



Forord

Denne masteroppgaven ble utført høsten 2013, samt deler av våren 2014, ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Norges miljø og biovitenskapelige universitet.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder for denne oppgaven, professor Judith A. Narvhus, for inspirasjon, engasjement, god oppfølging og veiledning. Jeg vil også rette en stor takk til førsteamanuensis Hilde M. Østlie, som har vært biveileder, for gjennomlesning av oppgaven og for gode råd.

En stor takk rettes også til Trond Vilhelm Lund ved Rørosmeieriet for tilsendt tettemelk, og Heidi Y. Grønnevik ved TINE for overrekkelse av kefir brukssyre.

Jeg vil også takke det tekniske personellet ved laboratoriet på Instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap for all hjelp og gode råd under gjennomføringen av forsøket og for et fantastisk arbeidsmiljø.

En spesiell takk rettes til overingeniør Kari R. Olsen som har hjulpet til med den praktiske utførelsen av forsøkene og analysebehandlinger.

Ås, mars 2014

Jeanette M. V. Syvertsen

Sammendrag

Det har blitt dokumentert at flere melkesyrebakteriestammer kan produsere GABA, som kan ha en blodtrykkssenkende effekt hos mennesker med mild hypertensjon. Utviklingen av mengde GABA har imidlertid ikke blitt undersøkt under både fermentering og lagring av surmelksprodukter med sammensatte kulturer. Målet med dette studiet var å undersøke innholdet av aminosyrer, spesielt GABA, under fermentering og lagring av ulike surmelksprodukter, samt å oppnå en økt innsikt i metabolismen av aminosyrer.

For å undersøke endringene i konsentrasjon av de ulike aminosyrene ble UHT-melk inokulert med ulike syrekulturer. Det ble benyttet brukssyre tillaget av kefir for produksjon av kefir, brukssyre av frysetørket DL-kultur for produksjon av kulturmilk, kommersiell tettemelk for fermentering av tettemelk (alle ved 22 °C), og to ulike frysetørkede yoghurtkulturer (YF-L901 og YC-183) for produksjon av to ulike typer yoghurt (begge ved 43 °C). Det ble tatt ut prøver til kjemiske analyser ved flere tidspunkt under fermentering, samt hver uke gjennom 4 ukers lagring ved 4 °C. Analysene ble også gjennomført hver tiende dag på kommersiell tettemelk ved lagring gjennom holdbarhetstiden på 60 dager.

Resultatene viste at det var mange fellestrekk med hensyn på omsetning av aminosyrer i de mesofile produktene. Generelt økte mengden av forgrenede aminosyrer, aromatiske aminosyrer, asparagin, histidin og lysin jevnt gjennom fermenteringen, for deretter å være stabil under lagring, mens arginin og glycin ble forbrukt under fermentering, og glutaminsyre ble forbrukt under lagring. Videre tydet resultatene på at tettemelkskulturen hadde en større evne til å produsere GABA under lagring enn kulturene i kefir og kulturmilk.

Yoghurtkulturene skilte seg fra de mesofile syrekulturene ved at mengden frie aminosyrer som allerede var tilgjengelig ved starten av fermenteringen stort sett ble forbrukt før den proteolytiske aktiviteten førte til frigjøring av aminosyrer fra peptider og dermed en netto økning i konsentrasjonen av aminosyrene. Det ble også avdekket at evnen til produksjon av GABA er stammespesifikk hos *S. thermophilus* og *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, noe som støttes av andre studier.

Det ble også utført et forsøk på å øke mengden GABA i yoghurt (YC-183) ved å tilsette glutaminsyre før inokulering. Resultatene viste at tilsetning av glutaminsyre først har en innvirkning på produksjon av GABA under lagring, hvor resterende mengde glutaminsyre ble fullstendig omsatt til GABA i løpet av to ukers lagring, uavhengig av konsentrasjonen ved

starten av fermentering. Resultatene antyder at GABA produseres i to trinn av yoghurtbakterier, og at tilsetning av glutaminsyre kan ha en innvirkning på metabolismen av glutamin og glycin.

Abstract

It has been documented that several strains of lactic acid bacteria are able to produce GABA, which may have a blood pressure lowering effect in people with mild hypertension. The development of the amount of GABA has not been examined during both the fermentation and storage of fermented milk products with complex starter cultures. The object of this study was to examine the content of amino acids, especially GABA, during fermentation and storage of different fermented dairy products, and to obtain a better insight into the metabolism of amino acids.

To investigate the changes in concentration of the different amino acids, UHT milk was inoculated with different starter cultures. For production of kefir a starter culture obtained from a 2-step fermentation with kefir grains was used, for cultured buttermilk a freeze dried DL culture was used, a commercial ropy milk (tettermelk) was used for fermentation of a ropy milk (all at 22 °C), and two different freeze dried yoghurt starters (YF-L901 and YC-183) for production of two different types of yoghurt (both incubated at 43 °C). Samples for chemical analysis were prepared at several times during the fermentation, and every week during 4 weeks of storage at 4 °C. The analysis were also conducted on stored commercial ropy milk every tenth day during the 60 days of shelf life.

The results showed several similarities with respect to the metabolism of amino acids in the mesophilic products. In general, the amount of branched chain amino acids, aromatic amino acids, asparagine, histidine and lysine increased evenly throughout the fermentation, and then continued to be stable during storage, while arginine and glycine were consumed during fermentation, and glutamic acid was consumed during storage. Furthermore, the results indicated that the ropy milk culture had a greater ability to produce GABA during storage than the cultures in kefir and cultured buttermilk.

The yoghurt cultures differed from the mesophilic cultures in which the amount of free amino acids that were already available in the beginning of fermentation, were mainly consumed before the proteolytic activity led to release of amino acids from peptides, and thus a net increase in the concentration of amino acids. It was also revealed, that the ability to produce GABA is strain specific in *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, which is supported by other studies.

An attempt to increase the amount of GABA in yoghurt (YC-183) by adding glutamic acid before inoculation was also carried out. The results showed that the addition of glutamic acid first was observed during storage, where the remaining amount of glutamic acid was completely metabolized to GABA during two weeks of storage, independent of the concentration in the beginning of fermentation. These results also suggest that GABA is produced in two steps by the yoghurt bacteria, and that the addition of glutamic acid may have an effect on the metabolism of glutamine and glycine

Innholdsfortegnelse

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INNLEDNING | 1 |
| 2 LITTERATUR | 3 |
| 2.1 Melkesyrebakterier..... | 3 |
| 2.2 Melkens sammensetning | 3 |
| 2.2.1 Aminosyrer i melk..... | 4 |
| 2.3 Fermentering av melk | 5 |
| 2.4 Noen fermenterte meieriprodukter | 6 |
| 2.4.1 Kefir..... | 6 |
| 2.4.2 Kulturmelk | 7 |
| 2.4.3 Tettmelk..... | 7 |
| 2.4.4 Yoghurt | 8 |
| 2.5 Karbohydratmetabolisme | 9 |
| 2.5.1 Homofermentativ nedbrytning av laktose | 10 |
| 2.5.2 Heterofermentativ nedbrytning av laktose..... | 10 |
| 2.6 Sitratmetabolisme..... | 11 |
| 2.7 Alternativ pyruvatmetabolisme | 12 |
| 2.8 Aminosyremetabolisme | 14 |
| 2.8.2 Deiminering..... | 15 |
| 2.8.3 Dekarboksylering..... | 17 |
| 2.8.4 Deaminering..... | 18 |
| 2.8.5 Eliminering | 19 |
| 2.8.6 Transaminering..... | 20 |
| 2.9 Tiltenkte positive helseeffekter hos tradisjonelle surmelksprodukter | 28 |
| 2.9.1 Bioaktive peptider..... | 28 |
| 2.9.2 Ekstracellulære polysakkarider | 29 |
| 2.9.3 Laktoseintoleranse..... | 30 |
| 2.9.5 γ -aminobutyrat (GABA)..... | 31 |
| 3 MATERIALER OG METODER | 33 |
| 3.1 Forsøksdesign..... | 34 |
| 3.2 Innledende forsøk..... | 34 |
| 3.3 Hovedforsøk..... | 35 |
| 3.3.1 Kefir..... | 36 |
| 3.3.2 Kulturmelk | 36 |
| 3.3.3 Tettmelk..... | 36 |
| 3.3.4 Yoghurt | 37 |
| 3.3.5 Kjemiske analyser..... | 38 |
| 4 RESULTATER | 42 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1 pH..... | 43 |
| 4.1.1 Kefir, kulturmilk og tettemilk..... | 43 |
| 4.1.2 Yoghurt | 44 |
| 4.2 Karbohydratmetabolisme | 45 |
| 4.2.2 Pyrodruesyre..... | 49 |
| 4.2.3 Acetaldehyd og etanol..... | 51 |
| 4.3 Sitratmetabolisme..... | 55 |
| 4.3.1 Kefir..... | 55 |
| 4.3.2 Kulturmilk | 56 |
| 4.3.3 Tettemilk..... | 57 |
| 4.3.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901 | 59 |
| 4.3.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 | 60 |
| 4.4 Omsetning av aminosyrer | 61 |
| 4.4.1 Forgrenede aminosyrer (leucin, isoleucin og valin)..... | 61 |
| 4.4.2 Aromatiske aminosyrer | 73 |
| 4.4.3 Glutaminsyre og GABA | 83 |
| 4.4.4 Glutamin | 88 |
| 4.4.5 Arginin, citrullin og ornitin | 92 |
| 4.4.6 Asparaginsyre og alanin..... | 96 |
| 4.4.7 Treonin..... | 101 |
| 4.4.8 Glycin..... | 104 |
| 4.4.9 Serin..... | 107 |
| 4.4.10 Metionin..... | 111 |
| 4.4.11 Lysin..... | 112 |
| 4.4.12 Asparagin..... | 115 |
| 4.4.13 Histidin | 118 |
| 4.4.14 Frie aminosyrer | 121 |
| 5 DISKUSJON | 124 |
| 5.1 pH..... | 125 |
| 5.2 Karbohydratmetabolisme | 126 |
| 5.2.1 Pyrodruesyre..... | 127 |
| 5.2.2 Acetaldehyd og etanol..... | 128 |
| 5.3 Sitratmetabolisme..... | 129 |
| 5.3.1 Sitronsyre og eddiksyre..... | 129 |
| 5.3.2 Diacetyl og acetoin..... | 130 |
| 5.4 Aminosyreomsetning | 131 |
| 5.4.1 Forgrenede aminosyrer (leucin, isoleucin og valin)..... | 132 |
| 5.4.2 Aromatiske aminosyrer (tryptofan, fenylalanin og tyrosin)..... | 135 |
| 5.4.3 Glutaminsyre og GABA | 136 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.4.4 | Glutamin | 140 |
| 5.4.5 | Arginin, citrullin og ornitin | 142 |
| 5.4.6 | Asparaginsyre og alanin..... | 143 |
| 5.4.7 | Treonin..... | 145 |
| 5.4.8 | Glycin..... | 146 |
| 5.4.9 | Serin..... | 146 |
| 5.4.10 | Metionin..... | 147 |
| 5.4.11 | Lysin..... | 148 |
| 5.4.12 | Asparagin..... | 149 |
| 5.4.13 | Histidin | 149 |
| 5.4.14 | Frie aminosyrer | 150 |
| 5.5 | Oppsummering av aminosyremetabolisme | 151 |
| 5.5.1 | Viktigste forskjeller i aminosyremetabolisme i surmelksprodukter | 151 |
| 5.5.2 | Glutaminsyres innvirkning på aminosyremetabolisme i yoghurt | 152 |
| 5.6 | Fremtidige aspekter..... | 153 |
| 6 | REFERANSER | 155 |
| | VEDLEGG | |

1 INNLEDNING

Høyt blodtrykk klassifiseres som den mest utbredte sykdommen i verden som kan forebygges, blant annet ved endret kosthold (WHO 2013). Det vil stadig være et fokus på avdekking av alternative behandlingsmetoder, for eksempel inntak av matvarer som inneholder helsebringende komponenter. Betydelige fremskritt er gjort i demonstreringen av at fermenterte meieriprodukter kan ha bestemte positive helseeffekter hos mennesker (Walstra et al. 2006b). Det har blant annet blitt rapportert at aminosyren γ -aminobutyrat (GABA) kan ha en blodtrykkssenkende effekt (Aoki et al. 2003; Inoue et al. 2003).

En rekke studier har forsøkt å kartlegge melkesyrebakteriers evne til å metabolisere aminosyrer, men disse er utført med enkeltstammer (Evenstad 2008; Liu et al. 2003; Nakae & Elliott 1965; Williams et al. 2001), og vil ikke reflektere metabolismen i produkter inokulert med sammensatte syrekulturer, som består av ulike slekter, arter og stammer. Disse studiene kan riktignok gi en antydning om hva som forventes i de produktene bakteriene er benyttet.

Det har ikke tidligere blitt rapportert endringer i omsetning av aminosyrer under både fermentering og lagring av surmelksprodukter med sammensatte syrekulturer. Det har blitt rapportert et innhold av GABA i norsk kefir (TINE SA, Norge) som kan bidra til redusert blodtrykk hos mennesker med mild hypertensjon (Grønnevik et al. 2011; Grønnevik et al. 2012). Det var derfor av interesse å undersøke innholdet av aminosyrer, og da spesielt GABA, under fermentering og lagring av flere surmelksprodukter. Det var også av interesse å oppnå en økt innsikt i metabolismen av aminosyrer, og å undersøke hvilken effekt tilsetning av glutaminsyre før inokulering hadde på metabolismen av aminosyrer, med fokus på mengden GABA som blir produsert i forhold til tilsatt mengde glutaminsyre.

Et dokumentert innhold av GABA kan øke den kommersielle interessen for det aktuelle produktet, ettersom det er rapportert flere helsebringende egenskaper ved inntak av GABA (Al-Wadei et al. 2011; Aoki et al. 2003; Inoue et al. 2003; Ko et al. 2013; Nakagawa et al. 2005). Resultatene fra denne studien vil kunne bidra til økt kunnskap om muligheter for økning av GABA i fermenterte meieriprodukter, og gi forståelse for utviklingen av de ulike aminosyrene i melk under fermentering.

I denne studien ble innholdet av aminosyrer, samt organiske syrer, karbohydrater og aromastoffer analysert under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemilk og to

typer yoghurt med ulik syrekultur. Det ble også gjort et forsøk hvor glutaminsyre ble tilsatt i melk for inokulering med en av yoghurtkulturene.

2 LITTERATUR

2.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er Gram-positive, katalase-negative, ikke-sporulerende, ikke-respirerende, aerotolerante kokker eller staver, som ved fermentering av karbohydrater har laktat som hovedprodukt (Wright & Axelsson 2012). Fra et matteknologisk synspunkt er de viktigste bakterieslektene som i dag inngår i denne gruppen *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetrageonococcus*, *Vagococcus* og *Weissella* (Wright & Axelsson 2012). Bakteriestammer og -arter fra fire av disse slektene benyttes ved kommersiell fermentering av meieriprodukter; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* og *Streptococcus* (Walstra et al. 2006c).

Melkesyrebakterier blir tradisjonelt knyttet til konservering av matvarer via fermentering, og betraktes først og fremst som fordelaktige mikroorganismer. De benyttes ved produksjon av en rekke fermenterte matvarer innen meieri, kjøtt, grønnsaker og korn. Noen av bakterieslektene omtales som probiotiske på grunn av deres helsefremmende effekter (Walstra et al. 2006b).

2.2 Melkens sammensetning

Melk er en vandig væske som produseres i melkekjertlene hos pattedyr. Væsken er en tynn dispersjon, hvor de involverte partiklene har ulik sammensetning. Ved melkens fysiologiske pH (6,7) er alle partiklene negativt ladet, noe som hindrer aggregering gjennom elektrostatisk frastøtning (Walstra et al. 2006a). Hovedkomponentene i kumelk er presentert i tabell 2.1.

Tabell 2.1 Hovedkomponenter i kumelk (Walstra et al. 2006e).

| Forbindelse | Konsentrasjon (% w/w) |
|--------------------|--------------------------|
| Karbohydrat | 4,6 |
| Fett | 4,0 |
| Protein | 3,3 |
| Kasein | 2,6 |
| Mineraler | 0,7 |

I melk foreligger fett i fettkuler omsluttet av en membran. Kasein, som utgjør omtrent 80 % av mengden protein i melk, foreligger i miceller. Kaseinmicellen er omtalt nærmere i kapittel 2.3. I melk utgjør disakkaridet laktose karbohydratmengden, og er hovedenergikilden til syrekulturen under fermentering. Melk inneholder også organiske syrer (Walstra et al. 2006e). Innholdet av disse, samt karbohydrater i melk er vist i tabell 2.2.

Tabell 2.2 Innhold (mmol/kg) av organiske syrer og karbohydrater i kumelk (Walstra et al. 2006d; Walstra et al. 2006e).

| Forbindelse | Konsentrasjon (mmol/kg) |
|--------------------|------------------------------------|
| Laktose | 134 |
| Glukose | 0,38 |
| Sitronsyre | 9,1 |
| Maursyre | 0,87 |
| Eddiksyre | 0,5 |
| Melkesyre | 0,22 |
| Oksalsyre | 0,22 |
| Urinsyre | 0,1 |
| Orotinsyre | 0,45 |

2.8.1 Aminosyrer i melk

Primærfunksjonen til proteiner i kosten er tilføring av essensielle aminosyrer. De essensielle aminosyrene er leucin, isoleucin, lysin, metionin, fenylalanin, treonin, tryptofan og valin. I tillegg kan histidin være essensiell for spedbarn (Walstra et al. 2006d). Inntak av kefir kontra melk gir forbedret fordøyelse av melkeproteinet, grunnet den proteolytiske aktiviteten til syrekulturen. Den proteolytiske aktiviteten er høyere i kefir enn i yoghurt, noe som fører til at innholdet av frie aminosyrer og små peptider er høyere i kefir enn i yoghurt fermentert med samme type melk (Wszolek et al. 2006). Tabell 2.2 viser innholdet av noen frie aminosyrer i melk og yoghurt av kumelk.

Konsentrasjonen av noen aminosyrer i kumelk og yoghurt av kumelk er presentert i tabell 2.2.

Tabell 2.2: Konsentrasjonen av noen aminosyrer (mmol/L) i kumelk og yoghurt av kumelk (Tamime & Robinson 1993).

| Aminosyre | Kumelk (mmol/L) | Yoghurt av kumelk (mmol/L) |
|---------------|----------------------|----------------------------------|
| Alanin | 0,018 – 0,072 | 0,13 – 0,426 |
| Arginin | 0,009 – 0,055 | 0,04 – 0,079 |
| Asparaginsyre | 0,017 – 0,039 | 0,052 – 0,090 |
| Fenylalanin | 0,003 – 0,007 | 0,010 – 0,036 |
| Glycin | 0,04 – 0,07 | 0,037 – 0,06 |
| Glutaminsyre | 0,1 – 0,265 | 0,326 – 0,479 |
| Histidin | 0,005 | 0,038 – 0,081 |
| Isoleucin | 0,004 – 0,011 | 0,011 – 0,030 |
| Leucin | 0,004 – 0,019 | 0,053 – 0,138 |
| Lysin | 0,012 – 0,051 | 0,043 – 0,060 |
| Metionin | 0,003 | 0,005 – 0,013 |
| Prolin | 0,010 | 0,469 – 0,612 |
| Serin | 0,007 – 0,128 | 0,142 – 0,276 |
| Treonin | 0,004 – 0,021 | 0,020 – 0,058 |
| Tryptofan | Spor | 0,009 |
| Tyrosin | 0,003 – 0,007 | 0,010 – 0,033 |
| Valin | 0,008 – 0,021 | 0,076 – 0,158 |
| Total | 0,247 – 0,784 | 1,471 – 2,638 |

Melk inneholder også ulike mineraler. Kalsium tas lett opp da mineralet danner løselige komplekser med proteiner og fosfor i melken. Melk er derfor blant de viktigste kildene til kalsium i Europa. Både vann- og fettløselige vitaminer finnes i ulike mengder i melk (Saxelin & Mäyrä-Mäkinen 2003).

2.3 Fermentering av melk

Fermentering av melk har lange tradisjoner. Opprinnelig ble spontan syring av råmelk utnyttet for å oppnå økt holdbarhet. I dag er årsakene for syring av melken mange. I tillegg til økt holdbarhet fører fermenteringsprosessen til forbedret smak, endret tekstur, økt fordøyelighet og muligheten for produksjon av en rekke ulike produkter (Robinson & Tamime 2006). I dag er prosessen ofte standardisert, og det benyttes spesifikke syrekulturer som er tilpasset produktet som ønskes oppnådd. Ved å bruke kommersielt tilpassede kulturer er prosessen og egenskaper i ferdigstilte produkter, som innhold av spesifikke smakskomponenter, konsistens og utseende, mer kontrollerbare og standardisert.

Kasein utgjør størsteparten av proteinet i kumelk, med 80 % (Lucey & Singh 1997), og deles videre inn i α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein (Lucey & Singh 1997; van Vliet et al. 2004). Kaseinet

foreligger i miceller bestående av submiceller med nanoklustere av kalsiumfosfat. Strukturen til kaseinmicellene stabiliseres av et «hårlag» med κ -kaseins hydrofile C-terminalende på overflaten. Hårlaget, som er negativt ladd, fører til sterisk frastøtning og hindrer aggregering ved melkens naturlige pH (van Vliet et al. 2004). Melkesyrebakterienes gradvise produksjon av laktat under fermenteringen, fører til oppløsning av kaseinmicellen ettersom kalsiumfosfatet oppløses (Lucey & Singh 1997). Senkningen i pH fører samtidig til endring i overflateladningen på kaseinmicellene, ettersom nettoladningen går fra sterkt negativ til nær nøytral (Robinson et al. 2006). Endringen i nettoladning kommer av at negativt ladede karboksylgrupper hos κ -kaseinet protoneres (de Kruif 1999). Ved pH-verdier nær 4,6, som er kaseinets isoelektriske punkt, destabiliseres kaseinmicellene og aggregerer ved hjelp av hydrofobe og elektrostatiske bindinger. Resultatet er en irreversibel, syrefelt melkegel (Robinson et al. 2006)

2.4 Noen fermenterte meieriprodukter

2.4.1 Kefir

Kefir har sin opprinnelse tilbake til tiden da pattedyr som ku, sau og geit ble etablert som husdyr. På den tiden ble melken oppbevart i omgivelsestemperaturen, som kunne variere mellom 20 og 30 °C etter hvilket område de befant seg i (Wszolek et al. 2006). Dette førte til spontan fermentering av melken. Kefir ble produsert i ulike deler av verden, og det lokale klima hadde betydning for hvilke mikroorganismer som dominerte i melken (Wszolek et al. 2006).

Produksjonen ved bruk av spesifikk syrekultur, og teknologien bak, kan spores tilbake til Kaukasusområdet. Her ble melken oppbevart i dyreskinnssekker, leirkrukker eller eiketønner, og fermenteringen foregikk kontinuerlig ved at fersk melk ble etterfylt ettersom den «gamle» ble drukket opp. På grunn av den kontinuerlige bruken ble det dannet en mikrobiologisk film (biofilm) på innsiden av beholderen, og dette fungerte som en slags syrekultur (Wszolek et al. 2006). Trolig er denne biofilmen opphavet til kefir-kornene vi kjenner i dag.

Kefir beskrives som en hvit eller gulaktig, viskøs og elastisk, men ikke seig drikk, med syrlig, forfriskende smak og en balansert gjæraroma (Wszolek et al. 2006). I dag produseres kefir kommersielt i store deler av verden. Som syrekultur benyttes kefir-korn, som har en ukjent opprinnelse. Kefir-kornene tilsettes i melk med ønsket fettprosent og forbehandling, og inkuberes ved ønsket temperatur og tid. Deretter siles kefir-kornene fra, og filtratet kalles

modersyre. Modersyren benyttes deretter til å lage en brukssyre, og det er denne brukssyren som benyttes ved produksjon av kefir.

Kefirkorn ser ut som små blomkålknuter, og består for det meste av vann, protein og polysakkarid kalt kefiran. Den mikrobiologiske sammensetningen er kompleks. Flere ulike melkesyrebakterier, deriblant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. kefiri*, *Lb. kefiranoferiens*, *Leuconostoc* spp. og *Streptococcus thermophilus* er påvist i kefir, i tillegg til gjærleker som *Saccharomyces*, *Candida* og *Kluyveromyces* (Walstra et al. 2006b). Sammensetningen av mikroorganismer i kefir gir kefir en kompleks og sammensatt smaksprofil. Melkesyrebakteriene står hovedsakelig for produksjonen av laktat, mens gjæren produserer etanol. Andre komponenter med betydning for den sensoriske profilen til kefir er eddiksyre, acetaldehyd, diacetyl og acetoin, og CO₂ (Walstra et al. 2006b).

2.4.2 Kulturmilk

Kulturmilk er en syrlig, viskøs fermentert melk med diacetyl som dominerende aromakomponent. Moderne kulturmilk (cultured buttermilk) ble utviklet for å erstatte kjernemelk, som er et biprodukt fra smørproduksjon. Kjernemelk har relativt kort holdbarhet på grunn av det høye innholdet av fosfolipider. Stor mengde umettede fettsyrer i fosfolipidene fører til at de er sterkt utsatt for autooksidasjon, noe som gir en skarp usmak (Walstra et al. 2006b).

Kulturmilk produseres av pasteurisert melk ved mesofil fermentering. Syrekulturen som vanligvis benyttes er en DL-kultur bestående av *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* som hovedsakelig produserer melkesyre, og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* og *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* som produserer aromakomponenter som diacetyl, acetaldehyd og CO₂. Acetaldehyd er ikke ønskelig i kulturmilk, ettersom den forårsaker en «grønn» eller yoghurtliknende smak (Lindsay et al. 1965). Derfor blir ofte bare *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* benyttet som aromaproducent i kulturmilk (Walstra et al. 2006b), ettersom den er i stand til å omsette acetaldehyd til etanol og eddiksyre (Liu et al. 1997).

2.4.3 Tettmelk

Tettmelk, eller tjukkmjøl, er en viskøs, trådtrekkende fermentert melk med mild og syrlig smak. I Norge stammer drikken fra Rørosregionen, og har en lang historie. Fersk melk ble da

tilsatt tette, en syrekultur bestående av tettemelk av god kvalitet. Dersom tetten ikke lenger var i stand til å fermentere melken, ble en ny hentet på nabogården. Tettemelken ble fermentert og oppbevart i tretønner hvor tilgangen på oksygen var begrenset. Kontaminering av gjær førte til produksjon av etanol i tillegg til melkesyre. Et linklede ble dyppet i tette, og deretter tørket, for å bevare syrekulturen til neste sesong. Blader fra tettegras (*Pinguicula vulgaris*) kunne også brukes for koagulering av melken om tette ikke er tilgjengelig. Bladene tilsettes melken før henstand i 17 – 20 °C til melken har koagulert (Fondén et al. 2006).

Kommersiell tettemelk har blitt produsert siden 1995 på Rørosmeieriet. Økologisk Tjukkmjølke fra Røros har i dag en beskyttet geografisk betegnelse-merking. Melken blir produsert økologisk på lokale gårder, og videre bearbeidet på Rørosmeieriet. Melken er pasteurisert, ikke-homogenisert lettmeik (1,5 % fett), og syrnes ved hjelp av tettemelkskulturer fra lokale gårder (Rørosmeieriet 2011). Det har blitt isolert både en slimdannende stamme og en syredannende stamme av *L. lactis* subsp. *cremoris*, samt *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* og *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* i tettekulturen fra Rørosmeieriet (Haug 1996). Produksjon av eksopolysakkarider fra slimdannende stammer er årsaken til den karakteristiske seige, trådtrekkende konsistensen.

2.4.4 Yoghurt

I dag finnes yoghurt i utallige slag som varierer i fett- og sukkerinnhold, smak, konsistens og ulike tilleggskulturer. Helt siden mennesker startet dyretemming har yoghurt inngått i kosten i Asia og Midtøsten (Robinson et al. 2006). Smakssetting ved hjelp av frukt på 1950-tallet førte til et raskt økende forbruk av yoghurt. Varianter med probiotiske bakteriestammer med dokumenterte helseeffekter har også kommet på markedet (Saxelin et al. 2003).

I motsetning til meieriproduktene nevnt over, blir yoghurt fermentert med en termofil kultur. Ved industriell produksjon av yoghurt lages enten rørt eller fast yoghurt. Den grunnleggende teknologien bak begge disse typene er basert på den tradisjonelle metoden fra Midtøsten. Den termofile syrekulturen som benyttes består av melkesyrebakteriene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* og *S. thermophilus*, som er utviklet i dette området. Disse bakteriene har en optimal veksttemperatur mellom 37 og 45 °C (Robinson et al. 2006).

Melkesyrebakteriene i yoghurt lever i symbiose, og det optimale forholdet mellom kokker og staver, i forhold til syreproduksjon ved optimal vekst, er 1,5:1 ved inokulering (Torriani et al. 1996). *Streptococcus thermophilus* vokser raskere enn *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* og

sørger for senkning av pH. Samtidig produserer streptokokkene maursyre og CO₂ som stimulerer vekst av laktobasillene. Ettersom *S. thermophilus* er svakt proteolytisk, er den avhengig av den sterkere proteolytiske evnen til *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* etter hvert som den lille mengden frie aminosyrer og små peptider i melk blir brukt opp (Robinson et al. 2006).

Acetaldehyd er den viktigste aromakomponenten i yoghurt, og står for den karakteristiske «yoghurtsmaken». Omsetningen av treonin er hovedveien for produksjon av acetaldehyd. Begge bakterieartene produserer acetaldehyd via denne metabolismen, men *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produserer større mengder enn *S. thermophilus* (Robinson et al. 2006).

2.5 Karbohydratmetabolisme

I melk finnes det karbohydrat i form av laktose, et disakkarid bestående av glukose og galaktose. Ettersom melkesyrebakteriene ikke har evne til å skaffe energi gjennom elektrontransportfosforylering, anskaffes energi gjennom substrat-nivå-fosforylering i glykolysen (Wright & Axelsson 2012).

Første steg i laktosenedbrytning er transport inn i cellen. De ulike slektene blant melkesyrebakteriene har ulike systemer for transport gjennom cellemembranen. Fosfoenolpyruvat-fosfotransferasesystemet (PEP-PTS) er karakteristisk for laktokokker. Transporten initieres av fosfoenol-pyruvat (PEP), et energirikt intermediat fra glykolysen. En fosfatgruppe overføres fra PEP til laktose via fosfotransferasesystemet (PTS) idet molekylet transporteres over membranen. Fosforylert laktose hydrolyseres intracellulært av fosfo- β -galaktosidase, til glukose og galaktose-6-fosfat. For å kunne metaboliseres videre, blir også glukose fosforylert til glukose-6-fosfat (Walstra et al. 2006c).

Andre slekter blant melkesyrebakteriene har membranbundne permeaser som benytter en «proton motive force» (pmf) for transport av laktose over membranen. Dette er først og fremst *Leuconostoc* spp., og enkelte laktobasiller. Noen termofile melkesyrebakterier, som *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, utskiller galaktose-delen av laktose over membranen gjennom permeasesystemet, i bytte mot et nytt laktosemolekyl. Disse melkesyrebakteriene er ikke i stand til å utnytte galaktose som energikilde (Walstra et al. 2006c). Intracellulær laktose spaltes til glukose og galaktose av β -galaktosidase. Før videre metabolisering fosforyleres glukose til glukose-6-fosfat (Walstra et al. 2006c).

Melkesyrebakteriene klassifiseres som homo- eller heterofermentative etter hvilke produkter som produseres ved nedbrytning av laktose. De metabolske veiene er ulike for homo- og heterofermentativ omsetning av laktose.

2.5.1 Homofermentativ nedbrytning av laktose

Homofermentative melkesyrebakterier produserer hovedsakelig melkesyre ved nedbrytning av laktose. Hos laktokokker fortsetter nedbrytning av glukose-6-fosfat via glykolysen.

Glukose-6-fosfat omdannes til fruktose-1,6-difosfat i to trinn av glukose-fosfat isomerase og fosfofrukto kinase. Fruktose bisfosfat aldolase splitter fruktose-1,6-difosfat til glycerinaldehyd-3-fosfat og dihydroksyacetonfosfat. Sistnevnte omdannes til glycerinaldehyd-3-fosfat, og de to glycerinaldehyd-3-fosfatmolekylene omdannes videre til pyruvat ved hjelp av flere ulike enzymer. Omdannelsen av pyruvat til melkesyre katalyseres av laktat dehydrogenase (Mayo et al. 2010).

Galakose-6-fosfat følger tagatoseveien til glycerinaldehyd-3-fosfat, før den entrer glykolysen. Først omdanner D-galaktose-6-fosfat isomerase D-galaktose-6-fosfat til D-tagatose-6-fosfat. Deretter blir sistnevnte fosforylert til D-tagatose-1,6-difosfat av D-tagatose-6-fosfat kinase før det splittes til glycerinaldehyd-3-fosfat og dihydroksyacetonfosfat av D-tagatose-1,6-difosfat aldolase (Kandler 1983).

Ved enkelte tilfeller, som ved overskudd av tungt nedbrytbare karbohydrater og begrenset tilgang på karbon, kan homofermentative melkesyrebakterier endre metabolismen slik at de i tillegg til melkesyre også produserer eddiksyre, etanol, maursyre og CO₂.

2.5.2 Heterofermentativ nedbrytning av laktose

Heterofermentativ nedbrytning fører til produksjon av betydelige mengder CO₂ og etanol eller eddiksyre i tillegg til melkesyre. Nedbrytning av glukose følger fosfoketolaseveien, hvor monosakkaridet omdannes til xylulose-5-fosfat av ulike enzymer. Xylulose-5-fosfat splittes til glycerinaldehyd-3-fosfat og acetyl-fosfat av D-xylulose-5-P-fosfoketolase. Førstnevnte vil følge glykolysen til pyruvat, og omdannes til melkesyre av laktat dehydrogenase. Acetyl-fosfat vil reduseres til etanol via acetyl-CoA og acetaldehyd av henholdsvis fosfotransacetylase, acetaldehyd dehydrogenase og alkohol dehydrogenase (Mayo et al. 2010).

Acetyl-fosfat kan også omdannes til eddiksyre istedenfor etanol. Dette skjer om det er andre elektronakseptorer til stede i cellen enn acetyl-CoA, for eksempel O₂ (Wright & Axelsson

2012). Heterofermentativ nedbrytning av glukose har et utbytte på 1 ATP per glukosemolekyl om acetylfosfat-intermediatet reduseres til etanol. Dersom intermediatet isteden omdannes til eddiksyre, vil det dannes et ekstra ATP-molekyl (Wright & Axelsson 2012).

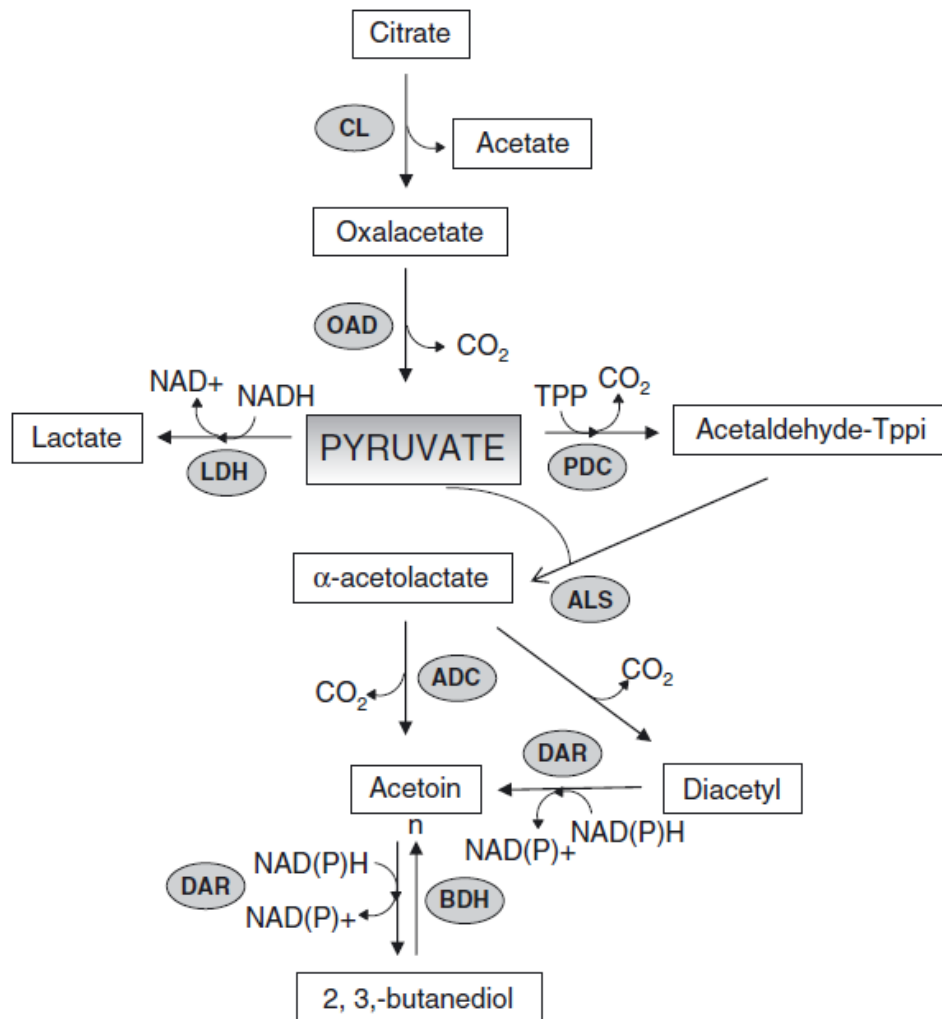
I heterofermentative melkesyrebakterier omdannes galaktose til glukose-6-fosfat via Leloir-veien før videre nedbrytning i glykolysen. Galaktose blir først fosforylert til galaktose-1-fosfat av galaktokinase før omdanning til glukose-1-fosfat av galaktose-1-fosfat-uridylyltransferase. Fosfoglucumutase omdanner glukose-1-fosfat til glukose 6-fosfat som følger glykolysen til pyruvat (Mayo et al. 2010).

2.6 Sitratmetabolisme

Melkesyrebakterienes nedbrytning av sitrat er viktig for den sensoriske profilen i de ulike fermenterte meieriproduktene. Aromakomponenter som diacetyl, eddiksyre og 2,3-butandiol dannes ved nedbrytning av sitrat, i tillegg til CO₂ som har betydning for den sensoriske profilen i kefir, og acetoin. Sitratomsetning er pH-avhengig, og har optimum ved pH 5,5 – 6,0 (Starrenburg & Hugenholtz 1991).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* er blant melkesyrebakteriene som kan omsette sitrat. For å utnytte sitrat kreves det at cellene har tre spesifikke enzymer; sitrat permease, sitrat lyase og oxaloacetat dekarboksylase (Bekal et al. 1998). Ekstracellulært sitrat fraktes inn i cellen av sitrat permease, og splittes intracellulært av sitrat lyase til eddiksyre og oxaloacetat. Oxaloacetat dekarboksyleres videre til pyruvat og CO₂ av oxaloacetat dekarboksylase. Hovedsakelig omdannes pyruvat til D-laktat ved katalysering av enzymet laktat dehydrogenase (Mayo et al. 2010).

Pyruvat kan også dekarboksyleres av pyruvat dekarboksylase til acetaldehyd tiaminpyrofosfat (acetaldehyd TPP), som igjen kondenserer med et annet pyruvatmolekyl og danner intermediatet α -acetolaktat ved hjelp av enzymet acetolaktat syntetase. α -acetolaktat er ustabil, og vil raskt omdannes videre, enten til acetoin via dekarboksylering katalysert av α -acetolaktat dekarboksylase, eller til diacetyl via en ikke-enzymatisk dekarboksylering under aerobe forhold. Diacetyl kan reduseres til acetoin av diacetyl reduktase, som kan reduseres videre til 2,3-butandiol av samme enzym. Sistnevnte reaksjon er reversibel, og katalyseres av 2,3-butandiol dehydrogenase (Mayo et al. 2010). En oversikt over sitratmetabolisme er vist i figur 2.6.1.

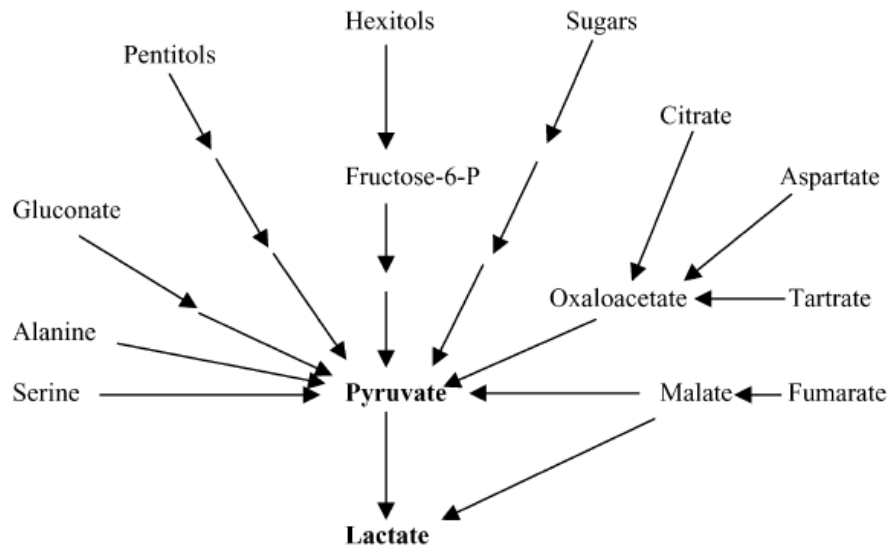


Figur 2.6.1: Metabolisme av sitrat. CL, sitrat lyase; OAD, oxaloacetat dekarboksylase; LDH, laktat dehydrogenase; PDC, pyruvat dekarboksylase; ALS, α -acetolaktat syntetase; ADC, α -acetolaktat dekarboksylase; DAR, diacetyl/acetoin reduktase; BDH, 2,3-butanediol dehydrogenase (Mayo et al. 2010).

Nedbrytning av sitrat benyttes generelt ikke som kilde til energi, og foregår kun så lenge nedbrytbart karbohydrat er til stede i mediet (Walstra et al. 2006c). Studier har vist at *Leuconostoc mesenteroides* kan utnytte små mengder sitrat selv ved fravær av glukose, men kun pyruvat, og ikke laktat, ble detektert i mediet (Marty-Teyssset et al. 1996). Det er også vist at mengden sitrat som blir nedbrutt øker i stor grad ved tilstedeværelse av glukose, selv i små konsentrasjoner (Marty-Teyssset et al. 1996; Ramos et al. 1994).

2.7 Alternativ pyruvatmetabolisme

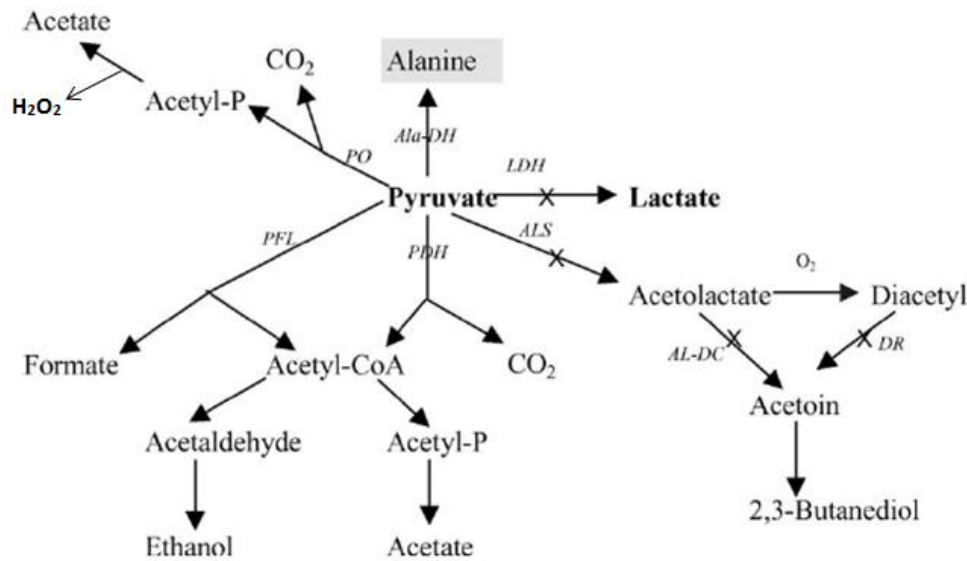
Pyruvat er et vanlig intermediat i nedbrytningen av flere ulike forbindelser, både karbohydrater, aminosyrer og organiske syrer (Liu 2002). I figur 2.7.1 vises en oversikt over hvilke forbindelser som kan metaboliseres til pyruvat og videre til laktat.



Figur 2.7.1: Mulige metabolske veier som leder til pyruvat og laktat hos melkesyrebakterier (Liu 2002).

Melkesyrebakterier produserer hovedsakelig melkesyre fra pyruvat, men som beskrevet kan diacetyl, acetoin og 2,3-butandiol være produkter fra pyruvat. Ulike slekter, arter og stammer blant melkesyrebakteriene kan også bryte ned pyruvat til andre komponenter, som eddiksyre, maursyre, etanol og CO_2 . Under anaerobe forhold, og med begrenset tilgang på glukose, kan pyruvat brytes ned til format og acetyl-CoA av pyruvat format lyase (Kandler 1983). Hos *Streptococcus thermophilus* er enzymet pyruvat-format lyase aktivt selv ved høye konsentrasjoner av glukose. Dette har stor betydning ved fremstilling av yoghurt fordi produksjon av format stimulerer vekst av *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* som er protolytisk, og forsyner den svakt proteolytiske *S. thermophilus* med frie aminosyrer (Walstra et al. 2006b).

Pyruvat kan også omdannes til acetyl-CoA og CO_2 av enzymet pyruvat dehydrogenase, ved en oksidering (Tamime et al. 2006; Walstra et al. 2006c). Acetyl-CoA kan videre fungere som elektronakseptor og danne etanol, eller gjennomgå substrat-nivå-fosforylering og gi 1 ATP og eddiksyre (Wright & Axelsson 2012). Eddiksyre kan også dannes aerobt ved oksidering av pyruvat til acetyl-fosfat av enzymet pyruvat oksidase, men da dannes også hydrogenperoksid (H_2O_2) (Wright & Axelsson 2012). Figur 2.7.2 viser en oversikt over alternative nedbrytningsruter for pyruvat.



Figur 2.7.2: Mulig nedbrytning av pyruvat hos melkesyrebakterier. Enzymer: Ala-DH, alanin dehydrogenase; PO, pyruvat oksidase; LDH, laktat dehydrogenase; PFL, pyruvat-format lyase; PDH, pyruvat dehydrogenase; ALS, α -acetolaktat syntetase; AL-DC, α -acetolaktat dekarboksylase; DR, diacetyl reduktase (Liu 2002).

2.8 Aminosyremetabolisme

Laktokokker og laktobasiller er auxotrofe for mellom 6 og 14 aminosyrer (Christensen et al. 1999), og krever derfor raskt tilgjengelige nitrogenholdige forbindelser for å opprettholde vekst. Ettersom melk kun inneholder en liten mengde frie aminosyrer og små peptider, er melkesyrebakterier avhengige av et proteolytisk system for å kunne vokse optimalt i melk. Ikke alle melkesyrebakterier er like godt utrustet med proteaser. *Streptococcus thermophilus* er et eksempel på en melkesyrebakterie som har svak proteolytisk aktivitet (Walstra et al. 2006c), og vil følgelig vokse dårlig i melk. Imidlertid vil *S. thermophilus* kunne vokse i melk i samarbeid med stammer som har aktive proteaser, slik som *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i yoghurt.

Membranbundne ekstracellulære serin-proteaser initierer nedbrytningen av kasein. Proteasene har sterk preferanse for kasein, som med sin tilfeldige og åpne struktur, er mottakelig for proteaseaktiviteten. Det finnes ulike proteaser som har ulik preferanse for kaseintypene som finnes i melk. Noen har spesifisitet for degradering av α_{s1} - mens andre foretrekker β -kasein eller κ -kasein. Kaseinet hydrolyseres til peptider av ulik størrelse, fra 4 til 30 aminosyrer (Savijoki et al. 2006).

Melkesyrebakterier er i stand til å frakte oligo-, di- og tripeptider, i tillegg til frie aminosyrer, gjennom cellemembranen via ulike transportsystemer. Oligopeptid-permease-systemet (OPP) kan frakte peptider bestående av opp til 18 aminosyrer inn i cellen (Savijoki et al. 2006). Andre transportsystemer for peptid- og aminosyre opptak er «protein motive force» (pmf)-drevet di- og tripeptid transportsystem (DtpT) og et ATP-drevet Dpp-system. Det førstnevnte transportsystemet har størst affinitet for hydrofile og ladede di- og tripeptider, mens Dpp-systemet kan transportere di-, tri- og tetrapeptider bestående av hydrofobe forgrenede aminosyrer (Savijoki et al. 2006).

Etter at små peptider er fraktet inn i cellen, hydrolyseres de til aminosyrer ved hjelp av intracellulære peptidaser. Disse peptidasene deles i to grupper; endopeptidaser som bryter indre peptidbindinger, og eksopeptidaser som fjerner aminosyrer fra en av endene på peptidet (Wright & Axelsson 2012). I tillegg finnes andre peptidaser med forskjellig, men overlappende spesifisitet (Savijoki et al. 2006).

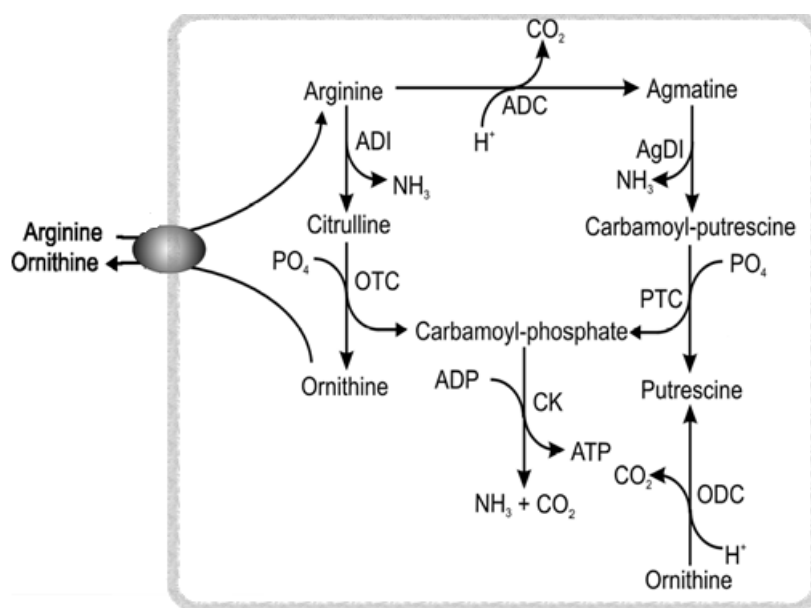
Hos laktokokker reguleres transkribering av flere gener som koder for proteiner i det proteolytiske systemet av respons til mengde tilgjengelige ekstracellulære peptider. Transkribering av gener som koder for proteiner i OPP-systemet styres av regulatoren CodY. Genene er samlet i et operon, og ved nedregulering av disse genene bindes CodY til promotoren i operonet, og hindrer dermed transkribering. Aktiviteten til CodY påvirkes av mengde intracellulære forgrenede aminosyrer. Blant annet valin, leucin og isoleucin stimulerer spesielt tilstedeværelse av isoleucin binding av CodY til operonet (den Hengst et al. 2005).

Utnyttelse av frie aminosyrer står sentralt i melkesyrebakterienes metabolske aktivitet. Aminosyrene som frigjøres ved proteolyse kan benyttes i proteinsyntese, energigenerering samt gjenvinning av reduserte kofaktorer (Christensen et al. 1999). Aminosyrer kan også omdannes til aromakomponenter. Reaksjoner som deaminering, dekarboksylering og transaminering inngår ved nedbrytning av aminosyrer.

2.8.2 Deiminering

Melkesyrebakterier kan bryte ned arginin via deiminering for å kontrollere intracellulær pH (Cotter & Hill 2003). Ammoniakkmolekylet som dannes går sammen med et proton fra cytoplasma og danner et ammoniumion, NH_4^+ , som fører til økning i pH. Arginin brytes ned gjennom arginin-deiminaseveien som produserer 2 mol NH_3 og 1 mol ATP per mol arginin

(Fox et al. 2000), og har dermed en energimessig gevinst. Arginin deiminase hydrolyserer arginin til citrullin og NH_3 . Citrullin kan omdannes til ornitin og carbamoylfosfat av enzymet ornitin carbamoyltransferase ved hjelp av en fosfatgruppe. Den reversible reaksjonen, dannelse av citrullin fra ornitin og carbamoylfosfat, katalyseres av samme enzym, og er første trinn i ureasyklusen (Fernández & Zúñiga 2006). Gjennom et antiport-transportsystem veksles ornitin ut av cellen mot arginin over cellemembranen. Videre omdannelse av carbamoylfosfat til CO_2 og NH_3 gir 1 ATP, og reaksjonen katalyseres av carbamat kinase (Fernández & Zúñiga 2006). Figur 2.8.1 viser nedbrytning av arginin via arginin-deiminaseveien.



Figur 2.8.1: Nedbrytning av arginin via arginin-deiminaseveien. ADI, arginin deiminase; OTC, ornitin-carbamoyltransferase; CK, carbamat kinase; ADC, arginin dekarboksylase; AgDI, agmatin deiminase; PTC, putrescin carbamoyltransferase; ODC, ornitin dekarboksylase (Fernández & Zúñiga 2006)

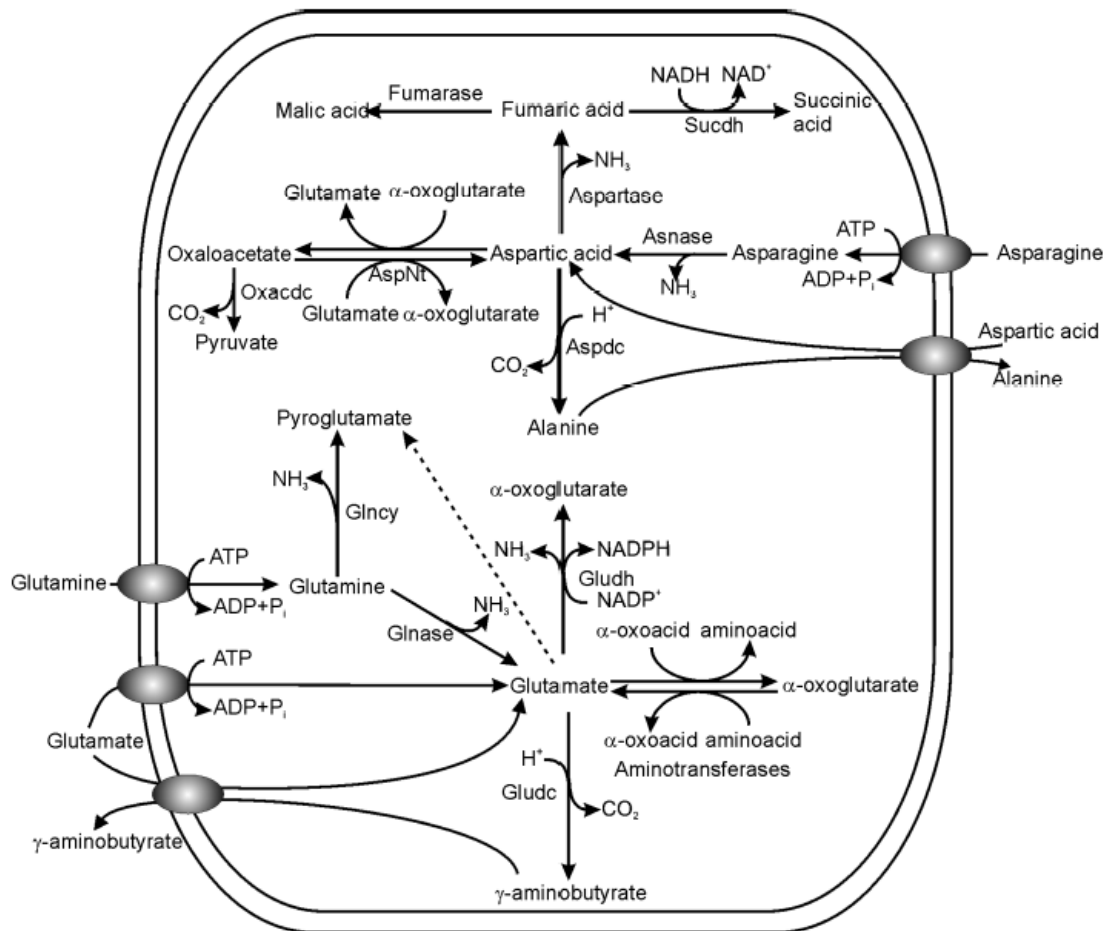
Arginin-deiminaseveien er en utbredt metabolsk vei blant melkesyrebakteriene. Ulike stammer blant slektene *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus* og *Weissella* kan bryte ned arginin gjennom arginin-deiminaseveien (Fernández & Zúñiga 2006). I tilfeller med begrenset tilgang på fermenterbare karbohydrater vil *Lactobacillus sakei* CTC 494 benytte arginin som energikilde via arginin-deiminaseveien (Rimaux et al. 2011). Samme studie viste også at pH regulerte kinetikken i metabolismeveien. Optimal pH for nedbrytning av arginin var 5,87, men foregikk likevel ved både lavere og nøytrale pH-verdier (pH 4,5 og 7,5). Ved pH 7,5 ble ikke citrullin omdannet til ornitin (Rimaux et al. 2011).

2.8.3 Dekarboksylering

Ved dekarboksylering av aminosyrer dannes CO₂ og det korresponderende aminet. Dannelsen av biogene aminer ved nedbrytning av aminosyrer kan føre til matintoksikasjon ved for høye konsentrasjoner. Histidin, lysin, tyrosin og ornitin er aminosyrene som omdannes til biogene aminer, og henholdsvis histamin, cadaverin, tyramin og putrescine er produktene som dannes (Mayo et al. 2010). Aminene fraktes ut av cellen gjennom et antiport-transportsystem, hvor en ekstracellulær aminosyre transporteres over cellemembranen samtidig som det korresponderende aminet fraktes ut (Fernández & Zúñiga 2006).

Dekarboksylering av glutaminsyre til γ -aminobutyrat (GABA) er foreslått å være en forsvarsmekanisme mot lav intracellulær pH (Cotter & Hill 2003; Nomura et al. 1999b). Ekstracellulær glutaminsyre transporteres gjennom cellemembranen av en spesifikk transporter. Transportproteinet fungerer som en antiport, og frakter GABA ut av cellen i bytte mot et nytt glutaminsyremolekyl (Cotter & Hill 2003). Reaksjonen forbruker H⁺-ioner, noe som fører til en økning av intracellulær pH. Glutamat dekarboksylase (GAD) fra *Lactococcus lactis* er aktivt ved pH-verdier mellom 4,0 og 5,5, med optimum ved pH 4,7 (Nomura et al. 1999b). Samme studie viste også at GAD var spesifikk for glutamat. Enzymet isolert fra *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 viste optimal aktivitet ved pH 4,4 (Huang et al. 2007). Produksjonen av GABA hos *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 økte ved tilsetning av pyridoxal-5'-fosfat (PLP) i mediet (Yang et al. 2008), noe som viser at dekarboksylasen kan benytte PLP som cofaktor. Dekarboksylering av lysin til cadaverin og arginin til agmatine konsumerer også et H⁺-ion og fører til pH-økning intracellulært, men disse reaksjonene er ikke assosiert med regulering av pH hos melkesyrebakterier (Cotter & Hill 2003).

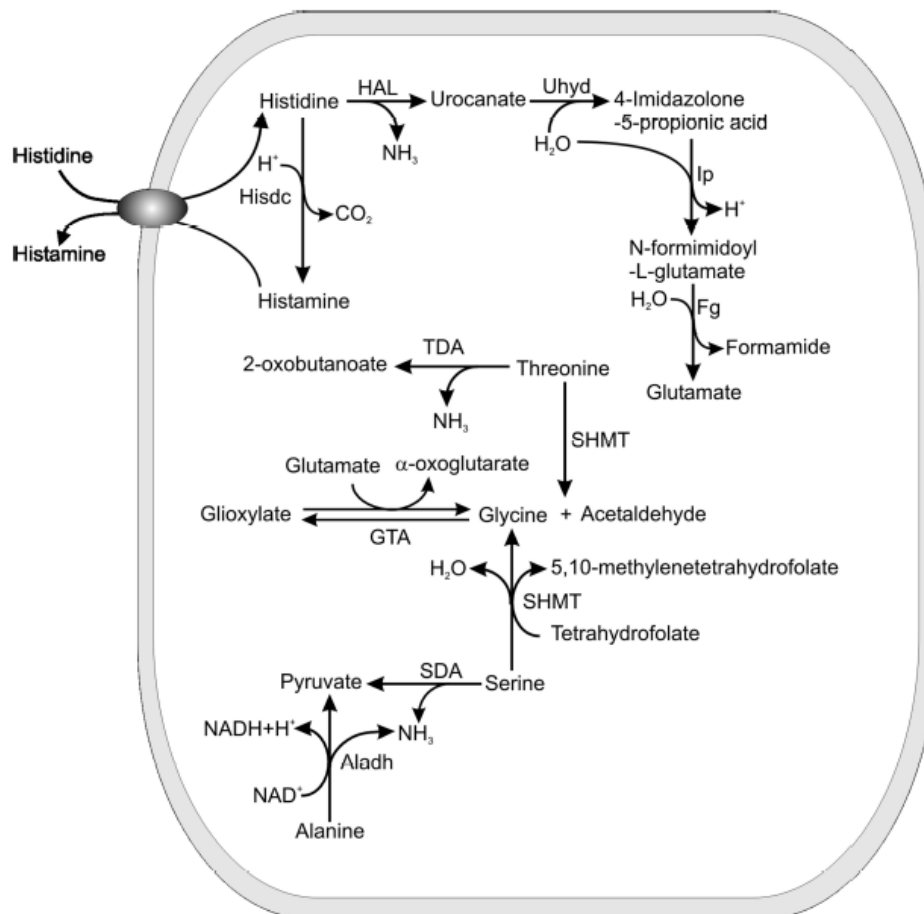
Asparaginsyre kan dekarboksyleres til alanin og CO₂ av enzymet aspartat dekarboksylase (Fernández & Zúñiga 2006). Dekarboksylering av asparaginsyre og glutaminsyre er vist i figur 2.8.2.



Figur 2.8.2: Metabolske veier for omsetning av asparagin, asparaginsyre, glutamin og glutaminsyre hos melkesyrebakterier. Aspdc, aspartat dekarboksylase; AspNt, aspartat aminotransferase; Asnase, asparaginase; Glnc, glutamin syklase; Glnase, glutaminase; Gludc, glutamat dekarboksylase; Gludh, glutamat dehydrogenase; Oxacdc, oxaloacetat dekarboksylase; Sucdh, ravsyre dehydrogenase (Fernández & Zúñiga 2006).

2.8.4 Deaminering

Deaminering av aminosyrer danner NH_3 og korresponderende α -ketosyre, og fører til en økning i intracellulær pH. Serin er blant aminosyrene som kan deamineres. Reaksjonen katalyseres av serin deaminase, og gir pyruvat i tillegg til ammoniakk. Hos noen melkesyrebakterier kan også enzymet treonin deaminase være involvert (Fernández & Zúñiga 2006). Pyruvat fra serinomsetning kan omdannes videre. Katabolisme av serin hos *Lactobacillus plantarum* INF15D resulterer hovedsakelig i eddiksyre, ravsyre og maursyre (Skeie et al. 2008). Også histidin og treonin kan deamineres av henholdsvis histidin-ammoniakk-lyase og treonin deaminase. Deaminering av histidin gir urocanat og treonin gir 2-oxobutanoat (Fernández & Zúñiga 2006). Figur 2.8.3 viser en oversikt over deaminering av alanin, histidin, serin og treonin.



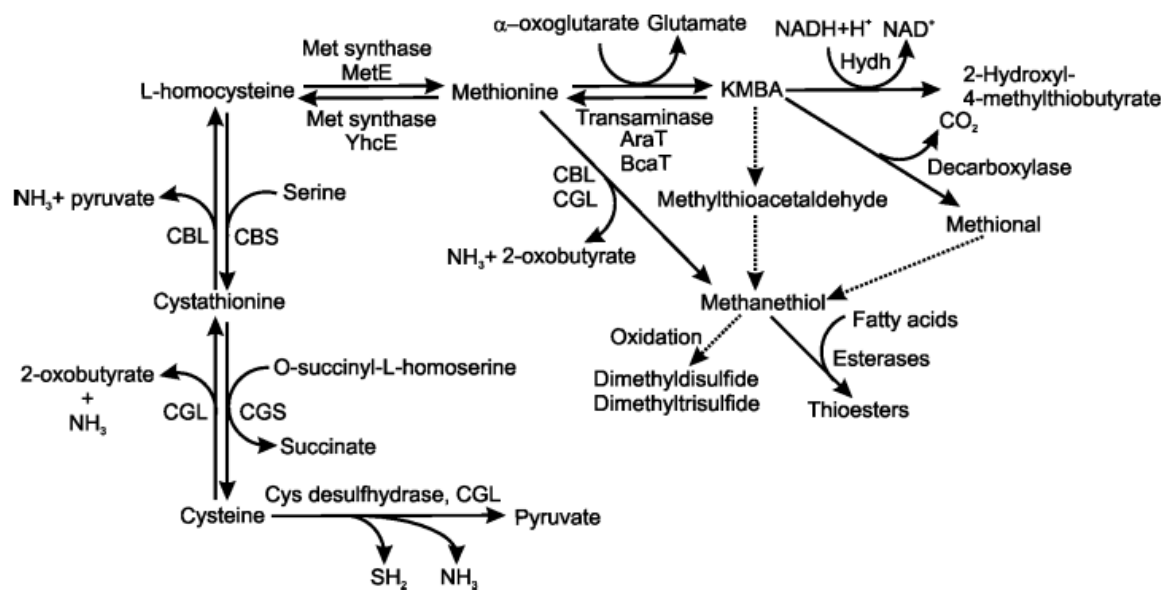
Figur 2.8.3: Metabolske veier for nedbrytning av alanin, histidin, serin og treonin. Hisdc, histidin dekarboksylase; HAL, histidin-ammoniakk-lyase; Uhyd, urocanate hydratase; Ip, imidazolonepropionase; Fg, formimidoylglutamase; TDA, treonin deaminase; SHMT, serin hydroksymetyltransferase; SDA, serin deaminase; Aladh, alanin dehydrogenase (Fernández & Zúñiga 2006).

