMPIQA	170	189		X				
KAVVPQR	176	183		X				
AVVPQRDMPIQA	177	189		X				
LLYQEPVLPVVRGPFPIIV	191	209	X					
LYQEPVLPVVRGPFPI	192	206	X					
LYQEPVLPVVRGPFPI	192	207			X			
LYQEPVLPVVRGPFPIIV	192	209			X			
YQEPVI	193	198			X			
YQEPVLPV	193	201				X		
YQEPVLPV	193	202			X			
YQEPVLPVVRGPF	193	204	X					
YQEPVLPVVRGPF	193	205			X			
YQEPVLPVVRGPFPI	193	206	X					
YQEPVLPVVRGPFPI	193	207		X				
YQEPVLPVVRGPFPII	193	208	X					
YQEPVLPVVRGPFPIIV	193	209	X					
QEPVLPV	194	202			X			
QEPVLPVVRGPFPI	194	206	X					
QEPVLPVVRGPFPI	194	207			X			
QEPVLPVVRGPFPIIV	194	209	X					
EPVLPVVRGPF	195	204	X					
EPVLPVVRGPF	195	205	X					
EPVLPVVRGPFPI	195	206	X			X		
EPVLPVVRGPFPI	195	206	X					
EPVLPVVRGPFPI	195	207	X			X		
EPVLPVVRGPFPII	195	208	X					
EPVLPVVRGPFPIIV	195	209	X					
PVLPVVRGPFPI	196	206	X					
PVLPVVRGPFPI	196	207	X			X		
PVLPVVRGPFPIIV	196	209			X			
VLGPVVRGPFPI	197	207	X					
LGPVVRGPFPI	198	207			X			
GPVVRGPFPI	199	207			X			
GPVVRGPFPIIV	199	209				X		
PVVRGPFPI	200	207	X					
PVVRGPFPII	200	208			X			
PVVRGPFPIIV	200	209			X			
GPVVRGPFPI	203	207						X

Tabell X b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Norgeia økologisk II

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
RPKHPIKHQGLPQE	1	14	X			
RPKHPIKHQGLPQEV	1	16		X		
EVLNELLRF	14	23	X			
VLNENLLR	15	22	X			
FVAPPEVFGK	24	34	X	X		
FVAPPEVFGKENVEL	24	40	X			
VAPPEVFGK	25	34		X		
VAPPEVFGKENVNE	25	39		X		
APPEVFGK	26	34	X	X		
APPEVFGKE	26	35	X			
PFPEVFGK	27	34		X		
AMEDIKQM	53	60			X	X
HIQKEDVPSE	80	89			X	
HIQKEDVPSER	80	90			X	
HIQKEDVPSERY	80	91			X	
DVPSERYLGY	85	94	X			
VPSERYLG	86	93	X			
ERYLGYLK	89	96	X			
ERYLGYLE	89	96	X			
YLEQLLRL	94	101	X			
<b>LRKKYVPQL</b>	99	109		X		
EGHAQQKEPMIGV	125	138			X	
EGHAQQKEPMIGVNOEL	125	142		X		
GIHAQQKEPMIG	126	137		X		
GIHAQQKEPMIGVNOEL	126	142		X		
EPMIGVNOELA	133	143				X
FRQFYQL	150	156		X		
YVPLGTQYTDA	165	176		X		
YVPLGTQYTDAPS	166	178				X
YVPLGTQYTDAPSF	166	179		X		
SDIPNPIGSEN	180	190		X		
SDIPNPIGSENSE	180	192			X	
SDIPNPIGSENSEK	180	193			X	X
SDIPNPIGSENSEK	180	193			X	X
SDIPNPIGSENSGKTTM	180	196		X		
SDIPNPIGSENSEKTTM	180	196			X	
SDIPNPIGSENSGKTTMPLW	180	199		X		
IPNPIGSENSEK	182	193			X	
IPNPIGSENSEKTTMP	182	197	X			

Tabell X c: Peptidfraksjoner fra  $\kappa$ -kasein i Norgeia økologisk II

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FSDKIAYIPIQ	18	29		X		
FSDKIAYIPIQY	18	30		X		
FSDKIAYIPIQYVL	18	32		X		
VLSRYPY	31	38		X		
INNOFLPYPYAKPAA	51	66		X		
INNOFLPYPYAKPAAVRSQAQLQ	51	75		X		
VRSPAQLQ	67	75		X		
VRSPAQLQWQVL	67	79		X		