2.8.5 Eliminering

I en elimineringsreaksjon elimineres et molekyl fra substratet. Gjennom en elimineringsreaksjon kan treonin omsettes direkte til acetaldehyd og glycin. Reaksjonen er katalysert av treonin aldolase, eller serin-hydroksymetyl-transferase som også har treonin-aldolase-aktivitet (Chaves et al. 2002). Chaves et al. (2002) viste at treonin-aldolase-aktiviteten til *S. thermophilus* mest sannsynlig skyldes serin-hydroksymetyl-transferase. Dannelsen av acetaldehyd og glycin fra treonin er vist i figur 2.7.3.

Metionin kan omdannes via α - γ -eliminering til metantiol. Reaksjonen katalyseres av to ulike enzym, cystationin- β -lyase og cystationin- γ -lyase. Ammoniakk og 2-oxobutytrat er også produkter fra via α - γ -eliminering av metionin. Lyasene krever pyridoxal-5'-fosfat (PLP) som kofaktor, og er funnet hos blant annet *Lactococcus lactis* (Fernández & Zúñiga 2006).

Metantiole kan oksideres videre til dimetyldisulfid og/eller dimetyltrisulfid (Engels et al. 2000). En oversikt over metioninmetabolismen er vist i figur 2.8.4.



Figur 2.8.4: Metabolisme av metionin og cystein via eliminerings- og transaminering. CBL, Cystationin- β -lyase; CBS, Cystationin- β -syntase; CGL, cystationin- γ -lyase; CGS, cystationin- γ -syntase; HydH, hydroksysyre dehydrogenase; K MBA, 4-metyltio-2-oxobutyrat. (Fernández & Zúñiga 2006).

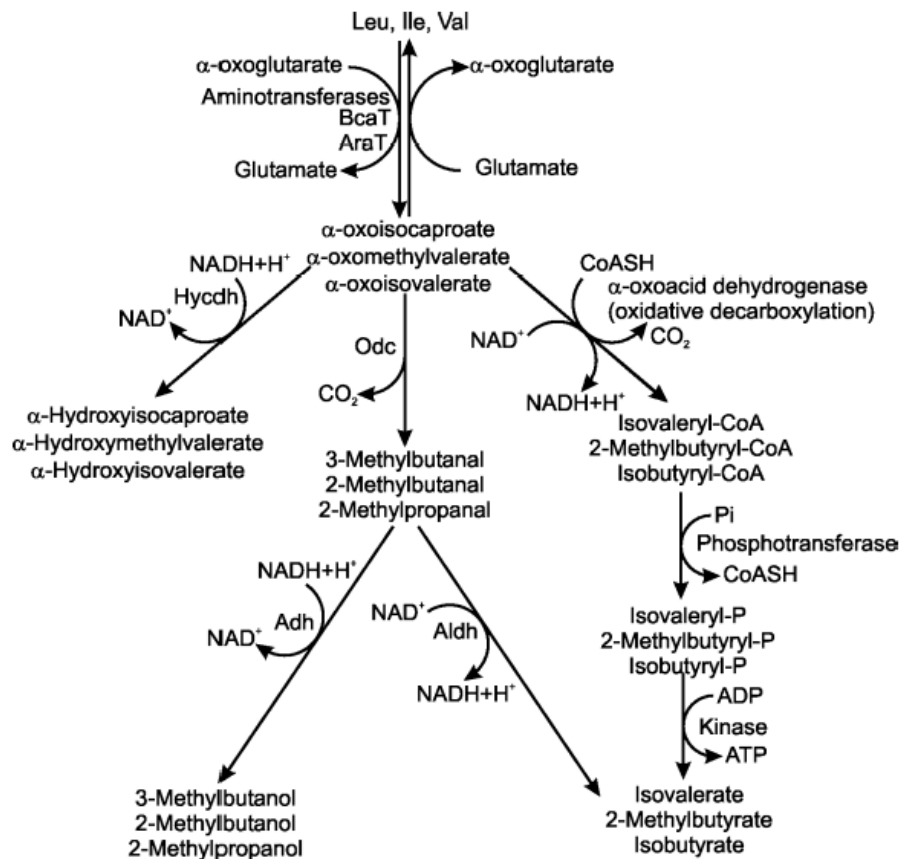
2.8.6 Transaminering

Transaminering av aminosyrer katalyseres av aminotransferaser. Disse enzymene katalyserer også den reversible reaksjonen, altså siste trinn i syntese av aminosyren (Yvon & Rijnen 2001). En aminogruppe overføres fra en aminosyre, og krever en α -ketosyre som aminogruppeakseptor. Aminosyren som donerer aminogruppen deamineres til en α -ketosyre. Videre metabolisme kan omdanne α -ketosyre til korresponderende aldehyd, hydroksysyre eller karboksylsyre via henholdsvis dekarboksylering, hydrogenering, eller oksidativ dekarboksylering (Mayo et al. 2010). Transaminering er en viktig reaksjon for omsetning av mange aminosyrer, deriblant metionin, de forgrenede aminosyre leucin, isoleucin og valin, og de aromatiske aminosyre fenylalanin, tyrosin og tryptofan (Yvon & Rijnen 2001). Alanin og asparaginsyre kan også transamineres (Le Bars & Yvon 2008).

Aspartat aminotransferase katalyserer den reversible transamineringen av asparaginsyre og α -ketoglutarat. Overføring av aminogruppen fra aspartat til α -ketoglutarat gir oxaloacetat og glutaminsyre (Fernández & Zúñiga 2006). Evnen til transaminering av aspartat kan ha betydning for smakssetting i ost. Oxaloacetat fra katabolisme av aspartat kan brytes ned til

pyruvat, som igjen omdannes til diacetyl og acetoin (Kieronczyk et al. 2004; Le Bars & Yvon 2008). Transaminering av alanin med α -ketoglutarat gir også pyruvat, i tillegg til glutaminsyre. Reaksjonen katalyseres av alanin aminotransferase. I en studie utført av Le Bars og Yvon (2008), ble ikke pyruvat fra transaminering av alanin omdannet til diacetyl og acetoin. Metabolske omsetningsveier for asparaginsyre vises i figur 2.8.2, og omsetning av alanin vises i figur 2.8.3.

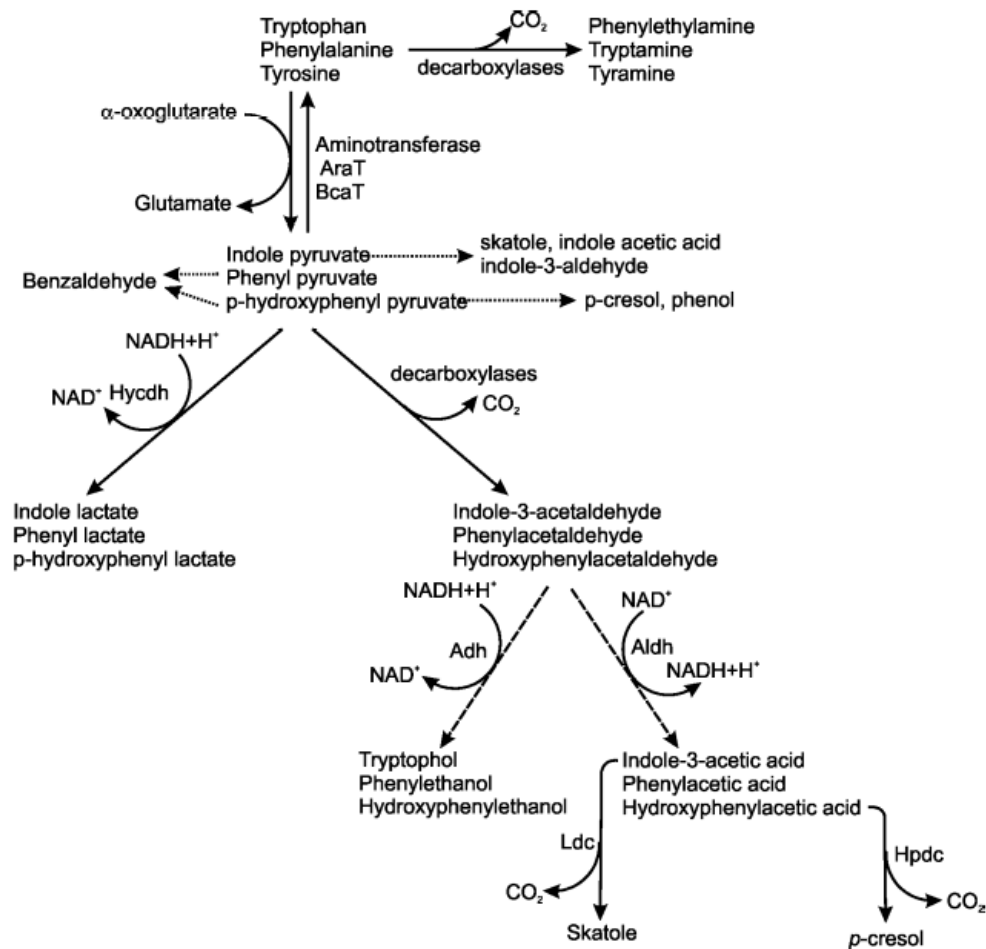
Transaminering av metionin og de forgrenede aminosyrene leucin, isoleucin og valin, katalyseres av forgrenet aminosyre aminotransferase (BcaT). Enzymet krever α -ketoglutarat som aminogruppeakseptor, og benytter PLP som kofaktor (Engels et al. 2000). Kofaktoren, som er tett bundet til aminotransferasen, frakter aminogruppen fra aminosyren. For regenerering av enzymaktivitet benyttes en aminogruppeakseptor, vanligvis α -ketoglutarat, som da omdannes til glutaminsyre (Hansen et al. 2001). Leucin, isoleucin og valin transamineres til henholdsvis α -oxoisocaproate, α -oxo- γ -metylvalerate og α -oxoisovalerate (Fernández & Zúñiga 2006). Figur 2.8.5 viser en oversikt over metabolisme av forgrenede aminosyrer hos melkesyrebakterier. Metionin transamineres til α -keto- γ -metyltiobutytrat (KMBA). Sistnevnte er et intermediat, og blir dekarboksylert til metional som konverteres til metantiole. Som nevnt ved beskrivelse av α - γ -eliminering av metionin, blir metantiole raskt oksidert til dimetyldisulfid og/eller dimetyltrisulfid under aerobe forhold (Engels et al. 2000). En oversikt over metioninmetabolisme er gitt i figur 2.8.4.



Figur 2.8.5: Omsetning av forgrenede aminosyrer (leucin, isoleucin og valin) hos melkesyre bakterier. BcaT, forgrenet aminosyre aminotransferase; AraT, aromatisk aminotransferase; Odc, α -oxosyre dekarboksylase; Hycdh, hydroksyisocaproate dehydrogenase; Adh, alkohol dehydrogenase; Aldh, aldehyd dehydrogenase (Fernández & Zúñiga 2006).

De aromatiske aminosyrene fenylalanin, tyrosin og tryptofan kan også transamineres.

Transamineringen katalyseres av aromatisk aminosyre aminotransferase (AraT), som er PLP-avhengig. Ved transaminering deamineres fenylalanin, tyrosin og tryptofan til fenyl-pyruvat, p-hydroksey-fenyl-pyruvat og indol-pyruvat, respektivt (Fernández & Zúñiga 2006). AraT benytter også α -ketoglutarat som aminogruppeakseptor (Yvon & Rijnen 2001), og er også aktivt mot leucin (Fernández & Zúñiga 2006). Både BcaT og AraT er viktig i omsetningen av aminosyrer hos *L. lactis* (Yvon & Rijnen 2001). Omsetningen av aromatiske aminosyrer er vist i figur 2.8.6.

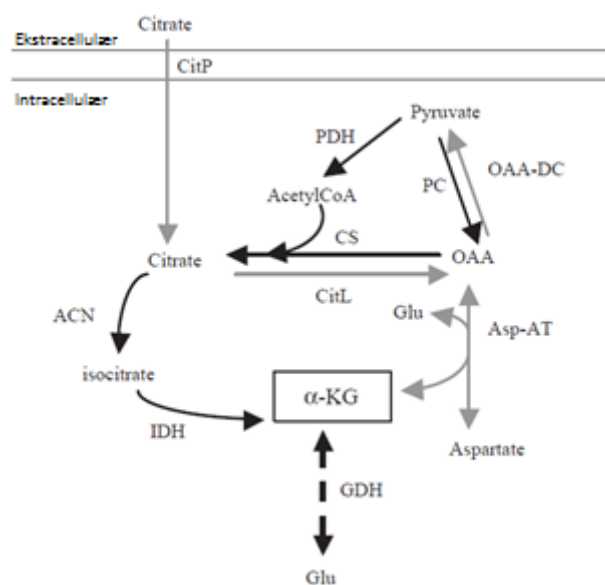


Figur 2.8.6: Omsetning av aromatiske aminosyrer. Hycdh, hydrokysisocaproate dehydrogenase; Adh, alkohol dehydrogenase; Aldh, aldehyd dehydrogenase; Hpdc, hydrokysyfenylacetat dekarboksylase; Ldc, indole acetat karboksylase (Fernández & Zúñiga 2006).

Produktene fra transaminering av aminosyrer, α -ketosyrer, kan metaboliseres videre via tre ulike reaksjoner; hydrogenering, dekarboksylering eller oksidativ dekarboksylering.

Hos laktokokker foretrekker transaminasene α -ketoglutarat som aminogruppeakseptor. Andre α -ketosyrer, som pyruvat, kan benyttes, men enzymenes aktivitet er lavere (Tanous et al. 2005). Favoriseringen av α -ketoglutarat gjør at dannelsen av denne α -ketosyren er grunnleggende for omsetning av aminosyrer. Det er tre metabolske veier som leder til produksjon av α -ketoglutarat. Substratene i disse «teoretiske» veiene er glutaminsyre, sitrat og pyruvat (Tanous et al. 2005). Fra glutaminsyre dannes α -ketoglutarat direkte gjennom en oksidativ deaminering katalysert av enzymet glutamat dehydrogenase (GDH). Som kofaktor benyttes NAD^+ , NADP , eller begge. En annen mulighet for produksjon av α -ketoglutarat er fra sitrat via sitrat-oxaloacetatveien. Denne veien katalyseres av tre ulike enzymer; sitrat permease, sitrat lyase og aspartat aminotransferase. Førstnevnte transporterer ekstracellulær

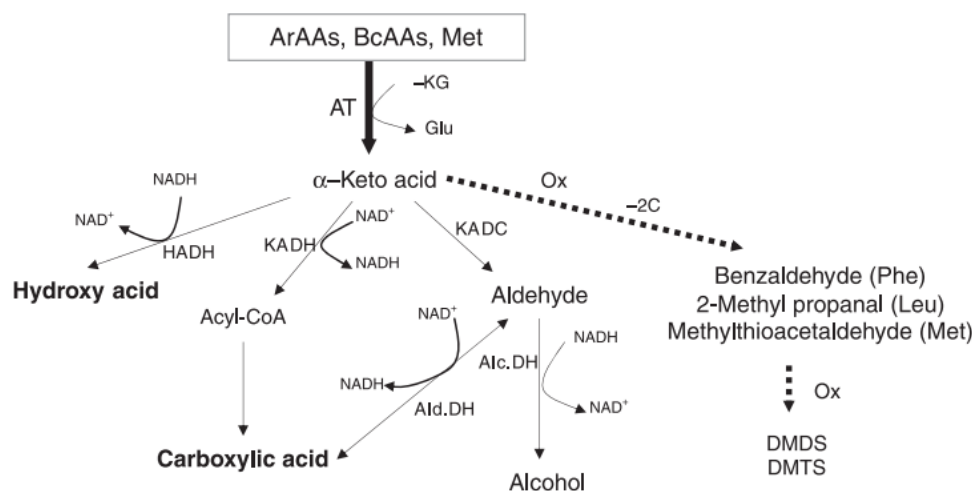
sitrat inn i cellen. Sitrat lyase omdanner sitrat til oxaloacetat og acetat. Ved hjelp av aspartat aminotransferase kan oxaloacetat, via en transaminering med glutaminsyre som aminogruppedonor, transamineres til asparaginsyre. I denne reaksjonen vil glutaminsyre deamineres til α -ketoglutarat. Tanous et al. (2005) viste at *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, som kan omsette sitrat, kan utnytte α -ketoglutarat produsert fra sitrat og glutamat til nedbrytning av aminosyrer. Den siste teoretiske veien for dannelse av α -ketoglutarat er fra pyruvat eller sitrat gjennom sitrat-isisitratveien. Veien krever at enzymene pyruvat dehydrogenase, pyruvat karboksylase, sitrat syntase, aconitase og isositrat dehydrogenase er aktive. Førstnevnte omdanner pyruvat til acetyl-CoA, mens pyruvat karboksylase omdanner pyruvat til oxaloacetat. Sitrat syntase produserer sitrat av acetyl-CoA og oxaloacetat. Deretter omdannes sitrat til isositrat og α -ketoglutarat av henholdsvis aconitase og isositrat dehydrogenase. Det er imidlertid ikke vist at melkesyrebakterier har aktivitet av alle enzymene nødvendig for den sistnevnte metabolismen. Aktivitet av enzymet glutamat dehydrogenase er essensielt for metabolisme av aminosyrer, ettersom dette er hovedveien for dannelse av α -ketoglutarat hos melkesyrebakterier (Tanous et al. 2005). De tre mulighetene for dannelse av α -ketoglutarat er vist i figur 2.8.7.



Figur 2.8.7: Metabolske veier for dannelse av α -ketoglutarat fra glutaminsyre, sitrat og pyruvat. GDH, glutamat dehydrogenase; CitP, sitrat permease; CitL, sitrat lyase; OAA-DC, oxaloacetat dekarboksylase; Asp-AT, aspartat aminotransferase; PDH, pyruvat dehydrogenase; PC, pyruvat karboksylase; CS, sitrat syntase; ACN, aconitase; IDH, isositrat hydrogenase (Tanous et al. 2005)

α -ketosyren som dannes ved transaminering mellom den respektive aminosyren og α -ketoglutarat kan omdannes videre til aromakomponenter gjennom tre reaksjoner; til

hydroksysyre via hydrogenering, til aldehyder via dekarboksylering, eller til karboksylsyrer via oksidativ dekarboksylering. I tillegg kan ulike kjemiske reaksjoner omdanne α -ketosyrer videre (Fernández & Zúñiga 2006). Omdanningen av α -ketosyrer til aromakomponenter styres av faktorer som pH, temperatur og vannaktivitet i vekstmediet (Ardö 2006). I figur 2.8.8 vises omdannelse av α -ketosyrer til ulike aromatiske og ikke-aromatiske komponenter.



Figur 2.8.8: Katabolisme av aminosyrer gjennom transaminering hos *Lactococcus lactis*. ArAAs, aromatiske aminosyrer; BcAAs, forgrenede aminosyrer; Met, metionin; α -KG, α -ketoglutarat; Glu, glutamat; AT, aminotransferase; HADH, hydroksylsyre dehydrogenase; KADH, ketosyre dehydrogenase; KADC, ketosyre dekarboksylase; Alc.DH, alkohol dehydrogenase; Ox, kjemisk oksidasjon (Kieronczyk et al. 2006).

2.8.6.1 Hydrogenering

Ved hydrogenering reduseres α -ketosyrer til korresponderende hydroksysyre. Hydroksysyrer er ikke aromatiske, men vil likevel kunne påvirke smaksprofilen i meieriprodukter ettersom det reduserer tilgjengeligheten av α -ketosyrer for andre reaksjoner som fører til dannelse av aromakomponenter (Yvon & Rijnen 2001).

Hydroksysyrer kan dannes fra aromatiske aminosyrer, forgrenede aminosyrer og metionin. Reaksjonen katalyseres av ulike dehydrogenaser, som kalles hydroksy-isocaproat-dehydrogenaser etter det foretrukne substratet, α -ketoisocaproat. Disse enzymene deles inn i D- og L-hydroksy-isocaproat-dehydrogenaser etter stereokjemien til produktet. Sistnevnte L-form er sjelden. Andre hydrogenaser, som laktat dehydrogenase og mandelat dehydrogenase har også blitt identifisert hos ulike melkesyrebakterier. Førstnevnte har sterk spesifisitet for pyruvat, og sistnevnte har, som hydroksy-isocaproat-dehydrogenaser, også sterkest aktivitet mot α -keto-isocaproat (Yvon & Rijnen 2001).

Ved reduksjon av α -ketosyren benyttes NADH som hydrogenonor (Yvon & Rijnen 2001). Dette fører til regenerering av NAD^+ , som kan bidra til å effektivisere bruk av energiprodukerende metabolisme, for eksempel glykolysen (Fernández & Zúñiga 2006). Ved reduserende forhold i vekstmediet vil dannelsen av hydroksysyrer fremfor aldehyder fra α -ketosyrer favoriseres (Smit et al. 2004).

2.8.6.2 Dekarboksylering

Dekarboksylering av α -ketosyrer katalyseres av α -ketosyre-dekarboksylaser og gir aldehyder. Denne aktiviteten er hovedsakelig funnet hos gjær (Yvon & Rijnen 2001), men også hos enkelte stammer tilhørende *Lactococcus lactis* (Smit et al. 2005). Aldehydene kan reduseres videre til alkoholer av en alkohol dehydrogenase eller oksideres til karboksylsyrer av en aldehyd dehydrogenase, men dette er ikke vist hos melkesyrebakterier (Fernández & Zúñiga 2006). α -ketosyre-dekarboksylaser er avhengig av tiaminpyrofosfat (TPP) og Mg^{2+} som kofaktorer. Den optimale pH for enzymaktivitet er 6,3, men aktivitet ned til pH 4 og opp til pH 9 er vist (Smit et al. 2005).

Reduksjon-oksidasjonspotensialet i det ekstracellulære miljøet påvirker dannelsen av aldehyder fra α -ketosyrer hos enkelte stammer. Ved reduserende redoks-potensial i omgivelsene ble produksjon av hydroksysyrer og karboksylsyrer favorisert hos *L. lactis* NCDO 763 og NCDO 1867. Ved oksiderende omgivelser ble dannelsen av aldehyder favorisert hos *L. lactis* NCDO 1867, samt kjemisk oksidering til andre aromakomponenter (Kieronczyk et al. 2006). I en studie av Smit et al. (2004) ble det undersøkt om enzymene hydroksysyre dehydrogenase og α -ketosyre-dekarboksylase konkurrerte om α -ketoisocaproat som substrat. En stamme av arten *L. lactis* subsp. *cremoris* ble inkubert med α -ketoisocaproat i medium med og uten NADH. Studien viste at de to enzymene konkurrerte om substratene, at reduksjonspotensialet i stor grad påvirket dannelsen av aromakomponenter, og at hydrogenering til hydroksysyrer dominerte (Smit et al. 2004).

2.8.6.3 Oksidativ dekarboksylering

Ved oksidativ dekarboksylering omdannes α -ketosyren direkte til den korresponderende karboksylsyrer, uten aldehydformen som intermediat. Ved oksidativ dekarboksylering av ketosyrer fra forgrenede aminosyrer, blir ketosyren først omdannet til korresponderende forgrenet acyl-CoA av forgrenet α -ketosyre-dehydrogenase-komplekset. Videre omsetning katalyseres av acyl-fosfotransferase og acyl-kinase, hvor produktet er en fri karboksylsyre

(Fernández & Zúñiga 2006). Produksjonen av karboksylsyrer fra forgrenede og aromatiske α -ketosyrer er ikke kjent i detalj, men er funnet hos enkelte laktokokker (Yvon & Rijnen 2001). Enzymkomplekset hemmes av treverdige arsenforbindelser og er avhengig av lipoinisyre som kofaktor for dannelsen av karboksylsyrer (Yvon & Rijnen 2001).

Pyruvat dehydrogenase er et lignende enzymkompleks, men det er usikkerhet om komplekset har aktivitet mot andre substrater enn pyruvat. Dehydrogenasekompleksene består begge av tre komponenter; α -ketosyre-dehydrogenase, dihydrolipoyl-transacylase og lipoamid-dehydrogenase. Førstnevnte katalyserer karboksyleringen av α -ketosyren i tillegg til den oksidative forflytningen av en acylgruppe til lipoylgruppen på dihydrolipoyl-transacylase. Både tiamin-pyrofosfat (TPP) og Mg^{2+} benyttes som kofaktorer under denne prosessen hvor det dannes et hydroksyacil-TPP intermediat. Dihydrolipoyl-transacylase katalyserer så overføringen av acylgruppen til CoA, som gir acyl-CoA. Til slutt forbruker lipoamid-dehydrogenase NAD^+ , med FAD som koenzym, for å oksidere dihydrolipoamidet som oppsto tilbake til sin opprinnelige form. Avhengigheten av NAD^+ for regenerering av enzymkomplekset, gjør at reaksjonen hemmes av NADH. Acyl-CoA, som er produktet fra oksidativ dekarboksylering av α -ketosyren, kan hydrolyseres videre til en karboksylsyre. Hos gjær katalyseres siste trinn av acyl-CoA-hydrolase, men reaksjonen kan også katalyseres av fosfat-butyrat-CoA transferase og butyrat kinase i to påfølgende trinn (Yvon & Rijnen 2001).

Oksidativ dekarboksylering av α -ketosyrer kan føre til mange ulike aromakomponenter, blant annet estere, tioestere, skatol og cresol. I tillegg kan karboksylsyrer og acyl-CoA reduseres til aldehyder av henholdsvis fettsyre-reduktase eller acyl-CoA-reduktase. Estere kan dannes fra karboksylsyrer og alkoholer, enten enzymatisk eller ved en spontan reaksjon (Yvon & Rijnen 2001).

2.8.6.4 Ikke-enzymatiske reaksjoner

Kjemiske reaksjoner, som ikke er katalysert av enzymer, kan også omdanne α -ketosyrer til aromakomponenter. Aromatiske α -ketosyrer kan omdannes til aldehyder som mangler to karbonatomer, og KMBA kan omdannes til metantiol. Kjemisk nedbrytning av α -ketosyrer fra tryptofan fører til dannelse av en rekke komponenter som forbindes med usmak, for eksempel i cheddar (Yvon & Rijnen 2001). Ketosyren som stammer fra transaminering av leucin, α -keto-isocaproat, kan gjennomgå en kjemisk oksidering til 2-metyl-propanal ved tilstedeværelse av Mn^{2+} (Smit et al. 2008).

2.9 Tiltente positive helseeffekter hos tradisjonelle

surmelksprodukter

Betydelige fremskritt er gjort i demonstreringen av at fermenterte meieriprodukter kan ha bestemte positive helseeffekter hos mennesker (Walstra et al. 2006b).

Det har vært kjent siden begynnelsen av det 20. århundre at noen bakterier har positive helseeffekter på mennesker (Ruas-Madiedo et al. 2002). Fokuset på funksjonelle matvarer har vokst, og i dag finnes det en rekke matvarer, særlig meieriprodukter, med probiotiske bakterier. De vanligste stammene som benyttes i probiotiske melkeprodukter tilhører slektene *Lactobacillus* og *Bifidobacterium* (Saxelin & Mäyrä-Mäkinen 2003). Fermenterte meieriprodukter kan inneholde andre komponenter med positiv effekt på helsen, som ekstracellulære polysakkarider, bioaktive peptider, β -galaktosidase og frie aminosyrer. Fermentert melk med bestemte bioaktive peptider, eller som inneholder aminosyren GABA, kan ha blodtrykkssenkende effekt (Aoki et al. 2003; Inoue et al. 2003; Pihlanto et al. 2010).

Verdens helseorganisasjon (WHO) klassifiserer høyt blodtrykk som den mest utbredte sykdommen i verden som kan forebygges. Ofte gir ikke sykdommen symptomer hos de lidende, men den kan føre til alvorlige sykdommer som slag, hjerteinfarkt og nyresykdom. I 2009 tilskrev WHO 13 % av alle dødsfall verden over til høyt blodtrykk, og 22 % av alle hjerteinfarkt i Vest-Europa skyldes høyt blodtrykk. Hypertensjon kan bidra til hjerte- og karsykdommer, som igjen er årsaken til 42 % av alle dødsfall i Europa (WHO 2013). Etersom hjerte- og karsykdommer er svært utbredt, vil det stadig være fokus på avdekking av alternative behandlingsmetoder, som for eksempel inntak av matvarer som inneholder helsebringende komponenter.

2.9.1 Bioaktive peptider

Tradisjonelt er proteiner i kosten kjent for å være en energikilde, samt å tilføre aminosyrer essensielle for vekst og vedlikehold av ulike biologiske funksjoner. Proteiner i matvarer har fått økt verdi etter hvert som kunnskapen om latente peptider med biologisk aktivitet har økt (Korhonen & Pihlanto 2006; Korhonen 2009). I følge Korhonen og Pihlanto (2006) har Kitts og Weiler (2003) definert bioaktive peptider som «spesifikke proteinfragmenter som har en positiv effekt på kroppslige funksjoner eller lidelser, og som til slutt kan påvirke helsen». Biologisk aktive peptider kan frigjøres ved enzymatisk nedbrytning av proteiner, eller

gjennom melkesyrebakterienes proteolytiske aktivitet under fermentering, både i melk eller i tarmsystemet (Sánchez-Rivera et al. 2014; Saxelin & Mäyrä-Mäkinen 2003). Bioaktive peptider kan virke regulerende med hormonliknende aktivitet i kroppen ved oralt inntak (Korhonen & Pihlanto 2006; Sánchez-Rivera et al. 2014). Blant annet kan de ha antimikrobiologisk-, blodtrykkssenkende-, immunstimulerende-, blodpropphindrende- og antistressende effekt, samt opioidaktivitet (Hartmann & Meisel 2007; Saxelin & Mäyrä-Mäkinen 2003). Bioaktive peptider med flere av nevnte egenskaper finnes naturlig i fermenterte meieriprodukter (Hartmann & Meisel 2007), og melkeproteiner anses å være den viktigste kilden til bioaktive peptider (Korhonen 2009).

Blant melkesyrebakteriene er evnen til å produsere bioaktive peptider med blodtrykkssenkende effekt arts- og stammeavhengig (Pihlanto et al. 2010). Pihlanto et al. (2010) viste at evnen til å danne peptider med hemmende aktivitet mot Angiotensin I konverterende enzymer (ACE) under fermentering er korrelert med stammens proteolytiske aktivitet. Studien viste at melk fermentert med *Lactococcus*-stammene hadde liten eller ingen ACE-hemmende aktivitet. Imidlertid førte fermentering med to stammer fra *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*, og flere arter eller stammer hos *Lactobacillus*, til melk med ACE-hemmende aktivitet (Pihlanto et al. 2010).

2.9.2 Ekstracellulære polysakkarider

Noen melkesyrebakterier produserer ekstracellulære polysakkarider under vekst. Ekstracellulære, eller eksopolysakkarider (EPS), er ulike polysakkarider produsert av mikroorganismer under vekst, og som finnes utenfor cellen. Disse kan danne en sammenhengende kapsel rundt cellen. De kan også skilles ut i vekstmediet, enten fullstendig frigjort fra cellen som slim, eller løst festet til celleveggen (Ruas-Madiedo et al. 2002). Bakterien kan ikke nyttiggjøre seg egenproduserte EPS som energikilde, men trolig har EPS en beskyttende funksjon mot uttørking, fagangrep, osmotisk stress og antibiotika eller andre giftige forbindelser. I tillegg har EPS betydning for cellens forankring til overflater og dannelse av biofilm.

I fermenterte meieriprodukter, for eksempel i rørt yoghurt, fungerer EPS som et naturlig fortykningsmiddel, og motvirker myseutskillelse (Duboc & Mollet 2001; Ruas-Madiedo et al. 2002; Tamime et al. 2006). Polysakkaridenes viskositetsøkende evne blir i større grad utnyttet, ettersom «tradisjonelle» metoder som tørrstoffanrikning og tilsetning av stabilisatorer er henholdsvis dyrt, og omdiskutert på grunn av E-nummerbruk (Tamime et al.

2006). Det finnes mange typer EPS, men først og fremst deles de inn i homopolysakkarider bestående av en type monosakkarid, og heteropolysakkarider som er sammensatt av ulike typer monosakkarider. Polysakkaridene varierer i sammensetning av monosakkarider, bindingstype mellom enhetene, forgreningsgrad, lengde og ladning (Duboc & Mollet 2001). Noen EPS kan inneholde andre enheter enn karbohydrater, som acetyl, fosfat eller glycerol (Ruas-Madiedo et al. 2002). Mengden EPS som produseres er avhengig av syrekultur, pH i vekstmediet og inkubasjonstemperatur (Tamime et al. 2006).

Det hevdes at noen EPS produsert av melkesyrebakterier har positive helseeffekter (Jolly et al. 2002). Det har vært spekulert i om den økte viskositeten grunnet EPS kan gjøre passasjen gjennom fordøyelsessystemet tregere, slik at kolonisering av probiotiske bakterier i tarmen stimuleres (Jolly et al. 2002). En annen foreslått helseeffekt av EPS er dannelse av kortkjedede fettsyrer ved mikrobiell nedbrytning i tykktarmen. Kortkjedede fettsyrer gir energi til tarmens epitelceller, og hevdes å kunne ha forebyggende effekt mot kreftutvikling i tarmen (Duboc & Mollet 2001; Jolly et al. 2002). Inntak av yoghurt kan beskytte mot infeksjon av influensavirus hos mus (Nagai et al. 2011). Studien viste at et surt EPS produsert av *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 var en av de aktive komponentene i yoghurten. En annen studie viste at høymolekylære sure EPS fra samme bakteriestamme hadde mitogen aktivitet hos lymfocytter fra mus (Kitazawa et al. 1998), og at fosforyleringen av polysakkaridet var av stor betydningen for aktiviteten. Eksopolysakkarider antas også å ha anti-kreftfremkallende effekt, immunregulerende- og kolesterolsenkende aktivitet og sårhelende egenskaper (Ruas-Madiedo et al. 2002).

For at EPS skal kunne gi positive helseeffekter må de være motstandsdyktige mot enzymatisk og mikrobiologisk nedbrytning i fordøyelsessystemet. Det er rapportert at det kan være variasjoner i grad av nedbrytbarhet blant EPS fra ulike bakteriestammer (Ruijsenaars et al. 2000). Studien viste at EPS fra *S. thermophilus* SFi 39 og SFi 12 ble brutt ned av fekal tarmflora, i motsetning til EPS fra *S. thermophilus* SFi 20, *L. lactis* subsp. *cremoris* B40, *Lactobacillus sakei* 0-1 og *Lactobacillus helveticus* Lh59.

2.9.3 Laktoseintoleranse

Laktose brytes ned i tarmsystemet av et laktaseenzym. Etter avvenning fra laktose i kosten, mister alle pattedyr deler av laktaseaktiviteten i tarmsystemet (Brown-Esters et al. 2012). Det regnes med at 60 % av mennesker over 4 år har sterkt redusert laktaseaktivitet (Walstra et al. 2006d). Hos mennesker med redusert laktaseaktivitet, vil et kosthold med mer laktose enn det

fordøyelsessystemet kan bryte ned føre til ubehag. Symptomer som oppblåsthet, magesmerter, diaré og magekramper er vanlig (Brown-Esters et al. 2012). Under fermentering av melk blir omtrent 20 % av laktosen brutt ned til glukose og galaktose som blir videre metabolisert. I yoghurt blir omlag dobbel mengde laktose brutt ned, ettersom syrekulturen i yoghurt kun kan utnytte glukose som energikilde (Walstra et al. 2006b).

Laktoseintoleranse er utbredt i de fleste deler av verden, men de fleste tåler små mengder laktose i kosten. Det er rapportert at et daglig inntak av laktose førte til tilpasning av mikrofloraen i tarmen, og reduksjon i symptomer på laktoseintoleranse (Hertzler & Savaiano 1996). Fermenterte meieriprodukter, spesielt yoghurt, kan ha en lindrende effekt hos laktoseintolerante. Dette kommer av syrekulturens β -galactosidase-aktivitet, som hydrolyserer laktose, og den viskøse konsistensen til yoghurt (Hertzler & Clancy 2003; Saxelin & Mäyrä-Mäkinen 2003). Ved inntak av fermentert melk vil passeringen gjennom tarmsystemet gå saktere, noe som fører til lengre kontakttid mellom laktose og laktase-enzymene og dermed økt nedbrytning av laktose (Walstra et al. 2006b). Det er også vist at naturell kefir forbedrer fordøyelse og toleranse av laktose hos voksne med redusert laktaseaktivitet (Hertzler & Clancy 2003).

2.9.5 γ -aminobutyrat (GABA)

γ -Aminobutyrat er en naturlig utbredt aminosyre som ikke inngår i proteiner (Ko et al. 2013). I hjernen hos virveldyr finnes GABA i store konsentrasjoner (Roberts & Frankel 1950), hvor den fungerer som et signalmolekyl i sentralnervesystemet. Aminosyren finnes også i andre levende organismer, som planter og bakterier (Waagepetersen et al. 1999).

Enzymet glutamat dekarboksylase (GAD) katalyserer reaksjonen der glutaminsyre dekarboksyleres til GABA (Cotter & Hill 2003). Videre kan GABA brytes ned til ravsyre semialdehyd ved hjelp av GABA-aminotransferase før intermedietet oksideres til ravsyre (Waagepetersen et al. 1999). Ettersom melkesyrebakterier er ikke-respirerende (Wright & Axelsson 2012), og dermed mangler enzymene som katalyserer disse reaksjonene, vil aminosyren akkumulere i vekstmediet.

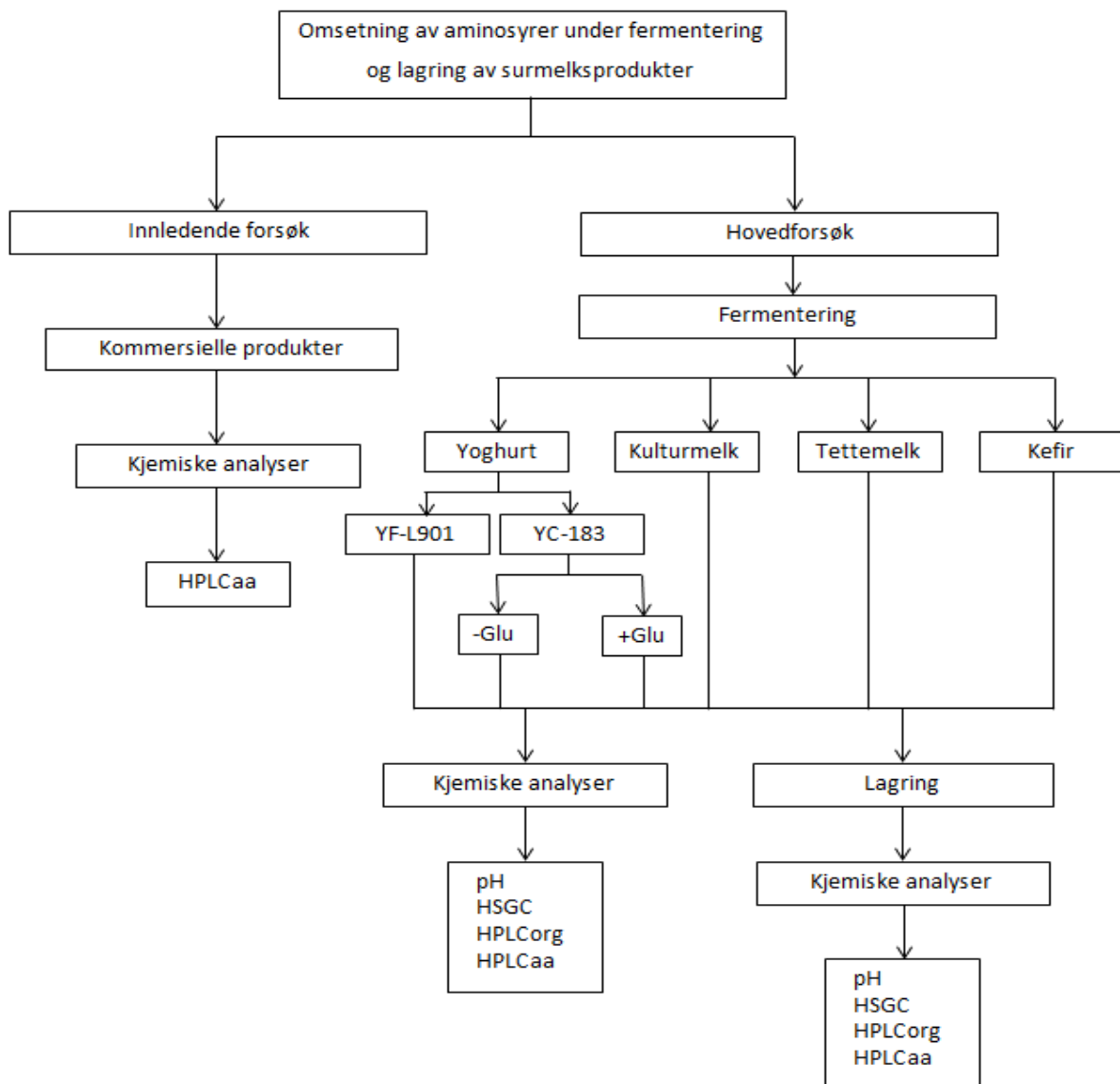
Blodsukkersenkende (Nakagawa et al. 2005), blodtrykkssenkende (Aoki et al. 2003) og krefthemmende (Al-Wadei et al. 2011) effekt er noen av de fysiologiske egenskapene GABA har vist å ha. I 2013 ble det funnet at fermentert soyamelk med økt GABA-konsentrasjon kan være et alternativ til behandling av depresjoner (Ko et al. 2013). Alle disse forsøkene ble

utført på rotter. En studie utført i 2003 viste at et daglig inntak av en fermentert melk med en GABA-konsentrasjon på 10 – 12 mg/ 100 ml hadde blodtrykkssenkende effekt på mennesker med mild hypertensjon (Inoue et al. 2003). Det har blitt rapportert at inntak av 220 g kommersiell kefir lagret i 2 uker tilsvarer en GABA-konsentrasjon på 10 mg (Grønnevik et al. 2011; Grønnevik et al. 2012).

Resultatene fra slike studier viser at det vil være aktuelt å undersøke innholdet av GABA i fermenterte meieriprodukter, samt undersøke om det er mulig å øke produksjonen av GABA i slike produkter.

3 MATERIALER OG METODER

Omsetningen av aminosyrer under fermentering og kjølelagring av kefir, kulturmilk, tettemelk og yoghurt ble undersøkt ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography (HPLC). I tillegg ble andre kjemiske analyser som pH, Headspace Gas Chromatography (HSGC) for flyktige aromakomponenter og HPLC for organiske syrer og karbohydrater utført. I figur 3.1 vises en oversikt over utføring av forsøket.



Figur 3.1 Flytskjema over praktisk gjennomføring av fermentering og analyser. +Glu, tilsatt glutaminsyre; -Glu, ikke tilsatt glutaminsyre; HSGC: Head Space Gas Chromatography, HPLCorg: High Performance Liquid Chromatography for organiske syrer og karbohydrater, HPLCaa: High Performance Liquid Chromatography for frie aminosyrer.

3.1 Forsøksdesign

Det ble gjort innledende forsøk med kommersielle produkter hvor frie aminosyrer ble analysert. I hovedforsøket ble det utført fermentering av kefir, kulturmilk, tettemilk og yoghurt med to ulike syrekulturer, hvor innholdet av aminosyrer, organiske syrer, karbohydrater og flyktige aromastoffer ble analysert. Omsetningen av aminosyrer ble analysert ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Flyktige aromastoffer ble analysert ved hjelp av Headspace Gas Chromatography (HSGC) og organiske syrer og karbohydrater ved hjelp av HPLC. Analysene ble utført både under fermentering og lagring produktene. Analysene ble også gjort under lagring av kommersiell tettemilk gjennom holdbarhetstiden, som er 60 dager¹. I tillegg ble det gjort et forsøk på å øke mengden GABA ved å øke innholdet av L-glutaminsyre i den ene yoghurttypen.

Hensikten med forsøket var å undersøke omsetningen av aminosyrer i de nevnte surmelksproduktene under fermentering og lagring, og da med spesiell interesse for omsetningen av GABA.

Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) ble benyttet for grafisk fremstilling av resultatene.

3.2 Innledende forsøk

Hensikten med det innledende forsøket var å undersøke innhold av GABA i ulike kommersielle surmelksprodukter. Det var også ønskelig å prøve ut prøveopparbeidelsesmetoden benyttet ved IKBM, NMBU for melkeprøver, på tettemilk og yoghurt som ikke hadde blitt opparbeidet etter denne prosedyren tidligere.

Kommersielle produkter ble kjøpt inn for å undersøke innhold av frie aminosyrer, og spesielt innholdet av GABA ble fokusert. Økologisk kefir (TINE), kulturmilk (TINE), yoghurt naturell (TINE) og Økologisk Tjukkmjølk (Rørosmeieriet AS, Røros, Norge) ble handlet inn fra lokale matvarebutikker. Kvantifisering av aminosyrer ble gjort i samtlige produkter ved hjelp av HPLC (se kapittel 3.3.5.1).

Proseduren for prøveopparbeidelse av melkeprøver til analyse av aminosyrer ga ikke pålitelige resultater ved analysering av tettemilk og yoghurt. Dette førte til gjentatte forsøk på forbedring av prosedyren inntil analysen ga tilfredsstillende resultater. I forhold til den

¹ Trond Vilhelm Lund, Meieribestyrer, Rørosmeieriet, 7374 Røros.

opprinnelige prosedyren for prøveopparbeidelse av melkesyrer ble det lagt til et trinn for miksing av prøvematerialet før opparbeidelse, samt at 15 minutter i vendemaskin og 1 minutt på vortexmikser erstattet 30 minutter i ultralydbad. Se kapittel 3.3.5.1 for prosedyren som ble benyttet.

Det ble valgt å gå videre med alle fire produkttyper til hovedforsøket, ettersom to av dem (kefir og kulturmilk) hadde lave konsentrasjoner av GABA, og to hadde høye (tette melk og yoghurt).

3.3 Hovedforsøk

I hovedforsøket ble det utført fermentering av kefir, kulturmilk, tette melk, samt yoghurt med to ulike kulturer. Fermentering av de ulike meieriproduktene ble utført 3 ganger med en ukes mellomrom. Etter fermentering ble produktene lagret i 4 uker ved 4 °C. Det ble analysert for innhold av aminosyrer, organiske syrer, karbohydrater og flyktige aromakomponenter ved ulike tidspunkt gjennom fermenteringsforløpet og under lagring. Det ble målt pH ved hvert analysetidspunkt. Disse analysene ble også utført på tre produksjoner med kommersiell Økologisk Tjukkmjøl (Rørosmeieriet) under lagring.

Fermentering av yoghurt ved bruk av syrekulturen YF-L901 (Chr. Hansen, Hørsholm) viste ikke tegn til dannelse av GABA, verken under fermentering eller lagring. Ettersom det ble funnet GABA i kommersiell yoghurt naturell (TINE), ble denne kommersielle yoghurten benyttet som podemateriale til fermentering av ny yoghurt. I yoghurt naturell (TINE) benyttes syrekulturen YC-183 (Chr. Hansen)². Forsøket ble gjentatt 3 ganger. Det ble også gjort forsøk på å øke mengden GABA i yoghurt podet med kommersiell yoghurt ved å tilsette L-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), og dette forsøket ble gjentatt to ganger.

Under fermentering av kefir, kulturmilk og tette melk ble analysene utført etter 0, 8, 12, 14 og 16 timer i vannbad ved 22 °C. For yoghurt med syrekultur YF-L901 (Chr. Hansen) ble analyser under fermentering ved 43 °C utført etter 0, 2, 4, 6,5 og 8 timer. Yoghurt inokulert med yoghurt naturell (TINE SA) ble analysert ved 0, 2, 4, 6 og 7 timer under fermentering. Analysetidspunktet «0 timer» ble tatt umiddelbart etter inokulering. Produktene ble fermentert til pH ≤ 4,5. Under lagring ble samtlige analyser utført etter 1, 2, 3 og 4 uker. Prøvetakingstidspunktene for lagret kommersiell tette melk var etter 20, 30, 40, 50 og 60 dager.

² Hege Sten, Driftslaboratoriet, TINE Meieriet Oslo, 0950 Oslo.

3.3.1 Kefir

Ved fermentering av kefir ble en brukssyre laget fra kefir Korn (TINE) benyttet som podemateriale. Ultrapasteurisert (UHT) og homogenisert lettmelk med 1,2 % fett (TINE) som holdt romtemperatur ble inokulert med 1 % kefir brukssyre (TINE) i sterilbenk. Inokulert melk (500 mL) ble overført til sterile 10 x 50 ml flasker før inkubering i vannbad ved 22 °C. Fermenteringen ble stoppet ved $\text{pH} \leq 4,5$, og flasker til lagring ble satt i isvann for rask nedkjøling, og deretter lagret ved 4 °C.

3.3.2 Kulturmilk

Brukssyren ble laget av en frysetørket Redi-Set CHN-19-kultur (Chr. Hansen, Hørsholm, Danmark), som er en aromatisk mesofil kultur. Det ble tilsatt omtrent en halv spiseskje frysetørket syrekultur til 1 liter romtemperert, ultrapasteurisert og homogenisert lettmelk (1,2 % fett) (TINE). Brukssyren ble inkubert i skap ved 22 °C i 12 – 14 timer.

Ved inokulering ble ultrapasteurisert og homogenisert lettmelk (500 mL) med 1,2 % fett (TINE) podet med 1 % av den tillagde brukssyren. Melken holdt romtemperatur ved inokulering, og ble overført til 10 x sterile 50 mL flasker. Flaskene ble inkubert i vannbad ved 22 °C. Fermenteringen ble avsluttet når $\text{pH} \leq 4,5$, og flaskene ble satt i isvann for rask nedkjøling.

3.3.3 Tettemelk

Romtemperert, ultrapasteurisert og homogenisert lettmelk med 1,2 % fett (TINE) ble inokulert med 1 % Økologisk Tjukkmjølke (Rørosmeieriet) i sterilbenk. Kartongen med tettemelk var uåpnet, og hadde vært lagret i omtrent 2 uker ved podingstidspunktet. Kartongene med tettemelk ble ristet kraftig for hånd før åpning og uttak av podemateriale. Inokulert melk (500 mL) ble overført til 10 x sterile 50 ml flasker i sterilbenk og inkubert i vannbad ved 22 °C. Ved $\text{pH} \leq 4,5$ ble fermenteringen stoppet. Flaskene ble satt i isvann for nedkjøling, og senere lagret ved 4 °C.

Det ene forsøket ble utsatt i to uker på grunn av problemer med et av analyseinstrumentene. Dette førte til at tettemelken som skulle benyttes som podemateriale var 2 uker eldre enn i de to andre forsøkene.

3.3.4 Yoghurt

3.3.4.1 Yoghurt med syrekultur YF-L901 (Chr. Hansen)

Ved produksjon av yoghurt ble det benyttet ultrapasteurisert og homogenisert lettmelk med 1,2 % fett (TINE). Omtrent 30 ml av syrekulturen (YF-L901 (Chr. Hansen)) ble tint omtrent 1 time før inokulering, og ble oppbevart i vannbad på 43 °C frem til inokulering.

Romtemperert melk (500 mL) ble tørrstoffanriket med 2,5 % skummetmelkpulver (TINE), og modnet i 20 minutter under omrøring. Pasteurisering av tørrstoffanriket melk ble utført ved 90 – 95 °C med en holdetid på 5 minutter under konstant omrøring. Melken ble kjølt ned til 43 °C i isbad, og inokulert med YF-L901 (Chr. Hansen) med en podeprosent på 0,02 %. Den inokulerte melken (500 mL) ble overført til 10 x sterile 50 ml flasker i sterilbenk, før inkubering ved 43 °C i vannbad. Vannbadet ble tildekket av aluminiumsfolie under fermentering. Ved endt fermentering (pH ≤ 4,5) ble flaskene kjølt raskt ned i isvann før de ble lagret ved 4 °C.

3.3.4.2 Yoghurt podet med yoghurt naturell (TINE)

Det ble utført fermentering av yoghurt med kommersiell naturell yoghurt (TINE) som podemateriale. Fremgangsmåten var den samme som beskrevet i 3.3.4.1, men istedenfor syrekultur YF-L901 (Chr. Hansen) ble den sterile melken podet med 2 % yoghurt naturell (TINE), som inneholder syrekultur YC-183 (Chr. Hansen). Det ble benyttet naturell yoghurt fra tre ulike produksjoner, men med omtrent samme alder, til inokulering.

3.3.4.3 Yoghurt tilsatt glutaminsyre

En glutaminsyreløsning (4,84 µg/ml) ble laget av L-glutaminsyre (Sigma) og ionebyttet vann. Løsningen ble satt i vendemaskin for blanding til aminosyren var oppløst, omtrent 30 – 40 minutter. Etter vending ble løsningen sterilfiltrert i sterilbenk gjennom et sterilt Millex GP-filter, med porestørrelse 0,22 µm (Millipore, Merck, Darmstadt, Tyskland), direkte over i en steril 50 ml glassflaske.

Melken ble behandlet som beskrevet i 3.3.4.1 før inokulering. Glutaminsyreløsningen ble tilsatt i 500 ml melk, til en konsentrasjon på 3 µmol/ml. Melken tilsatt glutaminsyre ble inokulert med 2 % yoghurt naturell (TINE). Det ble overført 50 ml av inokulert melk til 11 x

sterile 50 ml glassflasker og inkubert i vannbad ved 43 °C. Vannbadet ble dekket til med aluminiumsfolie under fermentering.

3.3.5 Kjemiske analyser

Ved analysering av produkter under fermentering ble pH målt umiddelbart i en flaske for hvert analysetidspunkt, før det ble tatt uttak til andre kjemiske analyser fra samme flaske. Flasken ble oppbevart på is. Ved analysering av egenfermenterte produkter i 50 ml glassflasker, både under fermentering og under lagring, ble innholdet homogenisert ved hjelp av Ultra-Turrax i 30 – 60 sekunder og ristet for hånd i 10 sekunder før innveining av prøvemateriale til kjemiske analyser. Ved analysering av kommersielle produkter ble innholdet overført til et plastbeger á 1 liter og blandet godt ved bruk av en elektrisk håndmikser før innveining og pH-måling. Prøvematerialet for analyse av frie aminosyrer ble, på grunn av praktiske årsaker, nedfrost (- 20 °C) og videre opparbeidet og analysert ved et senere tidspunkt.

3.3.5.1 Frie aminosyrer

Kvantifisering av frie aminosyrer i de ulike melkeprøvene ble gjort ved hjelp av HPLC, beskrevet av Bütikofer og Ardö (1999) med noen modifikasjoner. Instrumentet bestod av en Agilent 1200 serie autoinjektor (Agilent Technologies, Singapore), en Agilent 1200 serie pumpe (Agilent Technologies), en Agilent 1200 serie kolonneovn (Agilent Technologies), en Agilent 1200 serie termostat (Agilent Technologies) og en fluorescensdetektor (1200 serie, Agilent Technologies). Systemet ble styrt ved hjelp av programvaren EZChrom Elite (Agilent Technologies).

Det ble veid inn 5,00 g prøve i 15 ml sterile Nunc-rør. Hver prøve ble tilsatt 5,00 ml indre standard (0,4 µmol/ml L-norvalin (Sigma-Aldrich) i 0,1 M HCl (Merck, Darmstadt, Tyskland)), og mikset 1 minutt i mini shaker (Gene 2, New York, USA) før de ble satt i en Multi RS-60 Biosan vendemaskin (Biosan, Riga, Latvia) i 15 minutter. Prøvene ble sentrifugert (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) ved 3000 x *g* og 4 °C i 40 minutter. Det ble overført 0,5 ml av supernatanten til 1,5 ml Fliptube eppendorfrør (Gemü, Ingelfinden, Tyskland), og 0,5 ml 4 % trikloreddiksyre (Merck) ble tilsatt. Alle rørene ble mikset i en mini shaker (Gene 2,) før de ble satt på is i 30 minutter. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 15700 x *g* i 5 minutter ved 4 °C, Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble tatt opp med en steril 10 ml sprøyte

(Becton Dickinson, Fraga, Spania) med en engangskanyle 0,8 X 40 mm (Becton Dickinson). Supernatanten ble så filtrert gjennom et MFS-13 mm CA-filter med 0,2 µm porestørrelse (VWR International LCC, Pennsylvania, USA) direkte i et HPLC rør. Av filtratet ble 50 µl overført til et annet analyserør. Før analyse ble 350 µl boratbuffer (Agilent, Tyskland) tilsatt til hver prøve. Vialene ble forseglet med plastkork (Agilent) og Chromacol 2 SV septa (Agilent) og plassert i auto-sampleren for analysering. For derivatisering ble o-phtalaldehyde (OPA) (Agilent) benyttet.

For separasjon av aminosyrene ble prøven ført gjennom en XTerra RP 18 kolonne (150 x 4.6 mm; Waters, Milford, MA) ved hjelp av to mobilfaser, A og B. Kolonnen holdt en temperatur på 42 °C, og hastigheten på mobilfasen var 0,700 ml/min. Mobilfase A bestod av 30 mmol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck), 0,1 mmol/l titriplex III (Merck) og 0,25 % tetrahydrofuran. Mobilfase B bestod av 100 mol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck) og 0,53 mol/l titriplex III (Merck), tilsatt 80 % acetonitril (Merck). Begge mobilfasene ble justert til pH 7,2.. Fra prøvematerialet ble det injisert 10 µl.

Det ble analysert for aminosyrene L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-asparagin, L-serin, L-glutamin, L-histidin, glycin, L-treonin, L-citrullin, L-arginin, L-alanin, GABA, L-tyrosin, L-valin, L-metionin, L-norvalin, L-isoleucin, L-fenylalanin, L-tryptofan, L-leucin, L-ornitin og L-lysin. Identifisering og kvantifisering av de frie aminosyrene ble gjort ved sammenligning av retensjonstider mot en ekstern standard. Den eksterne standarden bestod av samtlige aminosyrer nevnt ovenfor, med kjent konsentrasjon. Ved tillaging av ekstern standard ble en bestemt mengde av samtlige aminosyrer løst i 0,1 M HCl (Merck). Videre opparbeidelse var tilsvarende den for melkeprøvene.

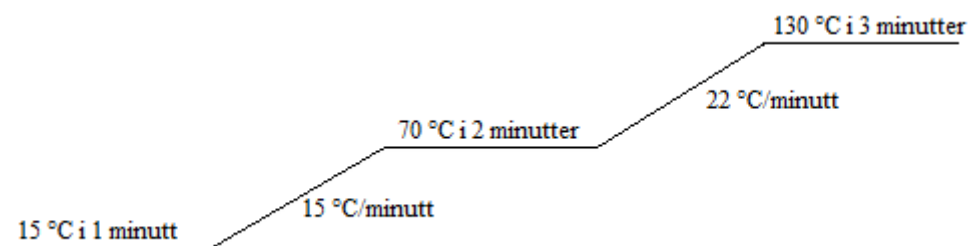
3.3.5.2 Flyktige aromastoffer

Innhold av flyktige aromastoffer ble analysert ved hjelp av HSGC etter en metode beskrevet av Narvhus et al. (1990).

Ved analysetidspunktene ble 10,00 g av prøven overført til en headspace-flaske (Machery Nagel, Tyskland). Flasken ble forseglet med caps (PTFA/Si septa, Agilent, USA) og plassert i en HP 7694 Headspace sampler med et 6890 GC system (Agilent, USA), en Parker 75-32 hydrogenerator med trykk på 1,8 bar (Parker Hannifin UK Ltd, Kent, UK) og Total Chrom LC-terminal (Perkin Elmer) programvare.

Headspace equilibreringsbadet hadde en temperatur på 50 °C, manifoldtemperaturen var på 60 °C, og ekvilibreringsstiden var på 45 minutter. Det ble injisert 1,0 ml av prøven, med en hastighet på 0,5 ml/min. Injektortemperaturen var 180 °C.

Nitrogen 6,0 (AGA, Norge) ble benyttet som bæregass. Hastigheten på bæregassen ble holdt konstant på 5,0 ml/min. En CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland) ble brukt for separering av komponentene. Kolonnen hadde en lengde på 25 meter, en indre diameter på 0,53 mm og filmtykkelse på 5,0 µm. Følgende temperaturprogram ble benyttet under analysen:



De ulike komponentene ble separert på grunnlag av ulik flyktighetsgrad og affinitet til kolonnens stasjonære fase. En flammeionisasjonsdetektor med temperatur på 200 °C ble benyttet for påvisning av komponentene. For kvantifisering av de ulike flyktige forbindelsene ble det benyttet standarder av melk tilsatt flyktige komponenter med kjent konsentrasjon. De ulike standardene som ble brukt var acetaldehyd, diacetyl, etylacetat, 2-butanon, 2-heksanol, 2-metyl-butanal, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanal, 3-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol (alle fra Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, 1-butanol, 1-propanol, 2-butanol og 2.3-pentadion (Merck, VWR).

3.3.5.3 Organiske syrer og karbohydrater

Kvantifisering av organiske syrer og karbohydrater ble gjort ved hjelp av HPLC etter en modifisert metode av Marsili et al. (1981), hovedsakelig som beskrevet av Narvhus et al. (1998). Det ble brukt en Perkin Elmer Serie 200 auto-injektor (Perkin Elmer, Waltham, USA), Perkin Elmer Serie 200 pumpesystem, Perkin Elmer LC 101 kolonneovn, Perkin Elmer Serie 200 RI-detektor, Perkin Elmer Serie 200 UV/VIS-detektor og Total Chrom LC-terminal, versjon 4.1 (Perkin Elmer).

Det ble veid inn 1,00 g av prøven i syrevaskede 10 ml Belcorør. Prøven ble tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann før henholdsvis 200 µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck) og 8 ml acetonitril (Merck) ble tilsatt. Prøvene ble vendt i 30 minutter i en Multi RS-60 Biosan vendemaskin (Biosan) og

sentrifugert i 15 minutter ved 3400 rpm og romtemperatur i en Kubota 2000-sentrifuge (Bunkyo-ku, Japan). Supernatanten ble tatt opp med en 10 ml steril sprøyte (Becton Dickinson, Singapore) med en engangskanyle 0,8 X 40 mm (Becton Dickinson, Singapore). Prøven ble filtrert direkte i et HPLC-rør (Agilent) gjennom et sprøytefilter med porestørrelse 0,2µm, og forseglet med Chromacol 8-SV plastkork inneholdene et Chromacol 8-ST101 septa. Av prøven ble 25 µl injisert i HPLC-instrumentet.

Organiske syrer og karbohydrater ble separert ved hjelp av en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) som ble oppvarmet til 30 °C. Mobilfasen som ble benyttet var 5 mM H₂SO₄ med en flow på 0,4 mL/min.

De organiske syrene og karbohydratene ble identifisert og kvantifisert ved sammenligning av retensjonstider mot standarder som inneholdt de ulike syrer og karbohydrater.

Standardløsningene for ekstern kalibrering ble behandlet på samme måte som prøvene.

Standardene inneholdt de organiske syrene sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, eplesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma), og karbohydratene glukose, galaktose og laktose (Merck). Organiske syrer ble detektert med en Perkin Elmer Serie 200 UV/VIS-detektor (Perkin Elmer), og karbohydratene med en Perkin Elmer Serie 200 RI-detektor (Perkin Elmer).

3.3.5.4 pH

Måling av pH i melkeprøvene ble utført ved hjelp av et PHM 210 standard pH-meter (Meter Lab, Radiometer, København, Danmark (Nerliens, Norge)). Romtemperert buffer med pH 4 (Merck) og pH 7 (Merck) ble benyttet ved kalibrering av pH-meteret før bestemmelse av pH i tettemelk, kefir og kulturmilk under fermentering. Før bestemmelse av pH i yoghurt under fermentering, ble pH-meteret kalibrert med buffere som holdt 43 °C. Ved måling av pH i lagrede prøver ble pH-meteret kalibrert med på 4 °C.

4 RESULTATER

I innledende forsøk ble innholdet av frie aminosyrer kvantifisert i noen kommersielle produkter (kefir, kulturmilk, tettemelk og yoghurt) for å undersøke om de inneholdt GABA. Det ble detektert GABA i alle produktene, hvor yoghurt og tettemelk inneholdt betydelig større mengder enn kefir og kulturmilk. Det ble derfor gjennomført syring av alle fire produkter for å undersøke utviklingen av aminosyrene både under fermentering og lagring.

Analysering av kefir, kulturmilk og tettemelk ble utført etter 0, 8, 12, 14 og 16 timers fermentering (22 °C), yoghurt syret med YF-L901 ble analysert etter 0, 2, 4, 6,5 og 8 timer (43 °C) og yoghurt med YC-183 ble analysert etter 0, 2, 4, 6 og 7 timer fermentering (43 °C). Alle produktene ble også analysert etter 1, 2, 3 og 4 ukers lagring (4 °C). I tillegg ble kommersiell tettemelk analysert hver tiende dag fra 20 til 60 dagers lagring. Analysene som ble gjennomført var kvantifisering av organiske syrer, karbohydrater, flyktige aromastoffer og aminosyrer, samt måling av pH.

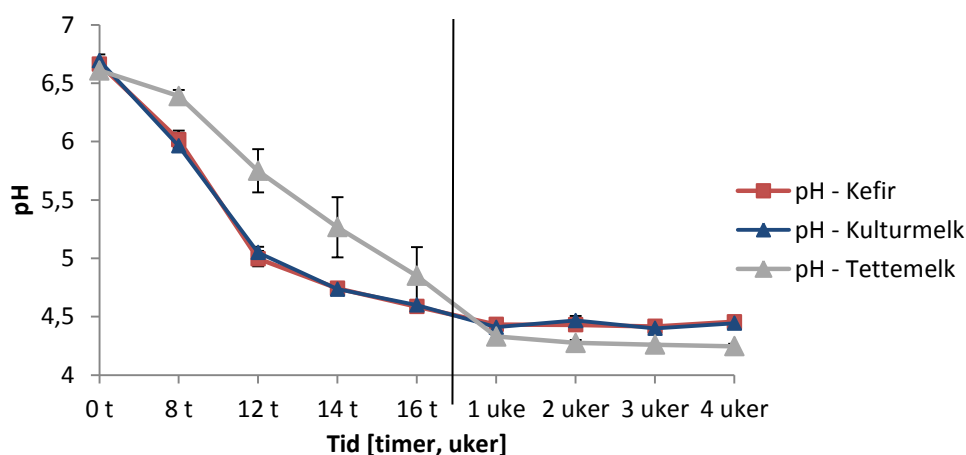
Ved fermentering av yoghurt med YC-183 ble det gjort et forsøk på å øke mengden GABA ved å tilsette glutaminsyre (3 mmol/kg).

Resultatene fra hovedforsøket er presentert som gjennomsnittsverdier av tre gjentak, bortsett fra for yoghurt med syrekultur YC-183 tilsatt glutaminsyre, hvor resultatene er gjennomsnittsverdier av to gjentak.

4.1 pH

Det ble foretatt pH-målinger under fermentering av kefir, kulturmilk og tettemelk ved 22 °C, under fermentering av yoghurt med syrekultur YF-L901 og YC-183 ved 43 °C, og hver uke gjennom 4 ukers kjølelagring. pH ble også målt i kommersiell tettemelk hver tiende dag gjennom holdbarhetstiden på 60 dager, med startpunkt på dag 20. Figur 4.1 viser pH i kefir, kulturmilk og tettemelk under fermentering.

4.1.1 Kefir, kulturmilk og tettemelk



Figur 4.1 Gjennomsnittlig pH i kefir, kulturmilk og tettemelk under fermentering og lagring.

Under fermentering sank pH fra 6,7 til 4,5 i løpet av 16 – 19 timer for kefir og kulturmilk. Figur 4.1 viser at nedgangen i pH var raskest de første 12 timene. Under lagring var pH stabil på omtrent 4,4 i kefir og kulturmilk.

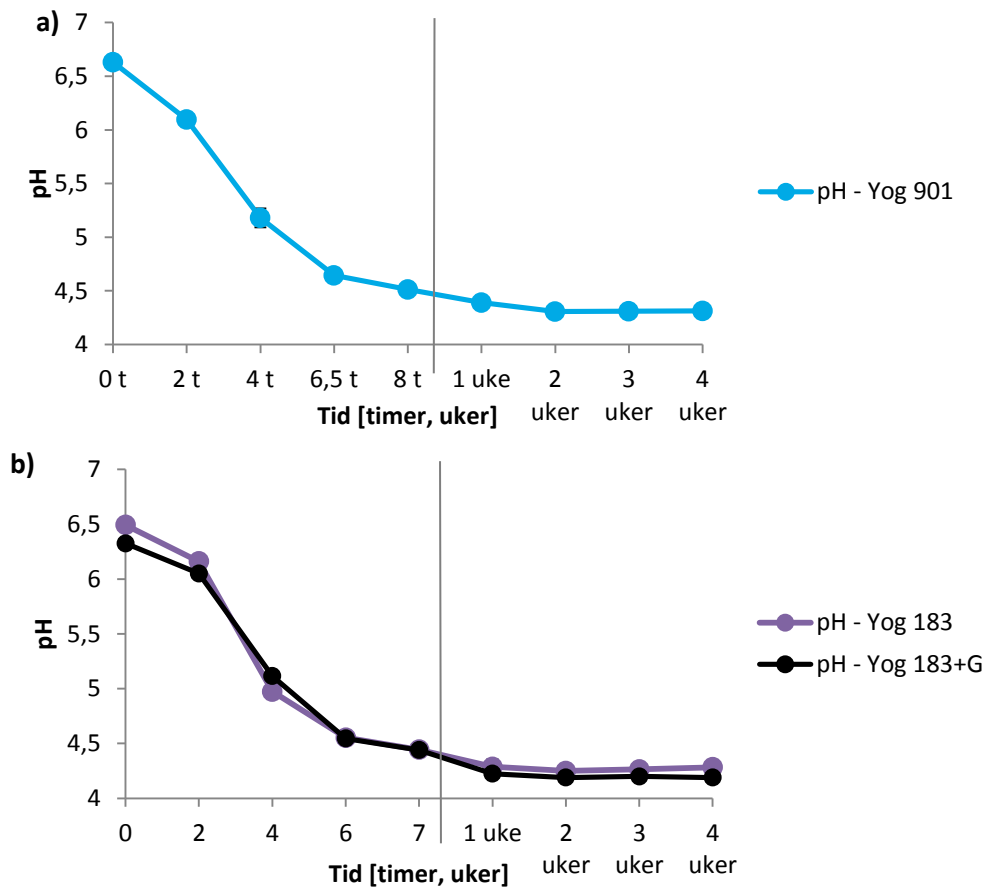
Ved fermentering av tettemelk tok det 18 – 22 timer før pH var $\leq 4,5$. Figur 4.1 viser at reduksjonen i pH var tregere for tettemelk enn for kulturmilk og kefir. Med utgangspunkt i at tettemelken hadde en pH på 4,5 ved slutten av fermentering, sank pH med 0,2 i løpet av den første uken av lagringsperioden. Under lagring sank pH noe mer, men jevnt gjennom hele perioden. Standardavvikene viste større variasjon mellom forsøkene med tettemelk ved 12, 14 og 16 timer enn for resten av forløpet, ettersom de tre produksjonene brukte ulik tid på å nå pH 4,5. Fermenteringen ble avsluttet ved pH 4,5.

Det ble tatt målinger av pH i kommersiell tettemelk under lagring i 20 til 60 dager.

Resultatene viste at pH var stabil på 4,2 i denne perioden.

4.1.2 Yoghurt

Måling av pH i løpet av fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901 og to varianter av yoghurt syrnet med YC-183 er vist i figur 4.2



Figur 4.2 Gjennomsnittsmålinger av pH under fermentering og lagring av **a)** yoghurt med syrekultur YF-L901 og **b)** yoghurt syrnet med YC-183, med og uten tilsetning av glutaminsyre (G).

Ved fermentering av yoghurt podet med YF-L901 sank pH raskt fra 0 – 6,5 timer. Figur 4.2 viser at yoghurten nådde en pH på 4,5 etter 8 timer. En ettersyrning fra pH 4,5 til 4,3 ble observert etter lagring i 2 uker. Gjennom resten av lagringsperioden var pH stabil på 4,3. I følge figur 4.2 sank pH raskt mellom 2 og 6 timers fermentering for begge yoghurttypene med syrekultur YC-183. Etter 7 timer ved 43 °C hadde begge variantene nådd pH 4,4. I løpet av den første uken under lagring sank pH til 4,2. Under kjølelagring var pH stabil på 4,2.

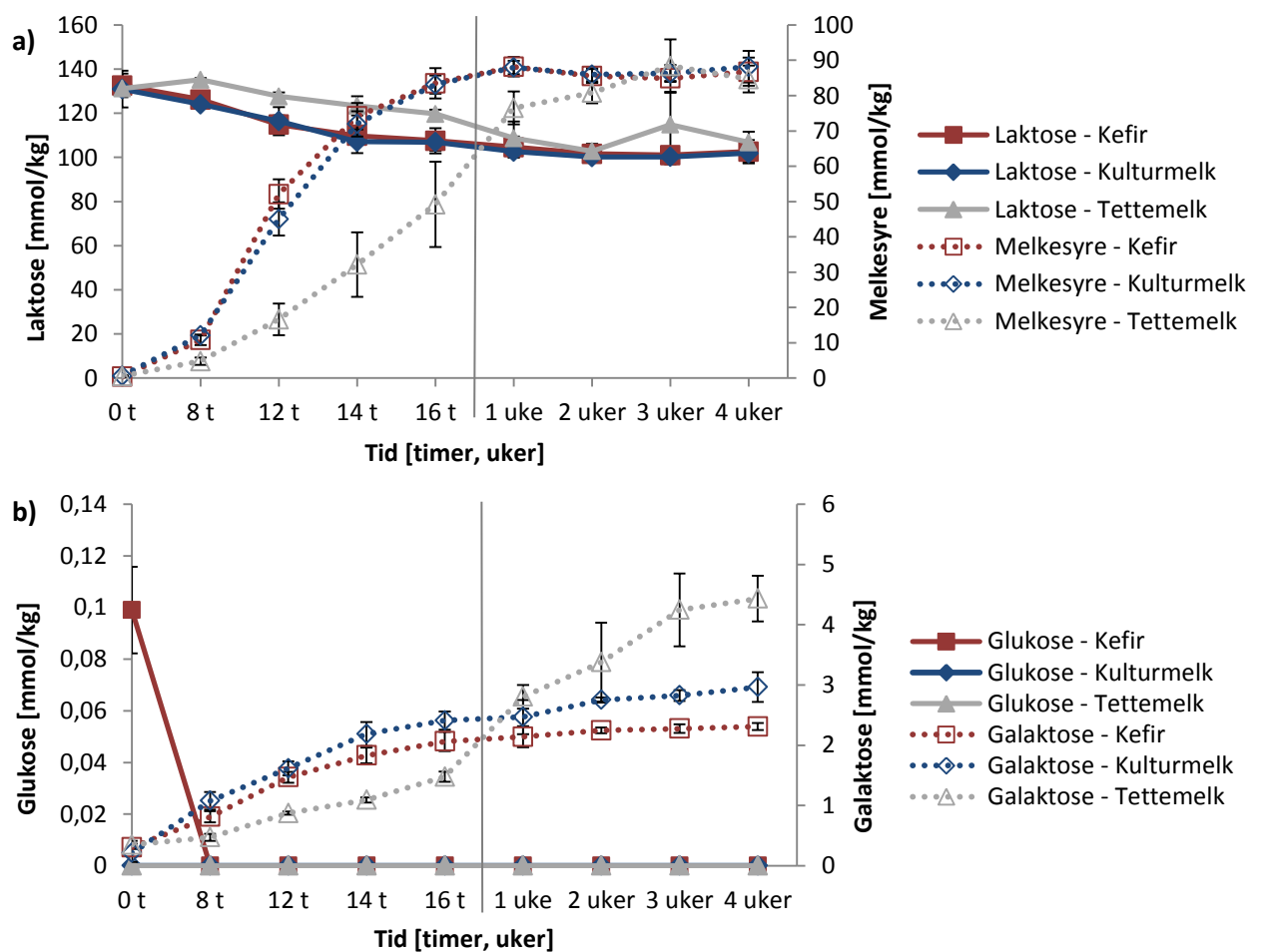
4.2 Karbohydratmetabolisme

4.2.1 Melkesyre og karbohydrater

Innhold av laktose, glukose, galaktose og melkesyre gjennom fermentering og lagring ble undersøkt i kefir, kulturmilk, tettemelk, samt yoghurt syrnet med to ulike kulturer. Ved homofermentativ nedbrytning av laktose kan det teoretisk dannes 4 mol melkesyre per mol laktose (Kandler 1983). Heterofermentative melkesyrebakterier produserer teoretisk 2 mol melkesyre, 2 mol CO₂ og 2 mol eddiksyre/etanol per mol laktose som metaboliseres (Kandler 1983).

4.2.1.1 Kefir, kulturmilk og tettemelk

Konsentrasjonen av karbohydrater og laktose ble fulgt under fermentering og lagring av kulturmilk, kefir og tettemelk. Resultatene er presentert i figur 4.3.



Figur 4.3 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av **a)** laktose og melkesyre og **b)** glukose og galaktose, i kefir, kulturmilk og tettemelk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.3 ble konsentrasjonen av laktose redusert under fermentering i 16 timer, fra omtrent 131 mmol/kg til 108 mmol/kg i kefir og kulturmilk. Samtidig ble det dannet 83 mmol/kg melkesyre. Under lagring var det ingen endringer i konsentrasjon av laktose eller melkesyre i kefir eller kulturmilk.

Reduksjon av mengde laktose var tregere i tettemilk enn de andre melketyperne. Fra 0 til 16 timer ble mengde laktose i tettemilk redusert fra omtrent 130 mmol/kg til 119 mmol/kg. I samme tidsrom ble det produsert 49 mmol/kg melkesyre. Mengde melkesyre i tettemilk økte med omtrent 8 mmol/kg fra 1 uke til 4 ukers lagring. I samme periode ble laktosekonsentrasjonen redusert med omtrent 2 mmol/kg.

Ved begynnelsen av fermenteringen ble konsentrasjonen av glukose i kefir målt til 0,1 mmol/kg. Dette ble omsatt i løpet av de første 8 timene. Det ble ikke detektert glukose senere under fermentering, eller under lagring av kefir. Mengde galaktose økte jevnt under fermentering for alle melketyperne i løpet av 16 timers fermentering. Konsentrasjonen av galaktose var omtrent uendret under lagring av kefir og kulturmilk, men økte i tettemilk. Det ble ikke funnet glukose under fermentering eller lagring av kulturmilk eller tettemilk (figur 4.3).

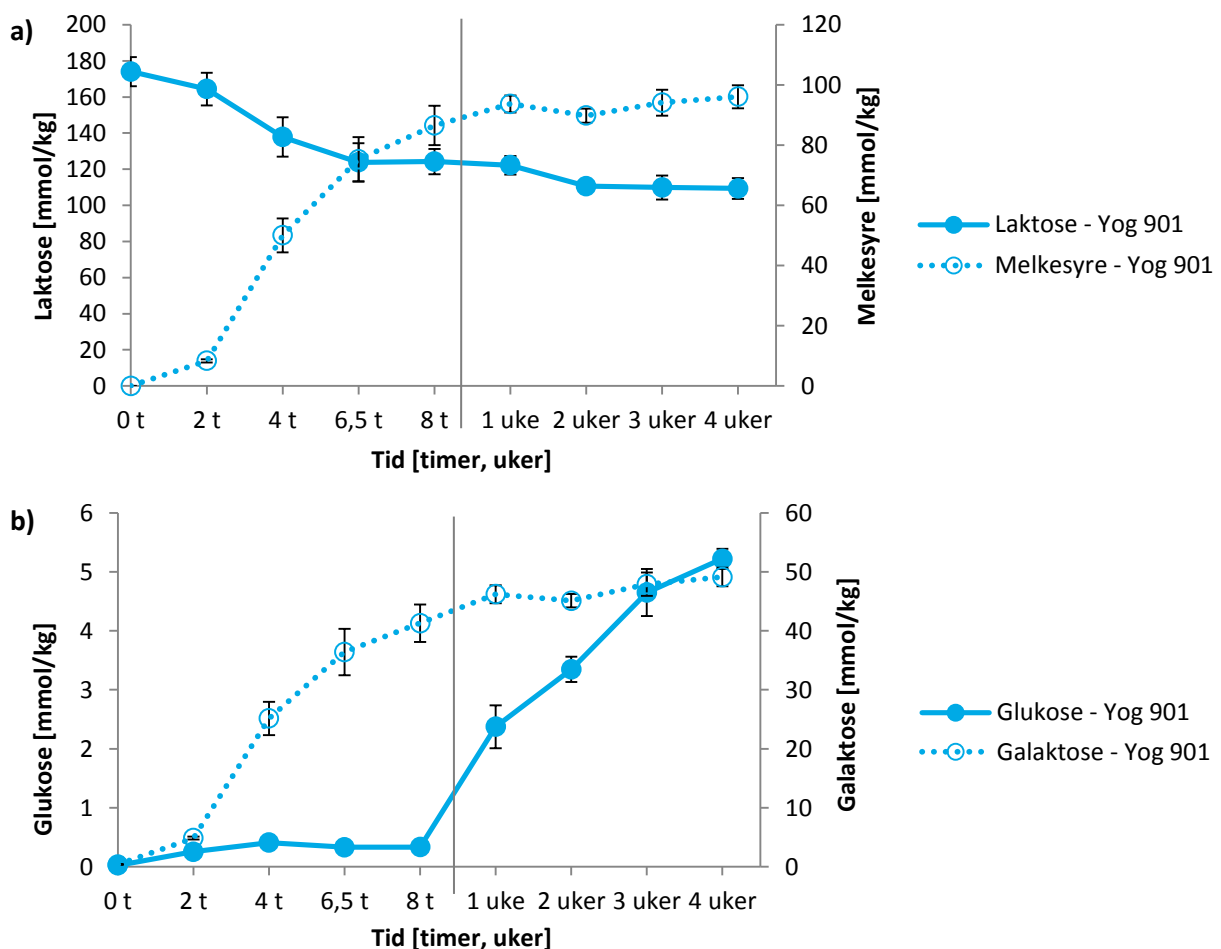
Konsentrasjonen av karbohydrater og melkesyre ble analysert i kommersiell tettemilk under lagring. Mengden laktose og melkesyre var stabil på henholdsvis 97 mmol/kg og 86 mmol/kg fra 20 til 60 dagers lagring. Konsentrasjonen av galaktose var også stabil i kommersiell tettemilk under lagring. Glukose ble kun detektert i den ene produksjonen etter 60 dagers lagring.

4.2.1.2 Yoghurt

4.2.1.2.1 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Under fermentering og lagring av yoghurt med syrekultur YF-L901 ble innholdet av karbohydrater og melkesyre analysert. Resultatene er presentert i figur 4.4.

I følge figur 4.4 ble mengden laktose redusert med 50 mmol/kg i løpet av fermenteringen. Det ble produsert 86 mmol/kg melkesyre i samme tidsrom. Under lagring ble laktose redusert med 13 mmol/kg, og melkesyre økte med 3 mmol/kg. Etter 8 timers fermentering var innholdet av galaktose 41 mmol/kg og glukose 0,33 mmol/kg. Under lagring økte mengde galaktose med ytterligere 8 mmol/kg, samtidig som konsentrasjonen av glukose til 5,2 mmol/kg.



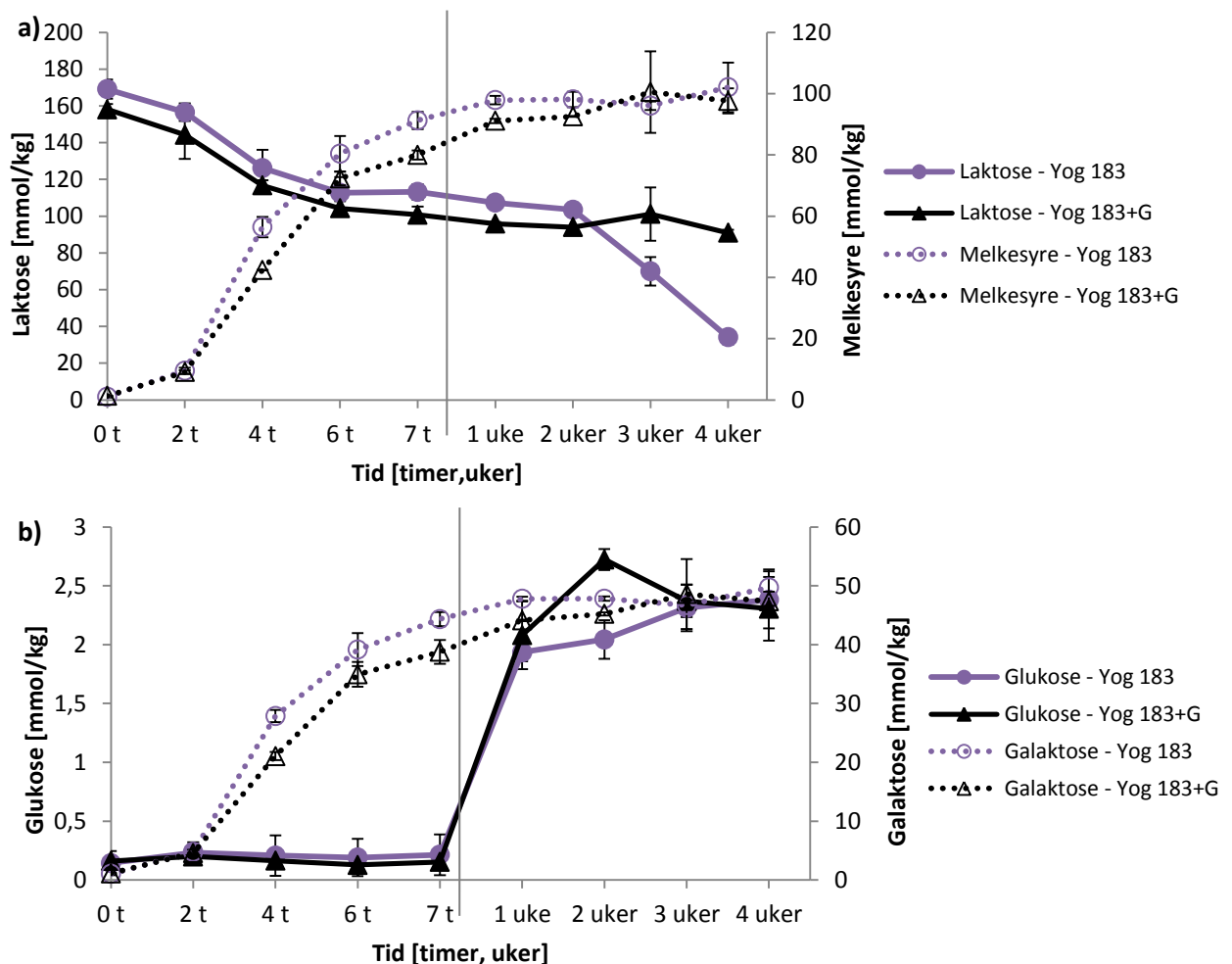
Figur 4.4 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av **a)** laktose og melkesyre, og **b)** glukose og galaktose, i yoghurt med syrekultur YF-L901 under fermentering og lagring.

4.2.1.2.2 Yoghurt med syrekultur YC-183

Mengden karbohydrat og melkesyre ble undersøkt i to varianter av yoghurt inokulert med YC-183, hvor en ble tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Figur 4.5 viser resultatene fra undersøkelsen.

Konsentrasjonen av laktose sank med ca. 56 mmol/kg under fermentering av begge yoghurtvariantene med YC-183 (figur 4.5). I samme tidsrom ble det produsert 91 mmol/kg melkesyre i yoghurt som ikke var tilsatt glutaminsyre, og 80 mmol/kg melkesyre i yoghurten tilsatt glutaminsyre.

Under fermentering økte konsentrasjonen av galaktose i yoghurtene til omtrent 40 mmol/kg. Kun små mengder glukose fantes i yoghurten under fermentering, men i løpet av lagringsperioden økte mengden glukose til 2,3 mmol/kg i begge yoghurtvariantene.



Figur 4.5 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av **a)** laktose og melkesyre og **b)** glukose og galaktose, i yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre (G; 3 mmol/kg) under fermentering og lagring.

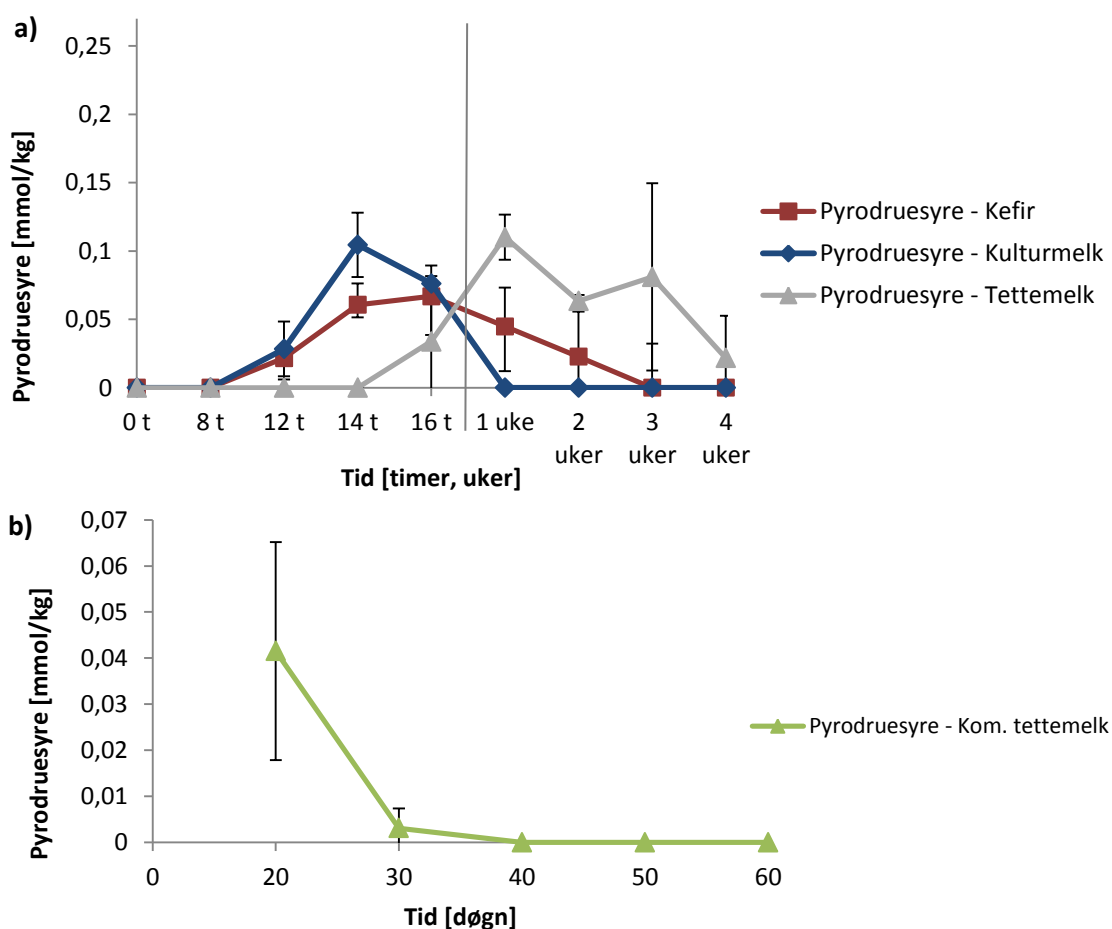
4.2.2 Pyrodruesyre

Konsentrasjonen av pyrodruesyre ble analysert i kefir, kulturmilk, tettemelk og yoghurt med to ulike syrekulturer. Pyrodruesyre kan blant annet dannes fra nedbrytning av karbohydrater, sitrat og asparagin, og omdannes til en rekke metabolitter, som blant annet melkesyre, alanin, acetaldehyd og eddiksyre (Fernández & Zúñiga 2006; Liu 2002). Se også figur 2.6.1 og 2.7.2.

4.2.2.1 Kefir, kulturmilk og tettemelk

Konsentrasjonen av pyrodruesyre ble målt under fermentering og lagring av tettemelk.

Resultatene er vist i figur 4.6.



Figur 4.6 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av pyrodruesyre i **a)** kefir, kulturmilk og tettemelk under fermentering og lagring, og **b)** kommersiell (kom.) tettemelk under lagring.

Ut fra figur 4.6 økte mengden pyrodruesyre i samtlige melketyper under fermentering.

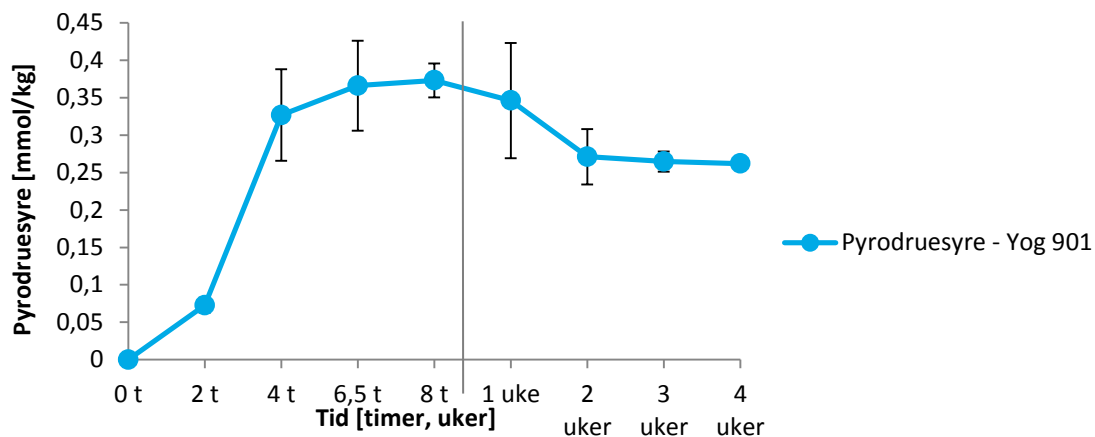
Konsentrasjonen av pyrodruesyre ble redusert i løpet av lagringsperioden i kefir. Det ble ikke detektert pyrodruesyre i kulturmilk under lagring. Mengden pyrodruesyre i tettemelk både steg og sank under lagring. Standardavvikene viste stor variasjon i mengde pyrodruesyre i

tettemelk mellom forsøkene. Konsentrasjonen av pyrodruesyre sank fra 20 til 30 dagers lagring. Det ble ikke detektert pyrodruesyre senere i lagringsperioden.

4.2.2.2 Yoghurt

4.2.2.2.1 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengde pyrodruesyre ble målt i yoghurt syrnet med YF-L901 under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.7.



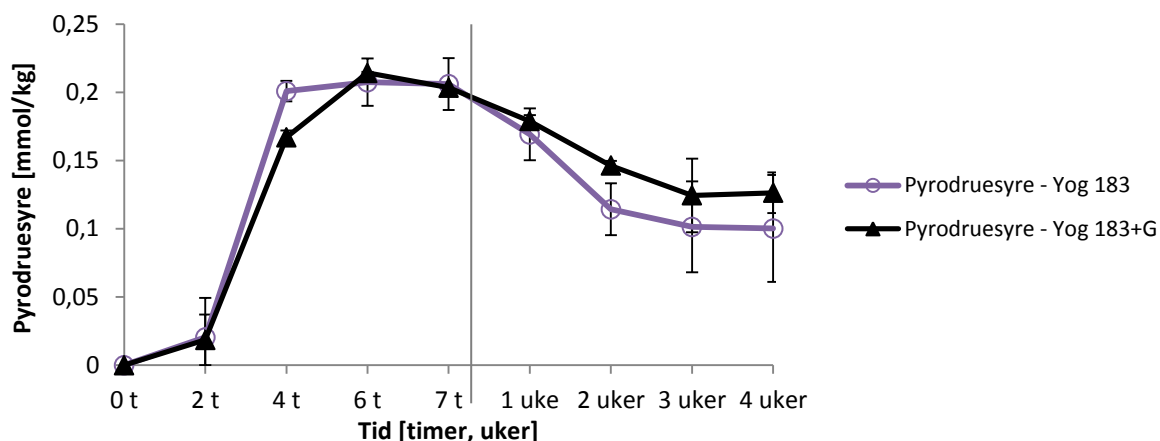
Figur 4.7 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) pyrodruesyre i yoghurt med syrekultur YF-L901 under fermentering og lagring.

Ut fra figur 4.7 økte konsentrasjonen av pyrodruesyre gjennom hele fermenteringsforløpet, men raskest de første 4 timene. Under lagring ble mengden noe redusert.

4.2.2.5 Yoghurt med syrekultur YC-183

Konsentrasjonen av pyrodruesyre ble målt under fermentering og lagring av to varianter av yoghurt med YC-183, hvor den ene var tilsatt glutaminsyre (3 mmol/kg). Resultatene er vist i figur 4.8.

I følge figur 4.8 økte mengden pyrodruesyre raskt de første 4 timene av fermenteringen. Under lagring ble konsentrasjonen redusert i begge yoghurtvariantene. Standardavvikene viste variasjon i mengde pyrodruesyre mellom forsøkene ved 3 og 4 ukers lagring.



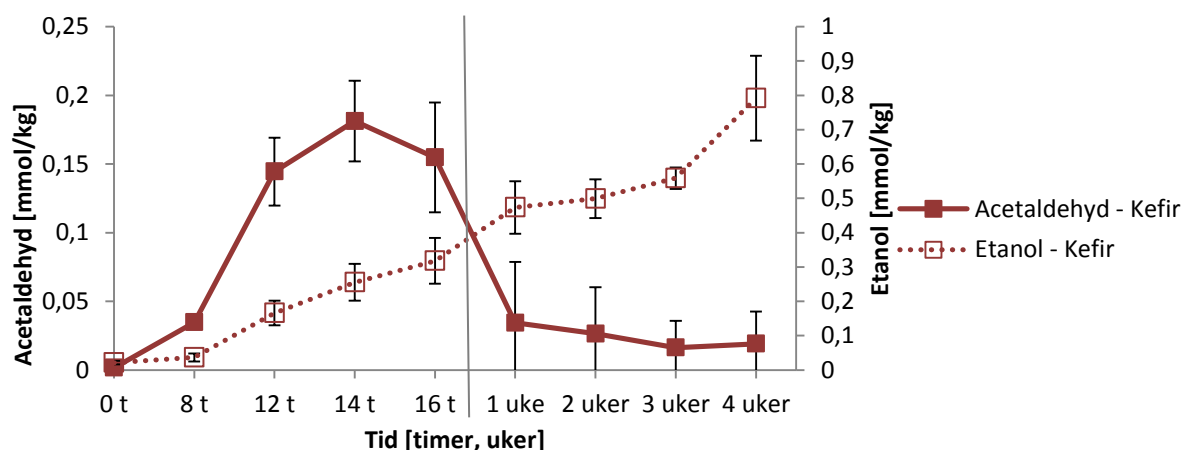
Figur 4.8 Gjennomsnittlig konsentrasjon av pyrodruesyre i yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

4.2.3 Acetaldehyd og etanol

Mengden av acetaldehyd og etanol ble undersøkt i kefir, kulturmilk, tettemilk og yoghurt med to ulike syrekulturer gjennom fermentering og under lagring. Acetaldehyd kan produseres fra nedbrytning av pyrodruesyre, og reduseres videre til etanol (de Vos & Hugenholtz 2004). Acetaldehyd kan også dannes ved nedbrytning av treonin (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.7.2 og 2.8.3.

4.2.3.1 Kefir

Mengde acetaldehyd og etanol ble målt i kefir. Resultatene er presentert i figur 4.9.



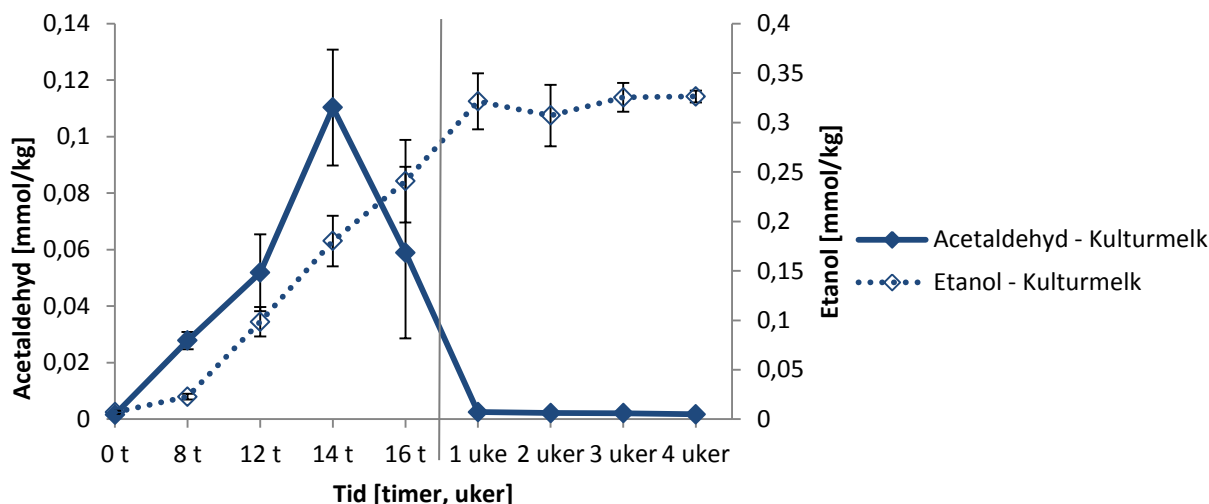
Figur 4.9 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) av acetaldehyd og etanol i kefir under fermentering og lagring.

I følge figur 4.9 økte mengden acetaldehyd fra 0 til 14 timer med omtrent 0,18 mmol/kg, for deretter å bli redusert gjennom resten av fermenteringen. I løpet av den første uken i lagringsperioden ble mengden redusert med 0,12 mmol/kg. Under lagring var konsentrasjonen forholdsvis stabil.

Konsentrasjonen av etanol økte jevnt gjennom fermentering og lagring av kefir. Etter fire uker var konsentrasjonen 0,8 mmol/kg.

4.2.3.2 Kulturmilk

Konsentrasjonen av acetaldehyd og etanol ble målt i kulturmilk. Resultatene er presentert i figur 4.10.



Figur 4.10 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av acetaldehyd og etanol i kulturmilk under fermentering og lagring.

I kulturmilk økte konsentrasjonen av acetaldehyd jevnt fra 0 til 14 timer fermentering med omtrent 0,11 mmol/kg, og hadde deretter en nedgang på 0,108 mmol/kg frem til 1 ukes lagring (figur 4.10). Det ble kun målt små mengder acetaldehyd under lagring.

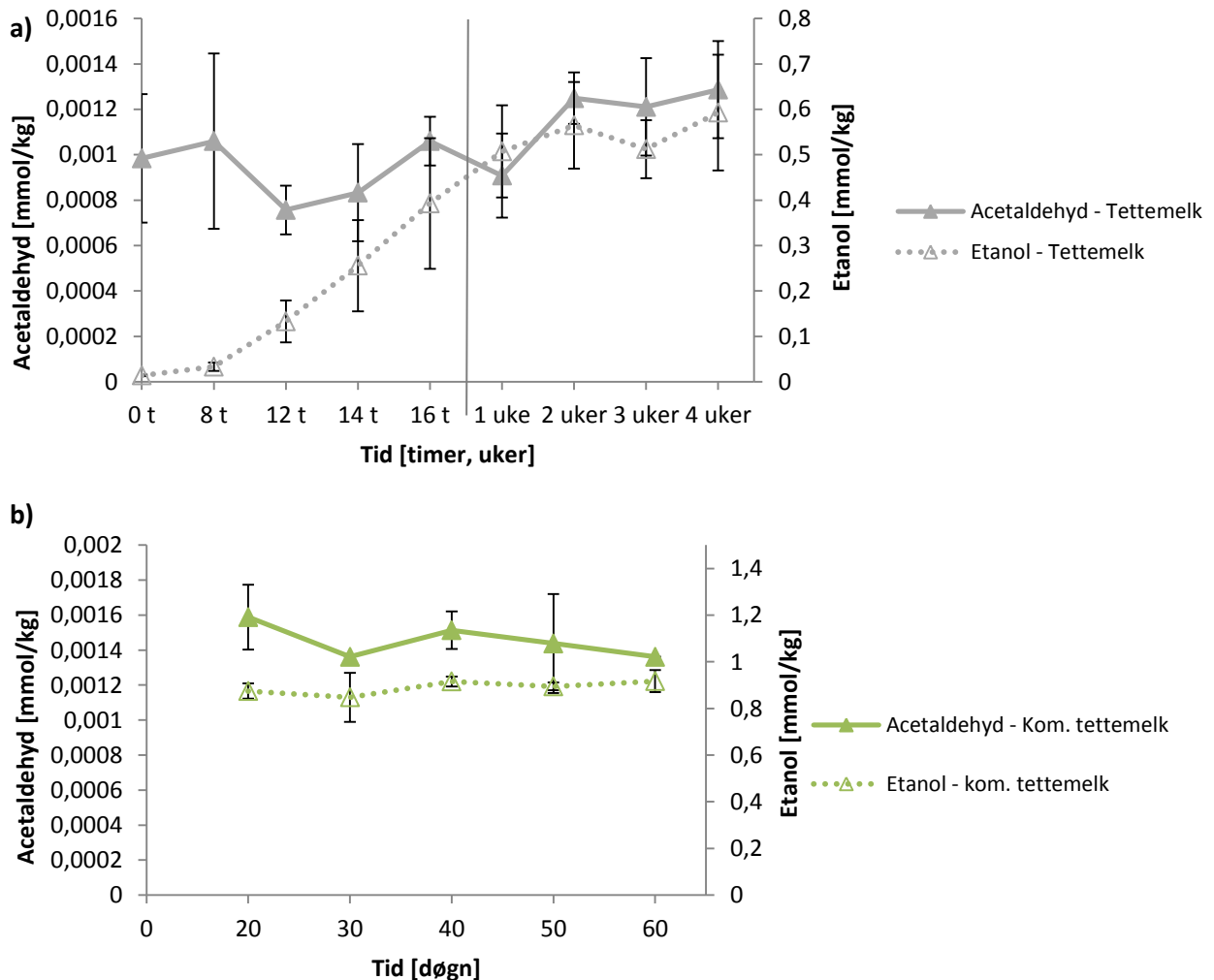
Mengden av etanol økte jevnt under hele fermenteringsforløpet, og var stabil på omtrent 0,32 mmol/kg under lagringsperioden.

4.2.3.3 Tettemilk

Det ble analysert for innhold av acetaldehyd og etanol i tettemilk under fermentering og lagring. Analysene ble også utført under lagring av kommersiell tettemilk. Resultatene er vist i figur 4.11.

I følge figur 4.11 ble det målt små konsentrasjoner av acetaldehyd i tettemilk både under fermentering og lagring. Mengden både økte og sank, og standardavvikene viste stor variasjon i konsentrasjon av acetaldehyd mellom de ulike forsøkene. Det samme ble observert under lagring av kommersiell tettemilk.

Konsentrasjonen av etanol økte jevnt gjennom hele fermenteringen, men var noenlunde stabil under lagring. Det ble heller ikke observert endringer i etanolkonsentrasjonen under lagring av kommersiell tettemelk fra 20 til 60 dager.



Figur 4.11 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) acetaldehyd og etanol i **a)** tettemelk under fermentering og lagring og **b)** kommersiell (kom.) tettemelk under lagring.

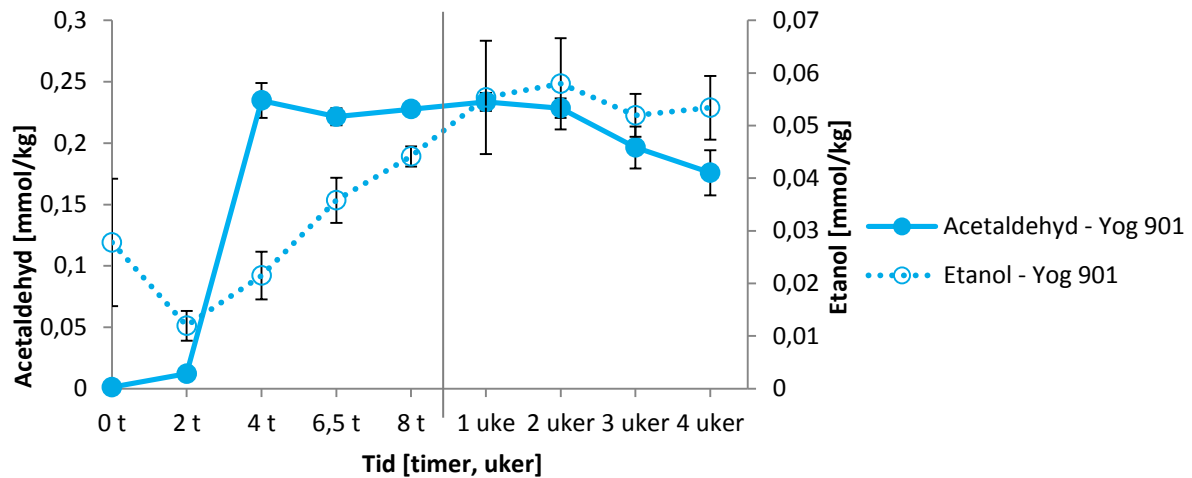
4.2.3.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Innholdet av acetaldehyd og etanol ble analysert i yoghurt fermentert med syrekultur YF-L901. Resultatene fra målinger under fermentering og lagring er presentert i figur 4.12.

Konsentrasjonen av acetaldehyd økte raskt til 0,23 mmol/kg fra 2 til 4 timers fermentering, og var deretter stabil gjennom resten av fermenteringen (figur 4.12). Under lagringsperioden ble mengden redusert med 0,06 mmol/kg.

Det ble observert lave mengder etanol ved 0 timer, og dette ble redusert frem til 2 timers fermentering. Fra 2 til 8 timers fermentering økte mengden etanol med omtrent 0,03 mmol/kg.

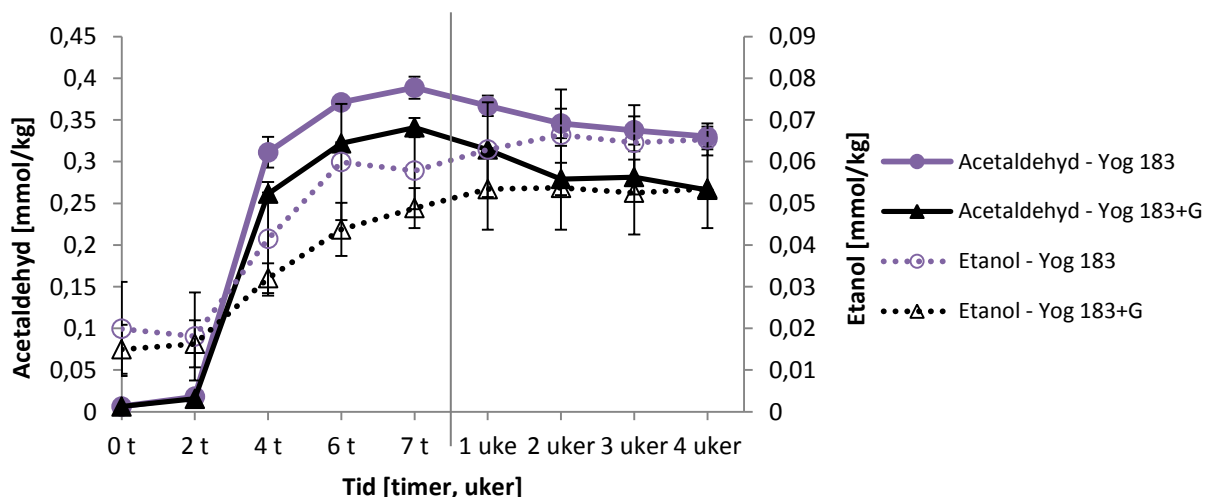
Under lagring økte konsentrasjonen noe den første uka, og var deretter relativt stabil på 0,05 mmol/kg. Standardavvikene viser variasjon i mengde etanol mellom de ulike forsøkene under lagring.



Figur 4.12 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av acetaldehyd og etanol i yoghurt med syrekultur YF-L901.

4.2.3.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Konsentrasjonen av acetaldehyd og etanol ble analysert under fermentering og lagring av to varianter av yoghurt med syrekultur YC-183, hvor den ene var tilsatt glutaminsyre (3 mmol/kg). Resultatene fra analysen er presentert i figur 4.13.



Figur 4.13 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av acetaldehyd og etanol under fermentering og lagring av yoghurt inkubert med syrekultur YC-183, med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

I følge figur 4.13 økte konsentrasjonen av acetaldehyd raskt fra 2 til 4 timer i begge yoghurtvariantene. Mengden økte fortsatt gjennom resten av fermenteringen, men økningen avtok betydelig. I varianten uten tilsatt glutaminsyre var konsentrasjonen 0,39 mmol/kg ved

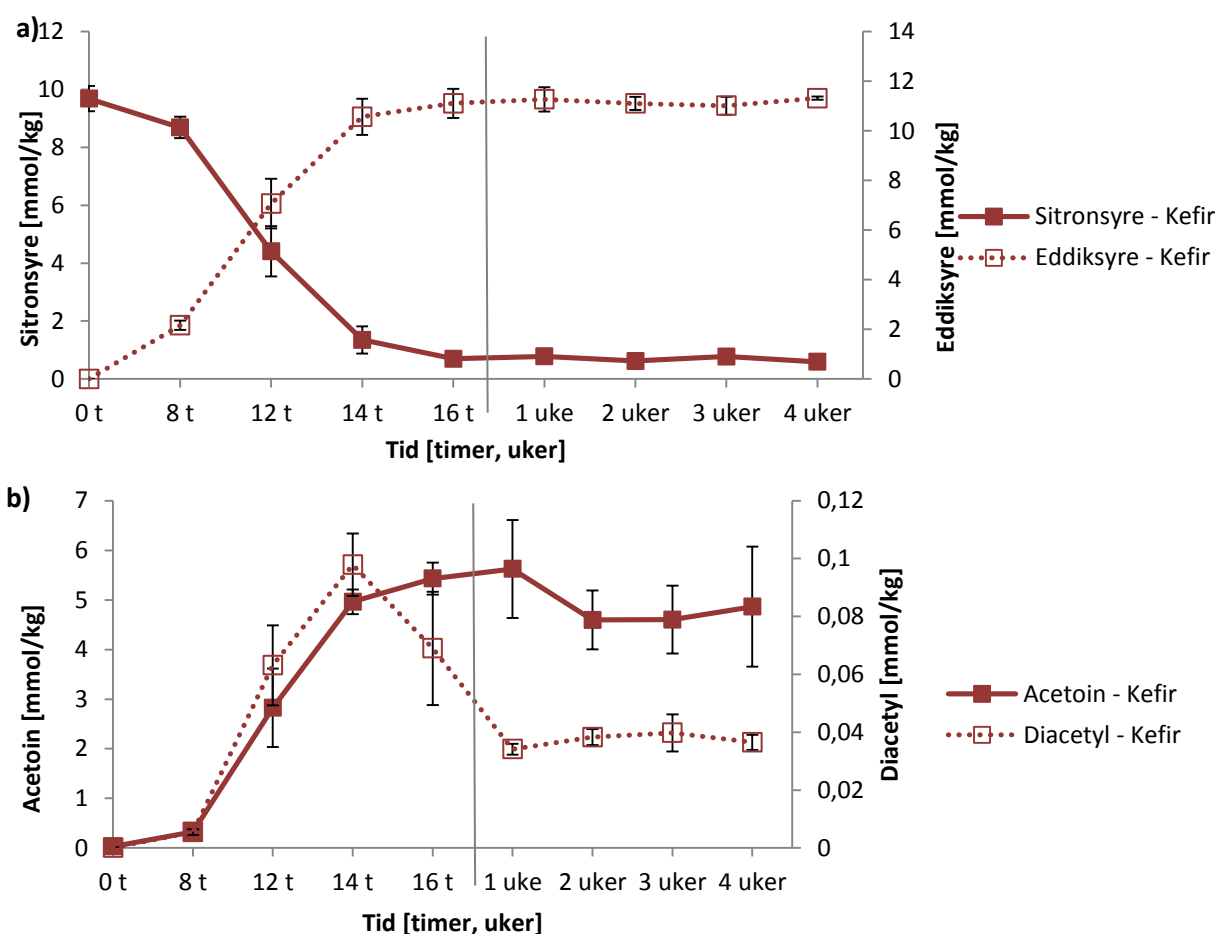
endt fermentering, og i varianten med glutaminsyre ble mengden målt til 0,34 mmol/kg. Konsentrasjonen ble noe redusert under lagring. Konsentrasjonen av etanol økte med omtrent 0,04 mmol/kg i begge variantene under fermentering. Under lagring var innholdet av etanol stabilt.

4.3 Sitratmetabolisme

Konsentrasjonen av sitronsyre, eddiksyre, acetoin og diacetyl ble målt i surmelksproduktene. Noen melkesyrebakterier kan bryte ned sitronsyre, som kan omdannes til eddiksyre og pyruvat. Pyruvat fra nedbrytning av sitronsyre kan videre omdannes til diacetyl og acetoin. Sistnevnte kan konverteres til 2,3-butandiol (Mayo et al. 2010).

4.3.1 Kefir

I kefir ble mengden av sitronsyre, eddiksyre, diacetyl og acetoin kvantifisert under fermentering og lagring. Figur 4.14 viser resultatene fra analysen.

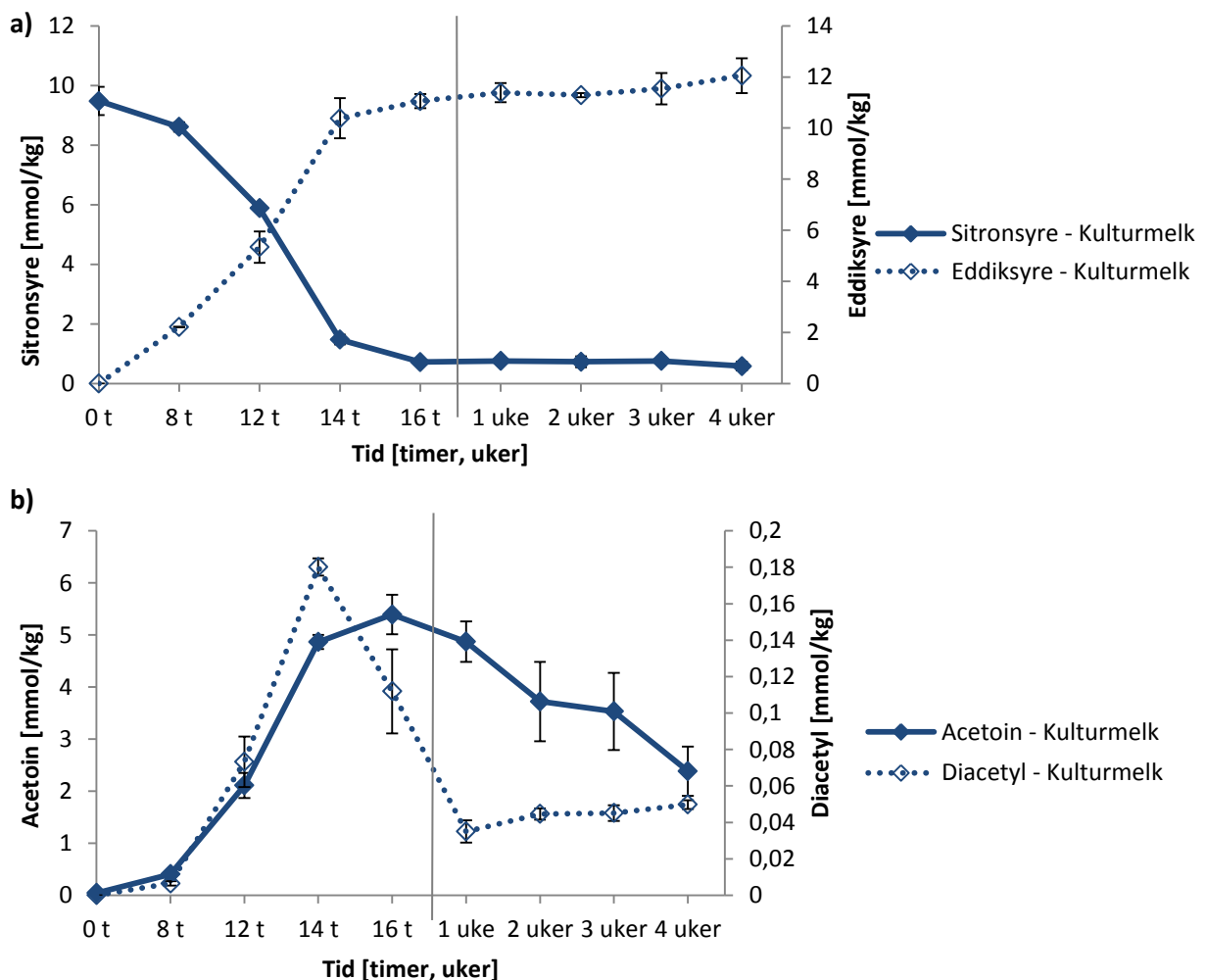


Figur 4.14 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av **a)** sitronsyre og eddiksyre og **b)** acetoin og diacetyl i kefir under fermentering og lagring.

Mengden sitronsyre ble redusert med 9 mmol/kg i løpet av fermenteringen. Konsentrasjonen av eddiksyre økte i samme takt som sitronsyre ble redusert, og etter 16 timer fermentering var konsentrasjonen 11 mmol/kg. Gjennom lagringsperioden var mengden av både sitronsyre og eddiksyre uforandret

4.3.2 Kulturmilk

Under fermentering og lagring av kulturmilk ble konsentrasjonen av sitronsyre, eddiksyre, acetoin og diacetyl analysert. Resultatene er presentert i figur 4.15.



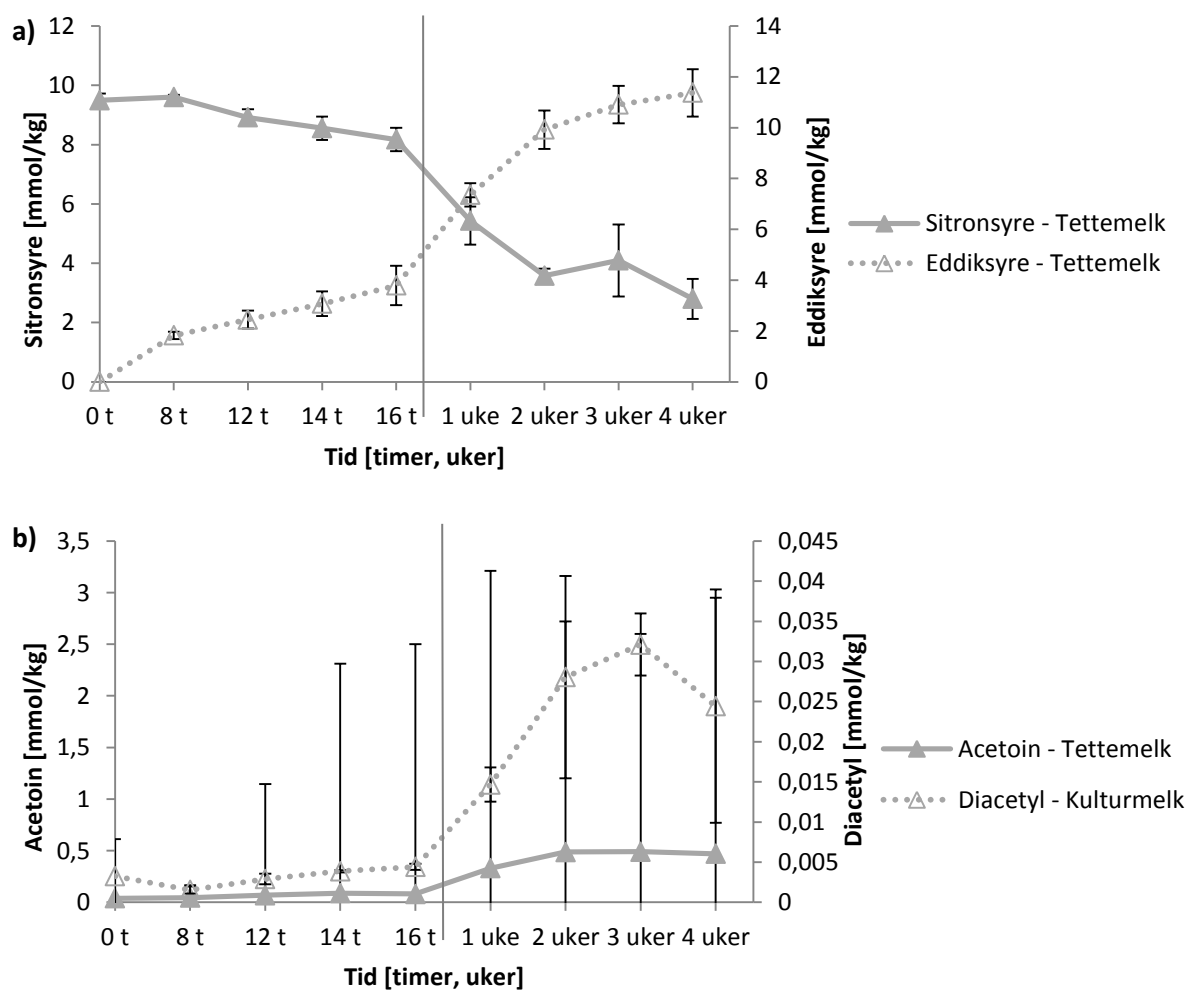
Figur 4.15 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av **a)** sitronsyre og eddiksyre og **b)** acetoin og diacetyl i kulturmilk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.15 ble mengden sitronsyre redusert med omtrent 9 mmol/kg i løpet av fermenteringen. Det ble dannet 11 mmol/kg eddiksyre i samme perioden. Under lagring økte mengden eddiksyre med 1 mmol/kg, mens konsentrasjonen av sitronsyre var stabil.

Konsentrasjonen av acetoin økte i ulik grad gjennom hele fermenteringen, men ble redusert under lagring. Fra 0 til 14 timer fermentering økte mengden diacetyl raskt, for deretter å reduseres. Under lagring økte konsentrasjonen av diacetyl med 0,015 mmol/kg.

4.3.3 Tettemelk

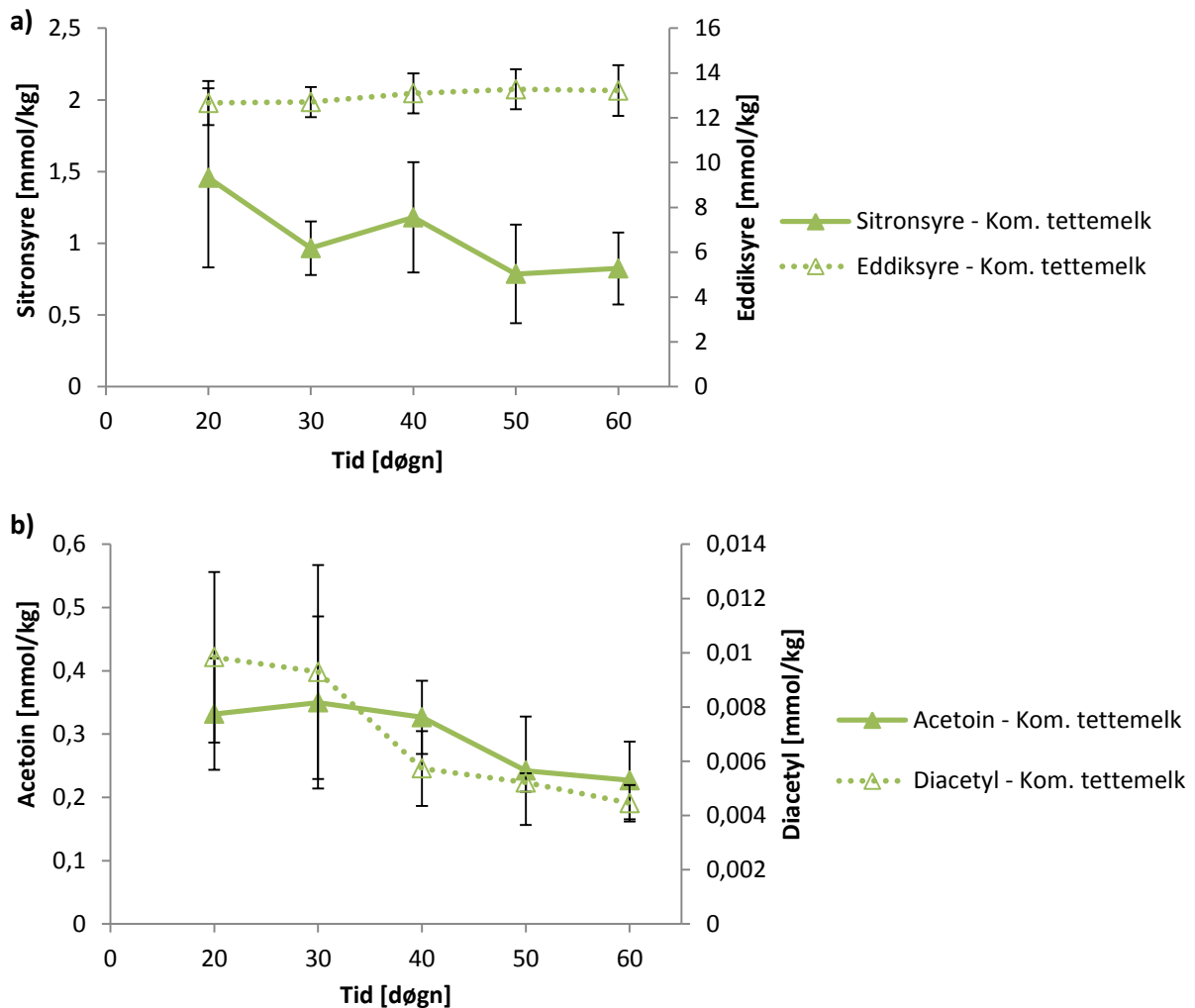
Konsentrasjonen av sitronsyre, eddiksyre, diacetyl og acetoin ble målt i tettemelk under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.16 og 4.17.



Figur 4.16 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) **a)** sitronsyre og eddiksyre og **b)** acetoin og diacetyl i tettemelk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.16 ble konsentrasjonen av sitronsyre redusert med omtrent 1,5 mmol/kg under fermentering. Under lagring ble mengden redusert i større grad, og målte 2,8 mmol/kg etter 4 uker. Konsentrasjonen av eddiksyre økte med 3,8 mmol/kg under fermentering, og økte ytterligere under lagring. Det ble målt en mengde på 11,3 mmol/kg etter 4 uker.

Det ble observert små mengder acetoin og diacetyl under fermentering av tettemelk. Under lagring økte konsentrasjonen av begge komponentene. Standardavvikene viste at det var svært stor variasjon i konsentrasjon av begge disse komponentene mellom de ulike forsøkene.



Figur 4.17 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) **a)** sitronsyre og eddiksyre, og **b)** acetoin og diacetyl i kommersiell (kom.) tettemelk under lagring.