MHQPPQLSPTV	144	155							X
MHQPPQLSPTVM	144	156			X				
MHQPPQLSPTVMFPPOSVL	144	163			X				
HQPPQLSPT	145	154					X		
SPTVMFPPOSV	152	162					X		X
MFPPO	156	160							X
LSLSQKVLVVPQ	163	175		X					
SLSQKVLVVPQKVVQRDMPIQA	164	187			X				
VLPVQKVVQ	170	180		X			X		X
LLYQEPVLGVRGPFPII	189	206			X				
LYQEPVLGPV	190	199					X		
LYQEPVLGVRGP	190	202		X					
LYQEPVLGVRGPF	190	204		X					
LYQEPVLGVRGPFPI	190	205					X		X
LYQEPVLGVRGPFPII	190	206					X		X
YQEPVLGPV	191	199					X		
YQEPVLGPR	191	200							X
YQEPVLGVRGP	191	202		X					
YQEPVLGVRGPF	191	203					X		X
YQEPVLGVRGPF	191	204		X					X
YQEPVLGVRGPFPI	191	205		X			X		X
YQEPVLGVRGPFPI	191	205							
YQEPVLGVRGPFPII	191	206		X			X		
YQEPVLGVRGPFPIIV	191	207		X			X		
QEPVLGVRGPFPI	192	205					X		X
QEPVLGVRGPFPII	192	206					X		X
QEPVLGVRGPFPIIV	192	207		X					
EPVLGVRGPFPI	193	205		X					
EPVLGVRGPFPII	193	206		X			X		
PVLGVRGPFPI	194	205					X		X
PVLGVRGPFPII	194	206							X
PVLGVRGPFPIIV	194	207			X				
LGPVRGPFPI	196	205							
GPVRGPFPI	197	205		X			X		X
PVRGPFPI	198	205							X
PVRGPFPII	198	206			X		X		X

Tabell XI b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Snøfrisk I

Peptid	Fra	Til	Ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
LRLLKYNVPOI	99	109		X		0
NVPOLEIVPK	105	114			X	
HSMKEGNPAHQKQPMIA	121	137		X		
HSMKEGNPAHQKQPMIAVNOEL	121	142		X		
FRQFYQL	150	156		X		
SDIPNPIGSENSGK	180	193			X	
SDIPNPIGSENSGKTTM	180	196		X		

Tabell XI c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Snøfrisk I

Peptid	Fra	Til	Ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
FQEYKQEKNM	17	27		X		
IKITVDDKHQ	70	80				X
IKITVDDKHQKALNEINQF	70	89		X		X
ITVDDKHQ	72	80				X
TVDDKHQ	73	80			X	X
NQFYQKFPQ	87	95			X	
YQKFPQ	90	96		X		
LQYPYQGPVILNPWDQV	97	113			X	
LQYPYQGPVILNPWDQVKR	97	115		X		
PYQGPVILNPWDQV	100	113				X
QGPVILNPWDQV	102	113			X	X
RNAGPFTPVN	115	125				X
NAGPFTPVNRE	116	127			X	X
TKTKLTFEKKRLNF	149	164		X		
KTKLTFEKKRLNF	151	164		X		
YQKFAWPQY	172	180		X		
YQKFAWPQYL	172	181		X		



PVLGVRGPFPIIV	194	207		X	
LGFVRGPFPII	196	206			X
GPVRGPFPI	197	205			X
GPVRGPFPII	197	206			X
PVRGPFPI	198	205			X
PVRGPFPII	198	206		X	X

**Tabell XII b: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S1}$ -kasein i Snøfrisk II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
LRKKYVVPQL	99	109		X		
HSMKEGNPAHQKQPMIAVNOEL	121	142		X		
FRQFYQL	150	156		X		
SDIPNPIGSENSGKTTM	180	196		X		