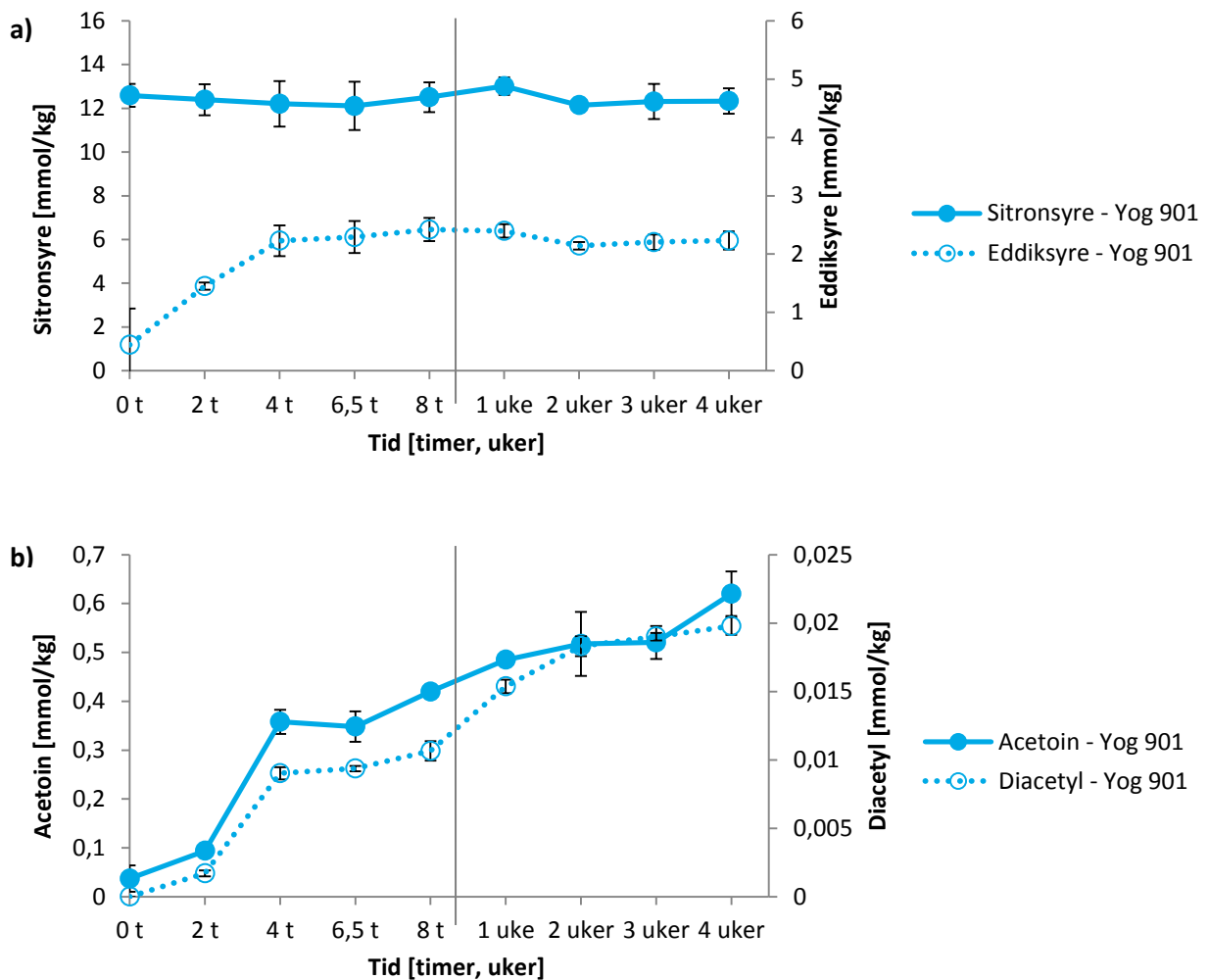
Konsentrasjonen av sitronsyre sank noe under lagring av kommersiell tettemelk (figur 4.17). Standardavvikene viser stor variasjon mellom de ulike produksjonene.

Konsentrasjonen av eddiksyre var stabil på omtrent 13 mmol/kg mellom 20 og 60 dagers lagring.

Figur 4.17 viser at mengden av både acetoin og diacetyl ble noe redusert i kommersiell tettemelk fra 20 til 60 dagers lagring. Standardavvikene viser at det var stor variasjon i mengden av disse komponentene mellom de ulike produksjonene.

4.3.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Konsentrasjonen av sitronsyre, eddiksyre, acetoin og diacetyl ble målt i yoghurt syrnet med kultur YF-L901. Resultatene er vist i figur 4.18.



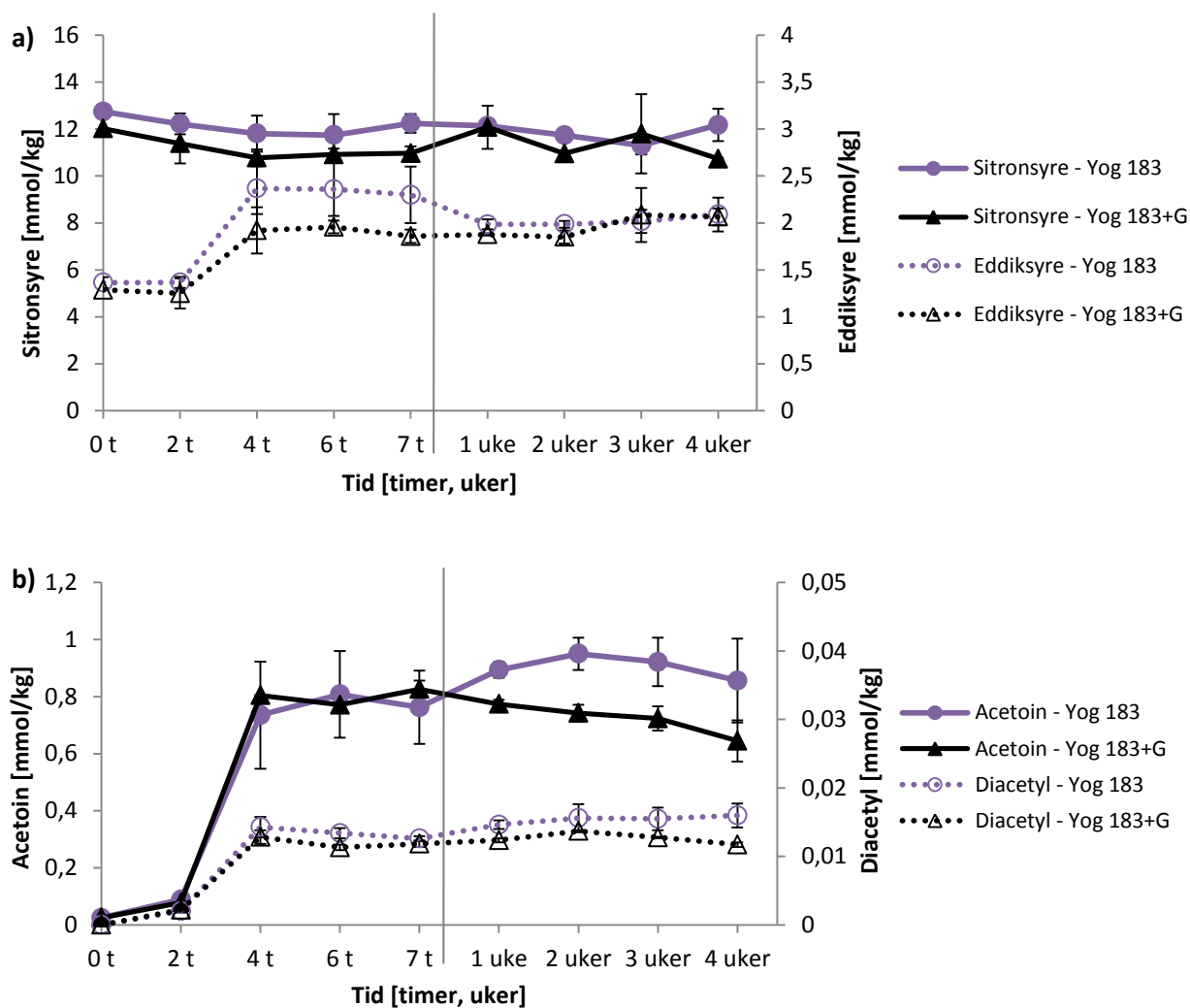
Figur 4.18 Gjennomsnittskonsentrasjonen (mmol/kg) av **a)** sitronsyre og eddiksyre og **b)** acetoin og diacetyl i yoghurt med syrekultur YF-L901 under fermentering og lagring.

Konsentrasjonen av sitronsyre var i følge figur 4.18 stabil gjennom fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901. Konsentrasjonen av eddiksyre økte fra 0 til 4 timer fermentering med 1,8 mmol/kg. Fra 4 til 8 timer fermentering og under lagring var konsentrasjonen stabil.

Konsentrasjonen av både acetoin og diacetyl økte under fermentering og lagring av yoghurten.

4.3.5 Yoghurt med syrekultur YC-183

Mengden sitronsyre, eddiksyre, acetoin og diacetyl ble undersøkt i to varianter av yoghurt syrnnet med YC-183, hvor den ene var tilsatt glutaminsyre (3 mmol/kg). Resultatene er presentert i figur 4.19.



Figur 4.19 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av **a)** sitronsyre og eddiksyre, og **b)** acetoin og diacetyl i yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt tilsatt glutaminsyre (G; 3 mmol/kg) og kultur YC-183.

Ut fra figur 4.19 var konsentrasjonen av sitronsyre stabil i begge yoghurtvariantene med syrekultur YC-183 under fermentering og lagring. Mengden eddiksyre økte fra 2 til 4 timer fermentering og var deretter forholdsvis stabil, både under fermentering og lagring.

I begge yoghurtvariantene økte konsentrasjonen av acetoin fra 2 til 4 timer fermentering, til omtrent 0,7 mmol/kg. Fra 4 til 7 timer fermentering var konsentrasjonen stabil. Under lagring både økte og sank konsentrasjonen av acetoin i yoghurtvarianten uten tilsatt glutaminsyre. I

yoghurtvarianten med glutaminsyre sank mengden noe under lagring. Mengden diacetyl økte også fra 2 til 4 timer i begge variantene, for deretter å være stabil gjennom resten av fermenteringen, samt under lagring.

4.4 Omsetning av aminosyrer

4.4.1 Forgrenede aminosyrer (leucin, isoleucin og valin)

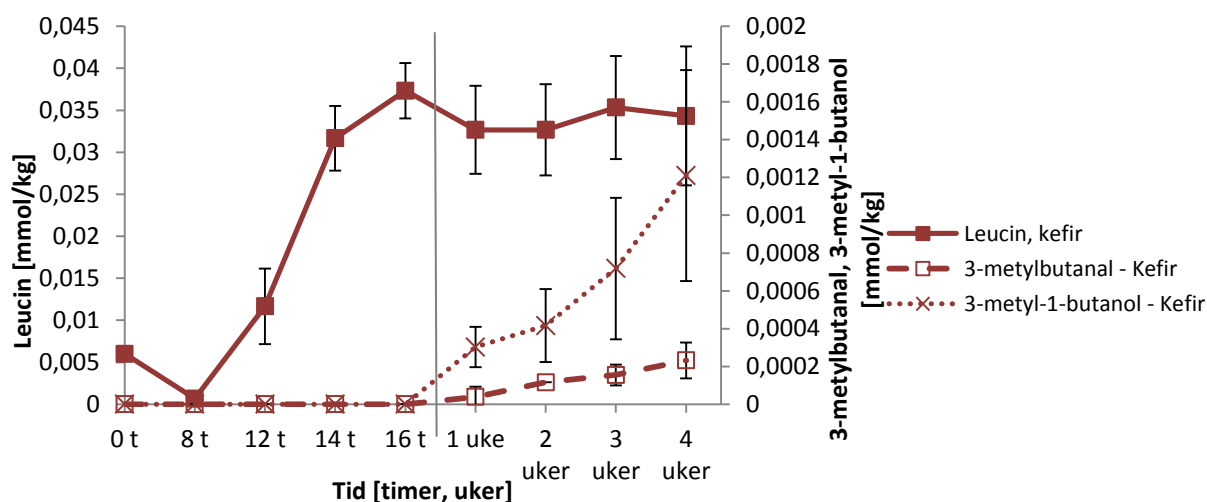
4.4.1.1 Leucin

Konsentrasjonen av leucin samt nedbrytningsproduktene, 3-metylbutanal og 3-metylbutanol, ble undersøkt under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemelk og to typer yoghurt syrnet med YF-L901 og YC-183. Analysene ble også utført på kommersiell tettemelk gjennom holdbarhetstiden på 60 dager.

Leucin kan omdannes til aromakomponentene 3-metylbutanal og 3-metylbutanol via transaminering (Smit et al. 2004). Se også figur 2.8.5.

4.4.1.1.1 Kefir

Ved fermentering av kefir ble mengde leucin, 3-metylbutanal og 3-metyl-1-butanol analysert etter 0, 8, 12, 14 og 16 timer. Analysene ble også utført hver uke gjennom fire ukers lagring. Resultatene er presentert i figur 4.20.

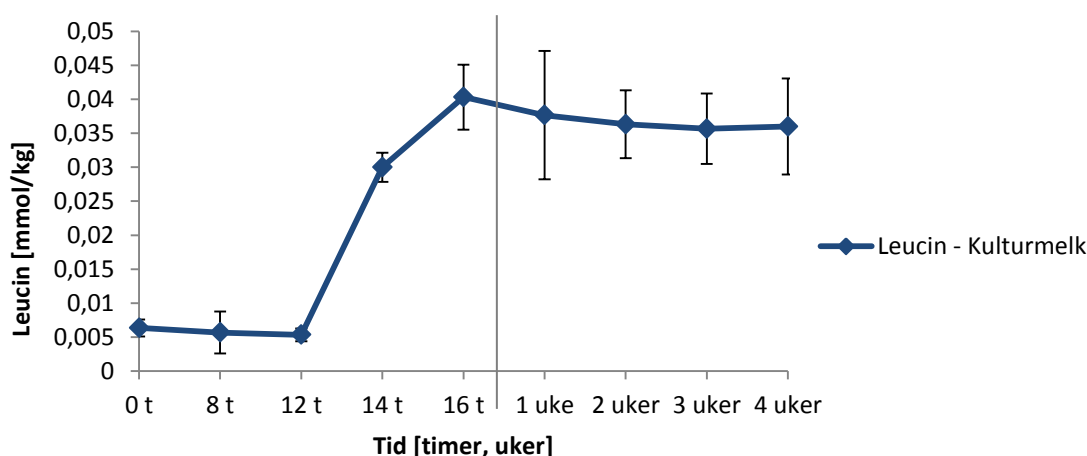


Figur 4.20 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) leucin, 3-metylbutanal og 3-metyl-1-butanol i kefir under fermentering og lagring.

I følge figur 4.20 ble den mengden leucin som fantes i melken ved starten av fermentering, 0,006 mmol/kg, tilsynelatende brukt opp i løpet av 8 timers fermentering. Mengden leucin økte deretter fra 0 til 0,037 mmol/kg mellom 8 og 16 timers fermentering. Gjennom lagringsperioden var det kun små endringer i mengde leucin i kefir, men standardavvikene var store. Det ble funnet små konsentrasjoner av 3-metylbutanal og 3-metyl-1-butanol under lagring av kefir, men standardavvikene var store også her.

4.4.1.1.2 Kulturmelk

I løpet av fermentering av kulturmelk ble innholdet av leucin undersøkt, samt mengde av korresponderende aldehyd og alkohol, etter 0, 8, 12, 14 og 16 timer. Analysene ble også utført hver uke gjennom fire ukers lagring. Mengde leucin i kulturmelk er vist i figur 4.21.



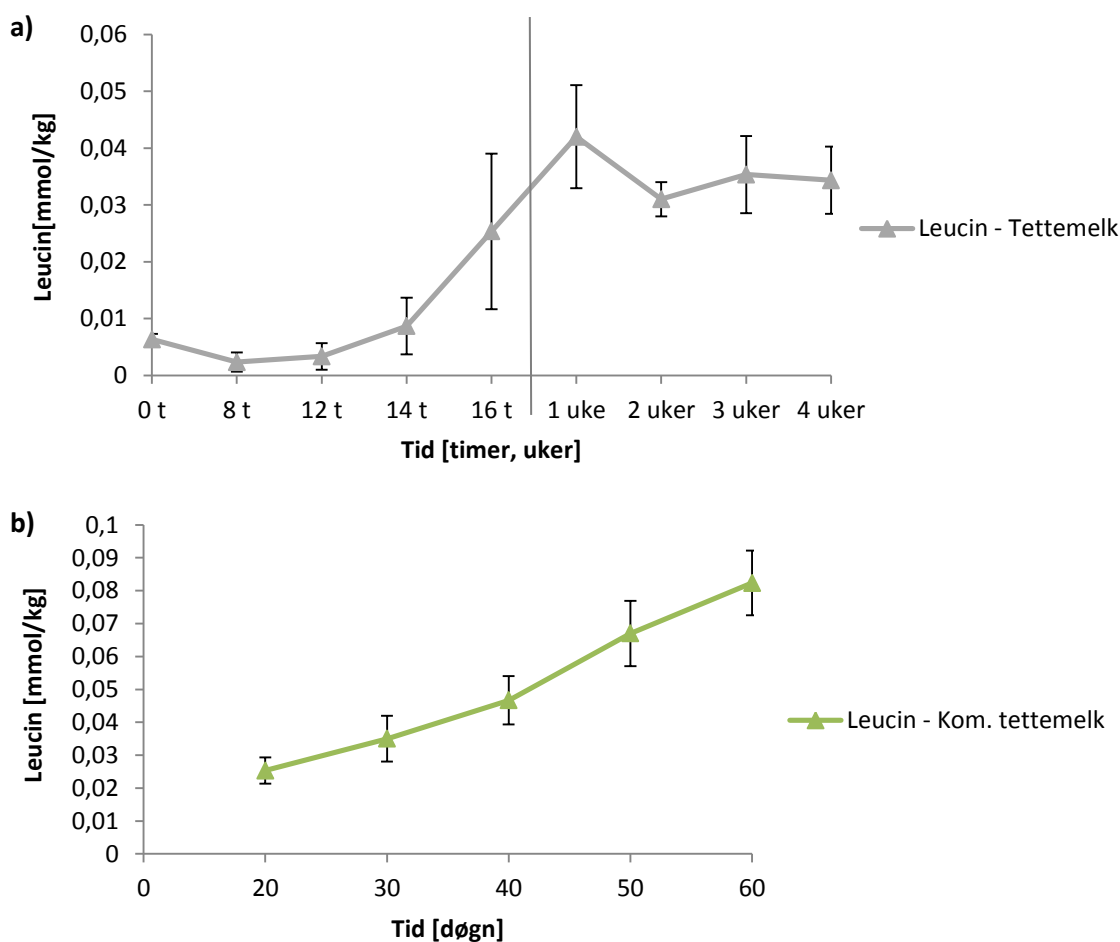
Figur 4.21 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av leucin i kulturmelk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.21 var det kun små mengde leucin i melken ved starten av fermenteringen (0,006 mmol/kg). Frem til 12 timers fermentering var konsentrasjonen uendret, men fra 12 til 16 timer økte konsentrasjonen. Under lagring var konsentrasjonen uendret, men standardavvikene viste stor variasjon i mengde leucin mellom forsøkene. Det ble ikke funnet 3-metylbutanal eller 3-metyl-1-butanol i kulturmelk, hverken under fermentering eller lagring.

4.4.1.1.3 Tette melk

Konsentrasjonen av leucin ble målt i tette melk under fermentering, etter 0, 8, 12, 14 og 16 timer, og etter 1, 2, 3 og 4 ukers lagring. Kommersiell tette melk ble analysert hver tiende dag fra 20 – 60 dagers lagring. Resultatene er presentert i figur 4.22. 3-metylbutanal og 3-metyl-1-butanol ble ikke detektert.

I følge figur 4.22 ble konsentrasjonen av leucin redusert de første 8 timene av fermenteringen. I resten av fermenteringsforløpet økte mengde leucin i tettemelk. Under lagring sank konsentrasjonen fra 1 til 2 ukers lagring, men de siste ukene var mengden stabil. I kommersiell tettemelk økte konsentrasjonen av leucin med 0,057 mmol/kg fra 20 til 60 dagers lagring.

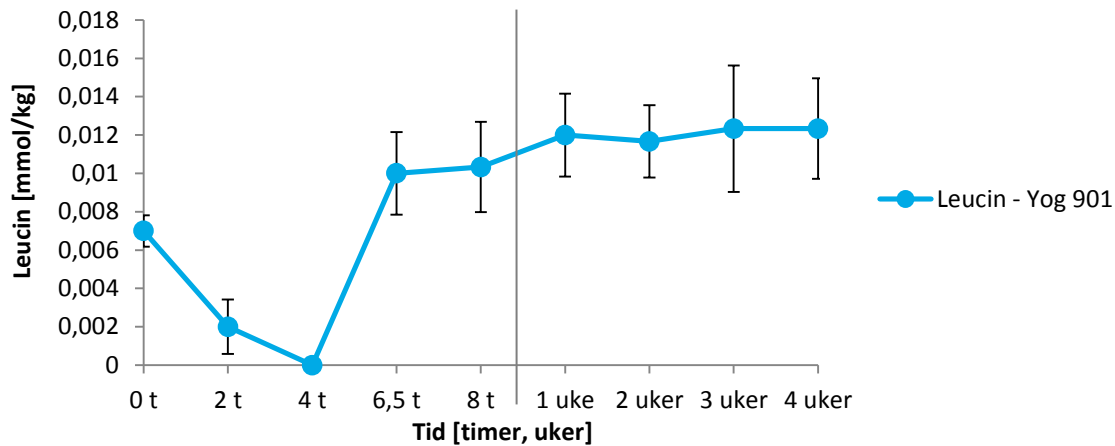


Figur 4.22 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av leucin i **a)** tettemelk under fermentering og lagring og **b)** kommersiell (kom.) tettemelk under lagring.

4.4.1.1.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Under fermentering av yoghurt ved 43 °C med syrekultur YF-L901 ble mengde leucin, 3-metylbutanal og 3-metyl-1-butanol målt etter 0, 2, 4, 6.5 og 8 timer. Det ble ikke detektert 3-metylbutanal eller 3-metyl-1-butanol i yoghurt fermentert med YF-L901. Figur 4.23 viser resultatene fra analysene.

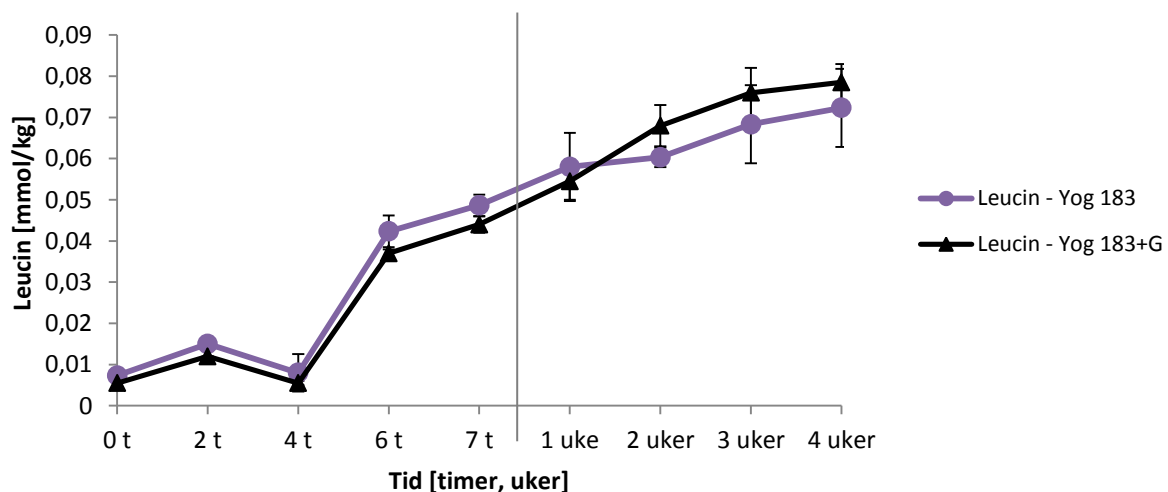
Ved 0 timer inneholdt melken 0,007 mmol/kg leucin, og dette ble redusert til 0 i løpet av 4 timers fermentering (figur 4.23). Fra 4 til 6,5 timers fermentering økte mengden leucin til 0,01 mmol/kg, og var tilnærmet uendret gjennom lagringsperioden.



Figur 4.23 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) leucin i yoghurt med syrekultur YF-L901 under fermentering og lagring.

4.4.1.1.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og YC-183 tilsatt glutaminsyre

Mengden leucin ble undersøkt i yoghurt syret med YC-183 og yoghurt tilsatt glutaminsyre (3 mmol/kg) og syret med YC-183. Det ble ikke detektert 3-metylbutanal eller 3-metyl-1-butanol i noen av yoghurtvariantene. Konsentrasjonen av leucin er vist i figur 4.24.



Figur 4.24 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av leucin i yoghurt syret med YC-183 og yoghurt tilsatt glutaminsyre (G; 3 mmol/kg) under fermentering og lagring.

I følge figur 4.24 økte mengde leucin noe i løpet av de to første timene under fermentering før dette ble omsatt fra time 2 til time 4. Konsentrasjonen økte deretter fra 0,0055 mmol/kg ved 4

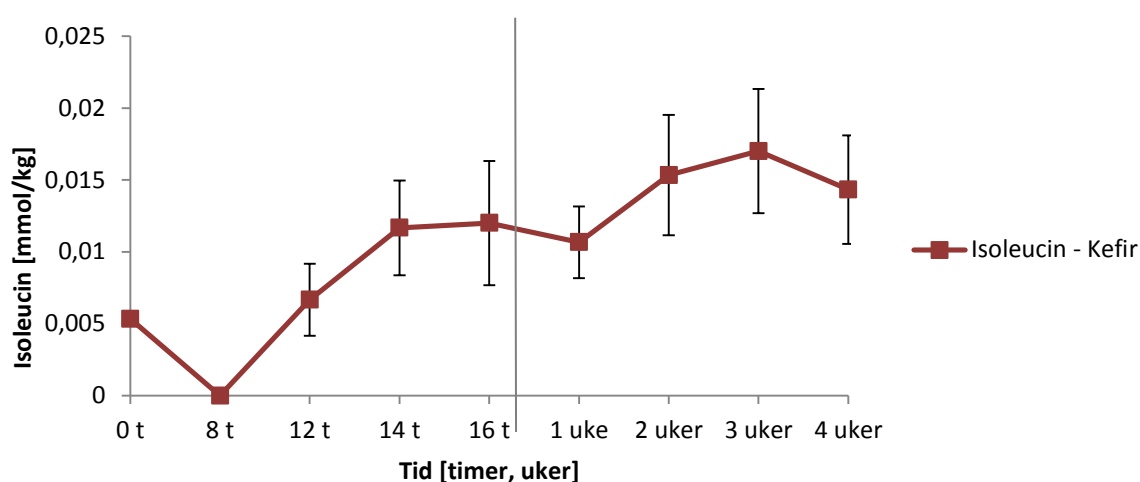
timer til 0,044 mmol/kg ved slutten av fermenteringen. I løpet av lagringsperioden på 4 uker økte konsentrasjonen av leucin ytterligere i begge variantene.

4.4.1.2 Isoleucin

Konsentrasjonen av isoleucin ble målt under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemilk og yoghurt med syrekultur YF-L901 og YC-183. Innholdet av aminosyren ble også undersøkt i kommersiell tettemilk under lagring. Isoleucin kan omdannes til aldehydet 2-metylbutanal via transaminering og dekarboksylering. Aldehydet kan reduseres videre til 2-metylbutanol (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.5.

4.4.1.2.1 Kefir

Under fermentering av kefir ble innholdet av isoleucin målt etter 0, 8, 12, 14 og 16 timer. Mengden isoleucin ble også analysert under lagring. Resultatene er presentert i figur 4.25. Konsentrasjonen av 2-metylbutanal og 2-metyl-1-butanol ble også målt.



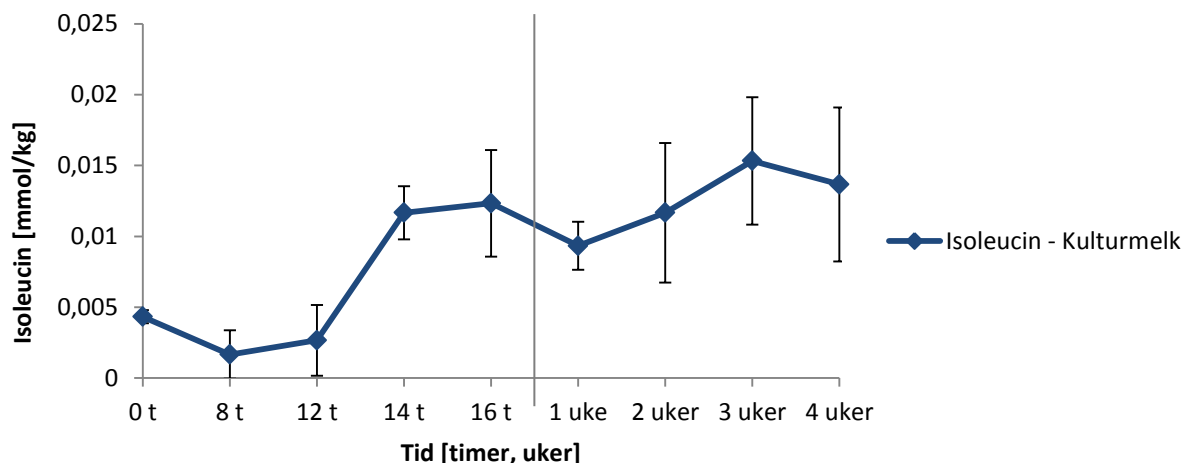
Figur 4.25 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) isoleucin i kefir under fermentering og lagring.

Konsentrasjonen av isoleucin var 0,005 mmol/kg ved begynnelsen av fermenteringen (figur 4.25). Dette ble tilsynelatende metabolisert i løpet av de første 8 timene. Konsentrasjonen økte til 0,012 mmol/kg fra 8 til 16 timers fermentering.

Kun svært lave konsentrasjoner av 2-metyl-1-butanol ble detektert i kefir (ikke vist). Etter 12 timers fermentering var konsentrasjonen av 2-metyl-1-butanol 0,00026 mmol/kg, og dette var uendret frem til slutten av lagringsperioden.

4.4.1.2.2 Kulturmilk

Mengden isoleucin, samt mengde 2-metylbutanal og 2-metyl-1-butanol, ble målt i kulturmilk i løpet av fermentering og lagring. Resultatene er presentert i figur 4.26.



Figur 4.26 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av isoleucin i kulturmilk under fermentering og lagring.

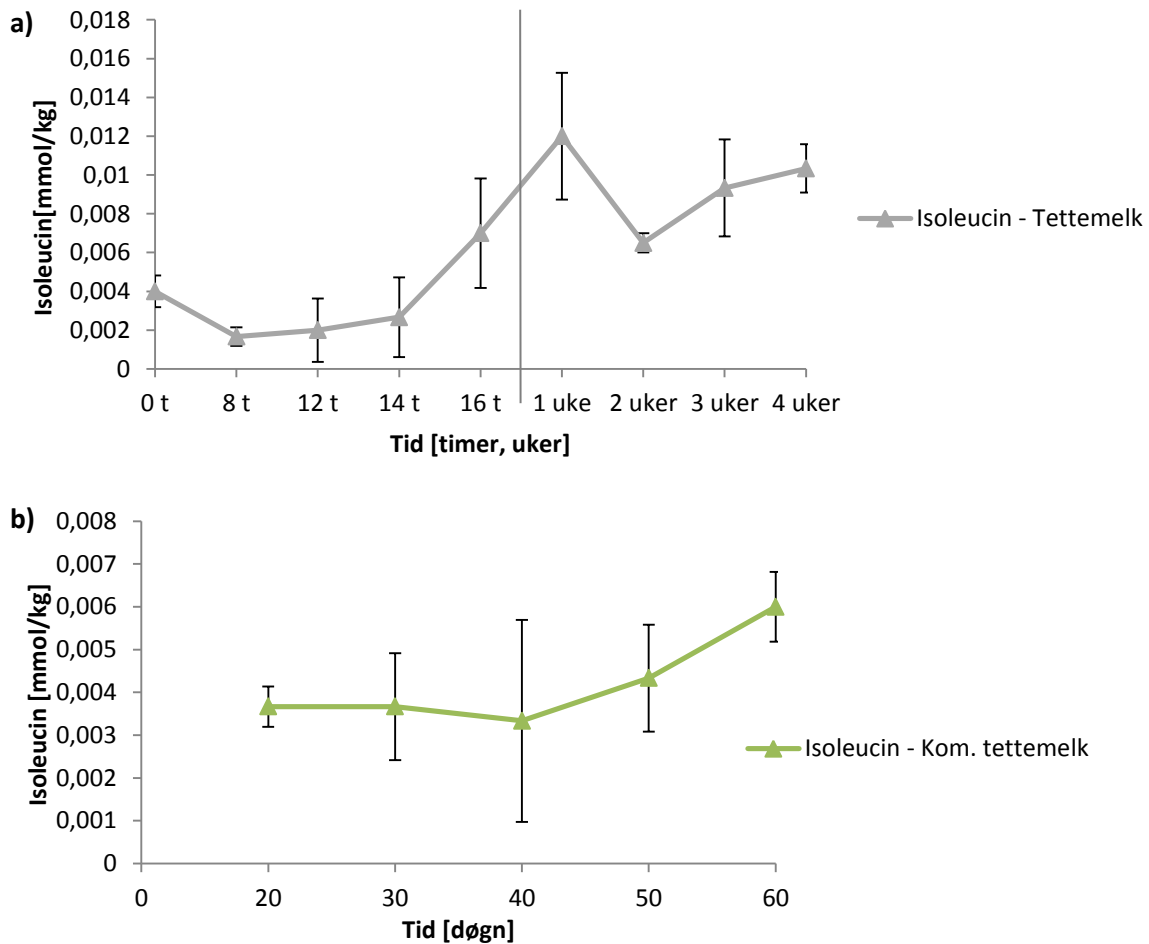
Figur 4.26 viser at mengden isoleucin var omtrent 0,005 mmol/kg ved begynnelsen av fermenteringen. Fra 12 til 14 timers fermentering steg konsentrasjonen til 0,01 mmol/kg. Konsentrasjonen var omtrent det samme gjennom lagringstiden på 4 uker.

Det ble kun funnet svært lave mengder 2-metyl-1-butanol (0,00022 mmol/kg ved 12 t) i kulturmilken under fermentering (ikke vist). Det ble ikke detektert 2-metylbutanal.

4.4.1.2.3 Tettemilk

Konsentrasjonen av isoleucin ble målt under fermentering og lagring av tettemilk, samt under lagring av kommersiell tettemilk. De to tettemilkene ble også undersøkt for innhold av 2-metylbutanal og 2-metyl-1-butanol, men disse ble ikke detektert. Resultatene fra analysen av isoleucin er vist i figur 4.27.

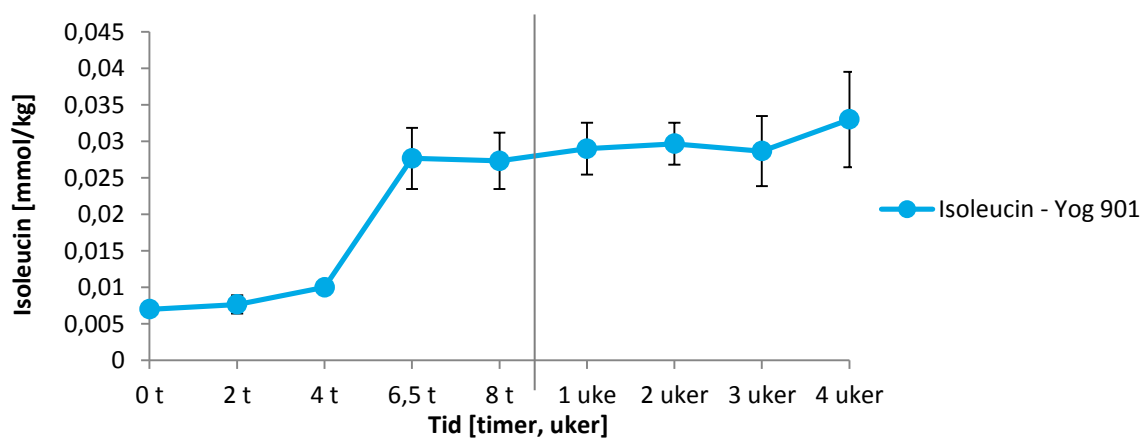
Fra 8 til 16 timers fermentering økte mengden isoleucin i tettemilk (figur 4.27). Under lagring både sank og økte konsentrasjonen av isoleucin. Standardavvikene viser at det var stor variasjon mellom forsøkene. Konsentrasjonen av isoleucin økte noe i kommersiell tettemilk under lagring, fra 20 til 60 dager. Standardavvikene viste også her stor variasjon mellom produksjonene.



Figur 4.27 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) isoleucin i **a)** tettemelk under fermentering og lagring og **b)** kommersiell (kom.) tettemelk under lagring.

4.4.1.2.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengden isoleucin i yoghurt med syrekultur YF-L901 ble målt under fermentering i 8 timer og lagring i 4 uker. Resultatene er vist i figur 4.28.

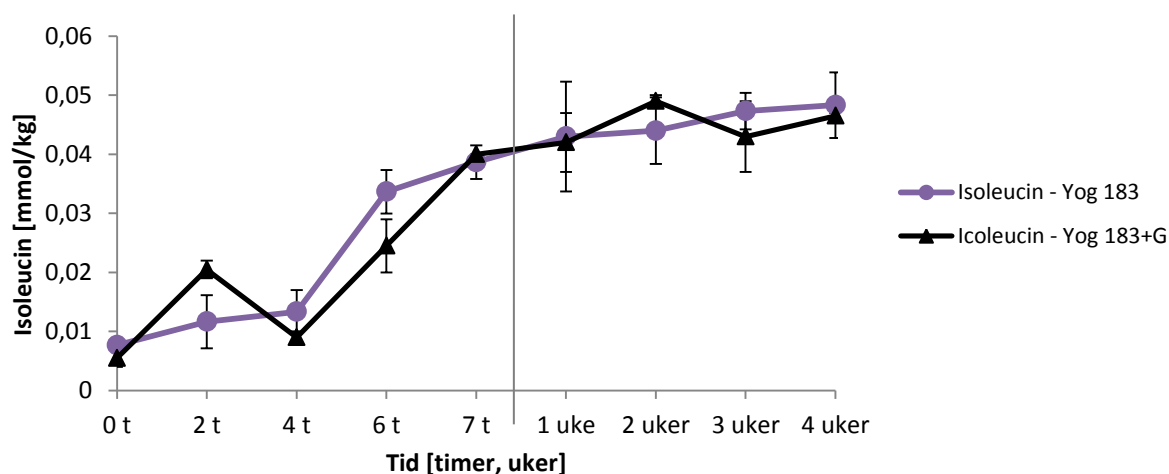


Figur 4.28 Gjennomsnittskonsentrasjonen (mmol/kg) av isoleucin i yoghurt syrnet med YF-L901 under fermentering og lagring.

I følge figur 4.28 var mengde isoleucin i yoghurt syrnet med YF-L901 0,007 mmol/kg ved starten av fermenteringen. Konsentrasjonen økte sakte i løpet av de 4 første timene, før den økte raskt frem til 6,5 timers fermentering. Deretter var konsentrasjonen uendret frem til 8 timers fermentering og gjennom lagringsperioden. Det ble ikke detektert 2-metylbutanal eller 2-metyl-1-butanol under fermentering eller lagring av yoghurt inokulert med YF-L901.

4.4.1.2.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og YC-183 tilsatt glutaminsyre

Konsentrasjonen av isoleucin samt aminosyrens korresponderende aldehyd og alkohol, henholdsvis 2-metylbutanal og 2-metyl-1-butanol ble undersøkt i løpet av fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YC-183, med eller uten tilsetning av glutaminsyre (3 mmol/kg). Figur 4.29 viser resultatene.



Figur 4.29 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) isoleucin i yoghurt med syrekultur YC-183, samt yoghurt med YC-183 og tilsatt glutaminsyre (G; 3 mmol/kg), under fermentering og lagring.

Konsentrasjonen av isoleucin økte og sank i yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre i løpet av de første fire timene (figur 4.29), mens mengden isoleucin i varianten som ikke var tilsatt glutaminsyre var omtrent uendret i samme tidsperiode. Etter fire timers fermentering var utviklingen av isoleucin omtrent lik i de to variantene. Det korresponderende aldehydet 2-metylbutanal og alkoholen 2-metyl-1-butanol ble ikke detektert under fermentering eller lagring av noen av yoghurtvariantene med YC-183.

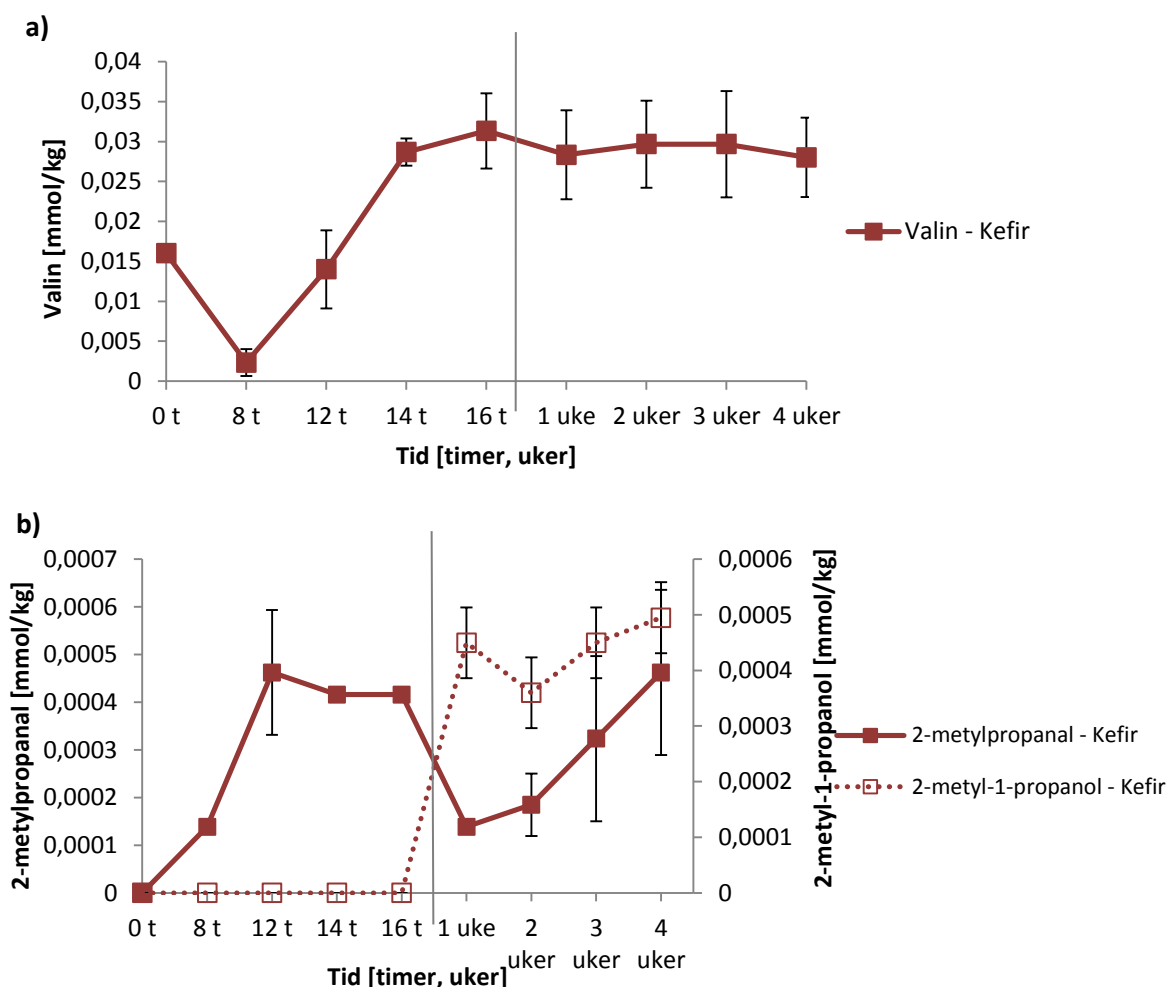
4.4.1.3 Valin

Metabolisme av valin via transaminering kan føre til dannelselse av 2-metylpropanal og den korresponderende alkoholen 2-metyl-1-propanol (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.5. Mengden valin, 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanol ble målt under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemilk, yoghurt syrnet med YF-L901 og yoghurt syrnet med

YC-183. Mengden av disse komponentene ble også målt under lagring av kommersiell tettemelk.

4.4.1.3.1 Kefir

Konsentrasjonen av valin, 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanol i kefir under fermentering og lagring er vist i figur 4.30.



Figur 4.30 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av **a)** valin og **b)** 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanol under fermentering og lagring av kefir.

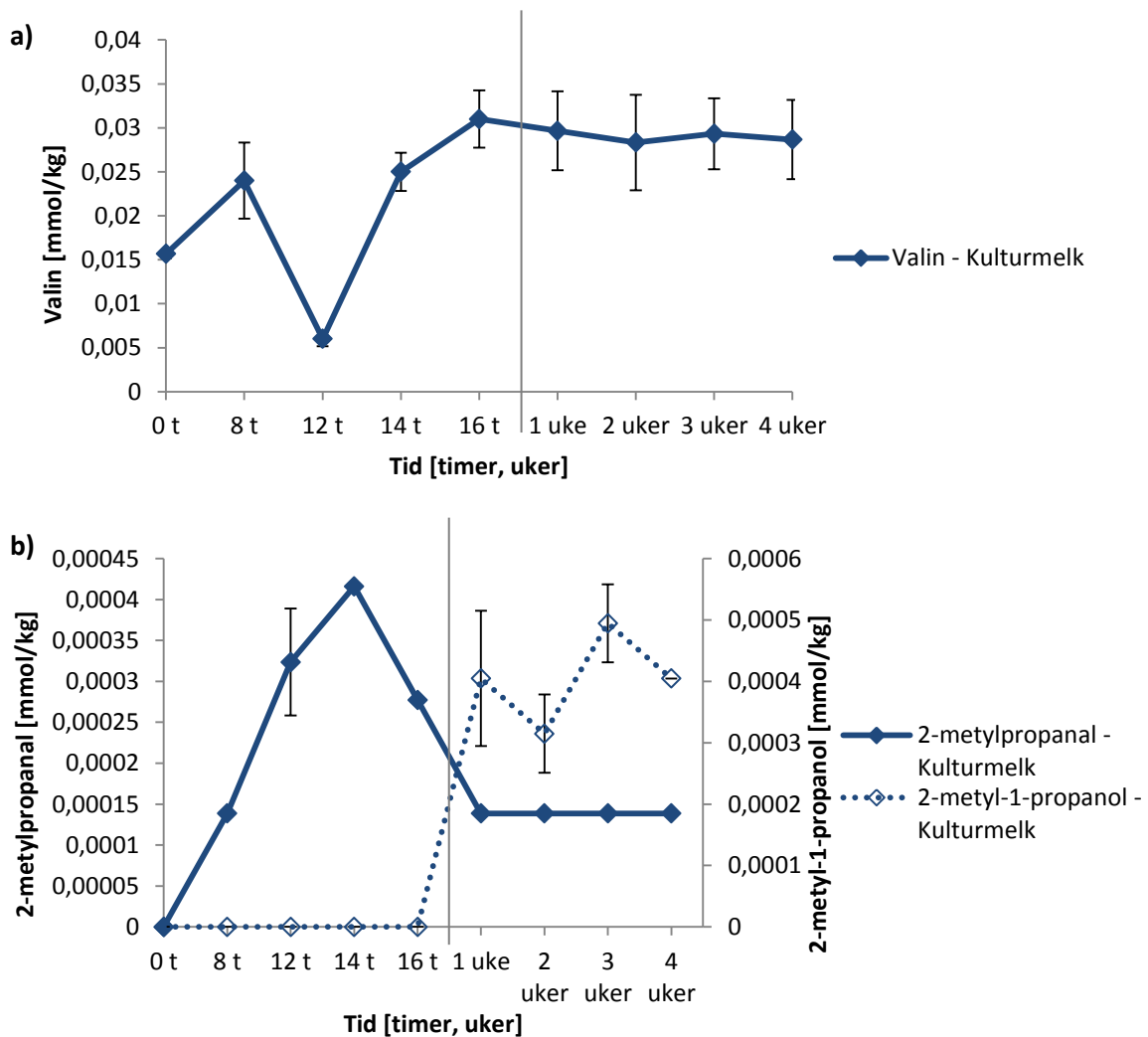
I følge figur 4.30 var konsentrasjonen av valin 0,016 mmol/kg ved begynnelsen av fermenteringen. I løpet av de første 8 timene ble mengden valin nesten fullstendig metabolisert. Mengden valin økte jevnt under fermentering, men økningen avtok etter 14 timer. Gjennom 4 ukers lagring var konsentrasjonen av valin stort sett stabil, men standardavvikene viser varierende konsentrasjon mellom de tre forsøkene.

Det ble detektert små mengder 2-metylpropanal under fermentering og lagring av kefir, og mengden økte kun de første 12 timene. I løpet av første uken i lagringsperioden sank

konsentrasjonen av 2-metylpropanal med 0,0003 mmol/kg, samtidig som mengden 2-metyl-1-propanol økte med omtrent tilsvarende mengde. Tilsynelatende økte mengden av aldehydet og alkoholen noe under lagring, men standardavvikene viser noe variasjon i mengde mellom forsøkene.

4.4.1.3.2 Kulturmilk

Mengde valin, 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanol ble undersøkt under fermentering og lagring av kulturmilk. Resultatene er vist i figur 4.31.



Figur 4.31 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) **a)** valin og **b)** 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanol i kulturmilk under fermentering og lagring.

Mengden valin i kulturmilk både økte og sank i løpet av fermenteringen, i følge figur 4.31. Mellom 8 og 12 timers fermentering ble konsentrasjonen redusert med 0,018 mmol/kg, før den igjen økte jevnt til 0,031 mmol/kg mellom 12 og 16 timers fermentering. Mengden valin var stort sett jevn gjennom lagringsperioden.

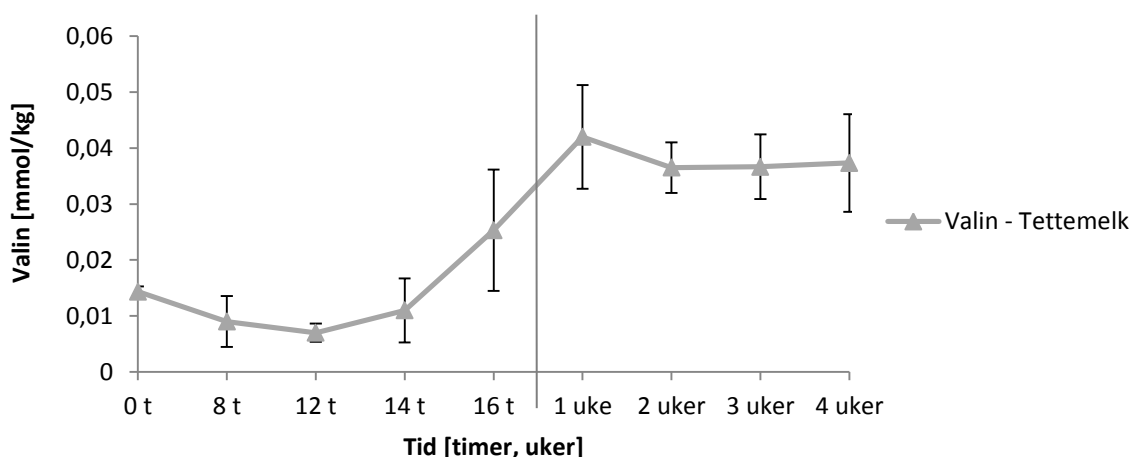
Mengden 2-metylpropanal økte jevnt med 0,0004 mmol/kg i løpet av de 14 første timene av fermenteringen. I følge figur 4.31 ble mengden redusert med 0,00014 mmol/kg mellom 14 og 16 timers fermentering. Gjennom lagringsperioden på 4 uker var konsentrasjonen av 2-metylpropanal konstant, på 0,00013 mmol/kg.

Det ble ikke detektert 2-metyl-1-propanol i løpet av fermenteringen. Etter en ukes lagring hadde 2-metyl-1-propanol økt til 0,0004 mmol/kg. Ved slutten av lagringsperioden var konsentrasjonen 0,0004 mmol/kg.

4.4.1.3.3 Tettemelk

Konsentrasjonen av valin i tettemelk ble undersøkt under fermentering og lagring. Det ble også målt mengde 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanol, men disse ble ikke påvist.

Resultatene fra målingene av valin i tettemelken er vist i figur 4.32.



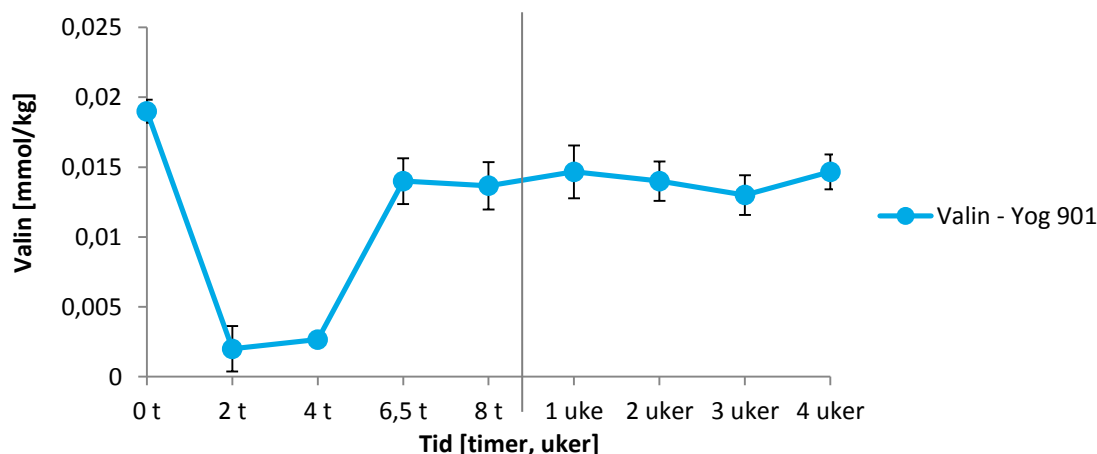
Figur 4.32 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av valin i tettemelk under fermentering og lagring.

Ut fra figur 4.32 sank konsentrasjonen av valin svakt i tettemelk fra 0 til 12 timers fermentering. Under resten av fermenteringen økte mengden. Under lagring var innholdet av valin omtrent uendret i tettemelk. Standardavvikene viser stor variasjon mellom forsøkene.

Det ble analysert for valin, 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanol i kommersiell tettemelk under lagring i 60 dager. Kun valin ble detektert, og konsentrasjonen var stabil på 0,02 mmol/kg fra 20 til 60 dagers lagring. Standardavvikene viste at det var stor variasjon mellom produksjonene.

4.4.1.3.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengden valin ble målt i yoghurt med syrekultur YF-L901. Resultatene er presentert i figur 4.33.



Figur 4.33 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av valin under fermentering og lagring av yoghurt syret med YF-L901.

I løpet av de første to timene under fermentering ble konsentrasjonen av valin i følge figur 4.33 redusert med 0,017 mmol/kg. Konsentrasjonen var uendret, 0,002 mmol/kg, mellom 2 og 4 timers fermentering, før den økte til 0,014 mmol/kg frem til 6,5 timers fermentering. Mengden var uendret frem til slutten av fermenteringen og gjennom lagringsperioden.

Det ble ikke detektert 2-metylpropanal eller 2-metyl-1-propanol i yoghurten under fermentering eller lagring.

4.4.1.3.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og YC-183 tilsatt glutaminsyre

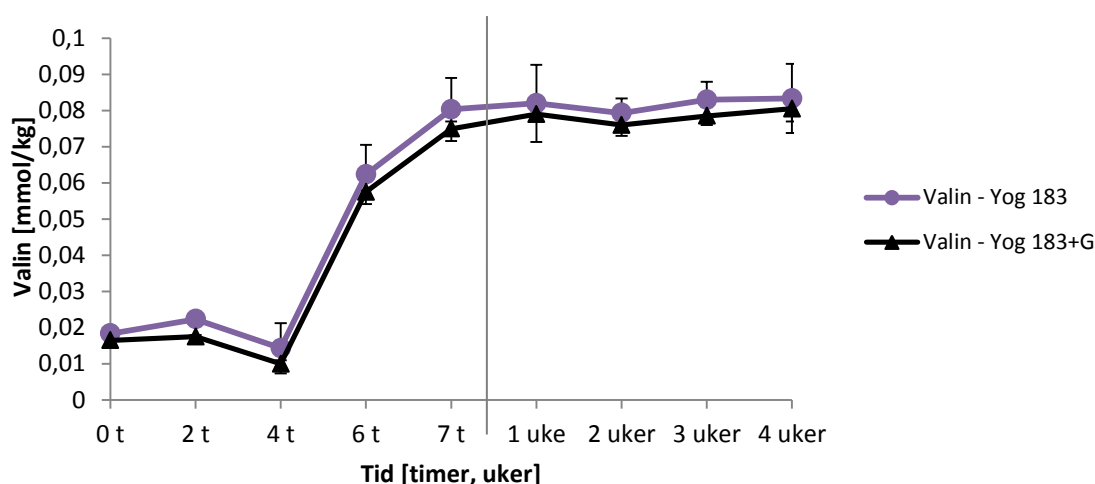
Konsentrasjonen av valin ble målt i yoghurt med syrekultur YC-183, og yoghurt tilsatt glutaminsyre (3 mmol/kg) og syrekultur YC-183. Resultatene er vist i figur 4.34.

I følge figur 4.34 sank konsentrasjonen av valin i yoghurt syret med YC-183 med 0,002 mmol/kg i løpet av de 4 første timene. Konsentrasjonen økte jevnt mellom 4 og 7 timers fermentering, fra 0,014 mmol/kg til 0,08 mmol/kg. Gjennom lagringsperioden var mengden av valin stort sett stabil

I yoghurtvarianten tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre sank mengden valin fra 0,016 mmol/kg med 0,006 mmol/kg de første 4 timene av fermenteringen. Mellom 4 og 7 timers fermentering

økte valinkonsentrasjonen fra 0,01 mmol/kg til 0,075 mmol/kg. Mengden valin var stabil gjennom lagringsperioden. Det ble observert omtrent samme utvikling av valin i yoghurt med og uten glutaminsyre.

Det ble ikke detektert 2-metylpropanal eller 2-metyl-1-propanol i noen av yoghurt variantene, verken under fermentering eller lagring.



Figur 4.34 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av valin under fermentering og lagring av yoghurt med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg) og syring med syrekultur YC-183.

4.4.2 Aromatiske aminosyrer

4.4.2.1 Tryptofan

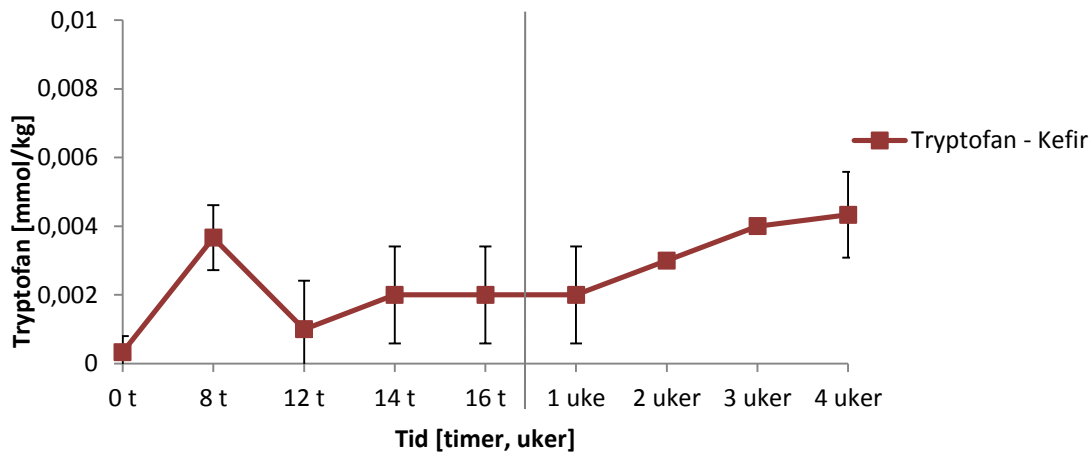
Mengden av tryptofan ble målt under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemelk og yoghurt med to ulike syrekulturer. Innholdet av den aromatiske aminosyren ble også undersøkt i kommersiell tettemelk. Tryptofan kan i følge Fernández og Zúñiga (2006) dekarboksyleres til tryptamin, eller omdannes til andre metabolitter via transaminering. Se også figur 2.8.6.

4.5.2.1.1 Kefir

Mengden tryptofan som ble funnet i kefir under fermentering og lagring er vist i figur 4.35.

Konsentrasjonen av tryptofan økte fra 0,0003 til 0,0036 mmol/kg i løpet av de første 8 timene av fermenteringen (figur 4.35). Mengde tryptofan ble redusert med 0,0026 mmol/kg mellom 8 og 12 timers fermentering. Gjennom resten av fermenteringen var mengden stort sett stabil.

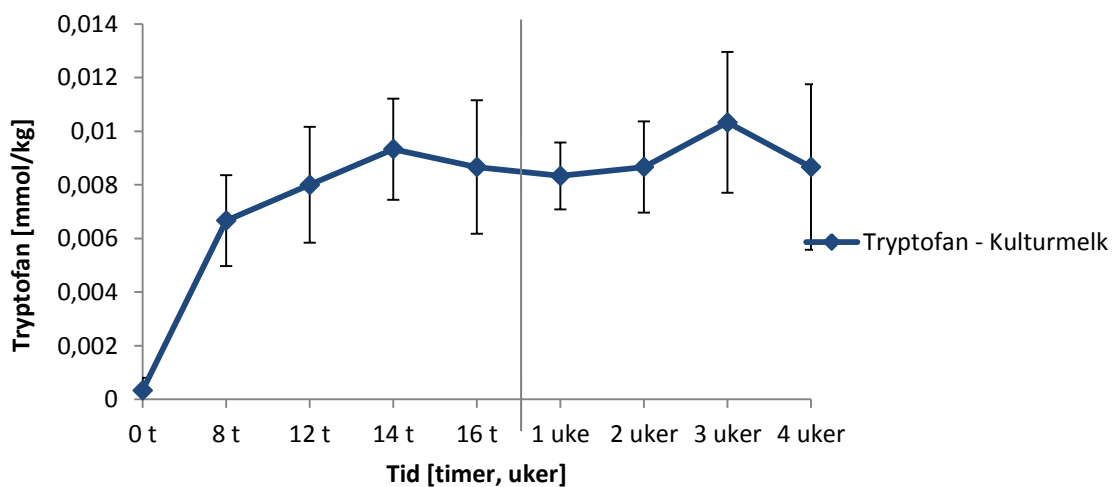
Ved slutten av lagringsperioden inneholdt kefir 0,004 mmol/kg tryptofan.



Figur 4.35 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av tryptofan i kefir under fermentering og lagring.

4.4.2.1.2 Kulturmilk

Mengde tryptofan i kulturmilk ble analysert under fermentering og lagring, og resultatene er presentert i figur 4.36.



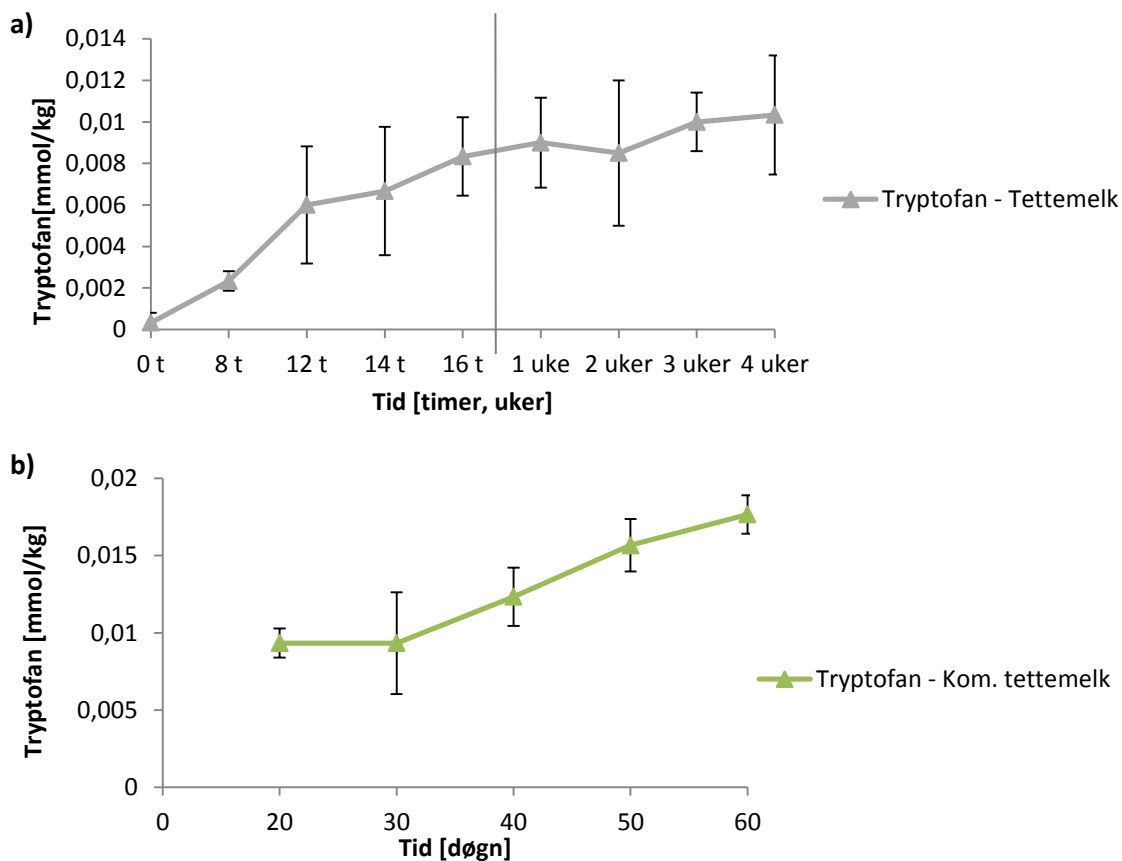
Figur 4.36 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av tryptofan i kulturmilk under fermentering og lagring.

I kulturmilk økte konsentrasjonen av tryptofan betydelig i løpet av de 8 første timene av fermenteringen, og noe mindre fra 8 til 14 timer (figur 4.36). Mengden var stort sett stabil videre under fermenteringen og gjennom lagringsperioden.

4.4.2.1.3 Tettemilk

Mengde tryptofan ble målt under fermentering og lagring av tettemilk, og under lagring av kommersiell tettemilk. Resultatene er presentert i figur 4.37. Konsentrasjonen av tryptofan

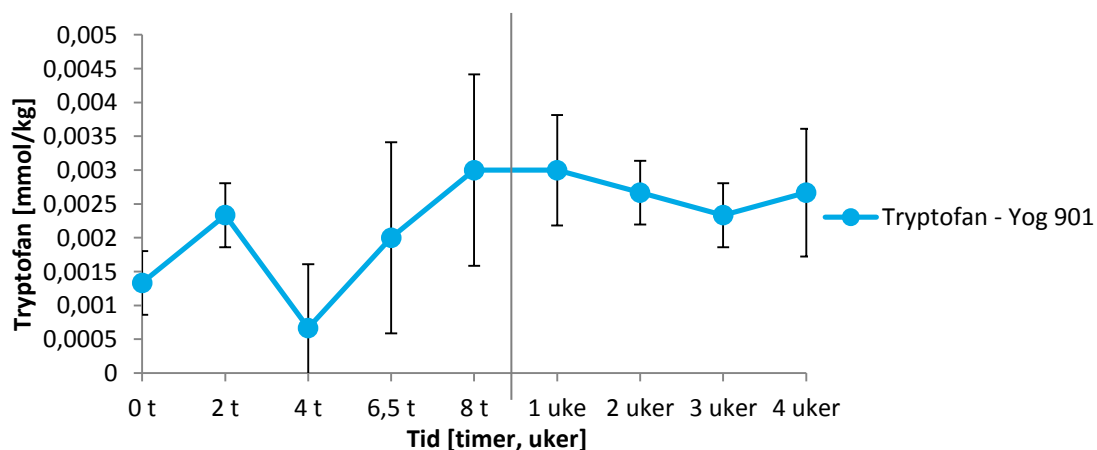
økte i tettemelk gjennom hele fermenteringsforløpet, og under lagring. Standardavvikene viste stor variasjon i mengde tryptofan mellom forsøkene. I kommersiell tettemelk økte konsentrasjonen av tryptofan noe under lagring fra 30 til 60 dager.



Figur 4.37 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) tryptofan **a)** under fermentering og lagring av tettemelk og **b)** under lagring av kommersiell (kom.) tettemelk.

4.4.2.1.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengde tryptofan i yoghurt med syrekultur YF-L901 er vist i 4.38.

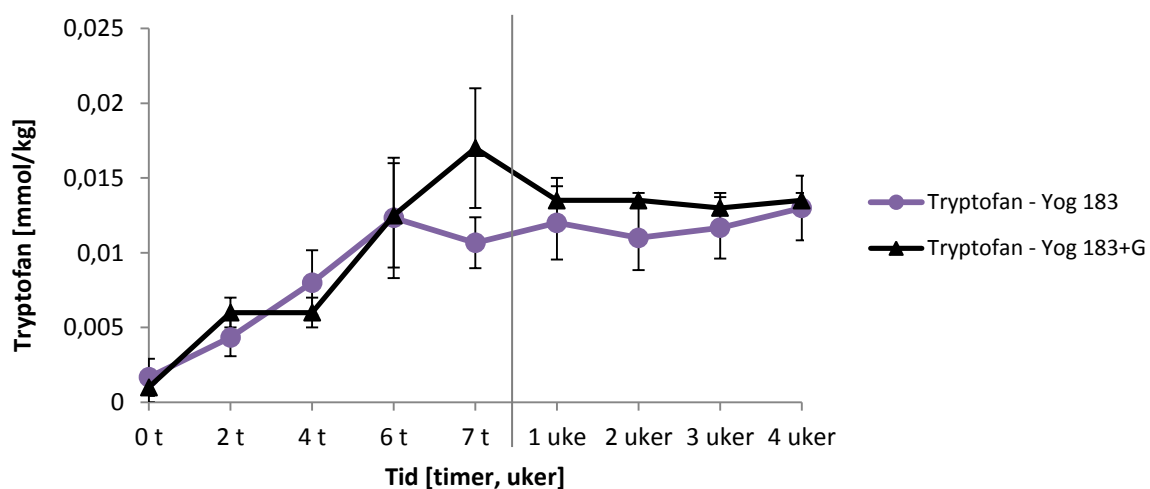


Figur 4.38 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av tryptofan i yoghurt med syrekultur YF-L901 under fermentering og lagring.

I følge figur 4.38 økte mengden tryptofan i yoghurten de første to timene av fermenteringen, før den ble redusert frem til 4 timers fermentering og videre økte fra 4 til 8 timers fermentering. Under lagringsperioden var mengden tryptofan stort sett stabil.

4.4.2.1.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og YC-183 tilsatt glutaminsyre

Mengde tryptofan ble målt i to varianter av yoghurt med syrekultur YC-183, med og uten tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Resultatene er presentert i figur 4.39.



Figur 4.39 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av tryptofan under fermentering og lagring av yoghurt med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg) og syring med YC-183.

Konsentrasjonen av tryptofan økte under fermenteringen i begge yoghurtvariantene (figur 4.39). Innholdet av tryptofan var stabilt gjennom lagringsperioden i begge variantene.

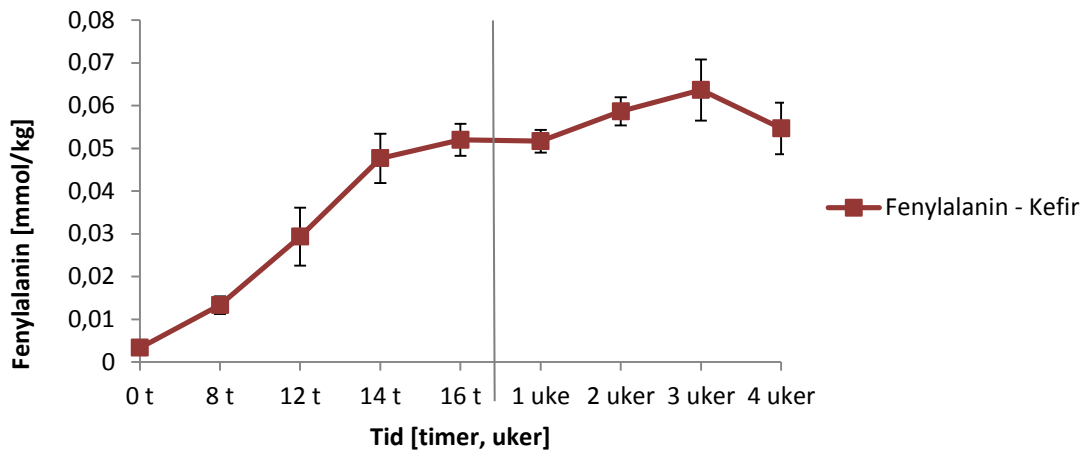
4.4.2.2 Fenylalanin

Konsentrasjonen av den aromatiske aminosyren fenylalanin ble analysert under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemelk, yoghurt med syrekultur YF-L901 og to varianter av yoghurt med syrekultur YC-183. Mengden fenylalanin ble også målt i kommersiell tettemelk under lagring. Fenylalanin kan dekarboksyleres til fenyletylamin, eller omdannes til ulike metabolitter via transaminering (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.6.

4.4.2.2.1 Kefir

Konsentrasjonen av fenylalanin i kefir gjennom fermentering og lagring er vist i figur 4.40.

Mengde fenylalanin økte jevnt til 0,052 mmol/kg gjennom fermenteringen (figur 4.40). Under lagring var konsentrasjonen stort sett stabil.

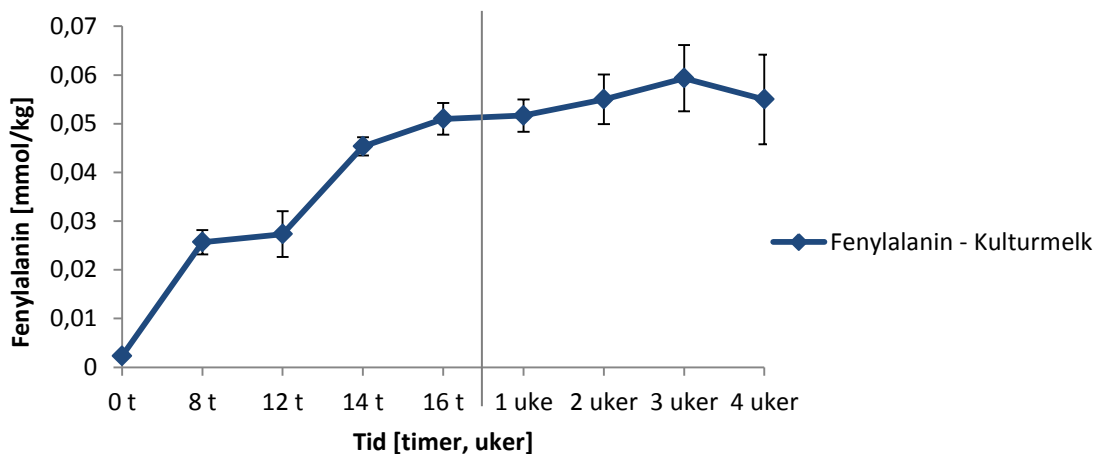


Figur 4.40 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) fenylalanin under fermentering og lagring av kefir.

4.4.2.2.2 Kulturmilk

Innholdet av fenylalanin i kulturmilk gjennom fermentering og lagring ble undersøkt.

Resultatene er presentert i figur 4.41.



Figur 4.41 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) fenylalanin i kulturmilk under fermentering og lagring

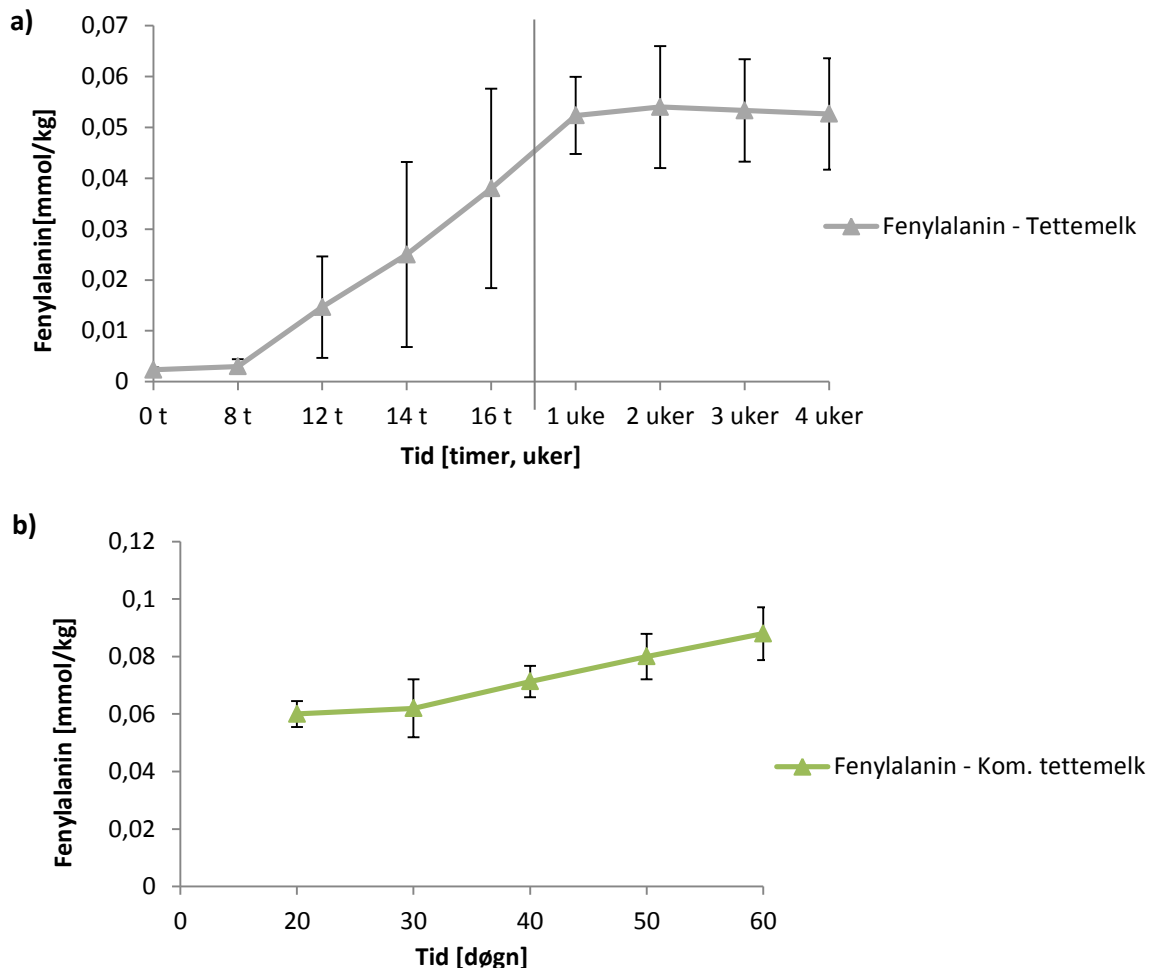
Ved fermentering av kulturmilk økte innholdet av fenylalanin gjennom hele fermenteringen (figur 4.41). Under lagring var konsentrasjonen så og si stabil.

4.4.2.2.3 Tettemilk

Konsentrasjonen av fenylalanin ble målt under fermentering og 4 ukers lagring av tettemilk.

Figur 4.42 viser resultatene fra målingene.

Ut fra figur 4.42 økte mengden fenylalanin i tettemelk fra 8 til 16 timers fermentering. Under lagringen var mengden stabil. Standardavvikene viser at det var stor variasjon mellom forsøkene. Konsentrasjonen av fenylalanin økte med 0,028 mmol/kg fra 20 til 60 dagers lagring av kommersiell tettemelk.

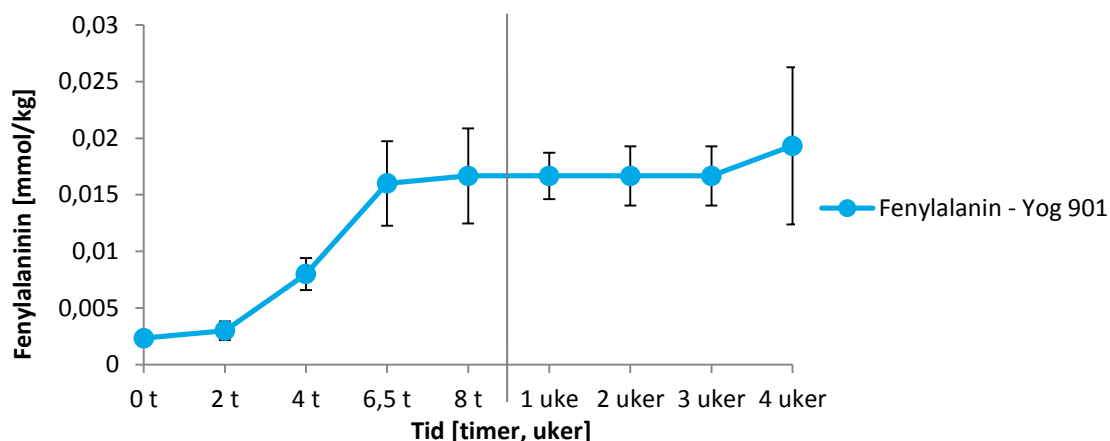


Figur 4.42 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av fenylalanin **a)** under fermentering og lagring av tettemelk og **b)** under lagring av kommersiell (kom.) tettemelk.

4.4.2.2.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Konsentrasjonen av fenylalanin ble undersøkt under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901. Figur 4.43 viser resultatene.

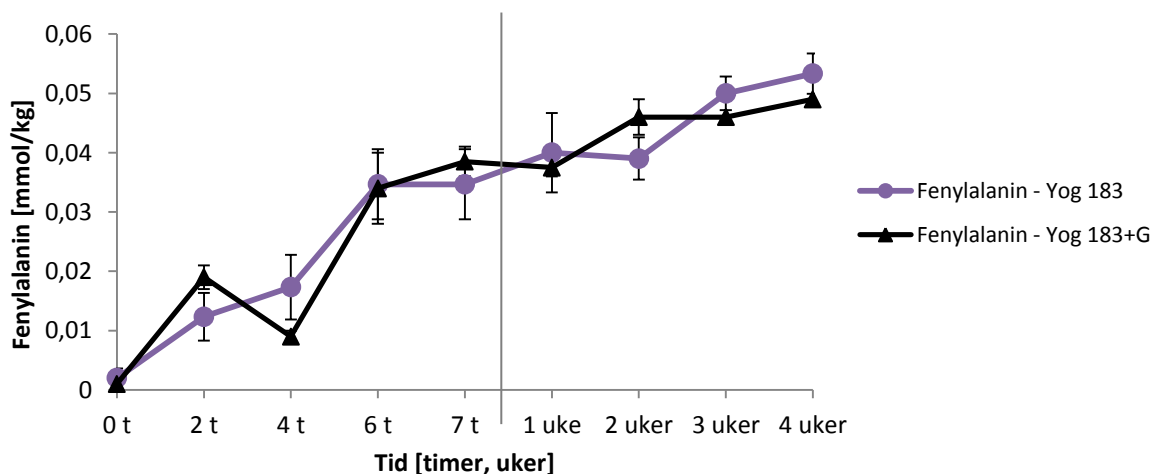
I følge figur 4.43 økte mengden fenylalanin i yoghurt syrnet med YF-L901 til 0,016 mmol/kg under fermenteringen. Gjennom lagringsperioden var mengden uendret.



Figur 4.43 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av fenylalanin under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YF-L901.

4.4.2.2.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og YC-183 tilsatt glutaminsyre

Mengde fenylalanin ble analysert i to varianter av yoghurt syrnet med YC-183. Den ene varianten var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Resultatene fra analysering av fenylalanin i de to variantene er vist i figur 4.44.



Figur 4.44 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av fenylalanin under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YC-183, og yoghurt tilsatt glutaminsyre (G; 3mmol/kg) og syrnet med YC-183.

I yoghurtvarianten uten tilsatt glutaminsyre økte konsentrasjonen av fenylalanin gjennom fermenteringen frem til 6 timer og en konsentrasjon på 0,035 mmol/kg (figur 4.44).

Konsentrasjonen var stabil de to første ukene under lagring, før den økte til en konsentrasjon på 0,0553 mmol/kg i løpet av de to siste ukene i lagringsperioden.

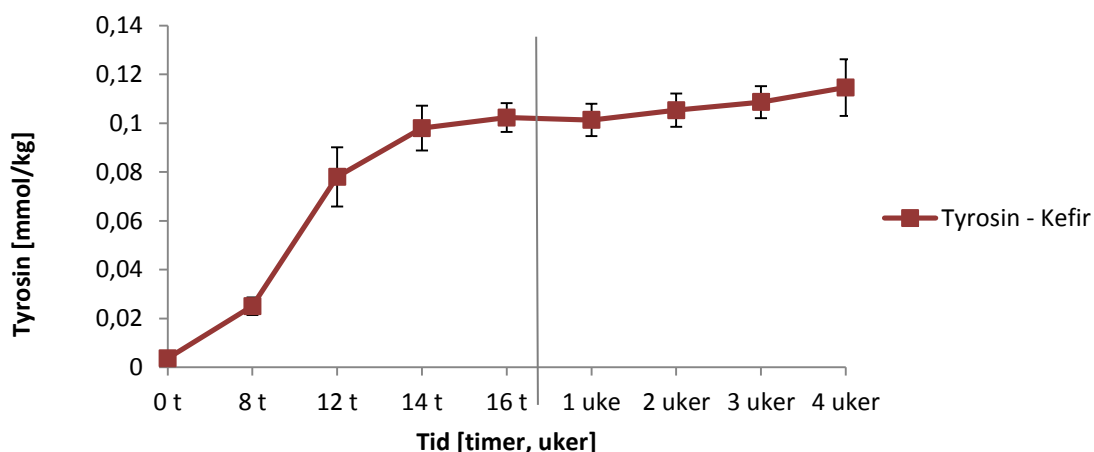
I yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre økte konsentrasjonen med 0,02 mmol/kg de to første timene under fermentering. Mellom 2 og 4 timers fermentering ble mengden fenyylalanin redusert før den økte til 0,038 mmol/kg ved 7 timers fermentering. Konsentrasjonen økte noe mellom en og to ukers lagring, til 0,046 mmol/kg, før den var stabil resten av lagringsperioden.

4.4.2.3 Tyrosin

Innholdet av tyrosin under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemilk, yoghurt syrnet med YF-L901 og to varianter av yoghurt syrnet med YC-183 ble undersøkt. Tyrosin kan dekarboksyleres til det biogene aminet tyramin, eller omdannes til andre metabolitter via transaminering (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.6.

4.4.2.3.1 Kefir

Under fermentering og lagring av kefir ble innholdet av tyrosin analysert. Resultatene er vist i figur 4.45.



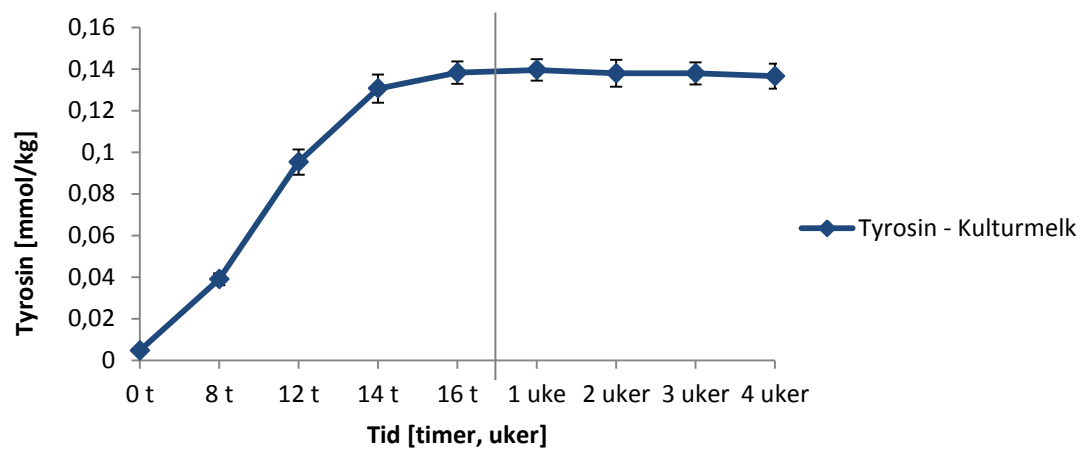
Figur 4.45 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av tyrosin i kefir under fermentering og lagring.

I følge figur 4.45 økte konsentrasjonen av tyrosin raskt de første 12 timene av fermenteringen. Etter fermentering i 16 timer var konsentrasjonen 0,1 mmol/kg, og gjennom lagringsperioden var mengden stabil.

4.4.2.3.2 Kulturmilk

Konsentrasjonen av tyrosin ble målt i kulturmilk under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.46.

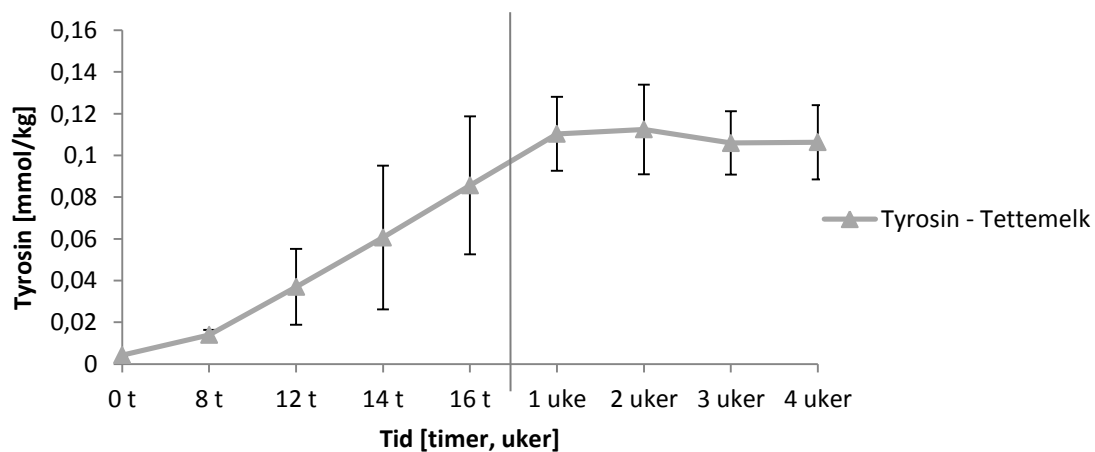
I kulturmilk økte konsentrasjonen av tyrosin gjennom hele fermenteringen, og nådde 0,13 mmol/kg etter 16 timer (figur 4.46). Konsentrasjonen var uendret gjennom 4 ukers lagring.



Figur 4.46 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av tyrosin i kulturmilk under fermentering og lagring.

4.4.2.3.3 Tettemelk

Konsentrasjonen av tyrosin ble analysert under fermentering og lagring av tettemelk, samt under lagring av kommersiell tettemelk hver tiende dag fra 20 til 60 dager. Resultatene fra målinger under fermentering og lagring av tettemelk er presentert i figur 4.47.



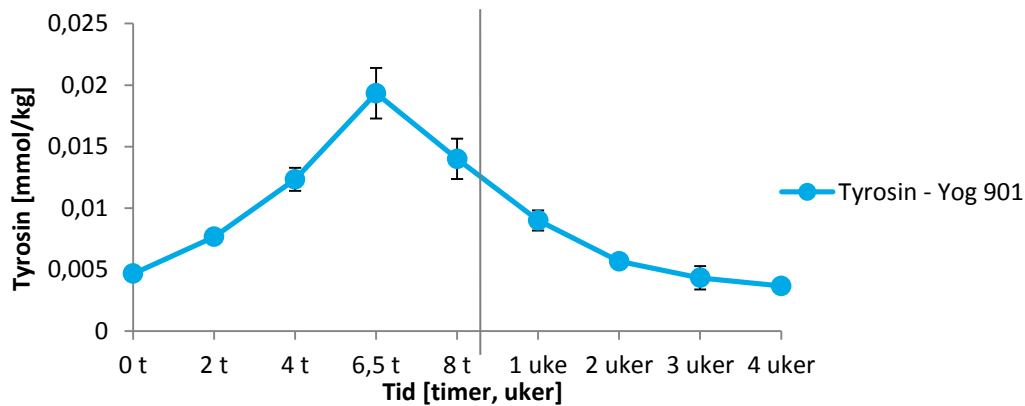
Figur 4.47 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) tyrosin i tettemelk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.47 økte mengden tyrosin gjennom hele fermenteringsforløpet. Under lagring var konsentrasjonen stabil.

Mengde tyrosin i kommersiell tettemelk ble målt fra 20 til 60 dagers lagring. Konsentrasjonen var stabil på 0,14 mmol/kg gjennom hele lagringsperioden.

4.4.2.3.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengden tyrosin ble målt i yoghurt syrnet med YF-L901 under fermentering og lagring. Resultatene er presentert i figur 4.48.



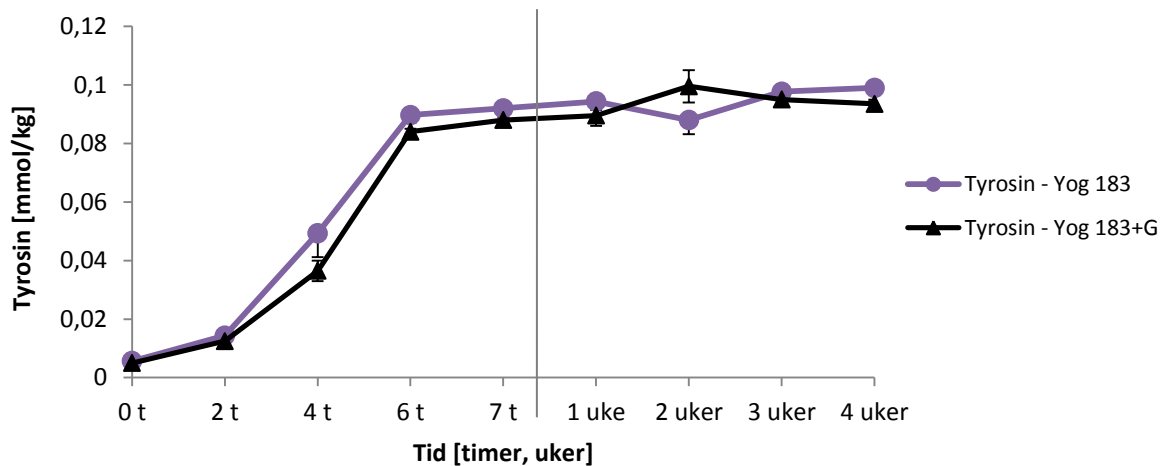
Figur 4.48 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av tyrosin under syrning og lagring av yoghurt med syrekultur YF-L901.

Konsentrasjonen av tyrosin økte, i følge figur 4.48, til omtrent 0,02 mmol/kg i løpet av 6.5 timers fermentering. Mellom 6.5 og 8 timers fermentering sank konsentrasjonen av tyrosin i yoghurten. Mengden tyrosin ble redusert under lagring, til 0,003 mmol/kg etter fire ukers lagring.

4.4.2.3.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og YC-183 tilsatt glutaminsyre

Mengde tyrosin ble målt under fermentering og lagring av to varianter av yoghurt syrnet med YC-183, hvor den ene var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Figur 4.49 viser resultatene fra analysen.

I følge figur 4.49 økte konsentrasjonen av tyrosin de første 6 timene av fermenteringen, til omtrent 0,085 mmol/kg i begge variantene. Mengden tyrosin var uendret under lagringsperioden.



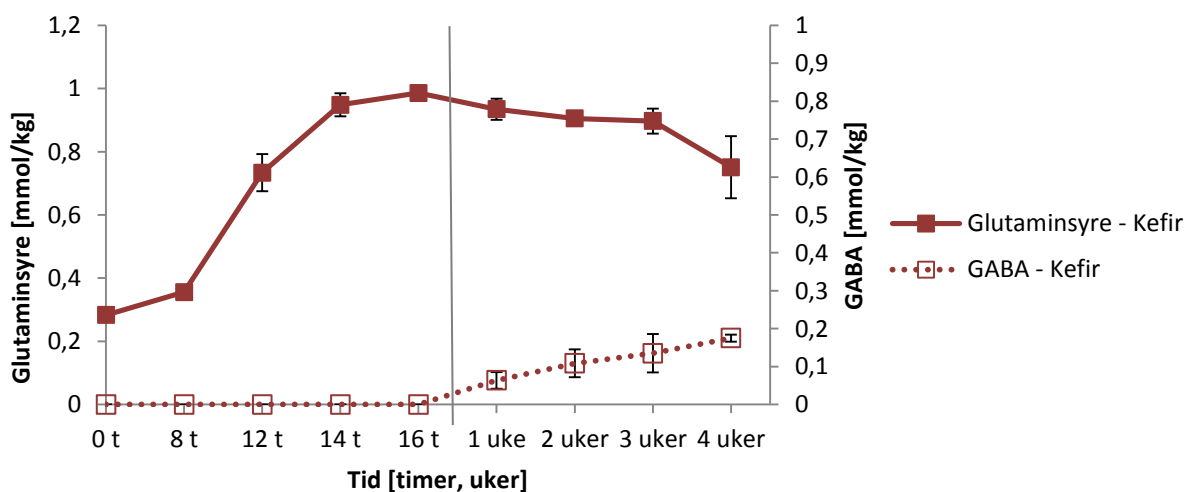
Figur 4.49 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av tyrosin under syrning og lagring av yoghurt med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg) og inokulering med YC-183.

4.4.3 Glutaminsyre og GABA

Glutaminsyre kan deamineres til α -ketoglutarat (Fernández & Zúñiga 2006). Noen melkesyrebakterier er i stand til å produsere GABA ved dekarboksylering av glutaminsyre (Cotter & Hill 2003). Glutaminsyre kan også dannes fra α -ketoglutarat via transaminering av andre aminosyrer, for eksempel forgrenede eller aromatiske aminosyrer, eller ved deaminering av glutamin (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.2.

4.4.3.1 Kefir

Mengde glutaminsyre og GABA ble målt i kefir under fermentering og lagring. Resultatene er presentert i figur 4.50.



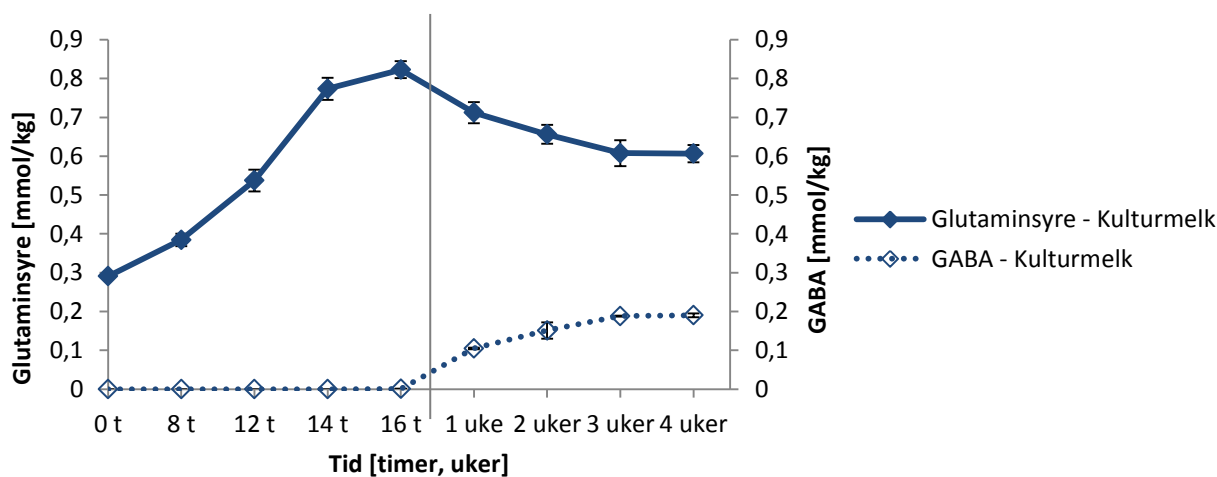
Figur 4.50 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av glutaminsyre og GABA i kefir under fermentering og lagring. GABA = γ -aminobutyrat.

I følge figur 4.50 økte mengden glutaminsyre i kefir under fermentering, til omtrent 1,0 mmol/kg etter 16 timer. I løpet av lagring ble mengden glutaminsyre redusert med 0,23 mmol/kg. Det ble ikke detektert GABA i kefir under fermentering, men konsentrasjonen økte jevnt gjennom hele lagringsperioden, til 0,17 mmol/kg etter 4 uker.

4.4.3.2 Kulturmilk

Mengde glutaminsyre og GABA ble målt i kulturmilk under fermentering og lagring.

Resultatene vises i figur 4.51.



Figur 4.51 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av glutaminsyre og GABA i kulturmilk under fermentering og lagring. GABA = γ -aminobutyrat.

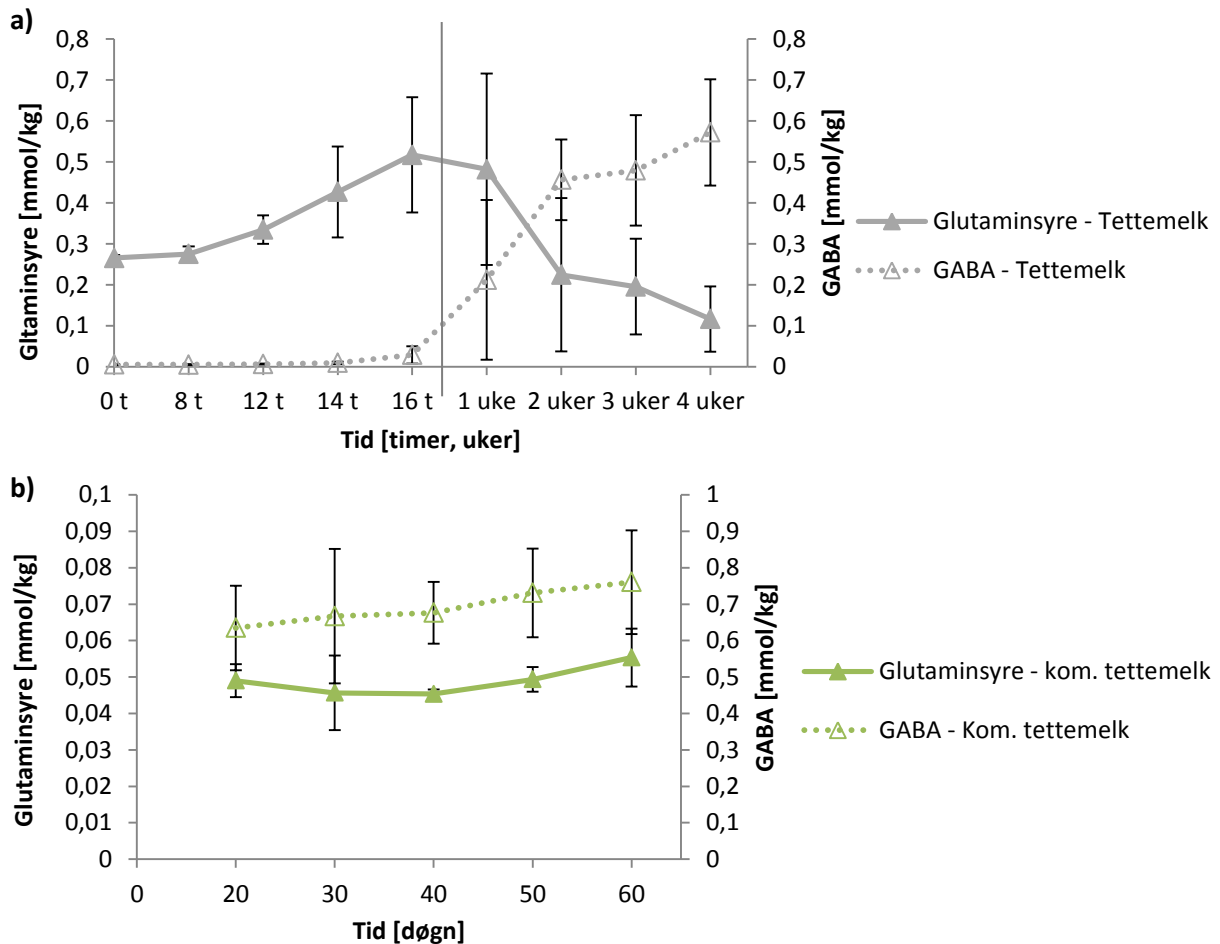
Konsentrasjonen av glutaminsyre i kulturmilk økte fra 0,29 mmol/kg til 0,82 mmol/kg i løpet av fermentering i 16 timer (figur 4.51). Under lagring ble glutaminsyremengden redusert med omtrent 0,2 mmol/kg. Det ble ikke detektert GABA under fermentering i kulturmilk, men under lagring i fire uker økte konsentrasjonen til 0,19 mmol/kg.

4.4.3.3 Tettemilk

Konsentrasjonen av glutaminsyre og GABA ble målt i tettemilk under fermentering og lagring, og i kommersiell tettemilk under lagring. Resultatene er vist i figur 4.52.

Ut fra figur 4.52 økte mengden glutaminsyre fra 0,26 til 0,52 mmol/kg i løpet av 16 timers fermentering. Under lagring sank konsentrasjonen med 0,4 mmol/kg. Konsentrasjonen av GABA hadde en svak økning under fermenteringen, til 0,029 mmol/kg etter 16 timer. Etter 4 ukers lagring økte mengden GABA til 0,57 mmol/kg i tettemelken.

Mengde glutaminsyre var omtrent uendret på 0,05 mmol/kg fra 20 til 60 dagers lagring av kommersiell tettemelk (figur 4.52). Konsentrasjonen av GABA økte tilsynelatende fra 0,63 mmol/kg til 0,76 mmol/kg fra 20 til 60 dagers lagring, men standardavvikene er store.

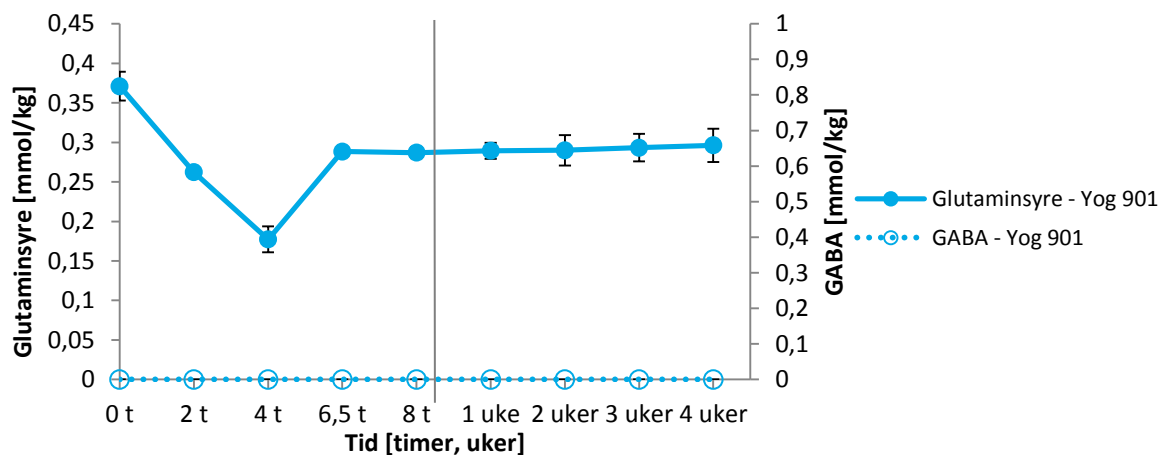


Figur 4.52 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) glutaminsyre og GABA i **a)** tettemelk under fermentering og lagring, og **b)** kommersiell (kom.) tettemelk under lagring. GABA = γ -aminobutyrat.

4.4.3.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901 ble innholdet av glutaminsyre og GABA undersøkt. Figur 4.53 viser resultatene.

I følge figur 4.53 ble mengden glutaminsyre redusert med cirka 0,2 mmol/kg i løpet av de 4 første timene av fermenteringen. Mellom 4 og 6,5 timer økte konsentrasjonen til 2,9 mmol/kg, og var stabil resten av fermenteringen og gjennom hele lagringsperioden. Det ble ikke detektert GABA i denne yoghurten, verken under fermentering eller lagring.



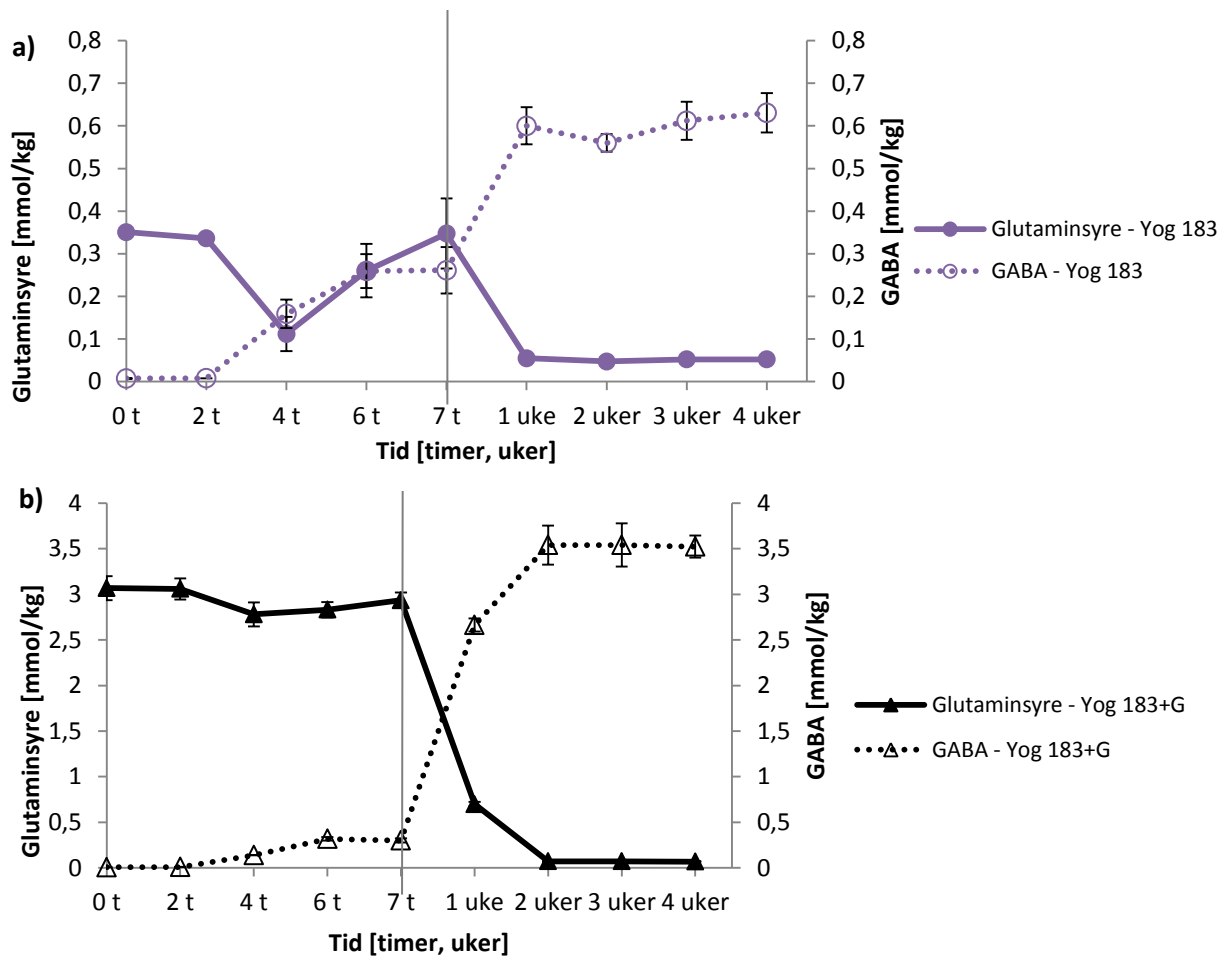
Figur 4.53 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av glutaminsyre og GABA under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901.

4.4.3.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

De to yoghurtvariantene syrnet med YC-183, hvor en var tilsatt glutaminsyre (3 mmol/kg), ble analysert for innhold av glutaminsyre og GABA under fermentering og lagring.

I følge figur 4.54 ble mengden glutaminsyre redusert med 0,24 mmol/kg i løpet av de 4 første timene ved fermentering av yoghurt med YC-183. Konsentrasjonen økte gjennom resten av fermenteringen, til omtrent 0,35 mmol/kg. I løpet av den første uken i lagringsperioden ble glutaminsyremengden redusert med 0,3 mmol/kg. Resten av lagringstiden var konsentrasjonen stabil på omtrent 0,05 mmol/kg.

Etter fermentering i 4 timer hadde konsentrasjonen av GABA økt til 0,16 mmol/kg i yoghurt med syrekultur YF-L901. Ved slutten av fermenteringen ble det målt en GABA-konsentrasjon på 0,26 mmol/kg i yoghurten. I løpet av den første uka i lagringsperioden ble mengden GABA doblet. Resten av lagringsperioden var konsentrasjonen stort sett stabil på omtrent 0,6 mmol/kg.



Figur 4.54 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) glutaminsyre og GABA under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YC-183 **a)** uten tilsetning av glutaminsyre, og **b)** tilsatt glutaminsyre (G; 3 mmol/kg). GABA = γ -aminobutyrat.

Konsentrasjonen av glutaminsyre i yoghurtvarianten tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre ble redusert med 0,22 mmol/kg i løpet av de første 4 timene av fermenteringen. Mellom 4 og 7 timers fermentering var glutaminsyre relativt stabil. Konsentrasjonen av glutaminsyre ble raskt redusert med 2,23 mmol/kg i løpet av 1 ukes lagring. Mellom uke 1 og 2 ble konsentrasjonen ytterligere redusert med 0,62 mmol/kg. Resten av lagringsperioden var mengde glutaminsyre uendret på 0,07 mmol/kg.

Etter fermentering i 4 timer ble konsentrasjonen av GABA målt til 0,13 mmol/kg. Mellom 4 og 6 timers fermentering økte mengden til 0,3 mmol/kg, og konsentrasjonen var stabil resten av fermenteringen. Etter lagring i 1 uke hadde konsentrasjonen av GABA økt med 2,36 mmol/kg. Mengden GABA økte videre mellom 1 og 2 ukers lagring med 0,87 mmol/kg, til en total mengde på 3,5 mmol/kg. Figur 4.54 viser at GABA-konsentrasjonen var stabil fra uke 2 og ut lagringsperioden.

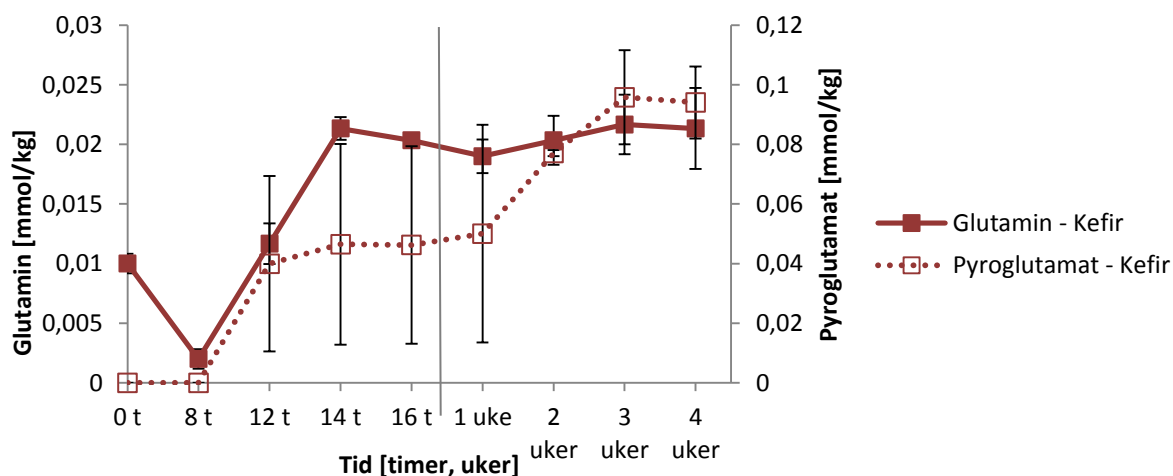
4.4.4 Glutamin

Glutamin kan omdannes til glutaminsyre via deaminering (Liu et al. 2003), eller metaboliseres til pyroglutaminsyre og ammoniakk (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.2.

4.4.4.1 Kefir

Innholdet av glutamin og pyroglutamat ble undersøkt i kefir under fermentering og lagring. Resultatene er presentert i figur 4.55.

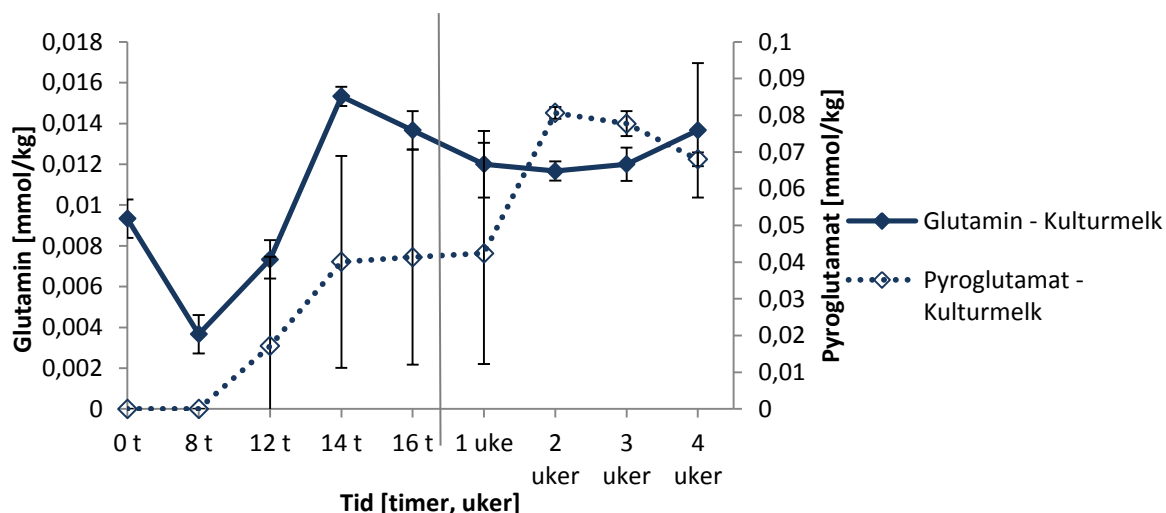
I følge figur 4.55 sank innholdet av glutamin fra 0,01 til 0,002 mmol/kg i løpet av de første 8 timene under fermentering. Konsentrasjonen økte jevnt mellom 8 og 14 timers fermentering, til 0,02 mmol/kg, og var stabil under lagringsperioden. Konsentrasjonen av pyroglutamat økte i ulik grad gjennom fermentering og lagring. Ved 16 timer hadde mengden pyroglutamat økt til omtrent 0,046 mmol/kg, og under lagring økte den ytterligere til 0,094 mmol/kg ved 4 uker.



Figur 4.55 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) glutamin og pyroglutamat i kefir under fermentering og lagring.

4.4.4.2 Kulturmilk

Mengde glutamin og pyroglutamat ble analysert under fermentering og lagring av kulturmilk. Resultatene fra analysen er vist i figur 4.56.



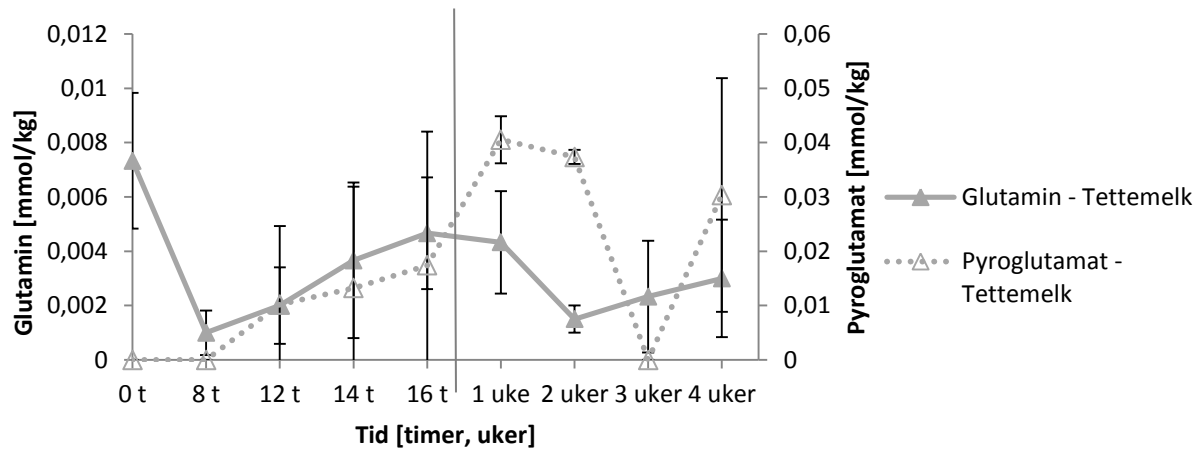
Figur 4.56 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) glutamin og pyroglutamat i kulturmilk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.56 ble innholdet av glutamin redusert de første 8 timene av fermenteringen. Mellom 8 og 14 timers fermentering økte konsentrasjonen til 0,015 mmol/kg. Mengden glutamin ble redusert til 0,012 mmol/kg fra 14 til 16 timer fermentering. Under lagring var innholdet av glutamin stort sett stabilt i kulturmilk. Konsentrasjonen av pyroglutamat økte i ulik grad gjennom fermentering og lagring. Ved 16 timer fermentering hadde konsentrasjonen av pyroglutamat økt til omtrent 0,04 mmol/kg. Det ble også observert en økning under lagring, og etter 4 uker ble det målt en mengde pyroglutamat på omtrent 0,07 mmol/kg.

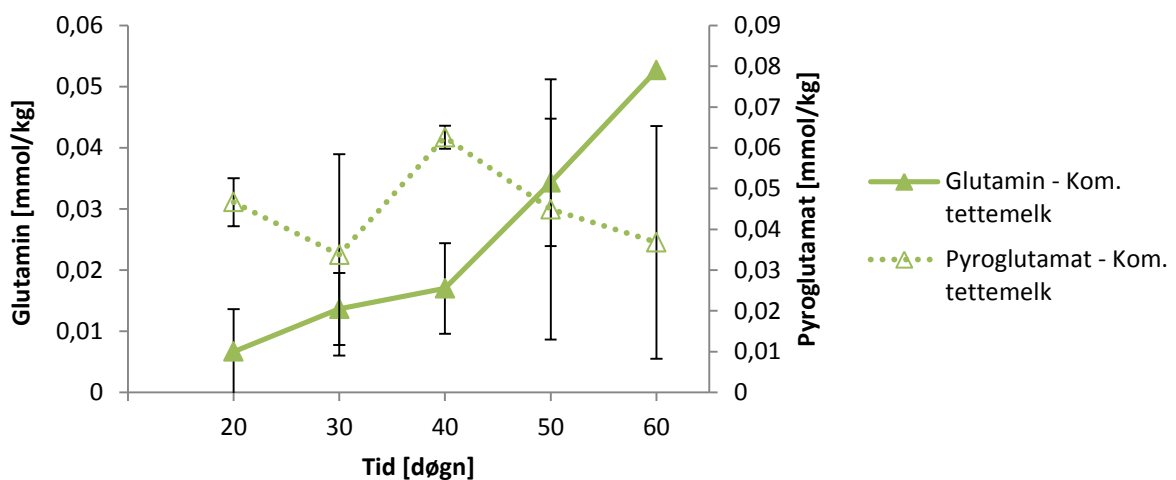
4.4.4.3 Tettemelk

Konsentrasjonen av glutamin og pyroglutamat ble målt under fermentering og lagring av tettemelk, samt under 60 dagers lagring av kommersiell tettemelk. Resultatene fra førstnevnte er vist i figur 4.57. Resultatene fra lagring av kommersiell tettemelk er vist i figur 4.58.

Konsentrasjonen av glutamin sank i løpet av de første 8 timene av fermenteringsforløpet (figur 4.57). Under resten av fermenteringsforløpet og lagringsperioden både steg og sank mengden glutamin. Konsentrasjonen av pyroglutamat økte til omtrent 0,02 mmol/kg etter 16 timer fermentering. Under lagring økte mengden før den deretter sank. Standardavvikene viste en stor variasjon i konsentrasjonen av glutamin og pyroglutamat.



Figur 4.57 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av glutamin og pyroglutamat i tettemelk under fermentering og lagring.

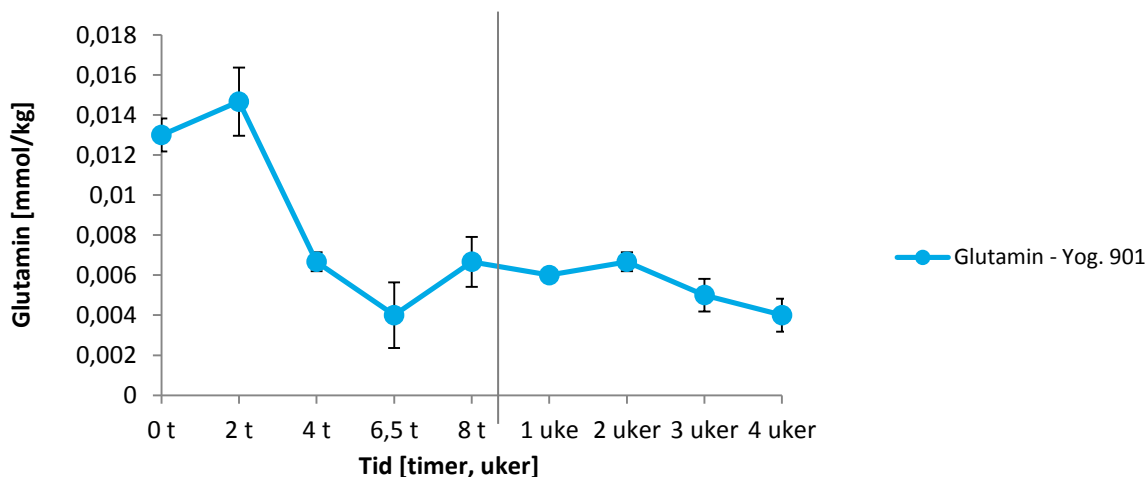


Figur 4.58 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) glutamin og pyroglutamat i kommersiell (kom.) tettemelk under lagring i 60 dager.

Konsentrasjonen av glutamin økte, i følge figur 4.58, fra 0,006 mmol/kg ved 20 dager til 0,052 mmol/kg etter 60 dagers lagring av kommersiell tettemelk. Konsentrasjonen av pyroglutamat både økte og sank under lagringen. Standardavviket viste stor variasjon i mengde pyroglutamat mellom de ulike produksjonene.

4.4.4.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengde glutamin og pyroglutamat ble undersøkt i yoghurt syrnet med YF-L901 under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.59.



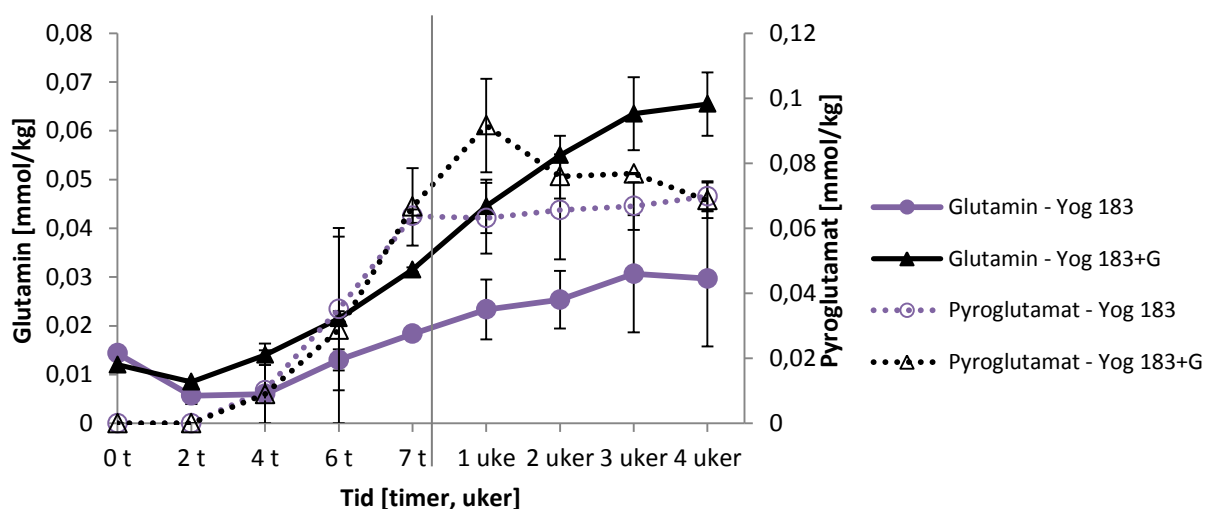
Figur 4.59 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) glutamin og pyroglutamat under fermentering og lagring av yoghurt syrnert med YF-L901.

Mengde glutamin i yoghurt syrnert med YF-L901 økte mellom 0 og 2 timers fermentering (figur 4.59). Mellom 2 og 6,5 timers fermentering ble konsentrasjonen av glutamin redusert med 0,01 mmol/kg. Glutamininnholdet var stort sett uendret gjennom lagringsperioden.

Pyroglutamat ble ikke detektert i yoghurt.

4.4.4.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Mengden glutamin og pyroglutamat ble målt i to yoghurtvarianter syrnert med YC-183., hvor den ene var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Resultatene er presentert i figur 4.60.



Figur 4.60 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av glutamin og pyroglutamat under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YC-183, med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

I følge figur 4.60 ble mengde glutamin redusert i løpet av de to første timene under fermentering i yoghurtvarianten som ikke var tilsatt glutaminsyre. Konsentrasjonen økte

gjennom resten av fermenteringen, til 0,018 mmol/kg. Under lagring økte mengden glutamin litt. I yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre ble mengden glutamin redusert i løpet av de to første timene under fermentering. Mellom 2 og 7 timers fermentering økte mengden glutamin til 0,03 mmol/kg. Mengden glutamin fortsatte å øke gjennom lagringsperioden, og etter lagring i 4 uker var konsentrasjonen av glutamin 0,065 mmol/kg. Mengden pyroglutamat økte under fermentering i begge variantene. Under lagring var pyroglutamat stabil i varianten uten tilsatt glutaminsyre, mens den ble noe redusert i varianten tilsatt glutaminsyre.

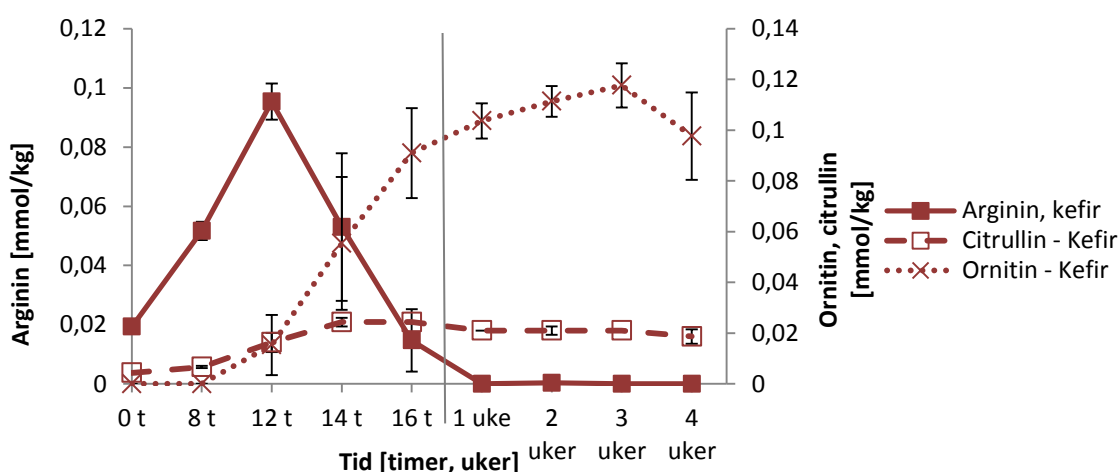
4.4.5 Arginin, citrullin og ornitin

Arginin kan omsettes via arginin-deiminaseveien. Denne metabolismen leder til dannelse av citrullin, som deretter kan omsettes til ornitin. Reaksjonen er reversibel (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.1.