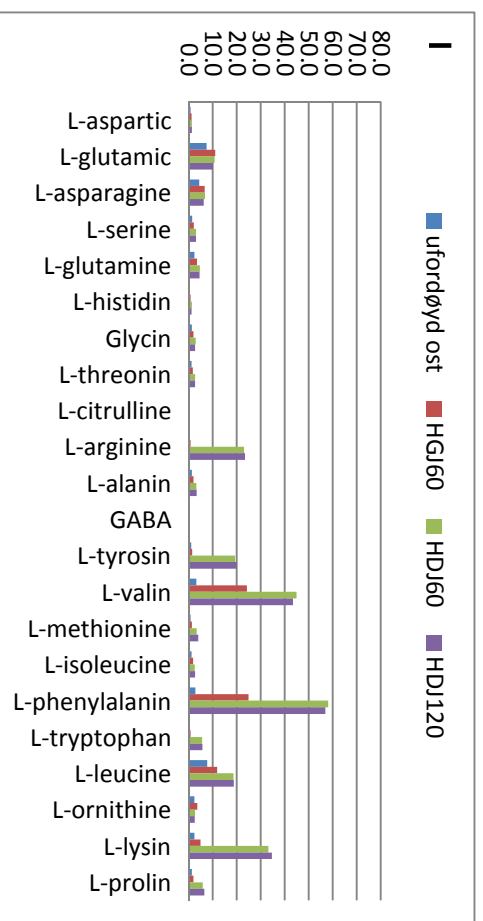
**Tabell XII c: Peptidfraksjoner fra  $\alpha_{S2}$ -kasein i Snøfrisk II**

Peptid	Fra	Til	ufordøyd ost	HGJ60	HDJ60	HDJ120
IKITVDDDKHYQ	70	80				X
IKITVDDDKHYQKALNEINQF	70	89		X		
YQKFPQY	90	96		X		
LQYPYQGGPIVL	97	107				X
LQYPYQGGPIVLNPWDQVKR	97	115		X		
NAGPPTPTVARE	116	127				X
KTKLITEEEKNRLNF	151	164		X		
KTKLITEEEKNRLNF	152	164		X		
YQKFAWPQY	172	180		X		
YQKFAWPQYL	172	181		X		

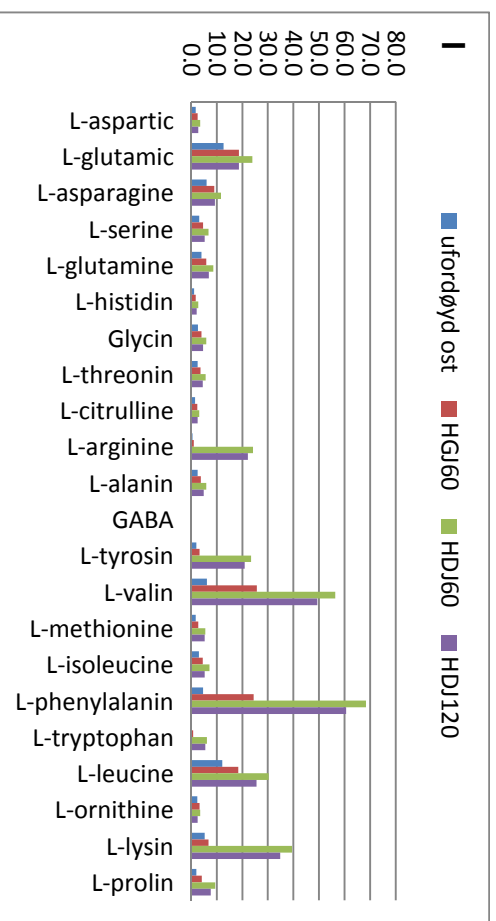
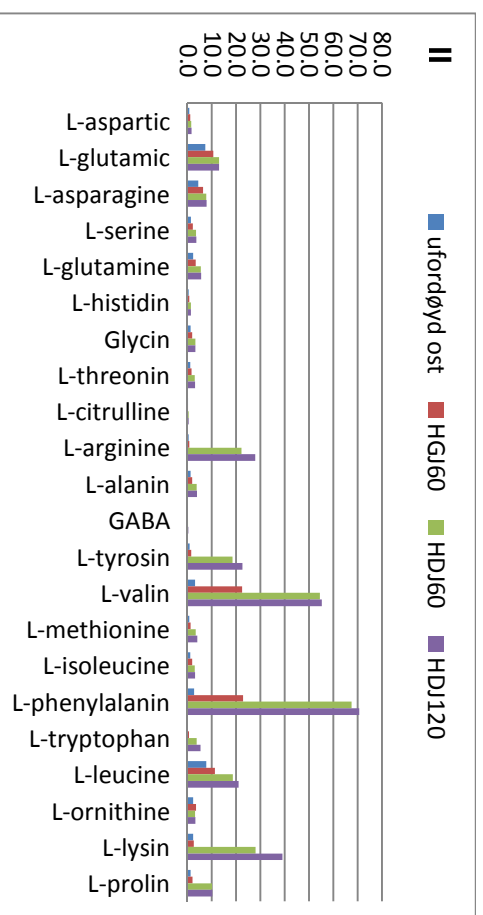
## **Vedlegg 2: Innhold av frie aminosyrer før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ – alle resultater**

Figur I-VI viser innholdet av frie aminosyrer i ufordøyd og fordøyd Norvegia lagret 3, 9 og 15 mnd, samt Norvegia lettere, Norvegia økologisk og Snøfrisk hvitost.