4.4.5.1 Kefir

Mengde arginin, citrullin og ornitin ble målt i kefir gjennom fermentering og lagring.

Resultatene er vist i figur 4.61.



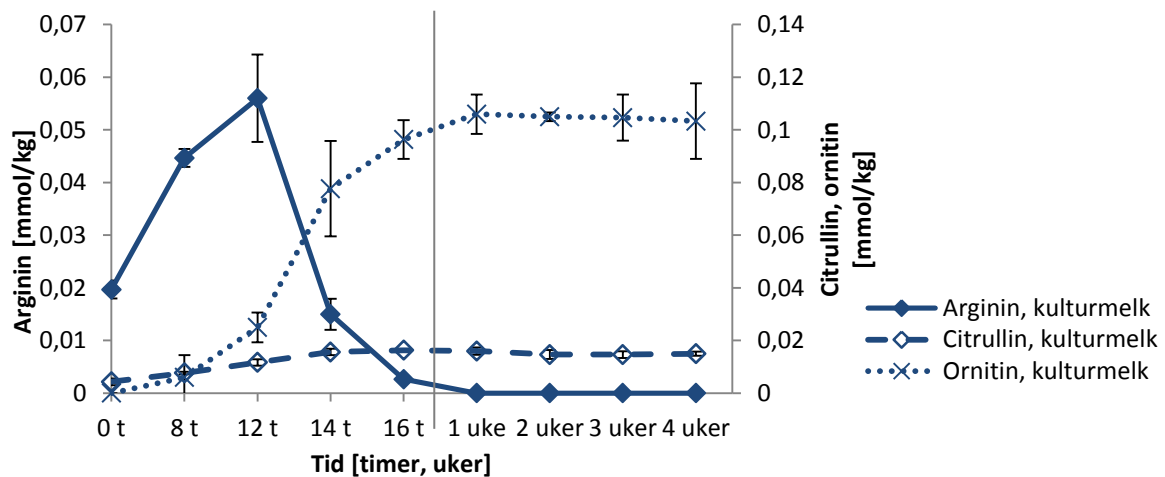
Figur 4.61 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av arginin, citrullin og ornitin i kefir under fermentering og lagring.

I følge figur 4.61 økte mengde arginin i kefir jevnt de første 12 timene av fermenteringen. Mellom 12 og 16 timers fermentering ble argininkonsentrasjonen redusert med 0,08 mmol/kg. I løpet av den første uka under lagring ble arginin fullstendig metabolisert, og det ble ikke detektert arginin resten av lagringsperioden.

Mengde citrullin økte noe i løpet av de 14 første timene av fermenteringen (figur 4.61). Konsentrasjonen av ornitin økte i større grad enn for citrullin under fermenteringsperioden. Under lagring var konsentrasjonen av citrullin stabil, mens mengden ornitin økte noe.

4.4.5.2 Kulturmilk

Konsentrasjonen av arginin, citrullin og ornitin ble undersøkt under fermentering og lagring av kulturmilk. Resultatene fra undersøkelsen er vist i figur 4.62.



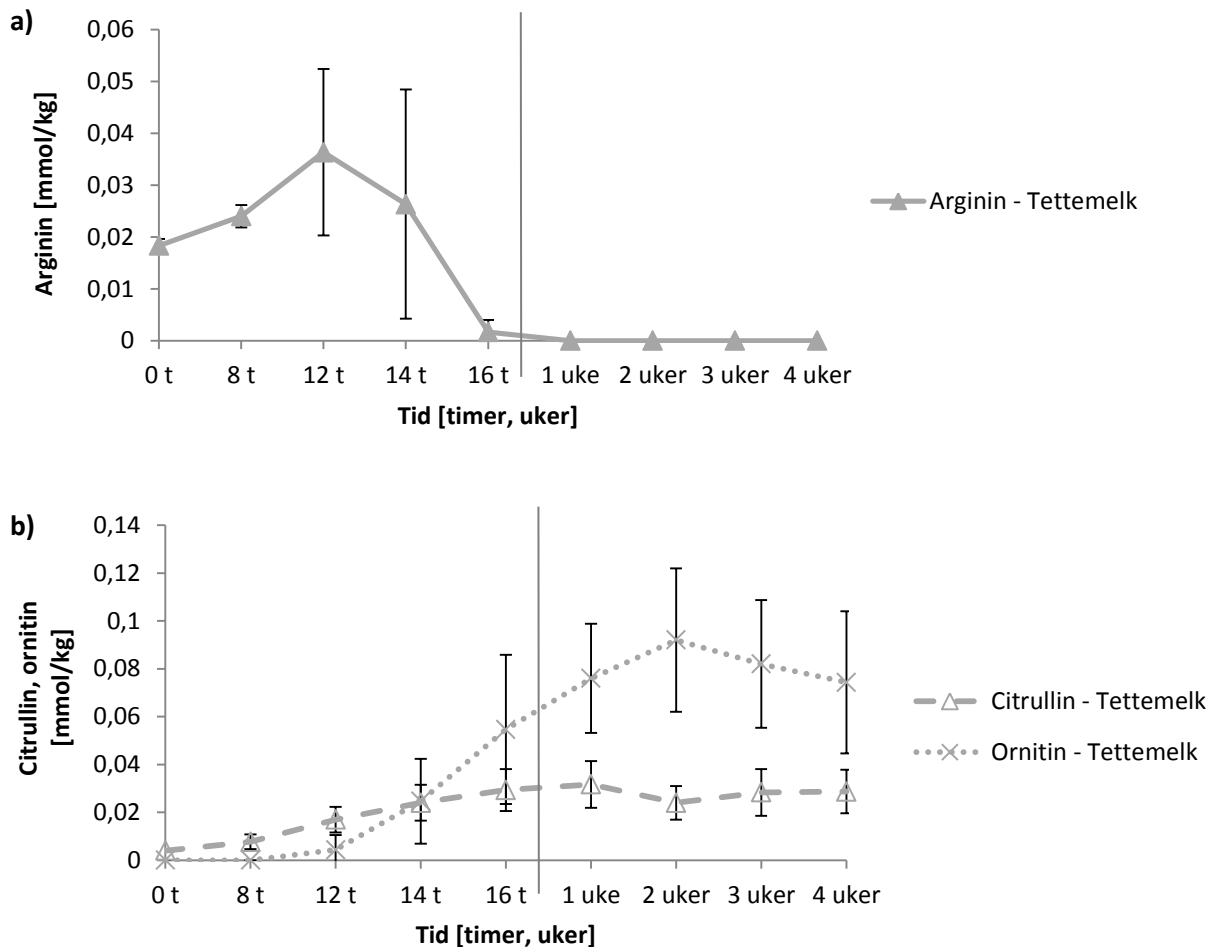
Figur 4.62 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av arginin, citrullin og ornitin under fermentering og lagring av kulturmilk.

Konsentrasjonen av arginin økte i løpet av de første 12 timene av fermenteringen (figur 4.62). Mellom 12 og 16 timers fermentering ble mengden arginin redusert med 0,054 mmol/kg, og under lagring ble det ikke detektert arginin i kulturmilken.

I følge figur 4.62 økte mengden av både citrullin og ornitin under fermentering av kulturmilk. Konsentrasjonen av citrullin økte svakt de første 14 timene av fermenteringen, og etter 16 timer ble den målt til 0,012 mmol/kg. Mengden ornitin økte med 0,096 i løpet av 16 timers fermentering. Konsentrasjonen av både citrullin og ornitin var stabil under lagring.

4.4.5.3 Tettemilk

Konsentrasjonen av arginin, citrullin og ornitin ble målt under fermentering og lagring av tettemilk. Resultatene er vist i figur 4.63.



Figur 4.63 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) **a)** arginin og **b)** citrullin og ornitin i tettemelk under fermentering og lagring.

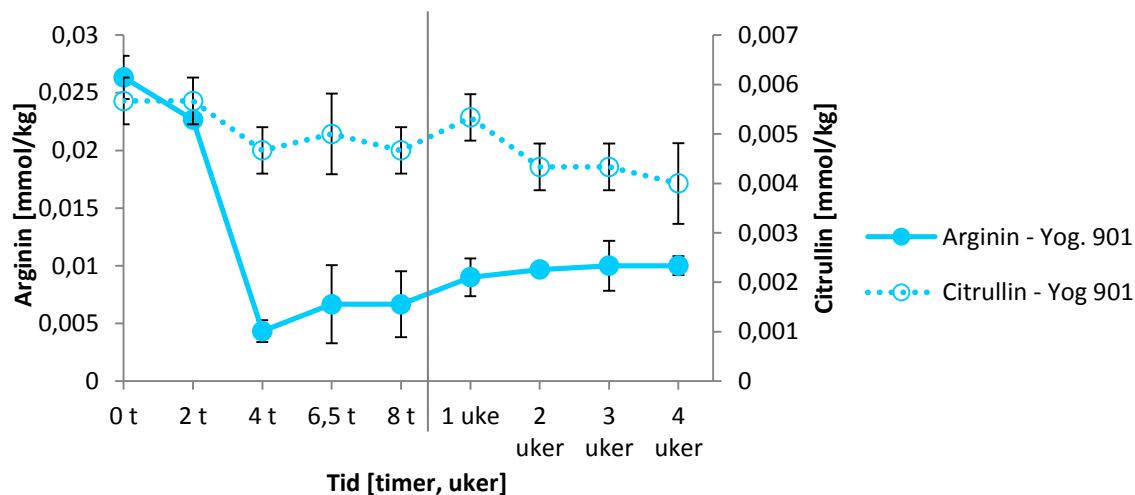
I følge figur 4.63 økte mengden arginin i tettemelk fra 0 til 12 timers fermentering. Fra 12 til 16 timer ble mengden redusert, og under lagring ble det ikke detektert arginin i tettemelk. Høyeste målte konsentrasjon av arginin var 0,036 mmol/kg etter 12 timer. Standardavvikene viste stor variasjon i konsentrasjon av arginin etter 12 og 14 timers fermentering.

Konsentrasjonen av citrullin og ornitin økte noe i tettemelk under hele fermenteringsforløpet, og mengden citrullin var stort sett stabil under lagring. Etter lagring i to uker var konsentrasjonen av citrullin og ornitin sammenlagt 0,11 mmol/kg, som er høyere enn maksimal mengde arginin målt. Standardavvikene viste stor variasjon i mengde citrullin og ornitin i tettemelk mellom forsøkene.

Innholdet av aminosyrene arginin, citrullin og ornitin ble også analysert i kommersiell tettemelk under lagring. Arginin ble ikke påvist i tettemelken fra 20 til 60 dagers lagring. Analysen viste at innholdet av citrullin og ornitin var uendret i samme periode. Til sammen utgjorde citrullin og ornitin en konsentrasjon på omtrent 0,12 mmol/kg.

4.4.5.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengden arginin, citrullin og ornitin ble målt i yoghurt syrnet med YF-L901 under fermentering og lagring. Det ble ikke funnet ornitin i yoghurten ved noen av analysetidspunktene. Resultatene fra måling av arginin og citrullin er presentert i figur 4.64.

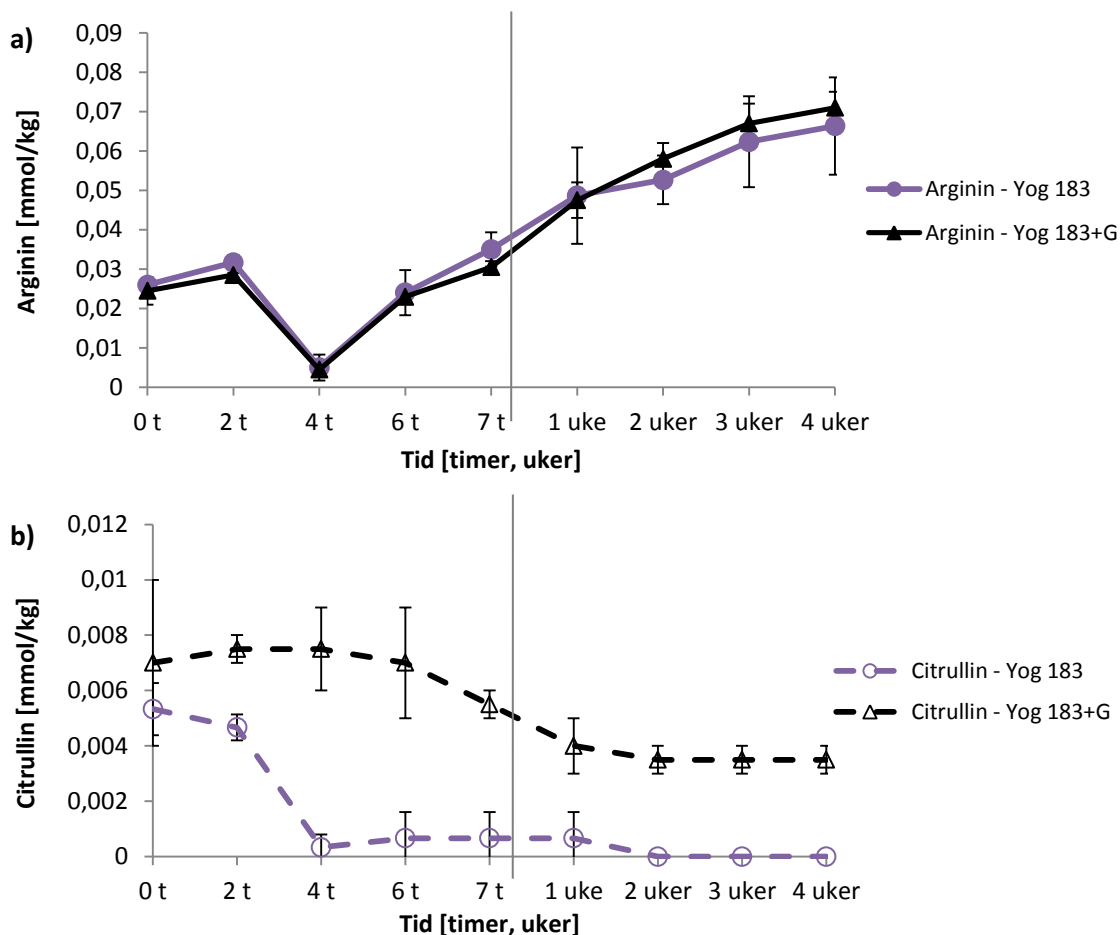


Figur 4.64 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) arginin og citrullin under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901.

I følge figur 4.64 ble mengden arginin i yoghurt redusert i løpet av de 4 første timene av fermenteringen. Konsentrasjonen var stort sett uendret under lagring. Etter lagring i 4 uker var konsentrasjonen av arginin 0,01 mmol/kg. Konsentrasjonen av citrullin ble noe redusert gjennom fermenteringen og lagringsperioden, men kun med en svært liten mengde, 0,001 mmol/kg.

4.4.5.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Mengde arginin, ornitin og citrullin ble målt i to varianter av yoghurt syrnet med YC-183, hvor den ene var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Ornitin ble ikke funnet ved noe tidspunkt i noen av variantene. Resultatene fra måling av arginin og citrullin er presentert i figur 4.65.



Figur 4.65 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av **a)** arginin og **b)** citrullin under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YC-183, og med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

I følge figur 4.65 økte mengde arginin i begge yoghurtvariantene i løpet av de to første timene under fermentering. Mellom 2 og 4 timers fermentering ble mengden arginin redusert med omtrent 0,025 mmol/kg i begge variantene, uten at det ble observert økning i mengde citrullin eller ornitin. Konsentrasjonen av arginin økte mellom 4 og 7 timers fermentering, og videre under lagring i begge variantene.

I yoghurtvarianten som ikke var tilsatt glutaminsyre ble den lille mengden citrullin påvist redusert i løpet av de fire første timene av fermenteringen. Gjennom de siste timene av fermenteringen, og i lagringsperioden, ble det målt liten eller ingen konsentrasjon av citrullin. I yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre ble det målt noe høyere verdier av citrullin.

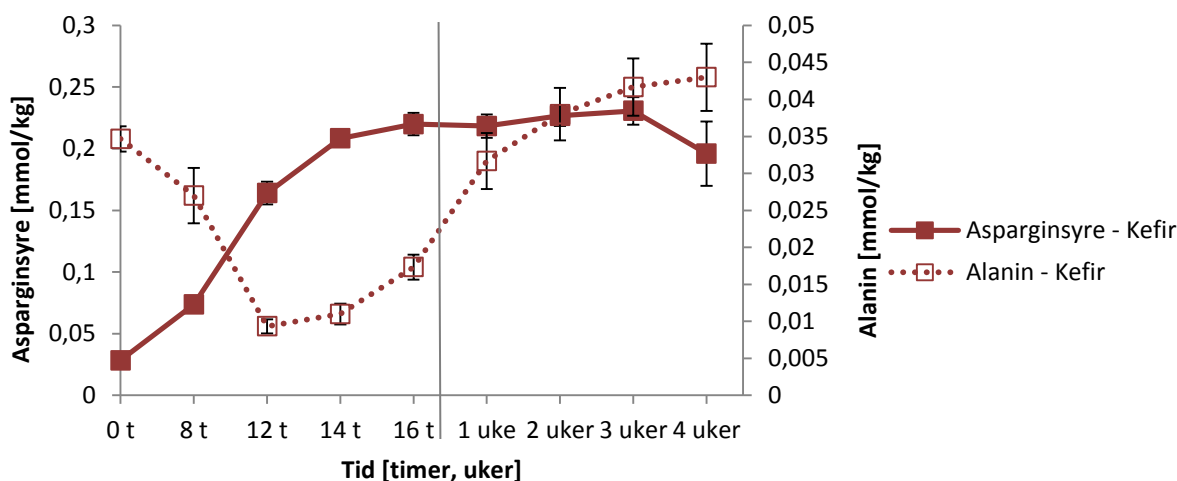
4.4.6 Asparaginsyre og alanin

Asparaginsyre kan dekarboksyleres til alanin, og dannes via deaminering av asparagin (Fernández & Zúñiga 2006). Via en transaminering kan asparaginsyre omdannes til

oxalacetat, og videre til pyruvat. Transaminering av alanin gir pyruvat (Le Bars & Yvon 2008). Se også figur 2.8.2 og 2.8.3.

4.4.6.1 Kefir

Konsentrasjonen av asparaginsyre og alanin ble målt under fermentering og lagring av kefir. Resultatene er vist i figur 4.66.



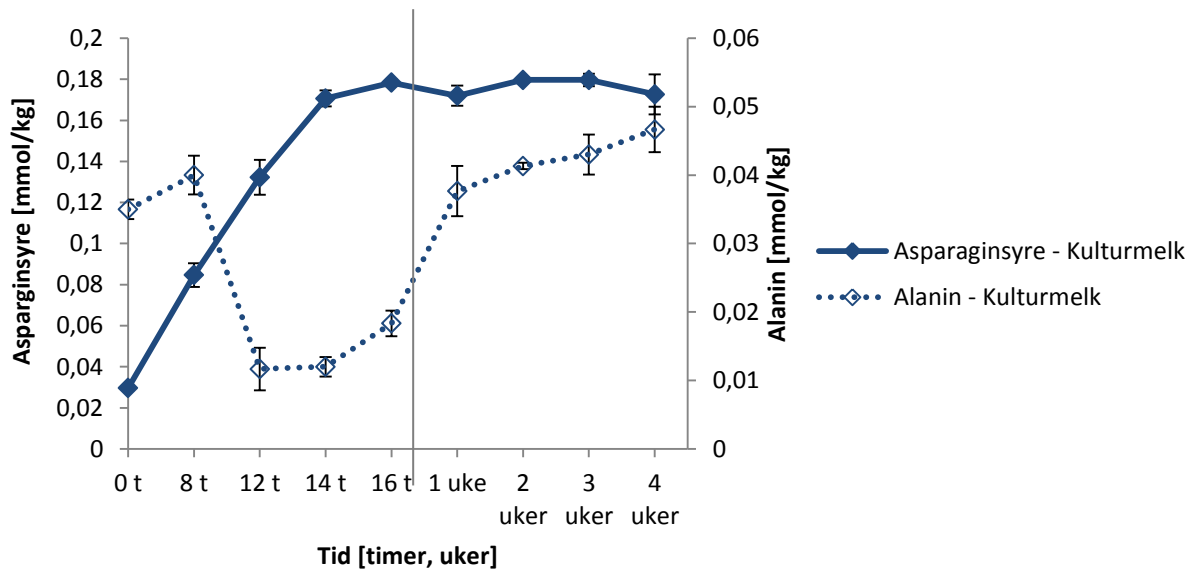
Figur 4.66 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) asparaginsyre og alanin i kefir under fermentering og lagring.

I følge figur 4.66 økte mengden asparaginsyre med 0,13 mmol/kg i løpet av de første 12 timene av fermenteringen. Mellom 12 og 16 timers fermentering økte mengden asparaginsyre ytterligere med 0,056 mmol/kg. Under lagring var konsentrasjonen av asparaginsyre stort sett uendret, men ble redusert med 0,035 mmol/kg den siste uken

I løpet av de 12 første timene av fermenteringen ble konsentrasjonen av alanin redusert med 0,025 mmol/kg. Mellom 12 og 16 timers fermentering økte mengden alanin i kefir med omtrent 0,008 mmol/kg. Konsentrasjonen av alanin økte til 0,043 mmol/kg i løpet av lagringsperioden.

4.4.6.2 Kulturmilk

Mengde asparaginsyre og alanin ble analysert under fermentering og lagring av kulturmilk. Resultatene er vist i figur 4.67.



Figur 4.67 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av asparaginsyre og alanin i kulturmelk under fermentering og lagring.

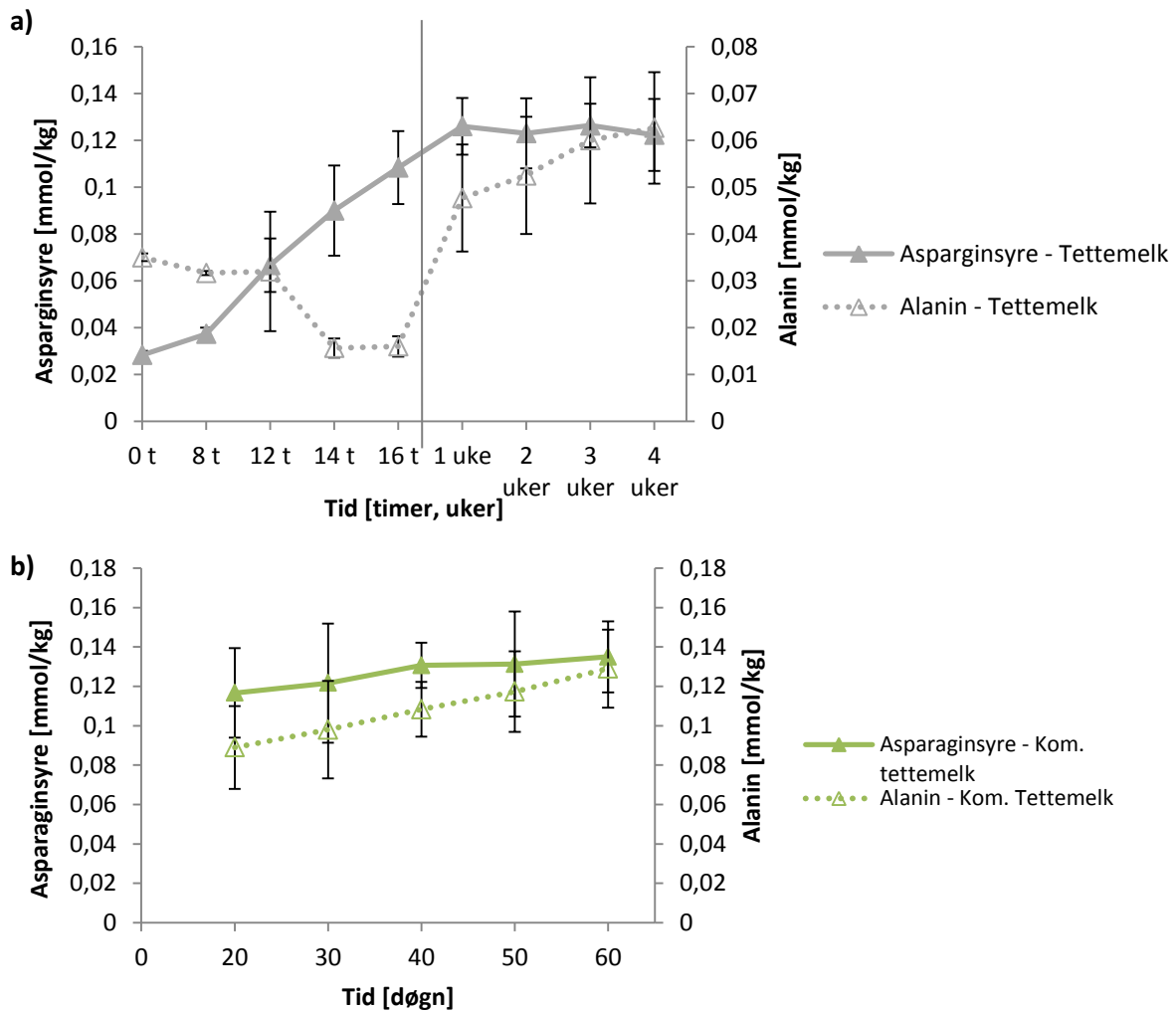
Konsentrasjonen av asparaginsyre økte, i følge figur 4.67, jevnt med omtrent 0,15 mmol/kg i løpet av fermenteringen. Mengden asparaginsyre var uendret gjennom lagringsperioden.

I de første 8 timene av fermenteringen økte mengde alanin i kulturmelk. Deretter ble mengden redusert med 0,03 mmol/kg i løpet av 4 timer. Mellom 12 og 16 timers fermentering økte konsentrasjonen av alanin til 0,018 mmol/kg. Mengden alanin økte også i løpet av den første uken under lagring, med nesten 0,02 mmol/kg. Under lagring avtok konsentrasjonsøkningen av alanin betydelig.

4.4.6.3 Tettemelk

Konsentrasjonen av asparaginsyre og alanin ble analysert under fermentering og lagring av tettemelk. Analysen ble også utført på kommersiell tettemelk under lagring i 60 dager.

Resultatene er presentert i figur 4.68.



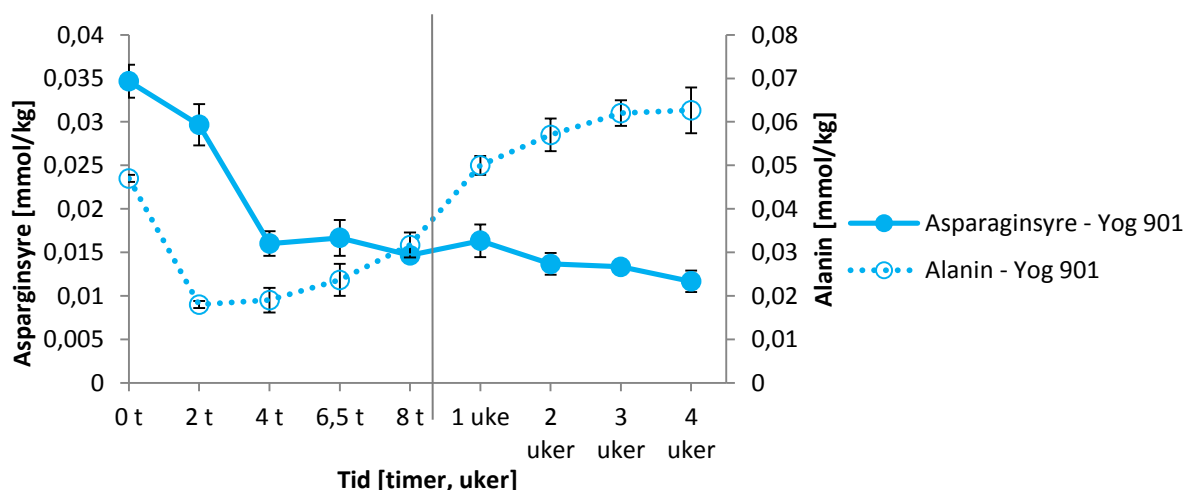
Figur 4.68 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) asparaginsyre og alanin i **a)** tettemelk under fermentering og lagring og **b)** kommersiell (kom.) tettemelk under lagring.

Ut fra figur 4.68 økte mengden asparaginsyre i tettemelk gjennom hele fermenteringsforløpet, til 0,1 mmol/kg. Under lagring var innholdet av asparaginsyre stabilt. Standardavvikene viste stor variasjon i mengde asparaginsyre mellom forsøkene. Mengden alanin sank i løpet av fermenteringen av tettemelk. Under lagring økte konsentrasjonen med 0,015 mmol/kg.

Mengde asparaginsyre i kommersiell tettemelk økte fra 0,11 mmol/kg ved 20 dager til 0,135 mmol/kg ved 60 dager (figur 4.68). Konsentrasjonen av alanin økte med 0,04 mmol/kg i samme periode. Standardavvikene for begge aminosyrene er store, men innholdet av de to aminosyrene var tydelig på ulikt nivå i de ulike produksjonene.

4.4.6.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengde asparaginsyre og alanin ble undersøkt under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901. Resultatene er presentert i figur 4.69.



Figur 4.69 Gjennomsnittskonsentrasjonen (mmol/kg) av asparaginsyre og alanin under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901.

I følge figur 4.69 ble mengden asparaginsyre redusert i løpet av de første fire timene av fermenteringen. Konsentrasjonen av asparaginsyre var uendret fra 4 til 8 timer. Under lagring ble mengde asparaginsyre redusert med 0,005 mmol/kg.

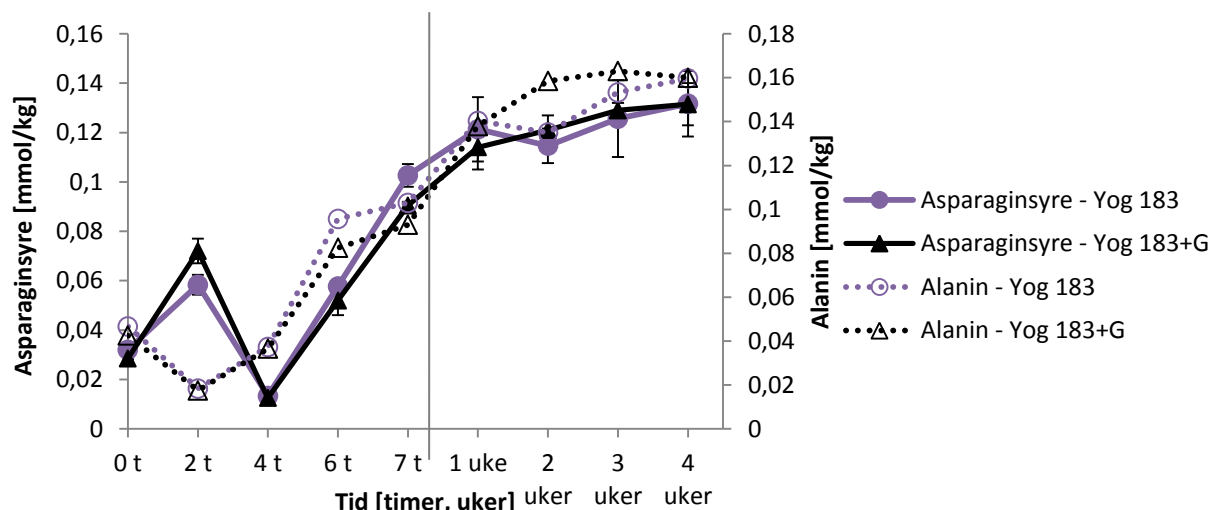
Under fermentering ble mengde alanin redusert fra 0 til 2 timer med 0,029 mmol/kg. Fra 2 til 8 timer økte konsentrasjonen av alanin med 0,013 mmol/kg. I løpet av den første uken under lagring økte alaninmengden videre med 0,019 mmol/kg. Etter 4 ukers lagring inneholdt yoghurten 0,06 mmol/kg alanin.

4.4.6.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Konsentrasjonen av asparaginsyre og alanin ble målt i to varianter av yoghurt inokulert med YC-183, hvor den ene var tilsatt glutaminsyre. Resultatene er vist i figur 4.70.

I følge figur 4.70 økte mengden asparaginsyre med omtrent 0,04 mmol/kg i begge variantene fra 0 til 2 timer. Fra 2 til 4 timer sank mengden asparaginsyre med 0,06 mmol/kg. Fra 4 til 7 timer økte konsentrasjonen med cirka 0,09 mmol/kg.

Mengde alanin sank i begge yoghurtvariantene fra 0 til 2 timer med omtrent 0,025 mmol/kg. Fra 2 til 7 timer økte konsentrasjonen med 0,085 mmol/kg i varianten uten glutaminsyretilsetning, og med 0,075 mmol/kg i varianten tilsatt glutaminsyre. Under lagring økte mengden alanin med 0,06 mmol/kg i varianten uten glutaminsyretilsetning. Varianten tilsatt glutaminsyre økte med 0,067 mmol/kg under lagring.



Figur 4.70 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av asparaginsyre og alanin under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YC-183, med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

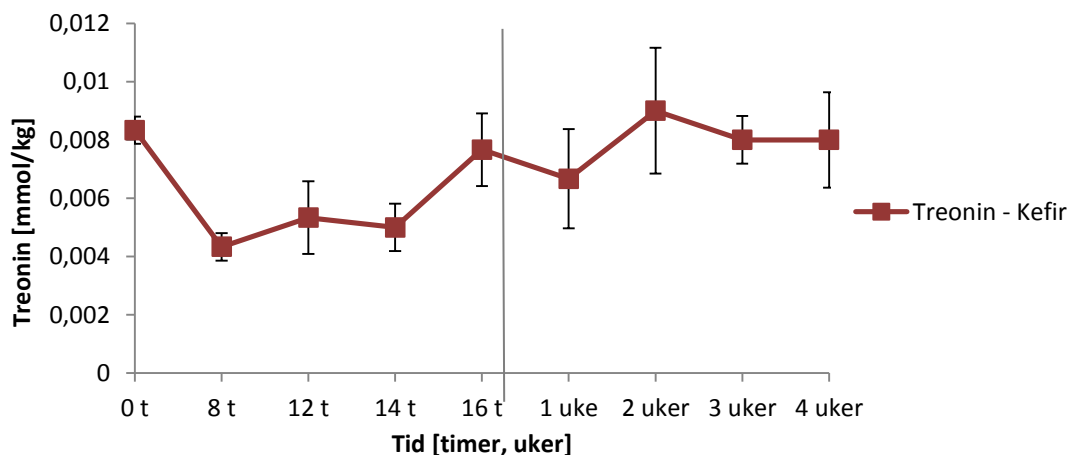
4.4.7 Treonin

Treonin kan splittes til glycin og acetaldehyd, eller deamineres til 2-ketobutanoat (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.3.

4.4.7.1 Kefir

Mengden treonin ble undersøkt i kefir under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.71.

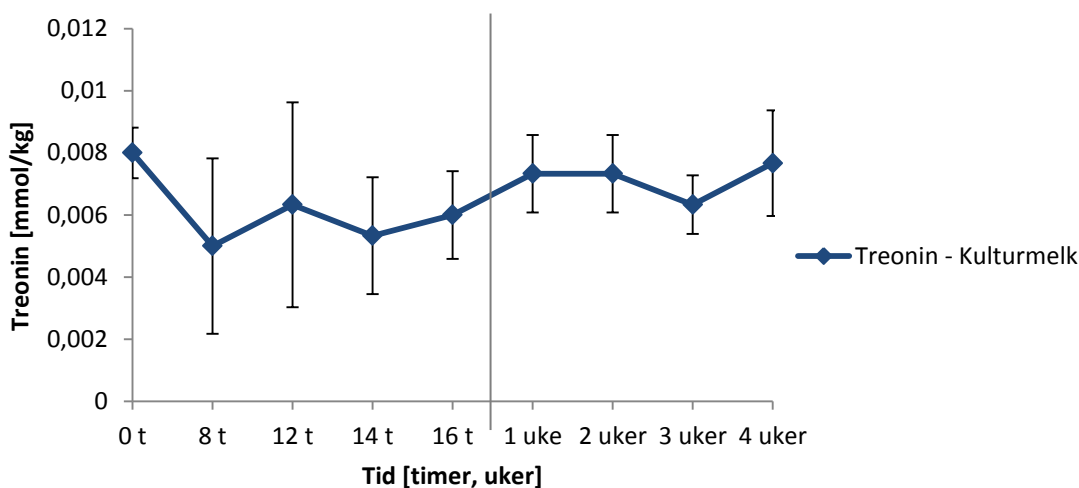
I følge figur 4.71 ble konsentrasjonen av treonin redusert med 0,004 mmol/kg fra 0 til 8 timers fermentering. Under lagring både økte og sank mengden treonin i kefir, men standardavvikene viser også ganske stor variasjon mellom forsøkene.



Figur 4.71 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av treonin i kefir under fermentering og lagring.

4.4.7.2 Kulturmilk

Innholdet av treonin i kulturmilk under fermentering og lagring ble undersøkt. Resultatene er presentert i figur 4.72.

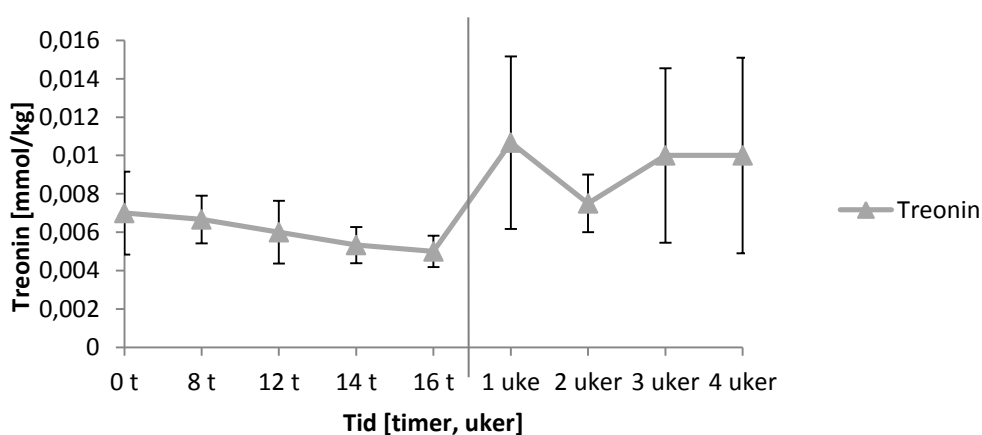


Figur 4.72 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) treonin i kulturmilk under fermentering og lagring.

Mengden treonin både økte og ble redusert under fermentering (figur 4.72). Under lagring var konsentrasjonen stort sett stabil. Standardavvikene viser stor variasjon mellom forsøkene.

4.4.7.3 Tettemilk

Konsentrasjonen av treonin ble målt i tettemilk, og resultatene er presentert i figur 4.73.



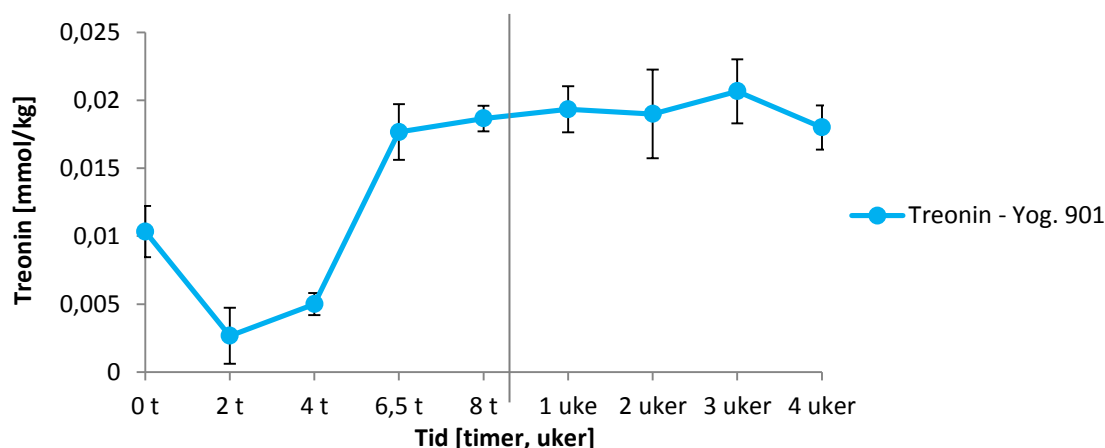
Figur 4.73 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av treonin under fermentering og lagring av tettemilk.

Ut fra figur 4.73 sank konsentrasjonen av treonin med 0,002 mmol/kg i løpet av 16 timers fermentering. Under lagring steg og sank mengden treonin, men standardavvikene viste stor variasjon mellom de ulike forsøkene.

Mengde treonin ble målt i kommersiell tettemelk under lagring ut holdbarhetstiden på 60 dager. Resultatene viste at konsentrasjonen av treonin økte jevnt fra 0,011 mmol/kg ved 20 dager til 0,036 mmol/kg ved 60 dagers lagring.

4.4.7.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Konsentrasjonen av treonin ble målt under fermentering og lagring av yoghurt med syrekultur YF-L901. Resultatet er vist i figur 4.74.



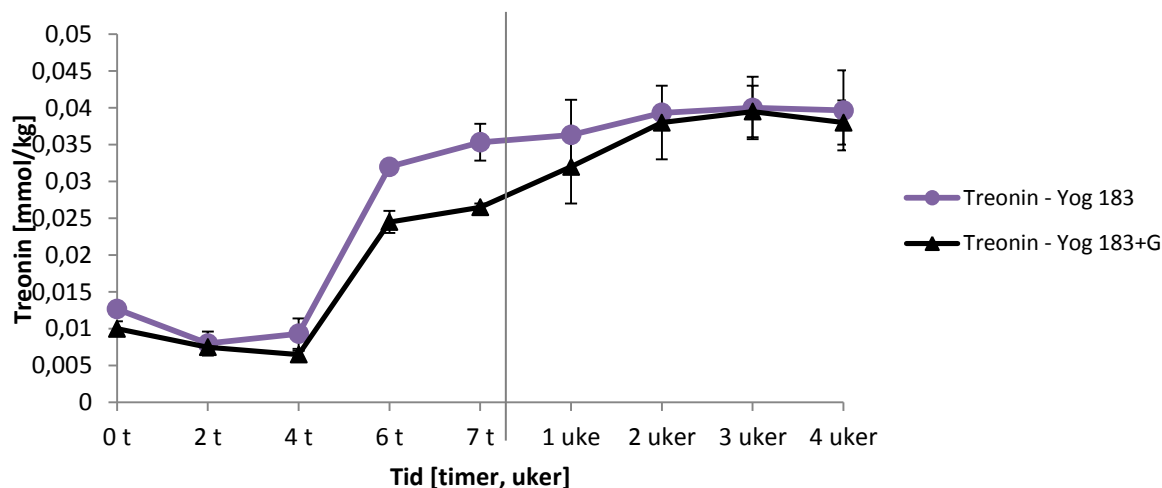
Figur 4.74 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av treonin under fermentering og lagring av yoghurt syret med YF-L901.

Konsentrasjonen av treonin ble i følge figur 4.74 redusert med 0,008 mmol/kg fra 0 til 2 timers fermentering. Fra 2 til 6,5 timers fermentering økte mengden treonin med 0,015 mmol/kg. I lagringsperioden var mengde treonin tilsynelatende uendret i yoghurt med syrekultur YF-L901.

4.4.7.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Mengde treonin under fermentering og lagring ble analysert i to yoghurtvarianter syret med YC-183, hvor den ene var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Resultatene er vist i figur 4.75.

I følge figur 4.75 sank mengden treonin i begge yoghurtvariantene med omtrent 0,003 mmol/kg fra 0 til 4 timer. Fra 4 til 7 timers fermentering økte konsentrasjonen av treonin med 0,026 mmol/kg i yoghurt uten glutaminsyretilsetning, og med 0,02 mmol/kg i varianten tilsatt glutaminsyre. Under lagring av yoghurt uten tilsetning av glutaminsyre var konsentrasjonen stabil. I yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre økte mengde treonin i løpet av de to første ukene under lagring. Fra 2 til 4 uker var konsentrasjonen uendret.



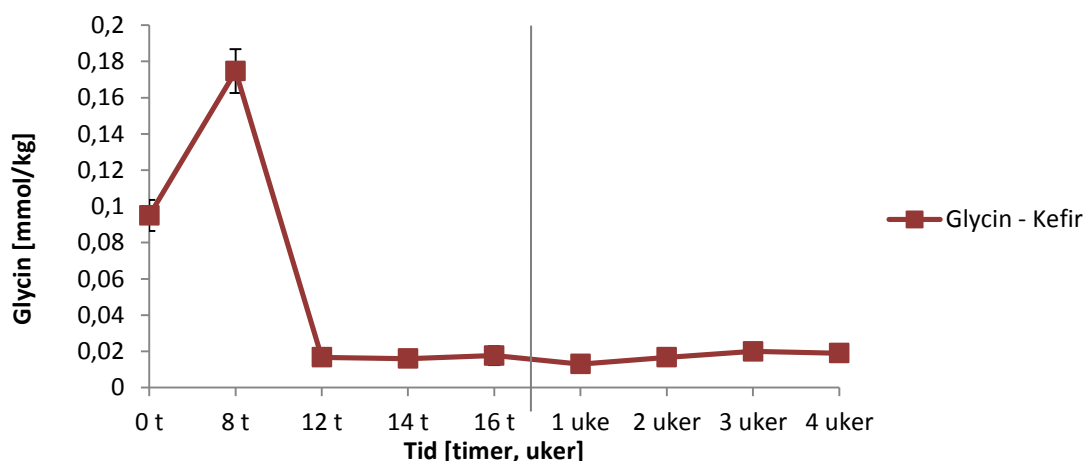
Figur 4.75 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av treonin under fermentering av yoghurt med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg) og syrning med YC-183.

4.4.8 Glycin

Konsentrasjonen av glycin ble målt i kefir, kulturmilk, tettemelk og yoghurt med to ulike syrekulturer. Som nevnt i 4.5.7, kan glycin dannes ved nedbrytning av treonin (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.3.

4.4.8.1 Kefir

Konsentrasjonen av glycin ble målt i kefir under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.76.



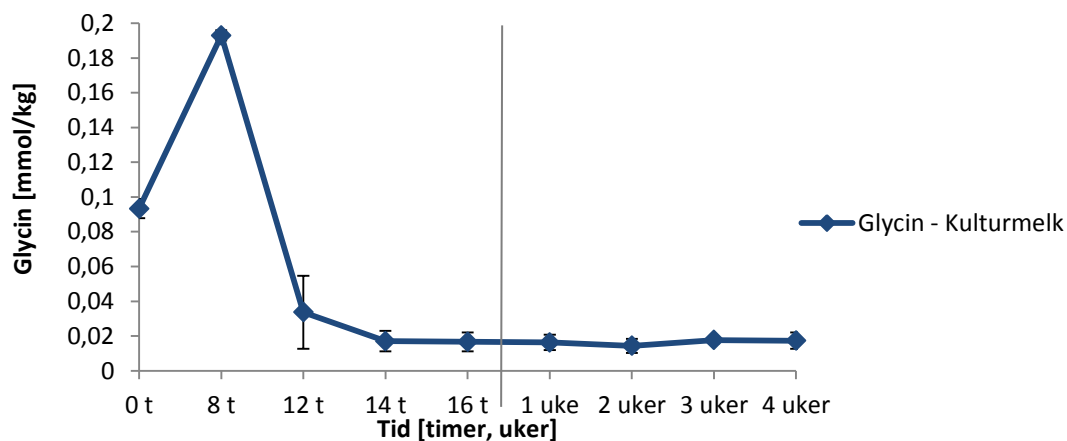
Figur 4.76 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av glycin i kefir under fermentering og lagring.

Konsentrasjonen av glycin i kefir økte fra 0,1 til 0,17 mmol/kg de første 8 timene av fermentering (figur 4.76). Fra 8 til 12 timers fermentering av ble mengden glycin redusert

med 0,15 mmol/kg. Fra 12 til 16 timers fermentering, og gjennom hele lagringsperioden, var konsentrasjonen av glycin stabil på omtrent 0,016 mmol/kg.

4.4.8.2 Kulturmilk

Under fermentering og lagring av kulturmilk ble mengden glycin undersøkt. Resultatet fra undersøkelsen er vist i figur 4.77.

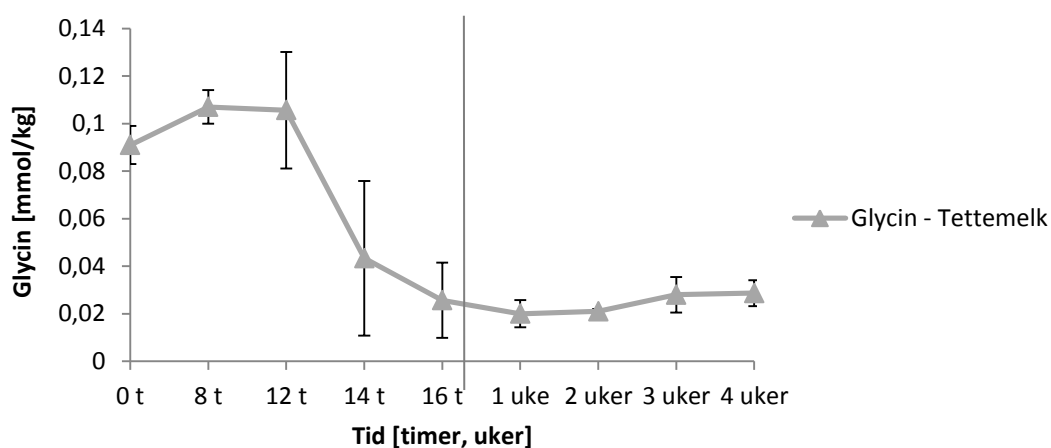


Figur 4.77 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av glycin under fermentering og lagring av kulturmilk.

I følge figur 4.77 økte mengden glycin fra 0 til 8 timers fermentering, med 0,1 mmol/kg. Fra 8 til 14 timers fermentering sank mengden glycin fra 0,19 til 0,017 mmol/kg. Under resten av fermenteringen og under lagring var konsentrasjonen konstant.

4.4.8.3 Tettemilk

Konsentrasjonen av glycin ble analysert under fermentering og lagring av tettemilk. Resultatene er vist i figur 4.78.



Figur 4.78 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) glycin i tettemilk gjennom fermentering og lagring.

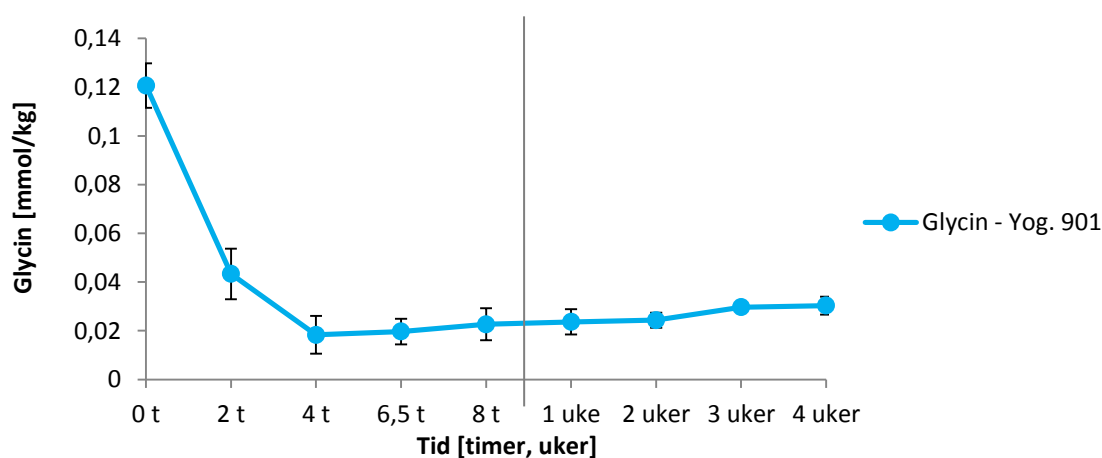
Ut fra figur 4.78 steg konsentrasjonen av glycin i løpet av de 8 første timene av fermenteringsforløpet. Under resten av forløpet ble mengden redusert. Under lagring viste konsentrasjonen av glycin en svak økning mellom 2 og 3 ukers lagring. Standardavvikene viser store variasjoner i konsentrasjon av glycin i tettemelk etter 12 og 14 timers fermentering.

Mengden glycin i kommersiell tettemelk under lagring ble analysert. Konsentrasjonen av glycin økte fra 0,018 til 0,031 mmol/kg under lagring fra 20 til 40 dager, og var stabil frem til 60 dagers lagring. Standardavvikene viste stor variasjon i mengde glycin mellom produksjonene ved 40 dagers lagring.

4.4.8.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Glycinkonsentrasjonen ble undersøkt under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901. Resultatene er presentert i figur 4.79.

Konsentrasjonen av glycin i yoghurten sank fra 0,12 mmol/kg ved 0 timer til 0,018 mmol/kg ved 4 timer, og var uendret frem til fermenteringsslutt (figur 4.79). Under lagring økte mengden glycin svakt til 0,03 mmol/kg etter 4 uker.



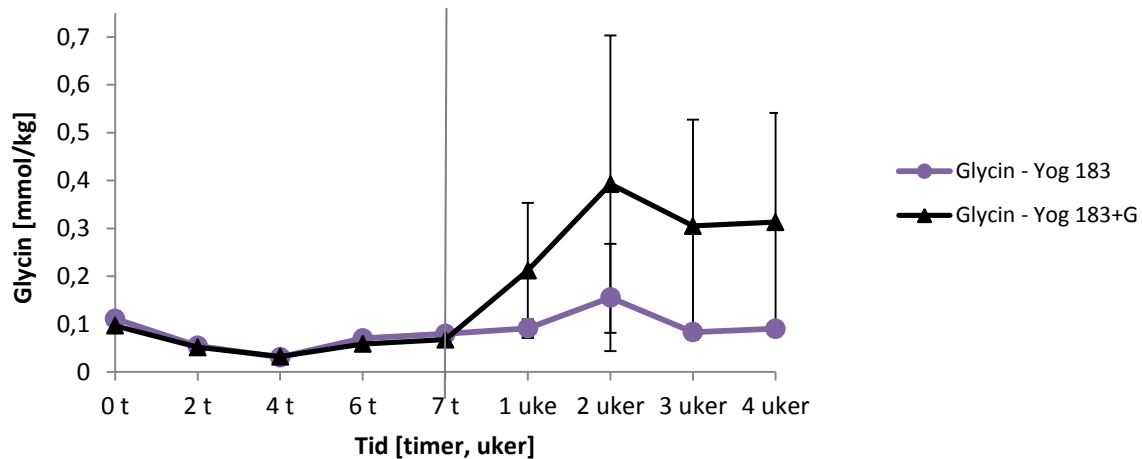
Figur 4.79 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av glycin gjennom fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901.

4.4.8.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Mengden glycin i to yoghurtvarianter syrnet med YC-183, hvor en var tilsatt glutaminsyre, ble undersøkt. Resultatene vises i figur 4.80.

I yoghurtvarianten uten tilsetning av glutaminsyre sank mengden glycin fra 0,11 mmol/kg til 0,03 mmol/kg fra 0 til 4 timers fermentering (figur 4.80). Fra 4 til 7 timer økte mengden

glycin til 0,08 mmol/kg. Konsentrasjonen økte til 0,09 mmol/kg gjennom den første uka under lagring. Resten av lagringsperioden var konsentrasjonen stabil. I yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre sank konsentrasjonen av glycin fra 0,096 til 0,032 mmol/kg de første 4 timene av fermenteringen. Fra 4 til 7 timer økte mengden til 0,067 mmol/kg. Under lagring økte mengden glycin frem til 2 uker, og flatet deretter ut.



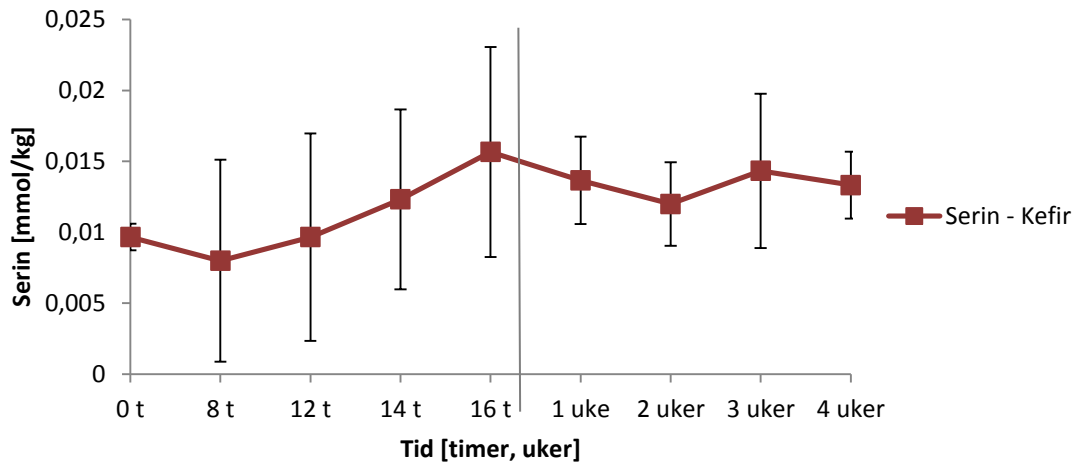
Figur 4.80 Gjennomsnittlig mengde (mol/kg) glycin under fermentering og lagring av yoghurt med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg), og inokulert med YC-183.

4.4.9 Serin

Konsentrasjonen av serin ble målt i kefir, kulturmilk, tettemilk og yoghurt med to ulike syrekulturer. I tillegg ble mengde serin målt i kommersiell tettemilk. Serin kan blant annet deamineres til pyruvat (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.3.

4.4.9.1 Kefir

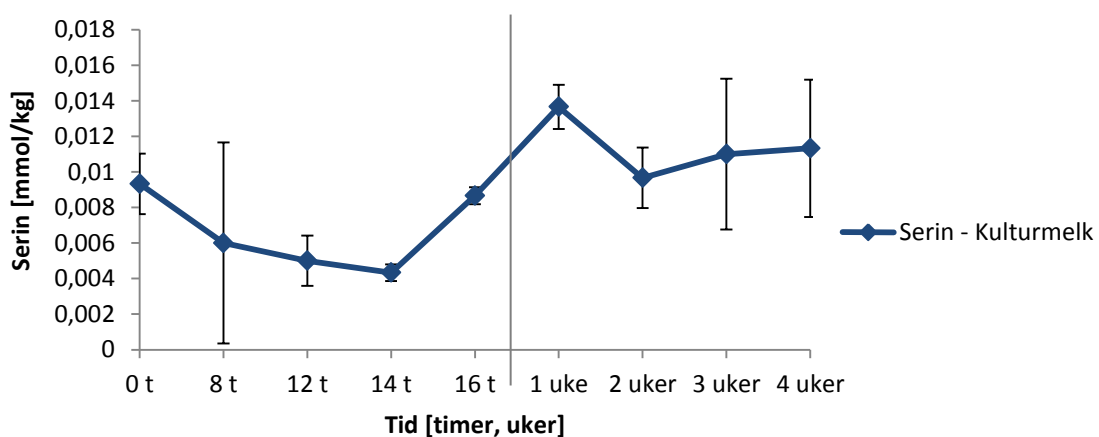
Konsentrasjonen av serin i kefir under fermentering og lagring ble analysert. Resultatene er presentert i figur 4.81. Ut fra figuren økte og sank konsentrasjonen av serin i kefir under fermentering og lagring. Standardavvikene viste store variasjoner mellom de tre forsøkene i forhold til mengde serin.



Figur 4.81 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) av serin i kefir under fermentering og lagring.

4.4.9.2 Kulturmilk

Under fermentering og lagring av kulturmilk ble konsentrasjonen av serin undersøkt. Resultatene er vist i figur 4.82.



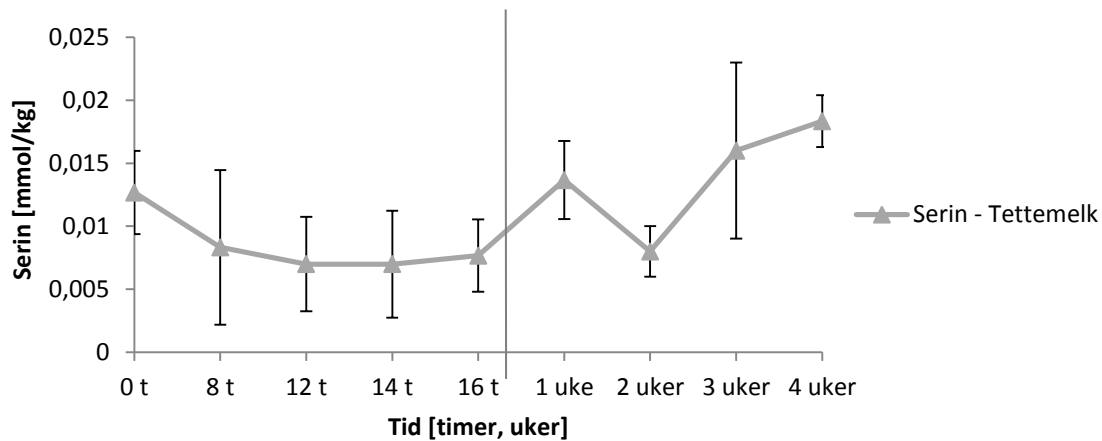
Figur 4.82 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av serin i kulturmilk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.82 sank konsentrasjonen av serin frem til 14 timers fermentering, før den økte til 0,008 mmol/kg etter 16 timers fermentering. Under lagring steg og sank mengden serin, men standardavvikene viser variasjon mellom forsøkene.

4.4.9.3 Tettemilk

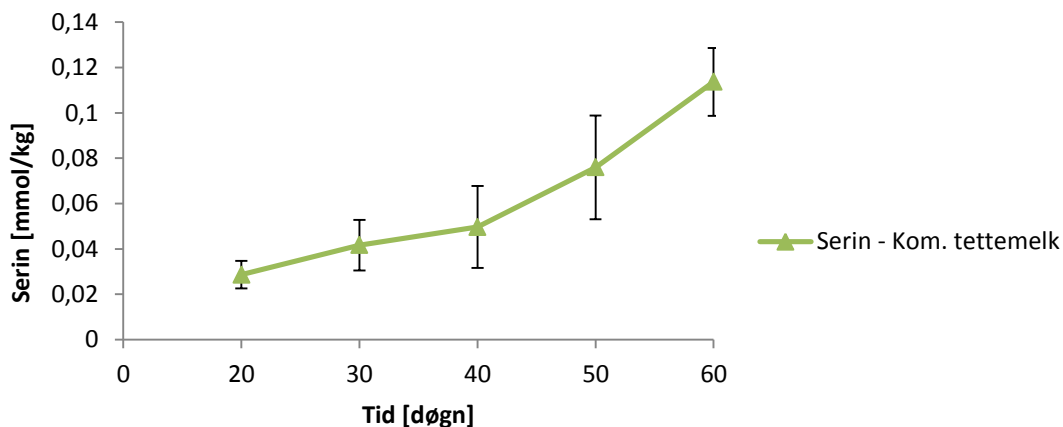
Konsentrasjonen av serin ble analysert under fermentering og lagring av tettemilk. Resultatene er vist i figur 4.83.

Ut fra figur 4.83 ble mengden serin noe redusert under fermentering av tettemilk. Under lagring både økte og sank konsentrasjonen. Standardavvikene viste stor variasjon i mengde serin mellom forsøkene.



Figur 4.83 Gjennomsnittlig mengde (mmol) serin under fermentering og lagring av tettemelk.

Kommersiell tettemelk har en holdbarhet på 60 dager, og konsentrasjonen av serin ble målt fra 20 til 60 dagers lagring. Resultatene er vist i figur 4.84.



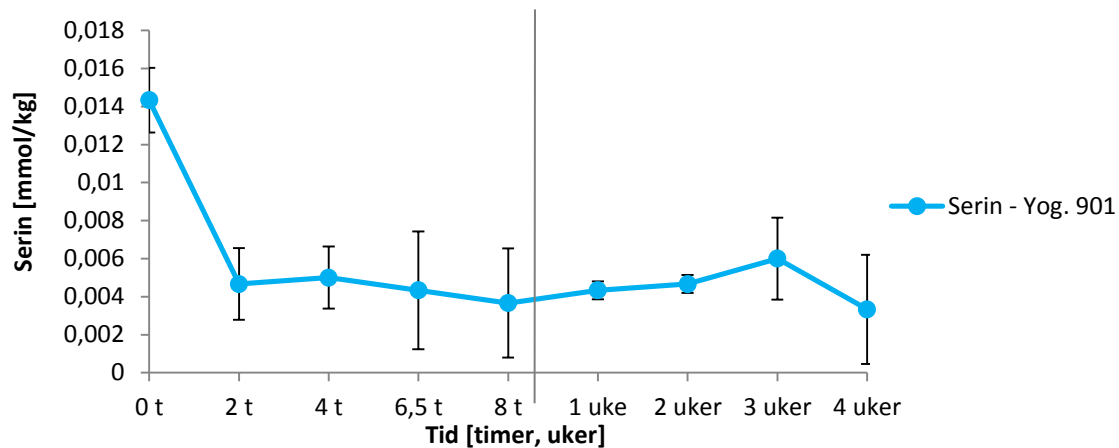
Figur 4.84 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av serin gjennom lagring av kommersiell tettemelk. Kom., kommersiell.

Mengden serin i kommersiell tettemelk økte, i følge figur 4.84, fra 0,028 til 0,11 mmol/kg under lagring i 20 til 60 dager.

4.4.9.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

I figur 4.85 er resultatene fra måling av serin under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901 vist.