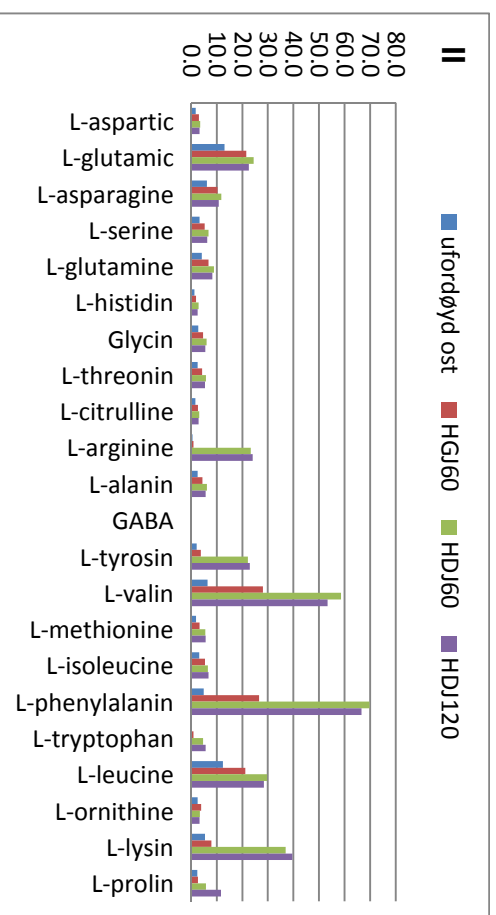
Osteprøvene ble undersøkt ved RP-HPLC analyse (2 gjentak).

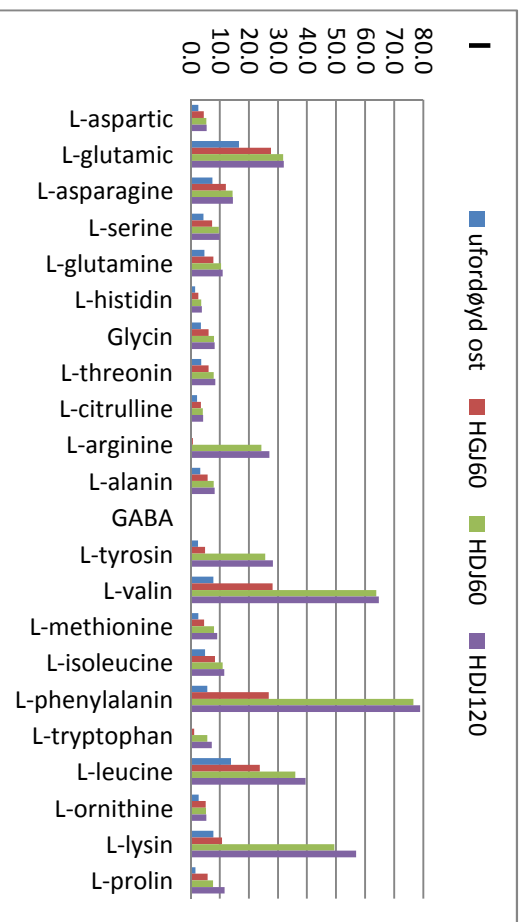


Figur I: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia I og II

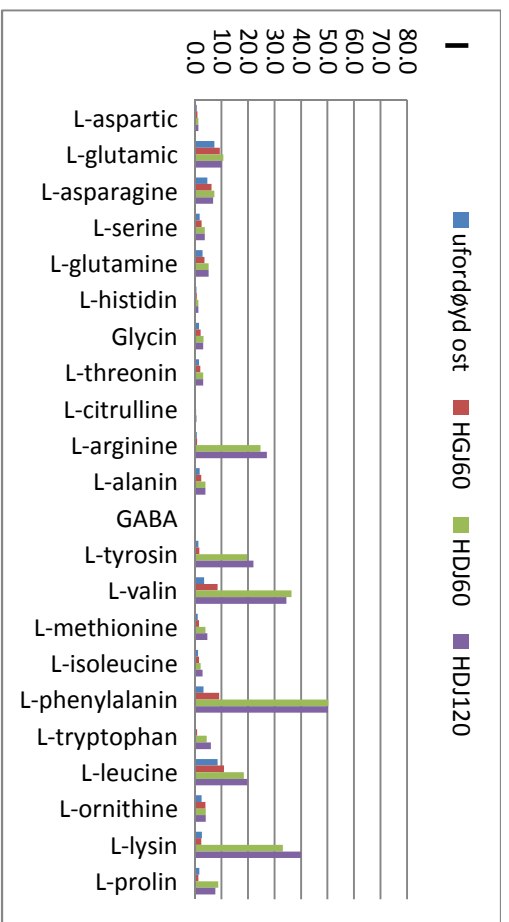
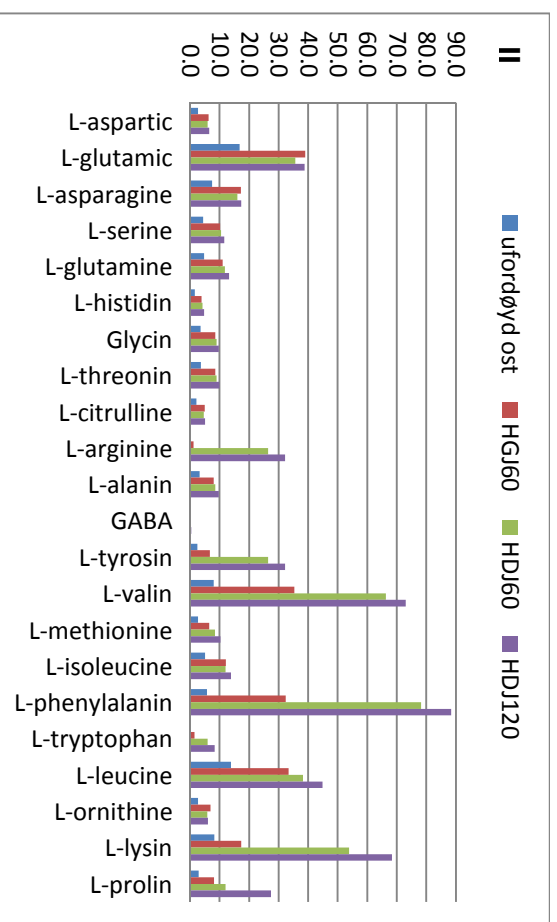