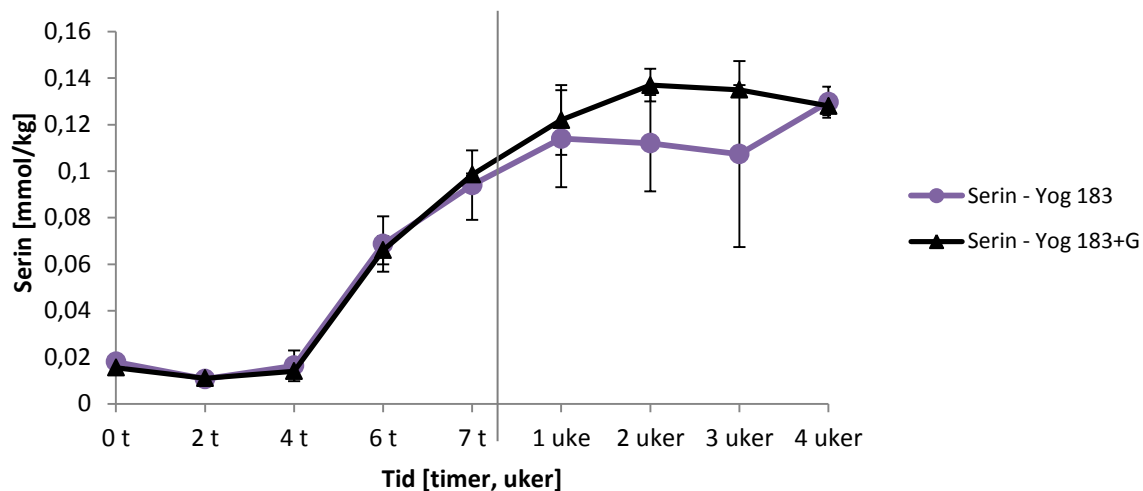
Ut fra figur 4.85 sank konsentrasjonen av serin i yoghurt med YF-L901 fra 0,014 til 0,004 mmol/kg i løpet av de to første timene av fermenteringen. Gjennom resten av fermenteringen og under lagring var den gjennomsnittlige konsentrasjonen omtrent uendret, men standardavvikene viser at det var stor variasjon i mengde serin mellom de tre forsøkene.



Figur 4.85 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av serin under fermentering og lagring av yoghurt syrnet med YF-L901.

4.4.9.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Det ble målt mengde serin i to varianter av yoghurt med YC-183. Den ene varianten var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Resultatene fra målinger under fermentering og lagring er vist i figur 4.86.



Figur 4.86 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) serin i yoghurt syrnet med YC-183, med og uten tilsetning av glutaminsyre G; (3 mmol/kg).

I følge figur 4.86 var det en svak reduksjon i mengde serin i begge yoghurtvariantene fra 0 til 2 timer fermentering. Fra 2 til 4 timer økte konsentrasjonen med 0,003 mmol/kg. Fra 4 til 7 timer økte mengden serin raskt til omtrent 0,1 mmol/kg i begge yoghurttypene.

Under lagring, fra 7 timer til 4 uker, økte mengden serin ytterligere, med ca. 0,028 i begge variantene. Etter lagring i 4 uker var konsentrasjonen 0,128 mmol/kg i begge yoghurtvariantene.

4.4.10 Metionin

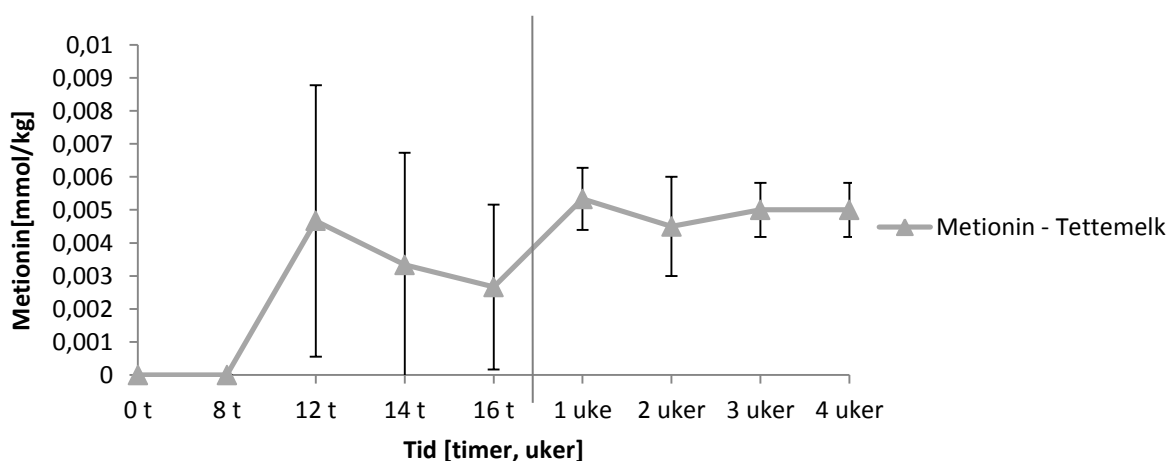
Konsentrasjonen av metionin ble analysert i kefir, kulturmilk, tettemilk og yoghurt. Metionin kan blant annet omdannes til aromakomponentene dimetyldisulfid og dimetyltrisulfid via eliminering til metantiol (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.4.

4.4.10.1 Kefir og kulturmilk

Konsentrasjonen av metionin ble analysert under fermentering og lagring av kefir og kulturmilk. Metionin ble kun detektert ved 8 timer fermentering, og konsentrasjonen var på ca. 0,01 mmol/kg i begge produktene. Det ble også detektert lave mengder i kulturmilk etter 12 timer, men standardavviket viste stor variasjon i mengden metionin mellom forsøkene.

4.4.10.2 Tettemilk

Konsentrasjonen av metionin ble analysert under fermentering og lagring av tettemilk. Resultatene er vist i figur 4.87.



Figur 4.87 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av metionin i tettemilk under fermentering og lagring.

I følge figur 4.87 både økte og sank konsentrasjonen av metionin under fermentering av tettemilk. Standardavviket viste store variasjoner i mengde metionin mellom forsøkene. Under lagring var mengden metionin stabil på omtrent 0,005 mmol/kg

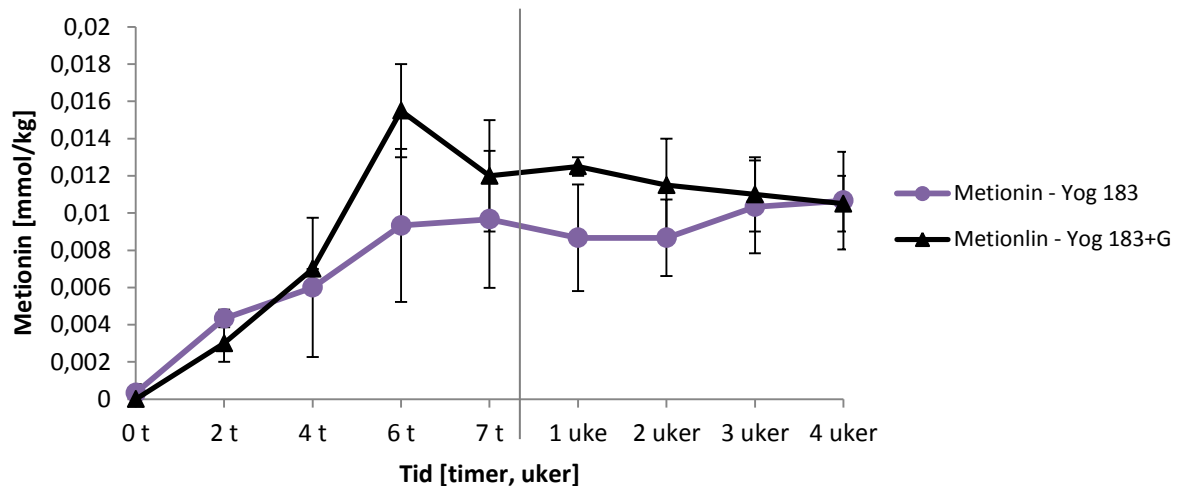
Under lagring av kommersiell tettemilk økte mengden metionin jevnt fra 0,008 til 0,03 mmol/kg fra 20 til 60 dager.

4.4.10.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Det ble ikke detektert metionin i yoghurt med syrekultur YF-L901.

4.4.10.5 Yoghurt med syrekultur YC-183

Konsentrasjonen av metionin ble målt i to varianter av yoghurt med syrekultur YC-183, hvor den ene var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Resultatene er vist i figur 4.88.



Figur 4.88 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) metionin i yoghurt syrnet med YC-183, med og uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

Konsentrasjonen av metionin økte, i følge figur 4.88, under fermenteringsforløpet i begge variantene. Standardavvikene viste variasjon i mengde metionin mellom forsøkene for begge variantene.

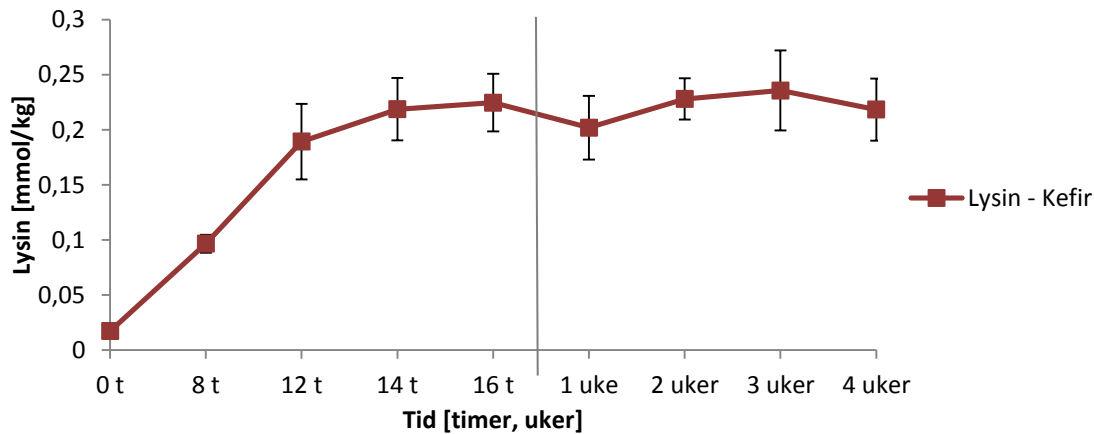
4.4.11 Lysin

Lysin kan via dekarboksylering omdannes til det biogene aminet cadaverin (Fernández & Zúñiga 2006). Gjennom fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemilk og to yoghurttyper med ulik syrekultur, ble mengden lysin målt.

4.4.11.1 Kefir

Lysinkonsentrasjonen ble målt i kefir under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.89.

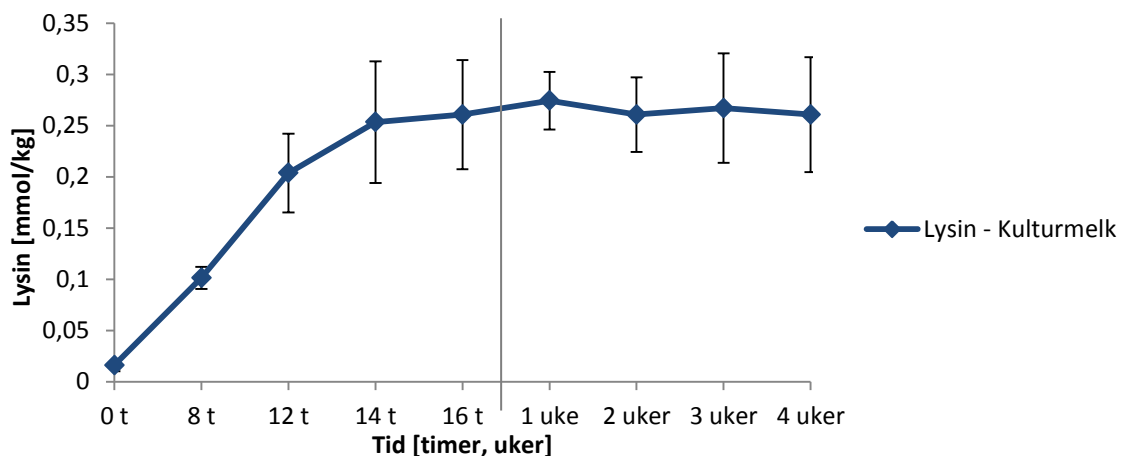
Under fermentering av kefir økte konsentrasjonen av lysin jevnt (figur 4.89) de første 12 timene, før økningen avtok. Under lagring var mengde lysin stabil, på omtrent 0,22 mmol/kg.



Figur 4.89 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av lysin i kefir under fermentering og lagring.

4.4.11.2 Kulturmilk

I kulturmilk ble mengden lysin undersøkt under fermentering og lagring. Resultatene er presentert i figur 4.90.



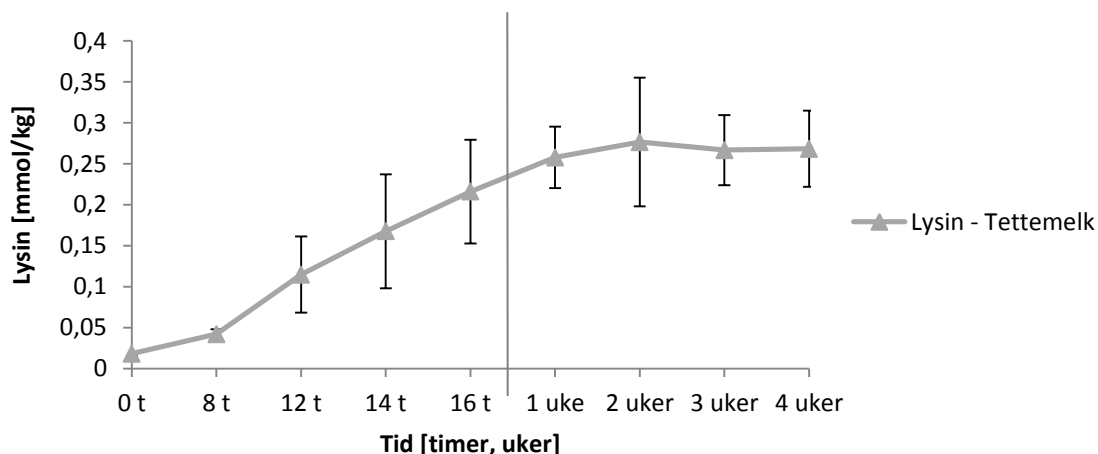
Figur 4.90 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av lysin under fermentering og lagring av kulturmilk.

I følge figur 4.90 økte mengden lysin i kulturmilk i løpet av de første 12 timene, før økningen avtok. Under lagring var mengden lysin stort sett uendret. Store standardavvik viser variasjon mellom forsøkene ved slutten av fermenteringen og under lagring.

4.4.11.3 Tettmelk

Konsentrasjonen av lysin ble målt i tettmelk under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.91.

Konsentrasjonen av lysin steg jevnt under fermentering av tettmelk (figur 4.91). Under lagring var mengden omtrent uendret. Standardavvikene viste stor variasjon i mengde lysin mellom de ulike forsøkene.



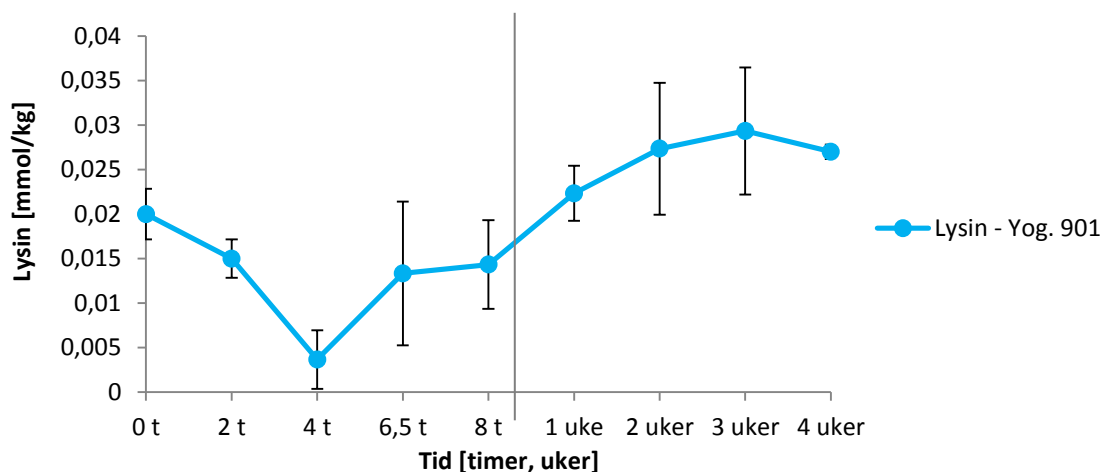
Figur 4.91 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) lysin i tettemelk under fermentering og lagring.

Det ble gjort analyser på kommersiell tettemelk under lagring for å måle konsentrasjonen av lysin. Analysene viste at mengden lysin var stabil på omtrent 0,19 mmol/kg i kommersiell tettemelk fra 20 til 60 dagers lagring.

4.4.11.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Mengden lysin ble undersøkt i yoghurt syrnet med YF-L901. Resultatene er vist i figur 4.92.

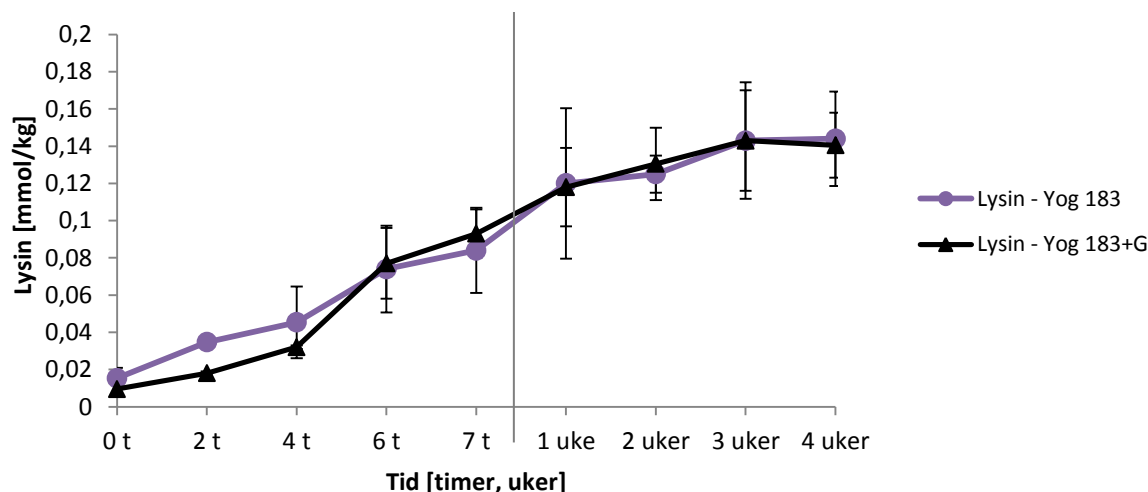
I yoghurt syrnet med YF-L901 ble mengden lysin redusert med 0,017 mmol/kg fra 0 til 4 timer fermentering (figur 4.92). Fra 4 til 8 timer fermentering økte mengden lysin, noe som fortsatte under lagring. Standardavvikene viser at det var større variasjon mellom forsøkene under slutten av både fermentering og lagring, enn ved de 4 første timene av fermenteringen.



Figur 4.92 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av lysin under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YF-L901.

4.4.11.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Det ble laget to varianter av yoghurt med syrekultur YC-183, hvor den ene var tilsatt 3 mmol/kg glutaminsyre. Mengden lysin ble undersøkt under fermentering og lagring av de to variantene, og resultatene er vist i figur 4.93.



Figur 4.93 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) lysin under fermentering og lagring av yoghurt syrnert med YC-183, med eller uten tilsetning av glutaminsyre (3 mmol/kg).

I følge figur 4.93 økte mengden lysin jevnt i begge yoghurtvariantene gjennom fermentering og lagring. Standardavvikene viser større variasjon mellom forsøkene under lagring enn under fermentering.

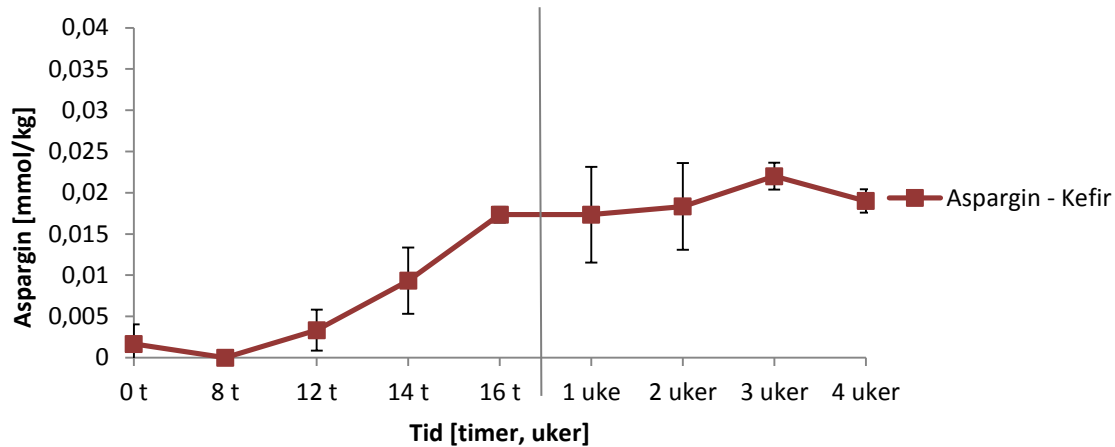
4.4.12 Asparagin

Det ble tatt målinger av asparagin under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemilk og yoghurt med to ulike syrekulturer. Mengden asparagin ble også målt i kommersiell tettemilk under lagring. Asparagin kan omsettes til asparaginsyre og ammoniakk (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.2.

4.4.12.1 Kefir

Under fermentering og lagring av kefir ble mengde asparagin målt. Resultatene er vist i figur 4.94.

Konsentrasjonen av asparagin økte fra 8 til 16 timers fermentering (figur 4.94). Under lagring var mengden asparagin stort sett stabil på 0,017 mmol/kg de to første ukene. Mellom 2 og 3 uker økte mengden med 0,004 mmol/kg.

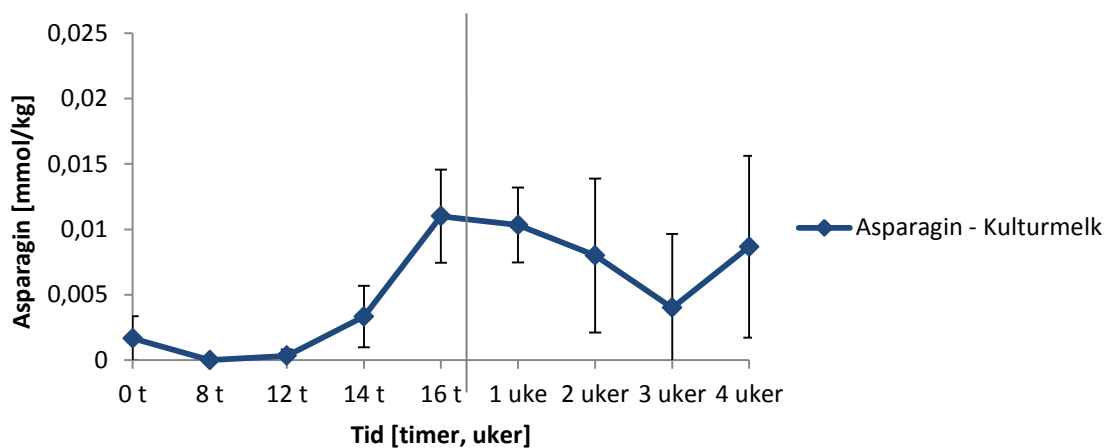


Figur 4.94 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av asparagin i kefir under fermentering og lagring.

4.4.12.2 Kulturmilk

Mengden asparagin ble målt under fermentering og lagring av kulturmilk. Resultatene er vist i figur 4.95.

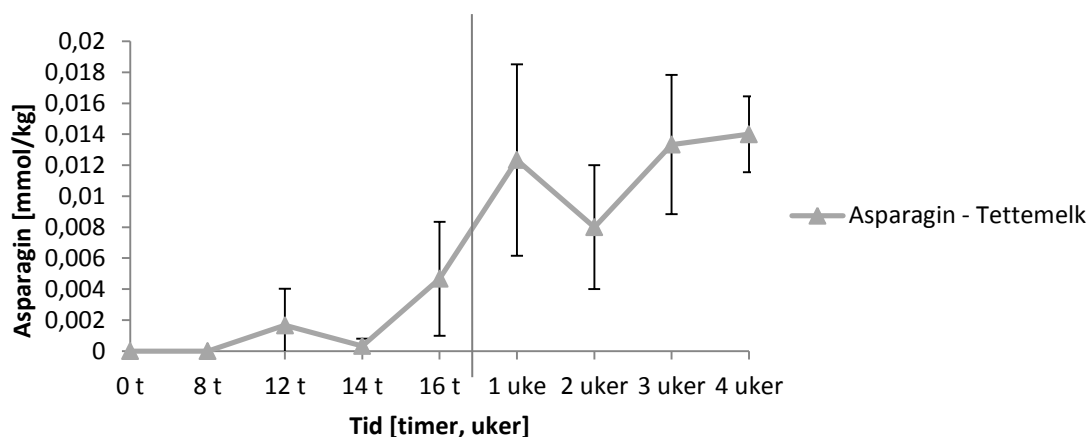
I kulturmilk økte mengden asparagin til 0,011 mmol/kg fra 12 til 16 timer fermentering i følge figur 4.95. Under lagring ble konsentrasjonen redusert til 0,004 mmol/kg i løpet av 3 uker. Fra 3 til 4 uker økte asparaginmengden til 0,008 mmol/kg. Standardavvikene viser stor variasjon under lagring mellom forsøkene.



Figur 4.95 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) asparagin i kulturmilk under fermentering og lagring.

4.4.12.3 Tettemilk

Under fermentering og lagring av tettemilk ble konsentrasjonen av asparagin analysert. Resultatene er vist i figur 4.96.



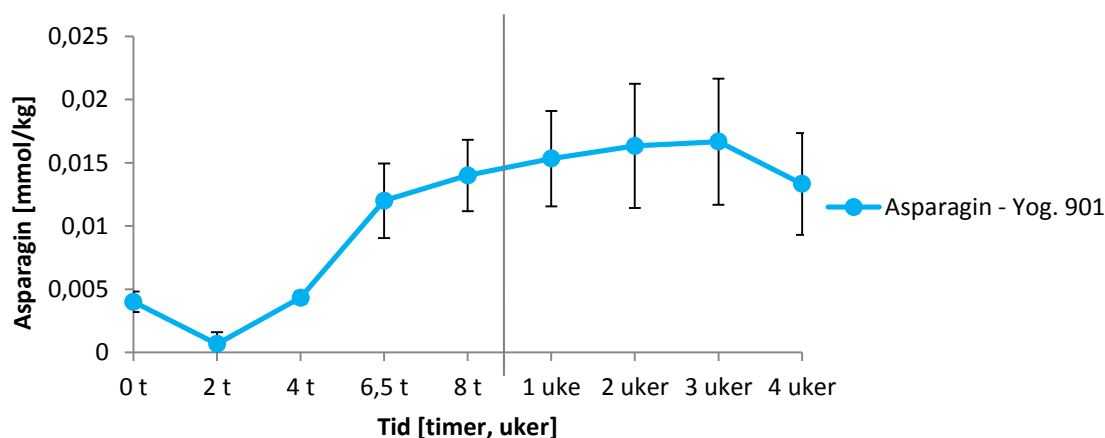
Figur 4.96 Gjennomsnittlig konsentrasjoner (mmol/kg) av asparagin gjennom fermentering og lagring av tettemelk.

I følge figur 4.96 økte konsentrasjonen av asparagin i løpet av de siste timene under fermenteringen. Under lagring både økte og sank konsentrasjonen av asparagin. Standardavviket viste stor variasjon mellom forsøkene i mengde asparagin under lagring.

I løpet av lagring fra 20 til 60 dager økte konsentrasjonen av asparagin jevnt i kommersiell tettemelk fra 0,02 til 0,07 mmol/kg.

4.4.12.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Konsentrasjonen av asparagin ble målt under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YF-L901. Resultatene er presentert i figur 4.97.



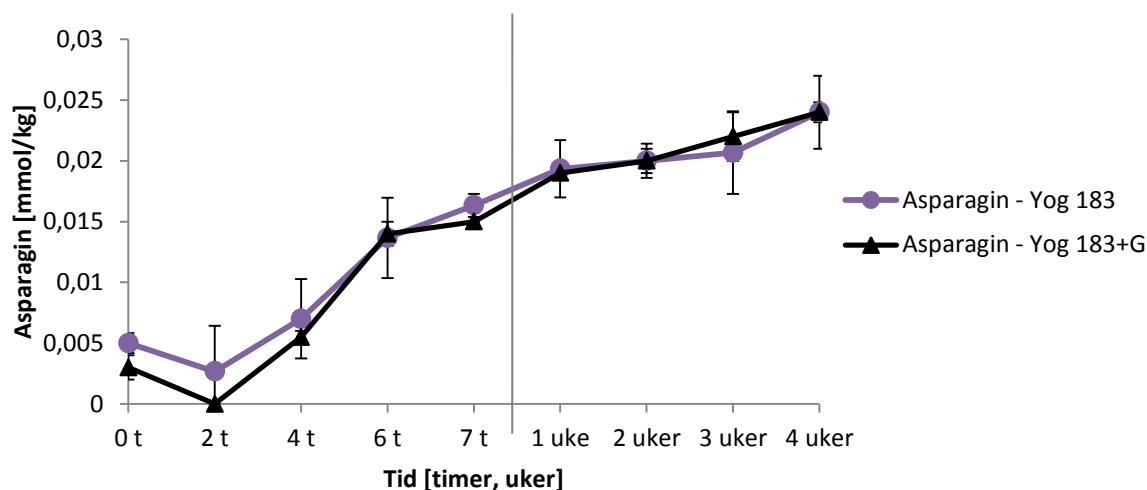
Figur 4.97 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) asparagin under syring av yoghurt med syrekultur YF-L901, samt gjennom lagring i 4 uker.

Ut fra figur 4.97 ble mengden asparagin i yoghurten redusert de første 2 timene under fermentering. Etter 2 timer fermentering økte konsentrasjonen gjennom resten av

fermenteringen, og i løpet av de 3 første ukene av lagringsperioden. Fra 3 til 4 uker sank mengden asparaginsyre.

4.4.12.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Det ble laget to varianter av yoghurt med syrekultur YC-183, hvor den ene ble tilsatt glutaminsyre. Figur 4.98 viser resultatene fra målinger under fermentering og lagring av begge variantene.



Figur 4.98 Gjennomsnittskonsentrasjon (mmol/kg) av asparagin i yoghurt syrnet med YC-183, med eller uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

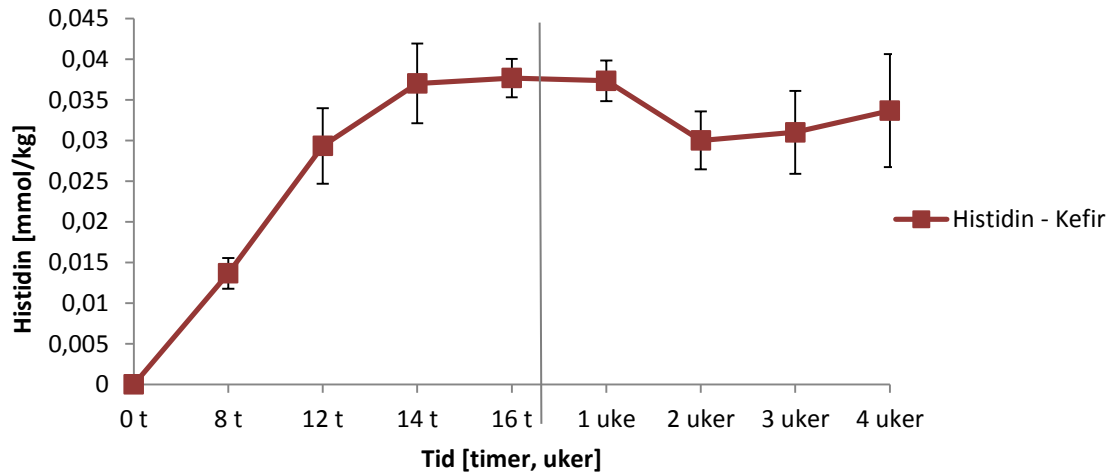
Ut fra figur 4.98 økte mengden asparagin stort sett gjennom hele fermenteringsforløpet og lagringsperioden for begge variantene.

4.4.13 Histidin

Konsentrasjonen av histidin ble analysert i kefir, kulturmilk, tettemelk og yoghurt med to ulike syrekulturer, gjennom fermentering og 4 ukers lagring. Kommersiell tettemelk ble undersøkt under lagring fra 20 til 60 dager. Histidin kan via deaminering og videre nedbrytning omdannes til glutaminsyre, eller dekarboksyleres til det biogene aminet histamin (Fernández & Zúñiga 2006). Se også figur 2.8.3.

4.4.13.1 Kefir

Konsentrasjonen av histidin ble målt i kefir under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.99.

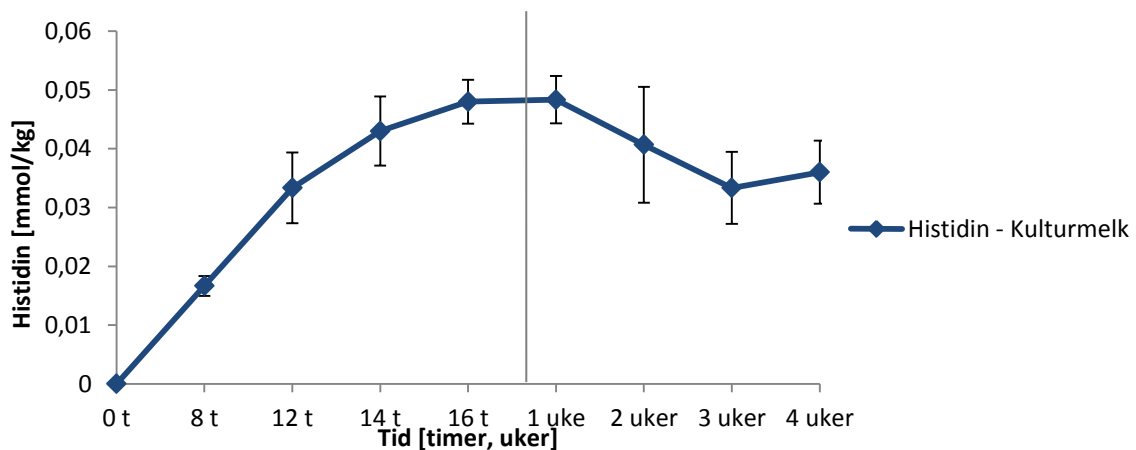


Figur 4.99 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) histidin i kefir under fermentering og lagring.

Ut fra figur 4.99 økte mengden histidin jevnt frem til 14 timer fermentering. I lagringsperioden både økte og sank mengden av histidin. Standardavviket viser at det var variasjon i mengde histidin mellom forsøkene, spesielt de siste ukene av lagringsperioden.

4.4.13.2 Kulturmilk

Under fermentering og lagring av kulturmilk ble det foretatt analyser av mengden histidin. Resultatene er vist i figur 4.100.

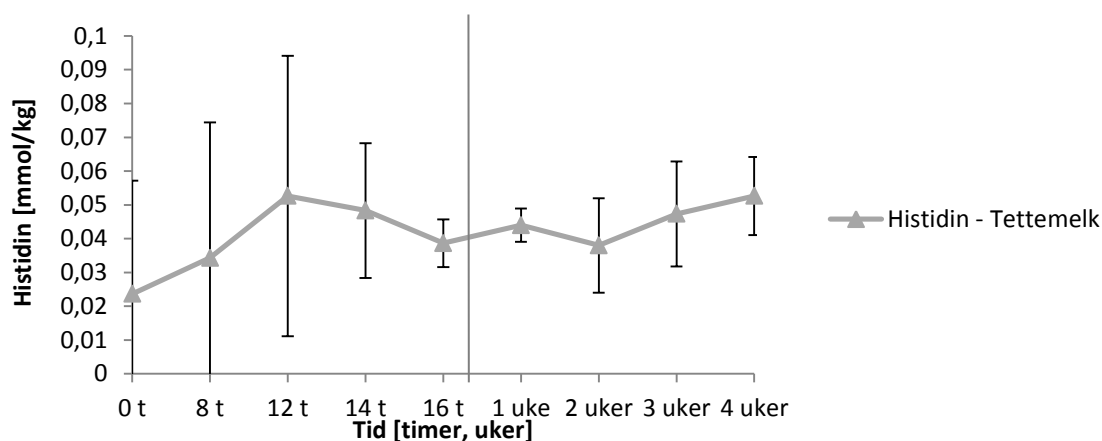


Figur 4.100 Gjennomsnittlig konsentrasjon (mmol/kg) av histidin i kulturmilk under fermentering og lagring.

Konsentrasjonen av histidin økte gjennom hele fermenteringsforløpet (figur 4.100). Under lagring ble mengden redusert. Standardavvikene viser stor variasjon mellom forsøkene i lagringsperioden.

4.4.13.3 Tetteemelk

Konsentrasjonen av histidin ble målt i tetteemelk under fermentering og lagring. Resultatene er vist i figur 4.101. Det ble også målt mengde histidin i kommersiell tetteemelk under lagring.



Figur 4.101 Gjennomsnittlig mengde (mmol/kg) histidin i tetteemelk gjennom fermentering og lagring.

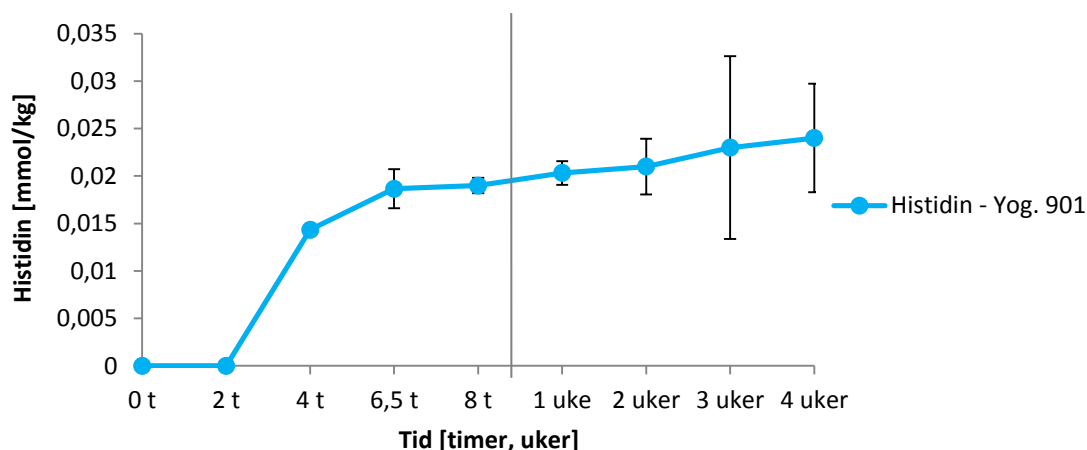
Ut fra figur 4.101 økte og sank konsentrasjonen av histidin under fermentering og lagring av tetteemelk. Standardavvikene viser at det var veldig stor variasjon i mengde histidin i de ulike forsøkene.

Mengden histidin ble også målt i kommersiell tetteemelk under lagring. Analysen viste at gjennomsnittskonsentrasjonen av histidin stort sett var stabil på 0,04 mmol/kg under lagring fra 20 til 60 dagers lagring. Standardavvikene viste at det var variasjon i konsentrasjonen av histidin mellom de tre produksjonene.

4.4.13.4 Yoghurt med syrekultur YF-L901

Konsentrasjonen av histidin ble målt under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med syrekultur YF-L901. Resultatene er presentert i figur 4.102.

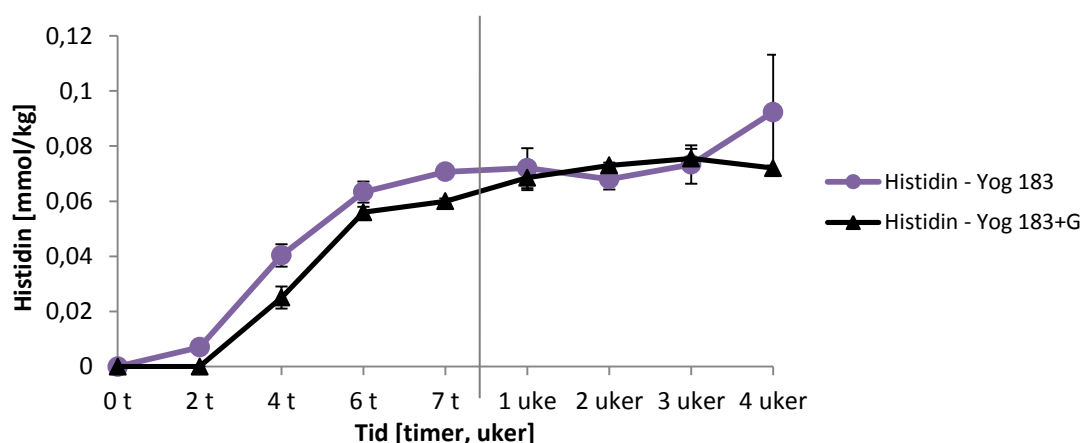
Ut fra figur 4.102 økte mengden histidin fra 2 til 6,5 timer fermentering. Under lagring var konsentrasjonen stabil. Standardavvikene viste stor variasjon i slutten av lagringsperioden.



Figur 4.102 Gjennomsnittlig innhold (mmol/kg) av histidin under fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YF-L901.

4.4.13.5 Yoghurt med syrekultur YC-183 og yoghurt med YC-183 og glutaminsyre

Mengden histidin ble målt under fermentering og lagring av to varianter av yoghurt med syrekultur YC-183. Resultatene er vist i figur 4.103.

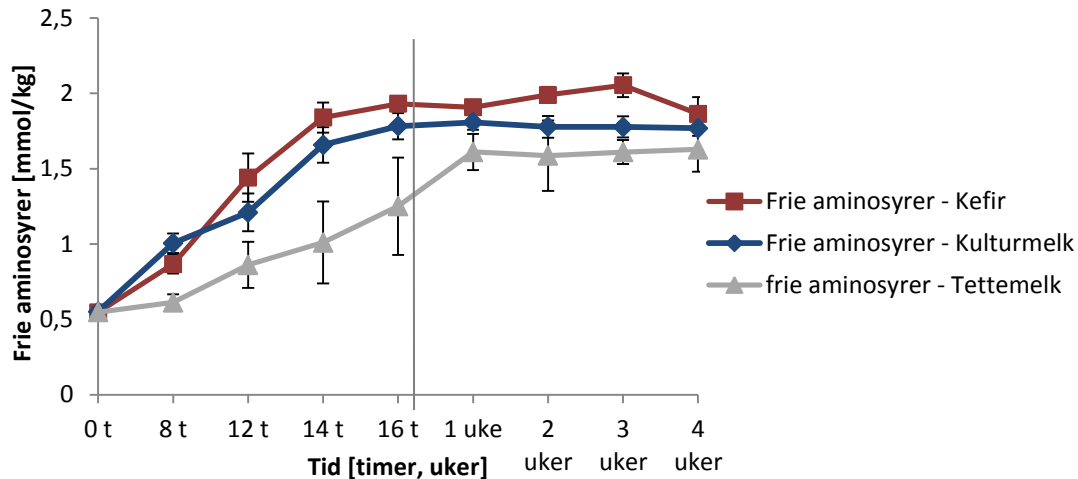


Figur 4.103 Gjennomsnittskonsentrasjoner (mmol/kg) av histidin gjennom fermentering og lagring av yoghurt inokulert med YC-183, med eller uten tilsetning av glutaminsyre (G; 3 mmol/kg).

Mengden histidin økte i følge figur 4.103 gjennom hele fermenteringsforløpet for begge variantene. Under lagring var konsentrasjonen av histidin stort sett stabil.

4.4.14 Frie aminosyrer

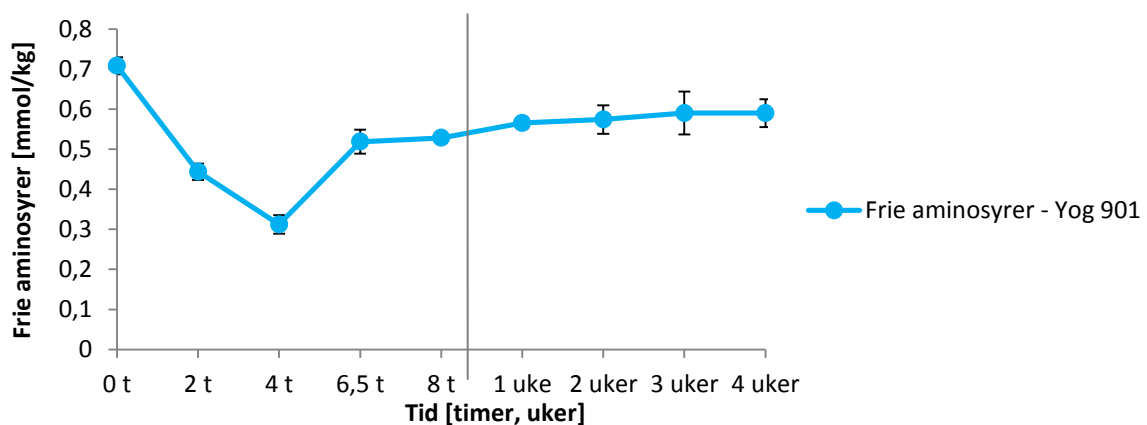
Gjennomsnittlig total mengde aminosyrer i kefir, kulturmilk og tettemilk gjennom fermentering og lagring er vist i figur 4.104.



Figur 4.104 Gjennomsnittlig total mengde (mmol/kg) frie aminosyrer i kefir, kulturmelk og tettemelk gjennom fermentering og lagring.

Ut fra figur 4.104 økte den totale mengden av frie aminosyrer gjennom hele fermenteringen av produktene. Under lagring var mengden forholdsvis stabil. Standardavvikene viser stor variasjon i total mengde frie aminosyrer i tettemelk mellom de ulike forsøkene etter 12, 14 og 16 timers fermentering. En jevn økning på 0,5 mmol/kg ble målt i kommersiell tettemelk fra 20 til 60 dagers lagring.

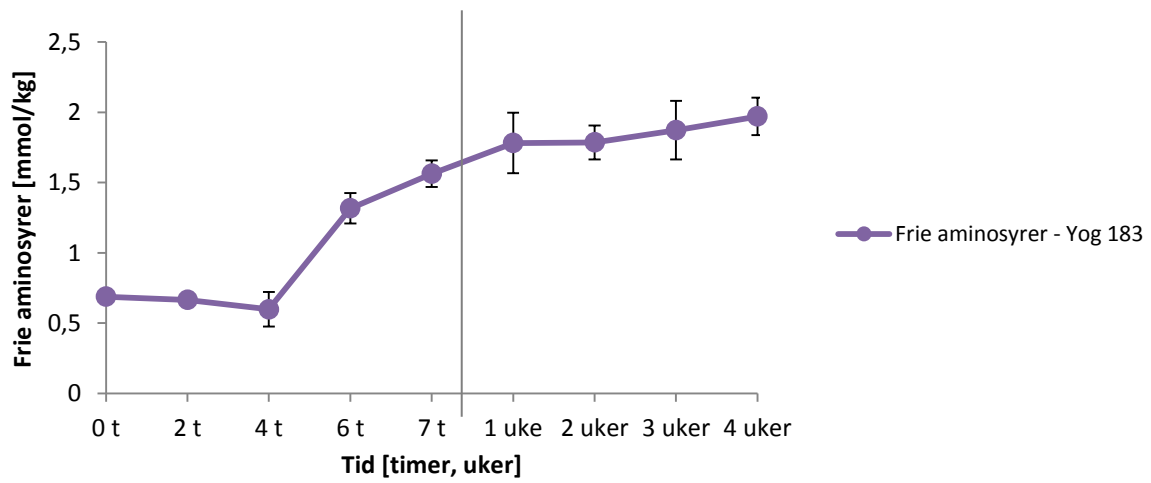
Total mengde frie aminosyrer i yoghurt med syrekultur YF-L901 og YC-183 er vist henholdsvis i figur 4.105 og 4.106.



Figur 4.105 Total mengde (mmol/kg) frie aminosyrer i yoghurt med syrekultur YF-L901.

Mengden frie aminosyrer i yoghurt med YF-L901 ble redusert de første fire timene (figur 4.105). Under lagring var mengden stabil.

Total mengde frie aminosyrer i yoghurt med syrekultur YC-183 er vist i figur 4.106. Mengden frie aminosyrer sank noe de første timene, for deretter å øke raskere fra 4 til 7 timer fermentering. Mengden økte også noe under lagring.



Figur 4.106 Total konsentrasjon (mmol/kg) av frie aminosyrer i yoghurt fermentert med YC-183, gjennom fermentering og lagring.

5 DISKUSJON

Det har blitt rapportert flere helsefremmende effekter ved oralt inntak av GABA, blant annet blodtrykkssenkende effekt (Aoki et al. 2003; Inoue et al. 2003). Grønnevik et al. (2011) har rapportert et innhold av GABA i norsk kefir (TINE) som kan være tilstrekkelig for å oppnå blodtrykkssenkende effekt hos mennesker med mild hypertensjon (Inoue et al. 2003). Produkter med tilsvarende mengde GABA kan få økt kommersiell interesse, ettersom hypertensjon kan bidra til hjerte- og karsykdommer som er svært utbredt (WHO 2013).

Grunnet tidligere funn av økende mengde GABA i norsk kefir (TINE) under lagring (Grønnevik et al. 2011) var det av interesse å undersøke om aminosyren kun ble produsert under lagring, eller om noe ble produsert allerede under fermentering. Det var også av interesse å kartlegge metabolismen av aminosyrer også i andre surmelksprodukter for å undersøke om GABA fantes i flere produkter. I tillegg til kefir, ble kulturmilk, tettemelk og yoghurt analysert. Yoghurt og kulturmilk fordi dette er produkter som regelmessig inntas, og tettemelk fordi innhold av aminosyrer, og spesielt GABA, ikke tidligere har blitt analysert³.

I dette studiet har mengden av ulike metabolske komponenter blitt kvantifisert ved bestemte tidspunkt under fermentering og lagring av kefir, kulturmilk, tettemelk, samt to typer yoghurt med ulik syrekultur (YF-L901 og YC-183). Det har også blitt gjort et forsøk på å øke mengden GABA i den ene yoghurttypen (YC-183) ved å tilsette glutaminsyre (3 mmol/kg) før inokulering. Studiet omhandler produksjon og forbruk av forbindelser fra karbohydrat- og sitratmetabolisme i tillegg til aminosyremetabolisme ettersom dette er knyttet sammen. Disse undersøkelsene kan gi økt kunnskap om omsetningen av aminosyrer i surmelksprodukter, samt effekten av tilsetning av glutaminsyre på metabolismen hos yoghurtbakterier.

Yoghurt syrnes med en termofil syrekultur, og dermed er det forventet mindre grad av metabolisme under lagring av dette produktet enn i kefir, kulturmilk og tettemelk som alle inneholder mesofile syrekulturer. Tettemelk inneholder den mest psykrotrofe mikrofloraen³, og det er derfor forventet større endringer i innhold av aminosyrer og andre forbindelser under lagring av dette produktet enn i de andre produktene.

³ Professor Judith A. Narvhus, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, 1430 Ås.

5.1 pH

I et surmelksprodukt gjenspeiler pH hovedsakelig produksjon av melkesyre, ettersom dette er hovedmetabolisme i alle surmelksprodukter (Tamime et al. 2006). Hvordan pH utvikler seg er først og fremst avhengig av produkt og den syrekulturen som har vært benyttet. pH i endelig produkt vil nås på ulike tidspunkt, avhengig av syrekulturens vekstrate og tilgjengelighet av nitrogen.

Mengde melkesyre ved en gitt pH er avhengig av melkens bufferkapasitet, som igjen påvirkes av innhold av proteiner og salt (Walstra et al. 2006c). Yoghurtypene i denne oppgaven ble tilsatt 2,5 % skummetmelkpulver, noe som kan påvirke melkens bufferkapasitet. Det var derfor forventet en større mengde melkesyre i yoghurt enn i de andre surmelksproduktene ved lik pH. I kefir og kulturmilk var mengde melkesyre omtrent 83 mmol/kg og pH 4,6 etter 16 timer fermentering. Dette er omtrent samsvarende med rapporterte verdier for sammensatte syrekulturer av melkesyrebakterier og gjær isolert fra kefir Korn, som produserte 87 – 100 mmol/kg i løpet av 18 timer ved 20 °C (Grønnevik 2012). I tettemilk har det blitt målt konsentrasjon av melkesyre på omtrent 70 mmol/kg ved pH 4,4 (Haug 1996). Tettemelken fermentert i denne oppgaven hadde pH på 4,3 og et melkesyreinnhold på 76 mmol/kg etter en ukes lagring, noe som er i tråd med funnene av Haug (1996). I følge Walstra et al. (2006b) vil yoghurt av konsentrert melk inneholde omtrent 130 mmol/L ved pH lavere enn 4,5, mot 90 til 100 mmol/L i ukonsentrert melk. Yoghurten produsert i denne oppgaven hadde pH 4,5 og inneholdt omtrent 90 mmol/kg ved endt fermentering, noe som bare så vidt er høyere verdier enn for kefir, kulturmilk og tettemilk, som ikke ble tørrstoffanrikt. Tilsetningen av skummetmelkpulver hadde ikke så stor påvirkning på produksjon av melkesyre som forventet.

I tettemilk var reduseringen i pH seinere enn for kefir og kulturmilk. I tillegg var det stor variasjon mellom de ulike forsøkene som skyldes forskyvningen i fermenteringsforløp og dermed ulik inkubasjonstid mellom de ulike forsøkene. Som nevnt, måtte det ene forsøket utsettes, noe som førte til at podematerialet ble eldre i dette forsøket enn i de foregående. Det er mulig at dette førte til redusert aktivitet i podematerialet. Også Haug (1996) observerte variasjoner i inkubasjonstid ved ulike forsøk på fermentering av tettemilk. Tettemilk viste en

økt grad av etterfermentering enn kefir og kulturmilk under lagring og dette kan skyldes at laktokokkene i tettemelk er noe mer psykrotrofe enn de som finnes i kefir og kulturmilk⁴.

I begge yoghurttyper, fremstilt med syrekulturene YF-L901 og YC-183, ble det en rask reduksjon i pH frem til henholdsvis 6,5 og 6 timers fermentering før pH-reduksjonen avtok. Det ble observert en ytterligere reduksjon i pH i begge yoghurttypene mellom slutten av fermentering og 1 ukes lagring. Denne ettersyrningen kan ha foregått under nedkjøling av yoghurten ved endt fermentering. Ettersyrning er et problem i yoghurt, ettersom en ytterligere økning av melkesyre vil gi en yoghurt som oppleves som for sur, og med redusert gelstyrke på grunn av økt elektrostatisk frastøtning (Robinson et al. 2006).

5.2 Karbohydratmetabolisme

I alle produktene ble det produsert tilsvarende mengde melkesyre, som henger sammen med reduksjonen i pH. Det ble imidlertid observert ulik reduksjon i laktose mellom de ulike produktene, og dette kan skyldes ulik metabolisme av laktose hos de ulike syrekulturene.

I kefir og kulturmilk ble mengden laktose redusert med cirka 25 mmol/kg frem til 16 timer fermentering. I tettemelk var reduksjonen noe saktere, men ved 1 uke var nivåene omtrent like. I samme periode økte konsentrasjonen av melkesyre til cirka 80 mmol/kg. Glukose ble ikke detektert i noen av disse tre produktene, og i kefir og kulturmilk ble en liten økning (2-3 mmol/kg) i galaktose observert. Det er en liten uoverensstemmelse i mengde melkesyre produsert i forhold til forbrukt laktose, og det er omtrent 12 mmol/kg laktose som ikke kan gjøres rede for i disse produktene om det kun hadde vært en ren homofermentativ metabolisme. Imidlertid inneholder både kefir, kulturmilk og tettemelk stammer av *Leuconostoc* spp., som er heterofermentative, og produserer eddiksyre, etanol og CO₂ i tillegg til melkesyre ved nedbrytning av laktose (Kandler 1983), og dermed vil konsentrasjonen av melkesyre være mindre ved en gitt pH.

I yoghurtene fermentert med syrekultur YF-L901 og YC-183 ble konsentrasjonen av laktose redusert med 50 mmol/kg i løpet av fermenteringen på 8 timer, og det ble dannet ca. 100 mmol/kg melkesyre. Ved samme tidspunkt ble det målt en konsentrasjon av glukose på 0,33 mmol/kg og galaktose på omtrent 40 mmol/kg. Under lagring av begge yoghurttypene ble det dannet en mindre mengde glukose. Ved fermentering av melk ved *S. thermophilus* og *Lb.*

⁴ Professor Judith A. Narvhus, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, 1430 Ås.

delbrueckii subsp. *bulgaricus* blir ikke galaktose brutt ned til melkesyre, men skiller det ut i mediet (Wright & Axelsson 2012). Et mol glukose metaboliseres til 2 mol melkesyre (Kandler 1983), og dette gjenspeiles i mengde laktose forbrukt og melkesyre produsert. Det ser ut til at det oppstod et skift i metabolisme ved kjøletemperatur, og glukose ble produsert. Det er ikke funnet tidligere rapporter om dette⁵. Ettersom yoghurtbakterier ikke er i stand til å omdanne galaktose, som utgjør halvparten av laktose, til melkesyre, må dobbelt så mye laktose brytes ned for å oppnå ønsket pH i yoghurt.

5.2.1 Pyrodruesyre

Pyrodruesyre er et mellomprodukt i flere metabolske veier, og er sentral i metabolismen hos melkesyrebakterier ettersom den vanligvis opptrer som en elektronakseptor og bidrar til balanse i cellenes reduksjon-oksidasjonspotensial (Wright & Axelsson 2012). Det er et toksisk stoff for cellen, og blir derfor metabolisert videre til blant annet melkesyre. Pyruvat kan også benyttes som aminogruppeakseptor i transamineringsreaksjoner, og selv omdannes til alanin i prosessen (Fernández & Zúñiga 2006).

Konsentrasjonen av pyrodruesyre økte, i ulik grad, i kefir, kulturmilk og tettemilk, for deretter å bli redusert under lagring. I kommersiell tettemilk ble det ikke detektert pyrodruesyre etter 40 dagers lagring. Begge yoghurtkulturene ga en rask økning av pyrodruesyre fra 0 til 4 timer fermentering, og mengden var mye høyere enn i de forrige produktene. Konsentrasjonen av pyrodruesyre på et hvert tidspunkt kan være en balanse mellom mengde produsert og mengden videre metabolisert⁴. Pyrodruesyre kan dannes som mellomprodukt fra nedbrytning av sitronsyre, men bakterieslektene i yoghurtkulturer er ikke i stand til å fermentere sitronsyre (Walstra et al. 2006c). Dannelse av pyrodruesyre fra karbohydratmetabolisme via glykolysen er en av hovedveiene i metabolismen hos melkesyrebakterier som leder til pyrodruesyre (Liu et al. 2003). Katabolisme av enkelte aminosyrer, som alanin, serin og asparaginsyre, leder også til dannelse av pyrodruesyre (Fernández & Zúñiga 2006; Liu et al. 2003).

Reduksjon i mengde pyrodruesyre kan skyldes konvertering til melkesyre. Andre komponenter kan også dannes fra degradering av pyrodruesyre, som eddiksyre, diacetyl, acetoin og 2,3-butandiol, eller omdanning til acetaldehyd og videre til etanol (Liu et al. 2003).

⁵ Professor Judith A. Narvhus, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, 1430 Ås.

5.2.2 Acetaldehyd og etanol

Acetaldehyd kan produseres fra nedbrytning av pyrodruesyre, og reduseres videre til etanol (de Vos & Hugenholtz 2004). Acetaldehyd kan også dannes ved nedbrytning av treonin (Fernández & Zúñiga 2006). Konsentrasjonen av acetaldehyd økte fra 0 til 14 timer fermentering i kefir og kulturmilk, for deretter å bli redusert gjennom resten av fermenteringsløpet. Ved denne reduksjonen vil cellene kunne regenerere NAD (Walstra et al. 2006c). Under lagring var mengden acetaldehyd lav og stort sett stabil. I tettemilk ble det målt ekstremt små konsentrasjoner av acetaldehyd, men etanol økte til et høyere nivå enn det som ble funnet i kefir og kulturmilk. Dette tyder på en større aktivitet av *Leuconostoc*-stammene i tettemilk. Reduksjonen i mengde acetaldehyd i kefir og kulturmilk etter 14 timer fermentering skyldes antagelig reduksjon til etanol av enzymet alkohol dehydrogenase. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 253 og 60 er i stand til å omsette acetaldehyd til etanol og eddiksyre ved pH 4 – 6 (Liu et al. 1997).

Konsentrasjonen av etanol økte gjennom hele fermenteringen i kefir og kulturmilk, men i førstnevnte fortsatte mengden å øke under lagring, mens den i kulturmilk var stabil. Etersom mengden etanol økte samtidig som mengden acetaldehyd økte, kan mengden acetaldehyd produsert i denne perioden være høyere enn det som fremstår av resultatene. Syrekulturen i kefir hadde en mer aktiv etanolproduksjon under lagring, trolig forårsaket av gjær. I tettemilk økte mengden etanol gjennom hele fermenteringen, uten endring i mengde acetaldehyd som kun ble detektert i små mengder. Dette kan tyde på at acetaldehyd produsert under fermentering ble redusert til etanol kontinuerlig.

Det ble produsert en mye større mengde acetaldehyd i de to yoghurttypene, enn i de mesofile produktene. Konsentrasjonen av acetaldehyd økte raskt med 0,22 mmol/kg fra 2 til 4 timer i yoghurt med syrekultur YF-L901. Yoghurtkultur YC-183 produserte en større mengde acetaldehyd enn YF-L901. Dette kan tyde på at førstnevnte kultur er mer proteolytisk aktiv, at de to kulturrene består av ulike stammer, samt at forholdet mellom de to bakterietypene kan være forskjellig. Bakteriesammensetning ble ikke undersøkt i denne oppgaven.

Streptococcus thermophilus og *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kan produsere acetaldehyd fra nedbrytning av treonin (Fernández & Zúñiga 2006). Acetaldehyd kan, som nevnt, også produseres via nedbrytning av laktose, men hos homofermentative melkesyrebakterier omdannes mesteparten av pyruvat fra karbohydratmetabolisme til melkesyre av laktat dehydrogenase (Wright & Axelsson 2012). En liten økning av treonin fra 2 til 4 timer

fermentering i nevnte yoghurt viser at ikke all treonin fra proteolytisk aktivitet ble brutt ned til acetaldehyd og glycin. Det ble altså frigjort mer treonin via proteolyse enn syrekulturen hadde behov for i den perioden. Ettersom det også dannes glycin ved nedbrytning av treonin burde det vært observert tilsvarende økning av glycin. Imidlertid ble mengden glycin redusert i denne perioden, noe som indikerer et stort behov for denne aminosyren hos yoghurtkulturene. Se kapittel 5.4.8 for metabolisme av glycin.

I yoghurtene ble det også dannet etanol under fermentering, men veldig små mengder sammenlignet med de andre produktene. Under lagring var mengden stabil, til tross for at det ble observert en reduksjon i mengde acetaldehyd i begge yoghurtene. Standardavvikene viste imidlertid større variasjon i mengde etanol og acetaldehyd under lagring enn under fermentering. Ettersom konsentrasjonen av etanol er stabil under lagring kan årsaken til reduksjonen i acetaldehyd være vanskelig å forklare ut fra resultatene i dette studiet.

5.3 Sitratmetabolisme

5.3.1 Sitronsyre og eddiksyre

Konsentrasjonen av sitronsyre sank i kulturmilk og kefir under fermentering, og etter 16 timer var mesteparten fermentert. I samme tidsperiode økte mengden eddiksyre tilsvarende. Ved 16 timer hadde konsentrasjonen av sitronsyre sunket med 9 mmol/kg i både kefir og kulturmilk. Det ble målt en mengde eddiksyre på 11 mmol/kg ved samme tidspunkt. Det vil si at det har blitt produsert 2 mmol/kg eddiksyre via en annen metabolisme. Ettersom begge disse produktene har blitt fermentert av en syrekultur som inneholder heterofermentative *Leuconostoc* spp, som kan danne eddiksyre ved nedbrytning av laktose (Mayo et al. 2010), er dette en trolig forklaring til den ekstra mengden eddiksyre produsert i forhold til forbruk av sitronsyre. Det ble også observert at konsentrasjonen av sitronsyre var stabil under lagring, og at ikke alt ble fermentert. Noe av årsaken kan være at aktiviteten til sitrat permease er aktivt mellom pH 5 og 6 (Starrenburg & Hugenholtz 1991). I tettemilk ble mengden sitronsyre redusert med 1,5 mmol/kg under fermentering, men mye saktere enn i de to forrige produktene, samtidig som konsentrasjonen av eddiksyre økte med 3,8 mmol/kg. Dette viser at 2,3 mmol/kg eddiksyre har blitt dannet fra andre metabolske veier også i tettemilk. Det har blitt isolert blant annet *L. mesenteroides* fra tettekulturer (Haug 1996), og som nevnt kan denne bakterieslekten danne eddiksyre ved fermentering av karbohydrater (Mayo et al. 2010).

I yoghurtvarianten med YF-L901 og varianten med YC-183 var konsentrasjonen av sitronsyre konstant høy gjennom hele fermenteringen og under lagring, noe som understøtter teorien om at yoghurtbakteriene ikke kan fermentere sitronsyre (Tamime et al. 2006). Konsentrasjonen av eddiksyre økte med 1,8 mmol/kg i yoghurt med syrekultur YF-L901, og 1 mmol/kg i yoghurt med syrekultur YC-183 fra 0 til 4 timer fermentering. Etersom sitrat ikke har blitt omsatt, må eddiksyren ha blitt produsert fra andre metabolske veier. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* er som nevnt, obligat homofermentativ, og produserer kun melkesyre ved nedbrytning av glukose (Wright & Axelsson 2012). Det har imidlertid blitt rapportert at en stamme *Lactobacillus* kan produsere eddiksyre ved omsetning av alanin, glycin eller serin (Nakae & Elliott 1965).

5.3.2 Diacetyl og acetoin

I produktene hvor sitronsyre ble metabolisert var det forventet å observere produksjon av diacetyl og acetoin. Ved omsetning av 1 mol sitronsyre er det forventet en samlet økning i mengde «4-C-komponenter» (diacetyl, acetoin og 2,3-butandiol) på 1 mol.