Figur II: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia 9 mnd I og II

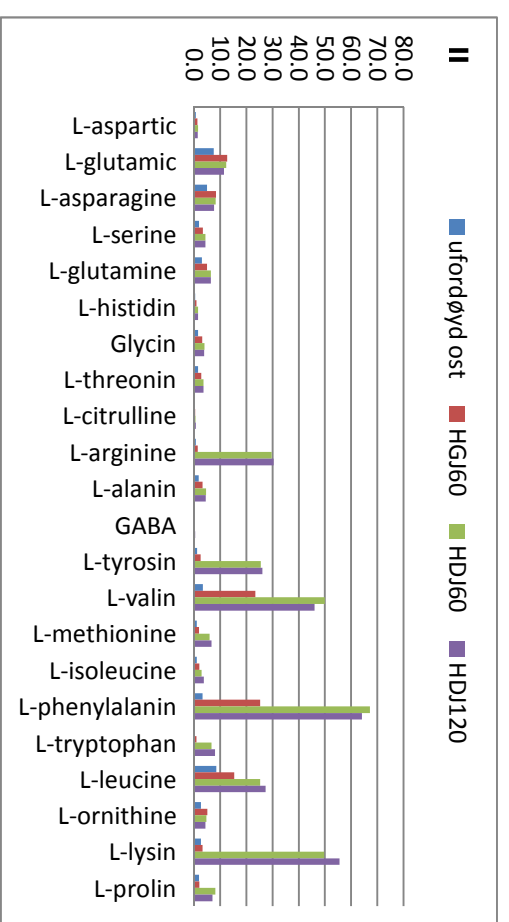


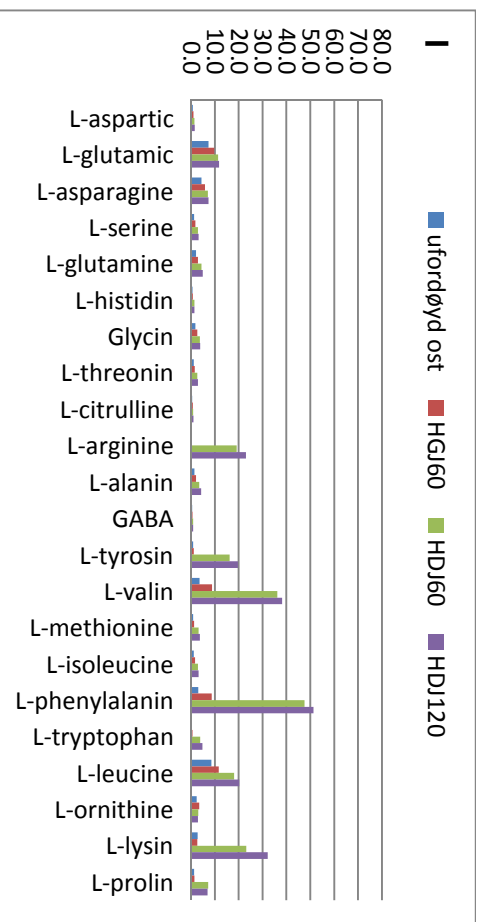


Figur III: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia 15 mnd I og II

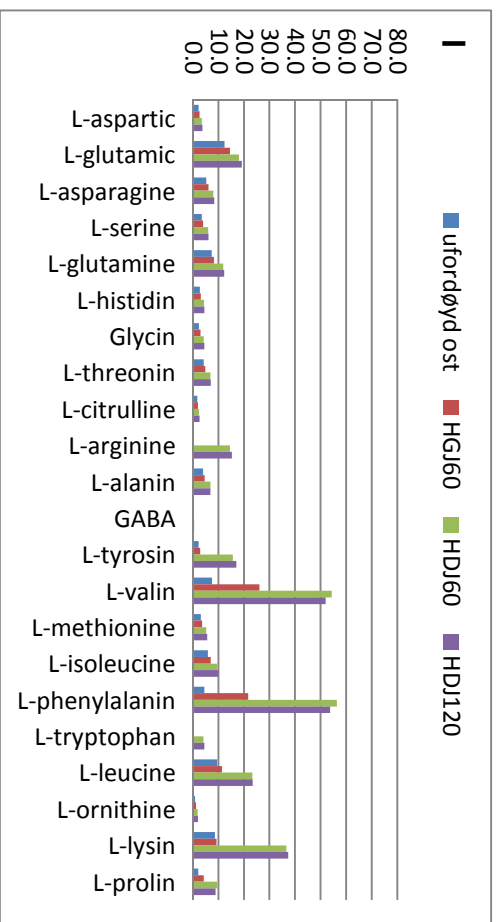
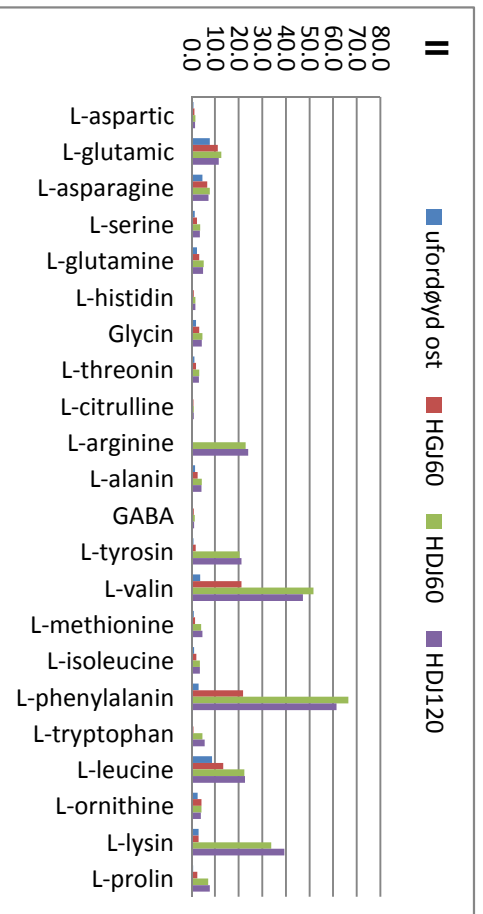


Figur IV: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia lettere I og II





Figur V: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Norvegia økologisk I og II



Figur VI: Frie aminosyrer (µmol/ml) i ufordøyd og fordøyd Snøfrisk I og II