I både kefir og kulturmelk økte konsentrasjonen av acetoin og diacetyl under fermentering. Fra 14 timer fermentering blir mengde diacetyl redusert, samtidig som økningen i mengde acetoin avtar. Under lagring var mengde diacetyl forholdsvis stabil, mens reduksjonen i acetoin fortsatte. Diacetyl og acetoin kan dannes ved nedbrytning av pyrodruesyre fra sitratmetabolisme. Ved nedbrytning av sitronsyre produseres det en større mengde pyrodruesyre enn det som er nødvendig for regenerering av NADH, noe som fører til at aromakomponenter som diacetyl og acetoin kan dannes (Walstra et al. 2006c). Det har også blitt vist at disse komponentene kan dannes ved omsetting av asparaginsyre hos *L. lactis* (Le Bars & Yvon 2008), men konsentrasjonen av asparaginsyre økte også samtidig som mengde diacetyl og acetoin økte. I kefir og kulturmelk hadde 9 mmol/kg sitronsyre blitt omsatt etter 16 timer fermentering. Ved samme tidspunkt ble det detektert til sammen 5,5 mmol/kg diacetyl og acetoin, noe som vil si at til sammen 3,5 mmol/kg av disse komponentene har blitt redusert til 2,3-butandiol.

I tettemelk, i tråd med en tregere metabolisme av sitronsyre, var konsentrasjonen av acetoin og diacetyl bare svakt økende under fermentering, og økte først under lagring. Dette stemmer med at sitronsyre først ble metabolisert i større grad under lagring. Standardavvikene viser at det var svært stor variasjon i mengde diacetyl og acetoin i tettemelk mellom de ulike forsøkene, noe som gjør resultatene upålitelige. I kommersiell tettemelk ble diacetyl og

acetoin redusert under lagring. Diacetyl reduseres til acetoin av diacetyl reduktase (DAR) (Mayo et al. 2010), noe som kan forklare reduksjonen i mengde diacetyl. Teoretisk skulle dette ha ført til en økning i mengde acetoin, men i kulturmilk ble mengden acetoin redusert samtidig. Acetoin kan omdannes til 2,3-butandiol av DAR, og reaksjonen regenererer NAD^+ fra NADH. Reaksjonen er reversibel, og katalyseres av 2,3-butandiol dehydrogenase (BDH) (Mayo et al. 2010), men ettersom NAD er begrensede er dette lite sannsynlig. Årsaken til at mengden diacetyl og acetoin økte før den sank, kan være at optimal pH for aktivitet av DAR og BDH er henholdsvis sur og basisk (Mayo et al. 2010), noe som fører til at diacetyl og acetoin vil omdannes til 2,3-butandiol i større grad ved lav pH, uten at 2,3-butandiol omdannes til acetoin. Etter lagring i 2 uker hadde sitronsyrekonsentrasjonen blitt redusert med omtrent 6 mmol/kg, samtidig som mengde diacetyl og acetoin ble målt til totalt 0,5 mmol/kg. Dette tyder på at mesteparten av diacetyl og acetoin ble redusert til 2,3-butandiol.

I yoghurt med syrekultur YF-L901 økte konsentrasjonen av acetoin og diacetyl gjennom hele fermenteringen og under lagring. Økningen var raskest fra 2 til 4 timer. I yoghurt med syrekultur YC-183 økte konsentrasjonen av acetoin og diacetyl hovedsakelig fra 2 til 4 timer, for deretter å være relativt stabil ved de andre analysetidspunktene. Konsentrasjonene i ferdig yoghurt var imidlertid omtrent like, mellom 0,01 og 0,02 mmol/kg. Ettersom yoghurtbakteriene ikke er i stand til å omsette sitronsyre (Tamime et al. 2006), må disse aromakomponentene ha blitt produsert via en annen metabolsk vei. Det har blitt rapportert at *Lactobacillus* INF15D kan danne diacetyl og acetoin av pyruvat fra transaminering av asparaginsyre (Kieronczyk et al. 2004). Dette kan være en mulig forklaring på dannelse av acetoin og diacetyl i yoghurt, ettersom mengden asparaginsyre ble redusert i tidsrommet hvor mengde diacetyl og acetoin økte.

5.4 Aminosyreomsetning

Frigjøring av aminosyrer fra peptider og den påfølgende utnyttelsen av disse står sentralt i melkesyrebakterienes metabolske aktivitet (Christensen et al. 1999). Frigjorte aminosyrer kan benyttes til proteinsyntese, generering av energi og til gjenvinning av reduserte kofaktorer. Konsentrasjonen av frie aminosyrer i melka ved et hvert tidspunkt kan anses som en nettoverdi påvirket av opptak av peptider og aminosyrer, proteolyse og frigjøring av aminosyrer fra cellene (Niven et al. 1998). Under logaritmisk vekst vil aminosyrer som frigjøres komme fra peptider transportert inn i cellene, og er overflødige i forhold til cellenes næringsmessige krav.

Generelt vil tilgang på frie aminosyrer være viktig for melkesyrebakterier tidlig i vekstfasen, mens viktigheten av proteolytisk aktivitet for tilgjengelighet av nitrogen øker etter hvert som veksten fortsetter (Niven et al. 1998). Med bakgrunn i dette vil en forvente en rask forsvinning av frie aminosyrer tidlig under fermentering, og etter hvert en økning av aminosyrer som dannes gjennom proteolyse, men som er i overskudd i forhold til cellenes behov. Det var forventet en generell økning i den totale mengden av aminosyrer i yoghurt, som rapportert av Tamime og Robinson (1993) (se tabell 2.2). Det har ikke lyktes å finne publikasjoner som rapporterer utvikling av aminosyrer i andre fermenterte meieriprodukter, hverken under fermentering eller under lagring.

For tettemelk var det store standardavvik i konsentrasjonen av de fleste aminosyrer under både fermentering og lagring. Dette kan skyldes at det oppsto en forskyvning i fermenteringsforløpet mellom forsøkene. Det ene forsøket måtte utsettes i to uker, noe som førte til at podematerialet ble 2 uker eldre enn for de to andre forsøkene. Dette førte til en mye tregere fermentering. Ettersom fermenteringen ble stoppet etter pH-verdi og ikke tid, skulle det kunne forventes at standardavvikene kun var store for verdiene under fermentering og ikke under lagring av tettemelk, men sammensetningen av melkesyrebakteriene kan ha endret seg, og dermed påvirket den totale metabolismen og verdiene under lagring.

Ettersom yoghurtbakteriene *S. thermophilus* og *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* er termofile, var det forventet mindre grad av aminosyremetabolisme i yoghurt under lagring enn i de mesofile produktene kefir, kulturmelk og tettemelk. I tettemelk, som inneholder den mest psykrotrofe syrekulturen, var det forventet å observere metabolisme av aminosyrer under lagring i større grad enn i de andre produktene⁶. Grønnevik et al. (2011) rapporterte metabolisme i kefir under lagring som skyltes vekst av gjær. Det var dermed forventet også endringer i konsentrasjon av aminosyrer i kefir under lagring.

5.4.1 Forgrenede aminosyrer (leucin, isoleucin og valin)

I kefir, etter en reduksjon av den opprinnelige mengden leucin, økte konsentrasjonen av leucin jevnt gjennom fermenteringen. Dette skyldes mest sannsynlig den proteolytiske aktiviteten til syrekulturen (Niven et al. 1998), som vil føre til frigjøring av frie aminosyrer som overgår cellenes næringsmessige behov. Under lagring var konsentrasjonen av leucin mer stabil. I samme periode ble det observert produksjon av 3-metylbutanal og 3-metyl-1-butanol. Leucin

⁶ Professor Judith A. Narvhus, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet, 1430 Ås

kan omdannes til aldehydet, 3-metylbutanal, via transaminering til α -ketoisocaproat, etterfulgt av en dekarboksylering (Fernández & Zúñiga 2006). Dette aldehydet kan videre reduseres til det korresponderende alkoholet, 3-metyl-1-butanol. Det ble målt en høyere konsentrasjon av dette alkoholet, noe som viser aktivitet av en alkohol dehydrogenase mot aldehydet.

Konsentrasjonen av leucin fulgte omtrent samme forløp, og oppnådde omtrentlig samme konsentrasjon, under fermentering og lagring av kulturmilk og tettemilk som i kefir, men i disse produktene ble verken aldehydet eller alkoholen detektert. α -Ketosyren som dannes ved transaminering av leucin kan omdannes til hydroksysyren α -hydroksyisocaproat via hydrogenering, eller til karboksylsyren isovalerat via oksidativ dekarboksylering (Fernández & Zúñiga 2006). Faktorer som pH, NaCl-konsentrasjon og oksidasjon-reduksjonspotensial kan påvirke hvilke metabolitter som dannes ved nedbrytning av forgrenede aminosyrer. Under oksidative forhold favoriseres dannelse av det korresponderende aldehydet, mens produksjon av hydroksysyren og karboksylsyren øker under reduserende forhold hos *L. lactis* (Kieronczyk et al. 2006). Evnen til transaminering av aminosyrer har blitt funnet hos blant annet *L. lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* og *S. thermophilus* (Yvon & Rijnen 2001). I kommersiell tettemilk ble det observert en jevn økning i mengde leucin fra 20 til 60 dager lagring. Dette kan skyldes lysing av celler og frigjøring av intracellulære peptidaser, eller en fortsettelse av proteolytisk aktivitet hos syrekulturen (Niven et al. 1998).

I yoghurt med syrekultur YF-L901 ble mengden leucin i melken redusert fra 0 til 4 timer fermentering, og økte deretter. Nivået nådde imidlertid ikke det som ble observert hos de mesofile produktene. Ettersom 3-metylbutanal eller 3-metyl-1-butanol ikke ble detektert, kan aminosyren enten ha blitt benyttet til proteinsyntese, eller, som nevnt, ha blitt omdannet til korresponderende hydrokso- eller karboksylsyre. Ettersom det ikke er analysert etter disse komponentene kan dette ikke bekreftes. Den stabile konsentrasjonen under lagring kan skyldes redusert proteolytisk aktivitet ved kjøletemperatur (Niven et al. 1998). Syrekultur YC-183 frigjorde en større mengde (omtrent x 6) leucin enn YF-L901, og økningen fortsatte under lagring, noe som kan komme av en større proteolytisk evne hos den YC-183 og en større aktivitet ved 4 °C.

Konsentrasjonen av isoleucin, som for leucin, sank fra 0 til 8 timer fermentering av kefir og kulturmilk, for deretter å øke. I tettemilk økte konsentrasjonen først etter 14 timer fermentering. I yoghurt med syrekultur YF-L901 var mengden isoleucin stabil fra 0 til 4 timer

fermentering, for deretter å øke frem til 6,5 timer og være stabil under lagring. I yoghurt med syrekultur YC-183 økte konsentrasjonen videre under lagring. Også isoleucin kan transamineres til korresponderende α -ketosyre, α -ketometylvalerat, som videre kan omdannes via dekarboksylering, hydrogenering eller oksidativ dekarboksylering (Fernández & Zúñiga 2006). Det ble målt lave verdier av alkoholen 2-metyl-1-butanol i begge produktene uten at 2-metylbutanal ble detektert. Dette tyder på at aktiviteten av α -ketometylvalerat dekarboksylase var lav, og at mengden aldehyd som ble produsert ble redusert. Omdannelse av isoleucin til α -hydroksymetylvalerate eller 2-metylbutyrat kan ikke utelukkes ettersom produktene ikke ble analysert for disse komponentene. Stabiliseringen under lagringstiden kan skyldes redusert proteolytisk aktivitet.

Konsentrasjonen av valin ble redusert i løpet av de første 8 timene av fermenteringen hos kefir. Valin kan omdannes til blant annet 2-metylpropanal via transaminering og dekarboksylering (Fernández & Zúñiga 2006), men mengden av aldehydet produsert i samme periode gjenspeiler ikke reduksjonen i mengde valin. 2-metylpropanal kan reduseres til det korresponderende alkoholet, men dette ble ikke detektert i kefir før etter en ukes lagring. α -ketosyren som dannes ved transaminering av valin kan også hydrogeneres til hydroksysyren α -hydroksyisovalerat eller dekarboksyleres oksidativt til isobutytrat, men om dette er tilfelle i kefir kan ikke bekreftes da det ikke ble analysert for disse komponentene. Reduksjonen av mengde valin kan også skyldes proteinsyntese (Niven et al. 1998). Under lagring av kefir var konsentrasjonen av valin stabil, noe som kan tyde på mindre grad av metabolisme, men mengden 2-metylpropanal og 2-metyl-1-propanal økte noe i denne perioden. Det kan tyde på enzymaktivitet, enten intracellulært, eller i mediet av enzymer frigjort ved lysing av celler.

I kulturmilk økte konsentrasjonen av både valin og 2-metylpropanal i løpet av de første 8 timene. Produksjonen av valin kan skyldes proteolytisk aktivitet, mens 2-metylpropanal, som nevnt, produseres ved transaminering av valin til α -ketoisovalerat, som dekarboksyleres til 2-metylpropanal (Fernández & Zúñiga 2006). Dette aldehydet kan reduseres til korresponderende alkohol, 2-metyl-1-propanol, men denne aktiviteten ser ut til først å være aktiv under lagring.

Det ble ikke detektert 2-metylpropanal eller 2-metyl-1-propanol i tettemilk, så reduksjonen av valin i begynnelsen av fermenteringen, var ikke et resultat av transaminering og dekarboksylering. Som nevnt, kan valin også omdannes til korresponderende karboksylsyre eller hydroksysyre (Fernández & Zúñiga 2006), men om dette er tilfelle i tettemilk kan ikke

bekreftes ettersom disse komponentene ikke ble kvantifisert. Aminosyren kan ha blitt benyttet i proteinsyntese.

En generell økning av forgrenede aminosyrer i yoghurt under fermentering støtter tidligere rapporterte verdier for forgrenede aminosyrer i yoghurt kontra melk (Tamime & Robinson 1993).

Tilsetning av glutaminsyre hadde ingen innvirkning på utviklingen av forgrenede aminosyrer i yoghurt fermentert med syrekultur YC-183.

5.4.2 Aromatiske aminosyrer (tryptofan, fenylalanin og tyrosin)

Det ble funnet svært små konsentrasjoner av tryptofan i alle fermenterte meieriprodukter. I kefir økte konsentrasjonen av tryptofan i løpet av de første 8 timene av fermenteringen, for deretter å synke og stabiliseres. Under lagring økte mengden noe. Ettersom konsentrasjonene var såpass lave med store standardavvik kan det være mulig at resultatet er «støy» i prøvens kromatogram. I kulturmelk og tettemelk økte konsentrasjonen av tryptofan gjennom fermenteringen, og også noe under lagring. Analysene av kommersiell tettemelk viste at mengden tryptofan økte fra 30 til 60 dagers lagring. En økning av tryptofan kan skyldes proteolytisk aktivitet hos syrekulturen (Niven et al. 1998). I yoghurt med syrekultur YF-L901 sank mengden tryptofan noe fra 2 til 4 timer, og økte frem til slutten av fermenteringen. Konsentrasjonene som ble detektert er lave og har store standardavvik, noe som kan tyde på at resultatene er «støy» fra instrumentet. En reduksjon i mengde tryptofan kan imidlertid skyldes proteinsyntese, eller nedbrytning til andre metabolitter. Tryptofan kan dekarboksyleres til det biogene aminet tryptamin, eller via transaminering katalysert av aromatisk aminosyre aminotransferase deamineres til indol-pyruvat. Sistnevnte kan omdannes til en rekke aromakomponenter (Christensen et al. 1999; Fernández & Zúñiga 2006), men innholdet av disse har ikke blitt analysert i denne studien. Yoghurtkultur YC-183 frigjorde større mengden tryptofan enn YF-L901, noe som kan tyde på at førstnevnte er mer proteolytisk aktiv. Under lagring var konsentrasjonen av tryptofan stabil, noe som kan skyldes lavere proteolytisk aktivitet ved lavere temperatur og pH.

Konsentrasjonen av fenylalanin økte stort sett jevnt gjennom fermentering i alle produktene, for deretter å være relativt stabil under lagring. Unntaket er yoghurt syrnet med YC-183. Begge variantene av denne yoghurten økte også under lagring, og i varianten tilsatt glutaminsyre ble mengden fenylalanin redusert fra 2 til 4 timer, for deretter å øke. Hvorfor

forbruket av fenylalanin fra 2 til 4 timer kun ble observert i varianten tilsatt glutaminsyre er usikkert. En reduksjon av fenylalanin kan skyldes et økt behov i proteinsyntese ved det aktuelle tidspunktet. Fenylalanin kan også omdannes til det biogene aminet fenyletylamin av en dekarboksylase. En annen mulighet for degradering av fenylalanin er via transaminering til fenylpyruvat, og videre konvertering til ulike aromakomponenter (Fernández & Zúñiga 2006).

Konsentrasjonen av tyrosin økte under fermentering i alle produktene, for deretter å være stabil under lagring, noe som støtter funn av Grønnevik et al. (2011) for kefir. Unntaket var yoghurt med syrekultur YF-L901, hvor konsentrasjonen økte fra 0 til 6,5 timer, for deretter å bli redusert gjennom resten av fermenteringsforløpet og under lagring. Reduksjon i mengde tyrosin kan skyldes proteinsyntese, dekarboksylering til det biogene aminet tyramin, eller omdannelse til andre metabolitter gjennom transaminering (Christensen et al. 1999; Fernández & Zúñiga 2006). I dette produktet ble det generelt detektert en lavere mengde tyrosin, som kan tyde på generelt lavere proteolytisk aktivitet hos kulturen. Det har tidligere blitt vist at mengden tyrosin i kefir er stabil under lagring i 4 uker (Grønnevik et al. 2011).

Det har blitt rapportert en økt mengde av forgrenede aminosyrer i yoghurt kontra melk (Tamime & Robinson 1993), noe som generelt støttes av denne studien.

5.4.3 Glutaminsyre og GABA

Glutaminsyre er et viktig mellomledd i omsetning av aminosyrer hos melkesyrebakterier siden aminotransferasene beskrevet hos denne gruppen benytter aminosyren som aminogruppedonor (Fernández & Zúñiga 2006). α -ketoglutarat, som dannes ved deaminering av glutaminsyre, er foretrukket aminogruppeakseptor ved transaminering av andre aminosyrer, og leder igjen til dannelse av glutaminsyre (Le Bars & Yvon 2008). Det har blitt rapportert at noen melkesyrebakterier isolert fra ulike typer fermenterte matvarer kan dekarboksylere glutaminsyre til den blodtrykkssenkende aminosyren GABA (Barrett et al. 2012; Nomura et al. 1999a; Yang et al. 2008), men at produksjonen av enzymet som katalyserer reaksjonen er stammeavhengig (Diana et al. 2014; Liu et al. 2003; Nomura et al. 1999a).

Konsentrasjonen av glutaminsyre økte gjennom hele fermenteringsforløpet i kefir, kulturmilk og tettemilk, og det ble ikke detektert GABA i denne perioden. Om økningen skyldes proteolytisk aktivitet eller transaminering kan ikke sies med sikkerhet ettersom mengde α -ketoglutarat ikke ble målt i denne studien. I en studie av Grønnevik et al. (2011) ble det

antydning at økningen av glutaminsyre under lagring trolig ikke skyldtes transaminering ettersom mengden α -ketoglutarat økte i samme tidsrom, men metabolismen under fermentering kan være noe annerledes. Under lagring av kefir og kulturmilk ble mengden glutaminsyre redusert med henholdsvis 0,23 og 0,2 mmol/kg, noe som gjenspeiler mengden GABA produsert i samme periode. I tettemilk ble konsentrasjonen av glutaminsyre redusert med 0,4 mmol/kg under lagring, samtidig som 0,57 mmol/kg GABA ble produsert. Dette tyder på at det også ble dannet noe glutaminsyre i lagringsperioden, enten fra α -ketoglutarat via transaminering av andre aminosyrer (Le Bars & Yvon 2008), eller gjennom proteolyse (Niven et al. 1998). I kommersiell tettemilk økte mengden GABA sakte, men jevnt til 0,76 mmol/kg fra 20 til 60 dagers lagring, noe som tyder på noe aktivitet av GAD gjennom hele holdbarhetstiden. At GABA først ble produsert under lagring kan skyldes at dekarboksylering av glutaminsyre muligens er en respons på lav pH (Cotter & Hill 2003), og at GAD fra *L. lactis* har en optimal pH på 4,7 (Nomura et al. 1999b). Gardner-Fortier et al. (2013) viste at produksjonen av GABA var lav hos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A23 ved pH 5,4 og 5,1. Noen gjærstammer kan bryte ned GABA via en modifisert TCA-syklus (Kumar & Punekar 1997).

Utvikling i glutaminsyre og GABA var svært forskjellig i de to yoghurttypene. I yoghurt syrnet med syrekultur YF-L901 sank konsentrasjonen av glutaminsyre med omtrent 0,2 mmol/kg fra 0 til 4 timer fermentering, for deretter å øke med 0,1 mmol/kg og være stabil under lagringstiden. En økt mengde glutaminsyre i yoghurt kontra kumelk støttes av tidligere funn (Tamime & Robinson 1993). Som nevnt, kan glutaminsyre blant annet dekarboksyleres til GABA, deamineres til α -ketoglutarat, dannes fra α -ketoglutarat ved transaminering av andre aminosyrer (Le Bars & Yvon 2008) eller ved deaminering av glutamin (Fernández & Zúñiga 2006). Ettersom det er foreslått at dekarboksylering av glutamat er en forsvarsmekanisme mot lav intracellulær pH (Cotter & Hill 2003; Nomura et al. 1999b), og det ble funnet GABA i kommersiell yoghurt under innledende forsøk, var det forventet å finne GABA i yoghurt når pH var redusert. Det ble imidlertid ikke detektert GABA i yoghurt med syrekultur YF-L901. Reduksjonen i konsentrasjonen av glutaminsyre kan derfor ikke komme av dekarboksylering. Glutaminsyre kan ha blitt omdannet til α -ketoglutarat fra 0 til 4 timer fermentering, men det kan ikke sies med sikkerhet ettersom det ikke er målt konsentrasjonen av sistnevnte i noen av meieriproduktene.

I yoghurt syrnet med syrekultur YC-183, sank konsentrasjonen av glutaminsyre også fra 0 til 4 timer fermentering, med 0,24 mmol/kg, men i samme periode ble det produsert 0,16

mmol/kg GABA. Dette viser at glutaminsyre også ble omsatt via andre reaksjoner enn dekarboksylering under fermentering, men at mesteparten ble dekarboksylert til GABA. Etter lagring i en uke ble mengden glutaminsyre redusert med 0,3 mmol/kg, som gjenspeiler mengde GABA produsert i samme tidsrom. Tilsynelatende ble mesteparten av mengden glutaminsyre dannet under fermentering dekarboksylert til GABA allerede i løpet av en ukers lagring, ettersom konsentrasjonen av begge aminosyrene er stabil gjennom resten av lagringsperioden. Konsentrasjonen av GABA etter fire ukers lagring var høyere enn høyeste registrerte mengde glutaminsyre, noe som tyder på at det også har blitt produsert mer glutaminsyre under fermentering enn det som kommer frem i resultatene.

Til tross for at konsentrasjonen av glutaminsyre var omtrent 10 ganger høyere ved 0 timer i yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre, ble det ikke dannet mer GABA enn i den uten glutamattilsetning gjennom selve fermenteringen. Det var derimot under første del av lagringsperioden at det ble dannet mest GABA, og i løpet av 2 ukers lagring var innholdet av glutamat blitt omsatt i begge yoghurtvariantene. Syrekulturen omsatte altså hele mengden glutaminsyre til GABA, uavhengig av opprinnelig konsentrasjon. Det har blitt rapportert at konsentrasjonen av glutaminsyre ikke påvirker produksjon av GABA hos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A23 før pH er rundt 4,8 (Gardner-Fortier et al. 2013), noe som ser ut til å være tilfelle også for melkesyrebakteriene i syrekultur YC-183 under fermentering. Glutaminsyre er essensiell for vekst av *S. thermophilus* (Guimont 2002), så en økt konsentrasjon av denne aminosyren kan ha påvirket vekst og metabolisme hos melkesyrebakterien i yoghurten tilsatt glutaminsyre.

Det ser ut til at produksjonen av GABA i kultur YC-183 er en to-trinns produksjon. Under fermentering er ikke reaksjonen påvirket av glutamatkonsentrasjonen, men under lagring ble resterende glutaminsyre omdannet til GABA i en mengde tilsvarende glutamatkonsentrasjonen.

Som nevnt, er dekarboksylering av glutaminsyre stammeavhengig hos *S. thermophilus* (Liu et al. 2003), noe som kan forklare hvorfor det ikke ble detektert GABA i yoghurt med syrekultur YF-L901. Ettersom produsenten av syrekulturene ikke oppgir hvilke stammer av *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* og *S. thermophilus* kulturene inneholder (Chr.Hansen 2008), og det ikke har blitt gjort mikrobiologiske analyser i dette studiet, kan det ikke bekreftes hvilke stammer som befinner seg i kulturene. Syrekultur YC-183 førte til en økning i den totale mengden frie aminosyrer i mye større grad enn YF-L901, noe som kan tyde på en generelt

bedre proteolytisk evne. Det kan også hende det var en annen balanse mellom *S.thermophilus* og *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i yoghurt med YF-L901. Hos *Lactococcus lactis* varierer også evnen til å produsere GABA. Nomura et al. (2000) viste at *L. lactis* subsp. *lactis* dekarboksylerte glutamat til GABA, men at *L. lactis* subsp. *cremoris* ikke hadde denne egenskapen. Ettersom *L. lactis* subsp. *cremoris* har en frameshift-mutasjon som hindrer dannelse av et aktivt GAD-enzym, ble det foreslått at evnen til å dekarboksylere glutaminsyre kunne være en effektiv måte å skille de to artene fra hverandre på (Nomura et al. 1999a), men dette er ikke støttet av resultatene i dette forsøket.

Forsøket viste at produksjon av GABA i yoghurt hovedsakelig foregår i løpet av 1 – 2 ukers lagring, mens i kefir, kulturmilk og tettemilk øker konsentrasjonen av GABA gjennom hele lagringsperioden. Det ble produsert mest GABA (ca. 0,6 mmol/kg) i tettemilk og yoghurt (TC-183), mindre i kefir og kulturmilk (ca. 0,2 mmol/kg), og ingenting i yoghurt fremstilt med YF-L901.

Inoue et al. (2003) har rapportert at et daglig inntak av fermentert melk med 10 mg GABA i en periode på 12 uker bidro til senkning i blodtrykk hos personer med mild hypertensjon. Tidligere har det blitt rapportert at 100 g norsk kefir (TINE) lagret i to uker tilsvarer mengden GABA rapportert av Inoue et al. (2003) (Grønnevik et al. 2011; Grønnevik et al. 2012). I dette studiet ble det observert at 100 g kefir lagret i 2 uker kun inneholder 1 mg GABA, og at det derfor må inntas 1000 g kefir daglig for å oppnå tilsvarende mengde. Det ville derimot vært tilstrekkelig med et daglig inntak av 160 g yoghurt (syrnet med YC-183) eller 220 g tettemilk for å oppnå tilsvarende mengde GABA, mengder som er mer overkommelige sammenlignet med kefir- eller kulturmilkmengdene i følge dette studiet. Dersom tettemilk, kefir eller kulturmilk inntas etter en lengre lagringsperiode, vil innholdet av GABA være høyere, og nødvendig mengde for å oppnå 10 mg lavere. Dette gjelder for produktene der mengden GABA økte i hele lagringsperioden, som kulturmilk, tettemilk og kefir. Om kommersiell tettemilk inntas etter 60 dagers lagring vil det være tilstrekkelig med 138 g for å dekke daglig mengde på 10 mg GABA.

Omsetting av glutaminsyre til GABA påvirkes av ulike faktorer. Som nevnt, er denne metabolske veien først og fremst stammeavhengig. Det er utført en rekke studier for å undersøke optimale forhold for dannelse av GABA under fermentering (Gardner-Fortier et al. 2013; Kim et al. 2009; Mazur et al. 2011; Yang et al. 2008). Yang et al. (2008) viste at produksjonen av GABA i buljong var relatert til biokjemiske egenskaper hos GAD. I studien

økte mengden GABA om forholdene først ble justert til optimale betingelser for produksjon av enzymet, og deretter til enzymets optimale forhold med hensyn til dekarboksylering av glutaminsyre. Det har blitt rapportert av Kim et al. (2009) at kombinasjonen av pH og temperatur under fermentering av bringebærsaft hadde innvirkning på mengde GABA produsert av *Lb. brevis* GABA100. Betydningen av pH for produksjon av GABA støtter funnene i dette studiet, hvor det var tydelig at GABA først ble dannet ved lav pH. Det har også blitt rapportert at konsentrasjonen av GABA etter fermentering av teblader økte med økt antall anaerobe/aerobe fermenteringssykluser, og at en temperatur på 40 °C førte til høyere konsentrasjoner enn 25 °C (Peng & Lee 2009). En studie av Watanabe et al. (2011) viste at *S. thermophilus* IFO13957 og *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IAM1120 produserte betydelig større mengder GABA i symbiose enn under vekst alene. Kun *S. thermophilus* IFO13957 var i stand til å konvertere glutamat til GABA ved inokulering alene i medium med pH 3,5. Det ble derfor antatt at denne stammen hovedsakelig sto for produksjonen av GABA når bakteriene ble inokulert sammen, men at *Lb. delbrueckii* IAM1120 produserte komponenter som stimulerte omsetningen. Det er, som nevnt, kjent at streptokokker er svakt proteolytiske og avhengig av mer proteolytiske laktobasiller for optimal vekst i melk (Robinson et al. 2006). Det kan derfor være naturlig å anta at *Lb. delbrueckii* forsyner *S. thermophilus* med større mengder glutamat enn streptokokkene anskaffer gjennom proteolyse på egenhånd. Også laktobasillene drar nytte av å vokse i symbiose med streptokokkene, grunnet sistnevntes produksjon av maursyre og CO₂ (Robinson et al. 2006). Siden studiet viste at også *Lb. delbrueckii* IAM1120 produserte små mengder GABA ved vekst alene, kan det ikke utelukkes at den produserte en større mengde GABA under symbiose enn antydnet av Watanabe et al. (2011). I tillegg vil pH i yoghurt være høyere enn pH 3,5. Ratanaburee et al. (2013) rapporterte at inokulering av to GAD-positive stammer økte mengden GABA i Nahm, en fermentert pølse. Tilsetning av natriumglutamat og inokuleringsmengden hadde også betydning for mengde GABA produsert.

Med hensyn til den store forskjellen i mengde GABA produsert i de to yoghurttypene vil det være av interesse å undersøke det bakteriologiske innholdet i disse to kulturene, og de ulike stammenes evne til å produsere GABA.

5.4.4 Glutamin

I kefir og kulturmilk ble mengden glutamin redusert fra 0 – 8 timers fermentering. Glutamin kan deamineres til pyroglutamat (Fernández & Zúñiga 2006), men denne forbindelsen ble

ikke påvist i disse produktene før ved 12 timer fermentering. Aminosyren kan ha blitt benyttet i proteinsyntese eller blitt omdannet til glutaminsyre via deaminering (Liu et al. 2003).

Økningen i konsentrasjonen av glutamin under fermentering i 8 – 14 timer kan skyldes melkesyrebakterienes proteolytiske aktivitet (Niven et al. 1998). Under lagring av kefir og kulturmilk var konsentrasjonen av glutamin stort sett stabil, noe som kan skyldes redusert proteolytisk aktivitet i denne vekstfasen (Niven et al. 1998).

I tettemilk ble det kun detektert små mengder glutamin under både fermentering og lagring. Etersom mengden glutamin som ble detektert var såpass liten og med store standardavvik, kan det tyde på at resultatet kun er støy fra instrumentet. Dette kan tyde på at melkesyrebakteriene i tettemilk var i stand til å katabolisere den mengden glutamin frigjort fra den proteolytiske aktiviteten. I den kommersielle tettemilken ble det derimot observert en økning i mengde glutamin, etter lagring i mer enn 30 dager. Dette kan for eksempel skyldes lysesering av bakterieceller og dermed lekkasje av intracellulære aminosyrer eller peptidaser ut i melken (Kieronczyk et al. 2001).

I yoghurt fermentert med YF-L901 økte mengden glutamin de første to timene, for deretter å avta under videre fermentering og lagring. Det motsatte ble observert i yoghurt med kultur YC-183 hvor konsentrasjonen steg under fermentering og lagring, og hvor konsentrasjonen også var betydelig høyere. Dette kan tyde på at omdannelsen av glutamin også kan være stammespesifikk, ettersom de to yoghurtkulturene har tydelig ulik omsetning av glutamin. Flere studier har bevist at noen melkesyrebakterier kan omsette glutamin, men metabolismen er ikke kjent i detalj (Fernández & Zúñiga 2006). Glutamin cyclotransferase kan omdanne glutamin til pyroglutamat og ammoniakk, og denne aktiviteten har blitt påvist hos *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* og *Lb. helveticus* (Mucchetti et al. 2002).

Konsentrasjonen av glutamin økte mer under fermentering og lagring i yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre enn den uten tilsetning. En forklaring kan være at den høye konsentrasjonen av glutaminsyre inhiberer deaminering av glutamin til glutaminsyre, men dette forklarer ikke hvorfor mengden glutamin fortsetter å øke under lagring når konsentrasjonen av glutamat er redusert til «normalt» nivå. Det har ikke lyktes å finne rapporterte muligheter for dannelse av glutamin fra glutaminsyre.

5.4.5 Arginin, citrullin og ornitin

Arginin akkumulerte i melken etter 12 timers fermentering av kefir, kulturmilk og tettemilk uten nevneverdig økning i mengde citrullin og ornitin. Gjennom resten av fermenteringsforløpet ble arginin fullstendig metabolisert i alle tre produktene, samtidig som konsentrasjonen av citrullin og ornitin økte. Som nevnt, omdannes arginin via arginin-deiminaseveien hos mange bakterieslekter til citrullin og/eller ornitin (Fernández & Zúñiga 2006). Det antas at deiminering av arginin er et forsvar mot lav intracellulær pH (Cotter & Hill 2003), noe som kan forklare en nedgang i mengde arginin først lenger ut i fermenteringsløpet. Denne metabolismen er spesielt kjent hos *L. lactis* subsp. *lactis* (Liu et al. 2003), som finnes i kefir (Grønnevik et al. 2011) og kulturmilk, men også *Pediococcus*, *Lactobacillus brevis* og *Lactobacillus fermentum* kan forbruke arginin (Liu et al. 2003). Konsentrasjonen av ornitin er høyere enn for citrullin, noe som viser at mesteparten av citrullinen fra nedbrytning av arginin ble videre omdannet til ornitin. Sammenlagt mengde citrullin og ornitin overstiger den høyest målte konsentrasjonen av arginin under fermentering, noe som kan tyde på proteolytisk aktivitet som frigjør arginin fra peptider.

For tettemilk viste standardavvikene stor variasjon i mengden av arginin, citrullin og ornitin. Ettersom deiminering av arginin som nevnt kan være respons mot lav intracellulær pH (Cotter & Hill 2003), kan variasjonen i konsentrasjon av aminosyrene skyldes forskyvningen i syrningsforløpet mellom de ulike forsøkene. Ved lagring av tettemilk fra 20 til 60 dager ble det ikke detektert arginin, samtidig som konsentrasjonen av citrullin og ornitin var stabil. Dette kan tyde på at arginin ikke lenger blir frigjort fra peptider, og dermed mindre proteolytisk aktivitet etter 20 dagers lagring ved 4 °C.

I begge yoghurttypene (YF-L901 og YC-183) ble arginin redusert i løpet av de fire første timene. Det ble ikke dannet citrullin eller ornitin i yoghurten, så arginin har ikke blitt katabolisert via arginin-deiminaseveien. Det ble imidlertid målt en liten mengde citrullin i alle de tre yoghurtvariantene, men hvor dette kommer fra er usikkert, og kan være støy med tanke på hvor lave konsentrasjoner som faktisk ble målt. Citrullin kan imidlertid syntetiseres fra ornitin av en spesialisert carbamoyl transferase (Fernández & Zúñiga 2006), men syrekulturen er avhengig av tilgjengelig ornitin i vekstmediet, noe som ikke var tilfellet. Under fermentering og lagring ble den lille mengden citrullin redusert, men ornitin ble ikke detektert i noen av prøvene. Hvorfor det ble målt citrullin i yoghurten er usikkert. Arginin kan

dekarboksyleres til agmatin, men dette er i følge Fernández og Zúñiga (2006) kun rapportert hos *Lactobacillus hilgardii* X1B. Det kan antas at arginin ble benyttet i proteinsyntese.

Det ble observert at yoghurten med YC-183 oppnådde en høyere konsentrasjon av arginin enn YF-L901 i løpet av lagringsperioden, noe som kan tyde på at førstnevnte hadde høyere proteolytisk aktivitet under lagring. Kun mengden arginin målt i yoghurt med YC-183 samsvarer med tidligere rapporterte verdier for arginin i melk og yoghurt (Tamime & Robinson 1993).

Det ble ikke observert noen innvirkning på mengde arginin forårsaket av tilsatt glutaminsyre i yoghurt syrnet med YC-183.

5.4.6 Asparaginsyre og alanin

I kefir økte konsentrasjonen av asparaginsyre under hele fermenteringen, for deretter å være stabil de første tre ukene av lagringsperioden. Den siste uken ble mengden asparaginsyre noe redusert. Grønnevik et al. (2011) rapporterte også en stabil mengde asparaginsyre i kefir under lagring. Omsetningen av asparaginsyre i kulturmilk og tettemilk fulgte samme utvikling, men produksjonen av asparaginsyre var noe større i kefir, og lavest i tettemilk. Økningen av asparaginsyre kan komme fra deaminering av asparagin katalysert av asparaginaser, som samtidig produserer NH₃ (Fernández & Zúñiga 2006). *Leuconostoc mesenteroides* kan syntetisere asparaginsyre fra oxalacetat ved hjelp av transaminaser (Marty-Teyssset et al. 1996). En annen mulighet for dannelse av asparaginsyre er fra pyruvat og CO₂ katalysert av pyruvat karboksylase hos *L. lactis* subsp. *lactis* (Liu et al. 2003). Konsentrasjonen av asparaginsyre kan også øke grunnet proteolytisk aktivitet. I det økningen av asparaginsyre begynner å avta, etter 12 timer fermentering, øker mengden alanin i disse produktene. Asparaginsyre kan dekarboksyleres til alanin. Aspartat dekarboksylase katalyserer dekarboksylering av asparaginsyre til CO₂ og alanin. Reaksjonen drives av et antiport-transportsystem, hvor intracellulær alanin veksles mot ekstracellulær aspartat gjennom cellemembranen. Aktiviteten av aspartat dekarboksylase har blitt beskrevet hos *Tetragenococcus halophilus* og *Lactobacillus* sp. M3 (Fernández & Zúñiga 2006).

I yoghurt fermentert med YF-L901 sank konsentrasjonen av asparaginsyre i løpet av 0 til 4 timer fermentering, for deretter å sakte bli redusert i løpet av de siste timene med fermentering og under lagring. Det ble imidlertid rapportert en økt mengde asparaginsyre i yoghurt kontra melk av Tamime og Robinson (1993), noe som samsvarer med funn i begge

yoghurtvariantene fermentert med YC-183 hvor mengden asparaginsyre økte jevnt fra 4 timer og ut fermenteringsperioden, og fortsatte under lagring. En senkning i asparaginsyre kan, som nevnt, skyldes dekarboksylering til alanin, transaminering til oxalacetat, eller konvertering til fumarsyre og ammoniakk (Fernández & Zúñiga 2006). Noen *Lactobacillus* sp. og *L. lactis* kan omdanne oxalacetat fra transaminering av asparaginsyre til pyruvat, og videre til aromakomponenter som diacetyl og acetoin (Kieronczyk et al. 2004). Aktivitet av aspartase, som produserer fumarsyre og ammoniakk fra asparaginsyre, er kun funnet hos *Lactobacillus murinus* (Fernández & Zúñiga 2006). En stabil konsentrasjon av asparaginsyre kan komme av svakere proteolytisk aktivitet ved 4 °C, eller at like mye asparaginsyre som dannes fra proteolyse omsettes videre til andre komponenter.

I kefir og tettemelk reduseres mengden alanin fra 0 til 12 timer fermentering, mens den i kulturmilk først øker, for deretter å synke frem til 12 timer. Omsetningen av alanin følger omtrent samme forløp hos kefir, kulturmilk og tettemelk gjennom slutten av fermenteringen og lagringsperioden, hvor den øker hele veien. Det har tidligere blitt rapportert et konstant innhold av alanin i kefir i løpet av 4 ukers lagring (Grønnevik et al. 2011). Økningen av alanin kan skyldes dekarboksylering av asparaginsyre, ettersom økningen av asparaginsyre synker i samme tidsrom. Alanin kan også produseres ved transaminering med pyruvat som aminogruppeakseptor, men dette er i følge Fernández og Zúñiga (2006) ikke blitt rapportert hos melkesyrebakterier. En studie av Ziadi et al. (2010) viste imidlertid at *L. lactis* kan danne alanin fra transaminering med pyruvat som aminogruppeakseptor, men at dette kun utgjorde omtrent 3 % av alle transamineringsreaksjoner under fermentering. Liu et al. (2003) skriver at homofermentative laktobasiller muligens kan utnytte pyruvat fra omsetning av serin som aminogruppeakseptor, og danne alanin via transaminering. Kefir kan inneholde homofermentative laktobasiller (Wszolek et al. 2006), så dannelse av alanin fra serin kan være en mulighet. Det kan ikke bekreftes da mengden serin stort sett var stabil under fermentering og lagring av kefir.

I begge yoghurttypene (YC-183 og YF-L901) sank konsentrasjonen av alanin de første to timene, for deretter å øke. I yoghurt med YF-L901 økte konsentrasjonen av alanin mer enn mengde asparaginsyre ble redusert i samme tidsrom, så alanin kan ha blitt produsert gjennom en annen metabolisme enn dekarboksylering av aspartat. I følge Liu et al. (2003) kan homofermentative laktobasiller utnytte pyruvat fra serinmetabolisme som aminogruppeakseptor og produsere alanin via transaminering. Proteolytisk aktivitet vil også kunne føre til økt frigjøring av alanin.

Tilsetning av glutaminsyre hadde ingen innvirkning på omsetningen av asparaginsyre og alanin i yoghurt fermentert med YC-183.

5.4.7 Treonin

Hos kefir og kulturmilk økte og sank konsentrasjonen av treonin gjennom hele fermenteringsløpet, og videre gjennom hele lagringsperioden. Konsentrasjonene som ble målt er lave, og standardavvikene viser stor variasjon i mengde treonin mellom forsøkene for begge produktene, og kan tyde på «støy» fra instrumentet. I tettemilk ble mengden treonin noe redusert under fermentering, men endringen var svært liten. Konsentrasjonen var høyere under lagring, men standardavvikene viste også her stor variasjon mellom innhold av treonin under lagring. Standardavviket kan skyldes forskyvningen i fermenteringsforløpet mellom de ulike forsøkene med tettemilk.

I yoghurtene med syrekultur YF-L901 og YC-183 ble mengden treonin redusert i løpet av de to første timene under fermentering. Treonin brytes hovedsakelig ned til glycin og acetaldehyd via en elimineringsreaksjon katalysert av treonin aldolase, og reaksjonen er viktig for utvikling av den karakteristiske smaken i yoghurt. Mellom 0 og 2 timer økte konsentrasjonen av acetaldehyd med 0,009 mmol/kg, omtrent tilsvarende mengde treonin som ble redusert med i samme tidsrom. Den største økningen av mengde acetaldehyd ble observert fra 2 til 4 timer fermentering. Aktivitet av treonin aldolase har blitt funnet hos *S. thermophilus* og *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, og aktiviteten indueres av treonin og undertrykkes av glycin og cystein (Fernández & Zúñiga 2006). «Knekket» i treonin-kurven hos yoghurtene ved 4 timer skyldes tydelig nedbrytning til glycin og acetaldehyd ettersom konsentrasjonen av sistnevnte øker i stor grad i dette tidsrommet. En forholdsvis stabil mengde glycin og acetaldehyd etter 4 timer fermentering tyder på at nedbrytning av treonin, og dermed dannelse av den karakteristiske yoghurtsmaken, foregår hovedsakelig fra 2 til 4 timer fermentering.

Treonin kan også deamineres til 2-oxobutanoat. 2-oxobutanoat er forløperen ved biosyntese av forgrenede aminosyrer, men det er usikkert om melkesyrebakterier har denne metabolismen. Det er imidlertid funnet gener som koder for treonin deaminase hos *L. lactis*, *L. mesenteroides* og alle streptokokker analysert (Fernández & Zúñiga 2006).

En økt mengde treonin i yoghurttypene i forhold til mengden målt ved starten av fermentering gjenspeiler verdier for mengde treonin i yoghurt og melk som har blitt rapportert av Tamime og Robinson (1993).

5.4.8 Glycin

I kefir og kulturmilk økte mengden glycin fra 0 til 8 timer fermentering, før den sank raskt fra 8 til 12 timer og var stabil gjennom resten av fermenteringsløpet og lagringsperioden. Også i tettemilk økte konsentrasjonen av glycin i første del av fermenteringen, men ikke med like mye som i de to andre produktene. Reduksjon av glycin var heller ikke like kraftig. Ettersom den målte mengden av en aminosyre kan betraktes som summen av produsert og forbrukt aminosyre ved det aktuelle tidspunktet (Niven et al. 1998), ble det frigjort et overskudd av glycin fra 0 til 8 timers fermentering, i forhold til cellenes næringsbehov akkurat da. Glycin kan som nevnt, dannes ved nedbrytning av treonin til acetaldehyd og glycin (Fernández & Zúñiga 2006). En økning i konsentrasjonen av en aminosyre kan også skyldes proteolytisk aktivitet, men dette er først viktigere lengre ut i bakterienes vekstsyklus (Niven et al. 1998)

I alle yoghurtvariantene ble mengden glycin redusert i løpet av de 4 første timene av fermenteringen. Fra 4 timer til slutten av fermentering ble det kun observert en svak økning i mengde glycin i yoghurtene. Under lagring ble det kun observert en økning av glycin i yoghurt syrnet med YC-183 og tilsatt glutaminsyre, men standardavvikene viser at det var stor variasjon mellom forsøkene. Dette samsvarer med tidligere rapporterte verdier for innhold av glycin i yoghurt kontra melk (Tamime & Robinson 1993).

Nedbrytning av glycin er lite kjent. Det har blitt rapportert aktivitet av glycin aminotransferase som reversibelt kan overføre aminogruppen fra glycin til α -ketoglutarat, men i følge Fernández og Zúñiga (2006), kun hos *Lactobacillus plantarum*. Nakae og Elliott (1965) har imidlertid rapportert at *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Lactobacillus* no. 138 kan danne eddiksyre fra nedbrytning av glycin.

5.4.9 Serin

I kefir, kulturmilk og tettemilk både økte og sank konsentrasjonen av serin gjennom fermentering og lagring, noe som ikke samsvarer med en studie der det ble observert en økning i mengde serin i kefir under lagring (Grønnevik et al. 2011). Standardavvikene viser at det var variasjon i mengde serin mellom forsøkene for hvert av produktene. Mange melkesyrebakterier kan omdanne serin direkte til pyruvat via deaminering katalysert av enten serin deaminase eller treonin deaminase (Fernández & Zúñiga 2006). Det er vanskelig å si noe om metabolismen av serin i disse produktene ettersom variasjonene er såpass store. I tillegg kan pyruvat dannet ved deaminering av serin, også omdannes og nedbrytes til en rekke andre

komponenter. Tilsynelatende økte mengden serin de siste timene av fermenteringen, og det kan være forårsaket av økt proteolytisk aktivitet i denne perioden. En studie av Liu et al. (2003) viste at stammer av *Leuconostoc mesenteroides* har liten evne til å metabolisere serin.

I yoghurt med YF-L901 ble mengden serin redusert i løpet av de første 2 timene av fermenteringen. Som nevnt, kan serin deamineres til pyruvat (Fernández & Zúñiga 2006), men også benyttes i syntese av proteiner. Gjennom resten av fermenteringen var mengden målt serin svært lav, også gjennom lagringsperioden. Dette kan tyde på at den mengden serin som ble produsert gjennom proteolyse også ble utnyttet av syrekulturen umiddelbart. Dette stemmer ikke med verdiene rapportert av Tamime og Robinson (1993), som antyder en økt mengde serin i yoghurt i forhold til melk.

I yoghurt med syrekultur YC-183 ble mengden serin noe redusert de første to timene, og var forholdsvis stabil fra 2 til 4 timer. Under resten av fermenteringen økte konsentrasjonen av serin betydelig, noe som tyder på at det ble frigjort en større mengde av aminosyren fra peptider enn det syrekulturens ernæringsmessige krav i denne vekstfasen (Niven et al. 1998). En større mengde serin i ferdig yoghurt i forhold til melken før fermentering samsvarer med tidligere rapporterte endringer i melk ved fermentering av yoghurt (Tamime & Robinson 1993).

5.4.10 Metionin

Metionin ble kun detektert ved 8 timer fermentering i kefir og kulturmilk. I tettemilk ble det målt en konsentrasjon av metionin på omtrent 0,005 mmol/kg fra 12 til 16 timer fermentering og gjennom lagringsperioden. Standardavviket viste stor variasjon mellom forsøkene, stå den detekterte mengden kan være «støy» fra instrumentet. Melkesyrebakterier kan omdanne metionin via flere ulike veier. Som nevnt, kan metionin deamineres til α -keto- γ -metyltiobutyrat, som videre omdannes til metantiol via detiometylering. Andre muligheter er konvertering til cystationin gjennom S-adenosyl-metionin eller en samtidig deaminering og detiometylering direkte til metantiol (Fernández & Zúñiga 2006). Nedbrytning av metionin til metantiol og videre til DMDS og DMTS er kjent hos blant annet *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei* og *Lb. helveticus* (Yvon & Rijnen 2001). Økningen i mengde metionin under lagring av kommersiell tettemilk kan skyldes lysering av cellene og dermed frigjøring av intracellulære peptidaser, men dette kan man ikke si med sikkerhet ettersom det ikke er foretatt noen mikrobiologiske analyser.

I yoghurt med syrekultur YF-L901 ble det ikke funnet metionin ved noe tidspunkt. Laktobasiller og *S. thermophilus* bryter hovedsakelig ned metionin ved hjelp av en aminotransferase (Fernández & Zúñiga 2006). Det ble funnet en jevn økning av metionin under fermentering av yoghurt med YC-183. Denne yoghurtkulturen har enten mindre evne til å omsette metionin, eller høyere proteolytisk aktivitet slik at det frigjøres en større mengde metionin fra kaseinet enn det cellene har behov for. Det har tidligere blitt registrert høyere verdier for metionin i yoghurt enn i melk (Tamime & Robinson 1993), noe som understøttes av resultatene fra yoghurt YC-183, men ikke yoghurt med YF-L901.

5.4.11 Lysin

Konsentrasjonen av lysin økte jevnt i kefir fra 0 til 12 timer fermentering, for deretter å avta. Under lagring var mengden lysin i kefir forholdsvis stabil på omtrent 0,22 mmol/kg. Omsetning av lysin i kulturmilk var likt som i kefir. I tettemilk økte konsentrasjonen av lysin jevnt gjennom hele fermenteringen, men standardavviket viser at det var variasjon mellom forsøkene med tettemilk. Det ble målt 0,27 mmol/kg lysin i kulturmilk og tettemilk under lagring. I den kommersielle tettemilken var også mengden lysin stabil frem til 60 dagers lagring. Økningen av mengde lysin kan skyldes syrekulturens proteolytisk aktivitet, som frigjør aminosyrer (Niven et al. 1998). Som nevnt, vil mengden av en aminosyre som måles reflektere overskuddet av cellenes ernæringsmessige krav ved det aktuelle tidspunktet.

I yoghurt med syrekultur YF-L901 ble det observert en reduksjon i mengde lysin fra 0 til 4 timer fermentering. Lysin kan, som nevnt, dekarboksyleres til det biogene aminet cadaverin av lysin dekarboksylase, men denne aktiviteten har ikke blitt identifisert hos melkesyrebakterier (Fernández & Zúñiga 2006). Lysin kan ha blitt benyttet i proteinsyntese av syrekulturen. *Streptococcus thermophilus* har generelt komplekse næringskrav når det gjelder tilgjengelige aminosyrer (Simova et al. 2006). Økningen i mengde lysin etter 4 timer fermentering kan komme av proteolytisk aktivitet (Niven et al. 1998).

Mengden lysin økte jevnt gjennom hele fermenteringen av yoghurt med syrekultur YC-183. Standardavvikene viser at det var variasjon i målt konsentrasjon av lysin mellom de ulike forsøkene. Generelt var konsentrasjonen av lysin høyere i yoghurt med YC-183 enn i YF-L901. Det kan skyldes variasjon i næringskrav mellom stammene i de ulike kulturene, eller ulik proteolytisk evne. Tamime og Robinson (1993) har også rapportert et noe høyere innhold av lysin i yoghurt enn i melk.

5.4.12 Asparagin

Det ble målt lave konsentrasjoner av asparagin i kefir og kulturmilk ved 0 timer, og dette ble ytterligere redusert fra 0 til 8 timer fermentering. Også i yoghurttypene ble det målt en liten mengde asparagin ved starten av fermentering, som også ble redusert fra 0 til 2 timer. Som nevnt, kan asparagin deamineres til asparaginsyre av asparaginaser (Fernández & Zúñiga 2006). Fra 8 til 16 timer fermentering økte mengden asparagin i både kefir, kulturmilk og tettemilk, noe som kan skyldes den proteolytiske aktiviteten til syrekulturen (Niven et al. 1998). Økningen avtok under lagring, men standardavvikene viste stor variasjon mellom forsøkene innenfor hvert produkt. Under lagring ble det observert en stabilisering av mengde asparagin, noe som støttes av tidligere funn av Grønnevik et al. (2011), og som kan tyde på reduksjon av proteolytisk aktivitet. Standardavviket viste at det var stor variasjon mellom forsøkene for hvert produkt. I yoghurt med syrekultur YC-183 økte mengden asparagin videre også under lagring. Dette kan enten skyldes at kulturen fremdeles er ganske aktiv under lagring, eller lysing av celler og frigjøring av intracellulære peptidaser.

5.4.13 Histidin

Konsentrasjonen av histidin økte jevnt fra 0 til 14 timer, før den ble stabilisert i kefir og kulturmilk. Under lagring både avtok og økte konsentrasjonen i begge produktene noe, noe som også tidligere har blitt vist i kefir (Grønnevik et al. 2011). Økningen i mengde histidin kan skyldes syrekulturens proteolytiske aktivitet (Niven et al. 1998). Histidin kan dekarboksyleres til det biogene aminet histamin (Mayo et al. 2010). Enzymet som katalyserer reaksjonen, histidin dekarboksylyase, syntetiseres i en inaktiv form som aktiveres ved sur pH (Fernández & Zúñiga 2006). Via deaminering katalysert av histidin-ammoniakk-lyase kan histidin omdannes til urocanat, som videre kan konverteres til glutaminsyre (Fernández & Zúñiga 2006).

Konsentrasjonen av histidin økte også jevnt ved fermentering av yoghurtene med ulike syrekultur, noe som understøtter tidligere rapporterte nivåer av histidin i yoghurt i forhold til melk (Tamime & Robinson 1993). *Streptococcus thermophilus* har gener som koder for histidin-ammoniakk-lyase, og kan dermed deaminere histidin, men mangler noen av enzymene for omdannelse av urocanat til glutaminsyre (Fernández & Zúñiga 2006).

5.4.14 Frie aminosyrer

I de mesofile surmelksproduktene kefir, kulturmilk og tettemilk økte den totale mengden av frie aminosyrer gjennom hele fermenteringen, og var noenlunde stabil under lagring. I de to yoghurttypene ble det observert en reduksjon i den totale mengden aminosyrer i løpet av de første timene av fermenteringen, før mengden økte. Aminosyrer som er fritt tilgjengelige i vekstmediet er viktigst for cellevekst i begynnelsen av den logaritmiske vekstfasen (Niven et al. 1998), noe som kommer tydelig frem i de to yoghurttypene. Den proteolytiske aktiviteten hos syrekulturen vil bli viktigere etter hvert som de frie aminosyrene opprinnelig til stede har blitt metabolisert og tilgjengelige nitrogenkilder dermed er begrenset. Den målte mengden vil være en nettoverdi som er påvirket av opptak og frigjøring av aminosyrer fra peptider til en hver tid.

Felles for alle produktene er at konsentrasjonen av forgrenede aminosyrer, aromatiske aminosyrer, asparagin, histidin og lysin generelt økte under fermentering, og er noenlunde stabil under lagring, noe som bidrar til økningen i den totale mengden aminosyrer i surmelksproduktene. I de mesofile produktene blir alanin, arginin, glycin, glutamin og metionin forbrukt i løpet av fermenteringen, mens glutaminsyre blir forbrukt under lagring. Innholdet av glutaminsyre var dominerende i alle produktene, noe som i kefir støttes av funn rapportert av Grønnevik et al. (2011), og i yoghurt av rapporterte verdier av Tamime og Robinson (1993).

I yoghurt ble det frigjort en større mengde aminosyrer gjennom siste del av fermenteringen, noe som kan tyde på økt proteolytisk aktivitet hos syrekulturen i denne perioden. En mer stabil total mengde frie aminosyrer under lagring kan komme av redusert proteolytisk aktivitet ved lavere temperatur (4 °C). Økningen av total mengde aminosyrer i yoghurt i løpet av fermentering er i tråd med verdier tidligere rapportert av (Tamime & Robinson 1993).

Yoghurtkulturen YF-L901 frigjorde den minste mengden av aminosyrer, kun en tredjedel av mengdene funnet i kefir og yoghurt med syrekultur YC-183. Kulturmilk og tettemilk hadde et litt lavere totalt innhold av frie aminosyrer enn kefir og yoghurt YC-183.

5.5 Oppsummering av aminosyremetabolisme

5.5.1 Viktigste forskjeller i aminosyremetabolisme i surmelksprodukter

Metabolismen av aminosyrer var generelt lik i de mesofile produktene kefir, kulturmilk og tettemilk, og i de to yoghurtvariantene som har termofil syrekultur. Det ble likevel observert noen forskjeller innad i og mellom disse to gruppene.

Resultatene i dette studiet viste at omsetningen av glutaminsyre til GABA varierte i stor grad mellom ulike surmelksprodukter. Bakteriestammene i tettemilk viste en større evne til å produsere GABA enn bakteriestammene i kefir og kulturmilk. Dette var også den viktigste ulikheten mellom yoghurtkulturene YF-L901 og YC-183, hvor førstnevnte ikke produserte noe og den andre produserte betydelige mengder GABA. Den største økningen i GABA ble observert under lagring for samtlige produkter (unntatt yoghurt YF-L901). I de mesofile produktene økte mengden jevnt gjennom lagringstiden, mens i yoghurten ble GABA produsert i to trinn, først under lagring og deretter ble resterende glutaminsyre metabolisert i løpet av de to første ukene i lagringsperioden. At mengden glutaminsyre var stabil kun under lagring i yoghurt YF-L901 henger sammen med den manglende dannelsen av GABA.

I kefir ble noe av mengden forgrenede aminosyrer omdannet via transaminering og videre dekarboksylering ved lagring, noe som ikke ble observert i tettemilk, og kun i svært liten grad i kulturmilk. Dette ble heller ikke observert i noen av yoghurtvariantene. Det er mulig at gjærstammene i kefir kan transaminere leucin, men aktiviteten er også rapportert for villstammen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* C1 (Evenstad 2008). Det ble også observert en reduksjon i mengde tyrosin gjennom slutten av fermenteringen og under lagring i yoghurt YF-L901 som ikke ble observert i noen av de andre produktene.

Omsetningen av glutamin varierte også mellom produktene, hvor mengden i hovedsak økte under fermentering i de mesofile produktene, og ble redusert i yoghurt YF-L901. Til tross for at glutaminmengden sank i denne yoghurten var dette det eneste produktet hvor pyroglutamat ikke ble detektert. Omsetningen av glutamin var også helt annerledes i yoghurt YC-183, hvor mengden økte både under fermentering og lagring samtidig som pyroglutamat ble dannet.

Resultatene i denne oppgaven viste at arginin ikke ble metabolisert til citrullin og ornitin av yoghurtbakteriene, i motsetning til av de mesofile syrekulturene. Yoghurtkultur YF-L901 økte ikke mengden arginin under fermentering og lagring, noe som ble observert i YC-183. Det var

også ulikheter mellom de mesofile og termofile produktene med hensyn på metabolisme av asparaginsyre, til tross for at utviklingen i mengde alanin var noenlunde lik. I de mesofile produktene økte konsentrasjonen av asparaginsyre til omtrent 0,18 mmol/kg gjennom fermenteringen og var stabil under lagring. I yoghurt YF-901 sank mengden frem til 4 timer for deretter å være stabil, i motsetning til i yoghurt YC-183 hvor asparaginsyre økte gjennom slutten av fermenteringen og under lagring. Samtidig var innholdet av alanin omtrent 3 ganger høyere i yoghurt YC-183 enn i de andre produktene under lagring.

Konsentrasjonen av treonin økte i de to yoghurtvariantene i slutten av fermenteringen mens den var lav og stabil i de mesofile surmelksproduktene. Samtidig ble det målt en større mengde acetaldehyd i begge yoghurttypene enn i de mesofile, hvor acetaldehyd i større grad ble redusert til etanol. Også omsetningen av glycin skiller de mesofile produktene fra de termofile yoghurttypene, hvor glycin først akkumulerte i de mesofile produktene for deretter å bli fullstendig metabolisert.

Det totale innholdet av frie aminosyrer i ferdig produkt varierte noe mellom produktene, hvor kefir og yoghurt YC-183 hadde det høyeste innholdet. I tillegg økte mengden aminosyrer generelt i større grad i yoghurt med YC-183 enn med YF-L901 under lagring. YC-183 hadde omtrent 3 ganger så høyt innhold av frie aminosyrer som YF-L901, og hadde generelt høyere proteolytisk aktivitet.

5.5.2 Glutaminsyres innvirkning på aminosyremetabolisme i yoghurt

I yoghurt syrnert med YC-183, med og uten tilsetning av glutaminsyre, ble det observert at konsentrasjonen av mange forbindelser generelt var litt lavere i varianten tilsatt glutaminsyre, der utviklingen var lik i begge variantene. Dette skyldes mest sannsynlig volumøkningen på omtrent 10 % som oppstod ved tilsetning av glutaminsyreløsningen.

Først og fremst førte tilsetning av glutaminsyre til en økning av mengde GABA i produktet. Tilnærmet all mengde tilsatt glutaminsyre ble dekarboksylert til GABA. Uavhengig av opprinnelig mengde glutaminsyre ved begynnelsen av fermenteringen, ble mesteparten først omsatt til GABA under lagring ved 4 °C.

Tilsetning av glutaminsyre i yoghurt førte til en generelt høyere konsentrasjon av glutamin under fermentering, og en mye større økning under lagring, noe som er vanskelig å forklare. Den store mengden tilsatt glutaminsyre kan ha påvirket graden av deaminering av glutamin til

glutamat, men det forklarer ikke den fortsettende økningen under lagring. Det har ikke lyktes å finne rapporterte muligheter for dannelse av glutamin fra glutaminsyre.

Det ble målt høyere konsentrasjoner av citrullin ved alle tidspunkt i yoghurtvarianten tilsatt glutaminsyre, uten at ornitin ble detektert i noen av variantene. Mengden av citrullin var imidlertid svært lav i begge variantene, og kan være et resultat av «støy» i prøvenes kromatogram.

Mengden av glycin økte i større grad under lagring i varianten tilsatt glutaminsyre, enn i varianten uten. Standardavvikene viser imidlertid stor variasjon i glycinkonsentrasjon i yoghurt tilsatt glutaminsyre mellom forsøkene.

Tilsetning av glutaminsyre kan ha en ulik innvirkning på metabolisme hos andre syrekulturer. For eksempel kan det forventes at glutaminsyre tilsatt i kefir eller kulturmilk ikke blir fullstendig omsatt til GABA under lagring, ettersom resultatene i denne studien viste at disse produktene inneholdt en større mengde glutaminsyre gjennom hele lagringsperioden enn yoghurt YC-183.

5.6 Fremtidige aspekter

I denne oppgaven ble aminosyremetabolismen i kefir, kulturmilk, tettemilk og yoghurt undersøkt under fermentering og lagring. Spesielt produksjon av GABA i disse produktene har vært av interesse på grunn av aminosyrens gunstige helseeffekter. Derfor ble det i tillegg gjort et forsøk på å øke mengde GABA i yoghurt naturell ved å tilsette L-glutaminsyre i melken før inokulering. Det har ikke tidligere blitt rapportert innhold av GABA i kulturmilk eller tettemilk.

Det har tidligere blitt gjort forsøk på økning av mengde GABA (Gardner-Fortier et al. 2013; Kim et al. 2009; Mazur et al. 2011; Yang et al. 2008), men kartlegging over utvikling av mengden aminosyrer under både fermentering og lagring har ikke tidligere blitt rapportert for surmelksproduktene. For videre arbeid i forhold til økt innhold av GABA, vil det være av interesse å undersøke muligheten for økt konsentrasjon i flere typer fermenterte meieriprodukter. For eksempel ville det være interessant å undersøke om tilsetningen av glutaminsyre har samme effekt på produksjon av GABA i kefir, kulturmilk og tettemilk som i yoghurt (YC-183). Dette kan gjøres på samme måte som i dette forsøket, hvor melken ble tilsatt en bestemt mengde glutaminsyre før inokulering. Det må imidlertid også undersøkes

om tilsetning av glutaminsyre vil påvirke produktet med hensyn på blant annet endringer i metabolisme hos syrekulturen og endringer i sensoriske egenskaper i ferdigstilt produkt.

Ettersom tilsetningsstoffer er omdiskutert, vil det være aktuelt å undersøke andre metoder for å øke mengden GABA i surmelksprodukter. Dette kan for eksempel gjøres ved å finne de optimale betingelsene for produksjon av GAD hos den aktuelle bakteriestammen, samt enzymets optimale forhold for høyest aktivitet på glutaminsyre. De optimale betingelsene for produksjon av GABA kan variere, og bør derfor bestemmes for den aktuelle stammen for å oppnå høyest mulig mengde GABA i produktet. Det kan også være aktuelt å undersøke sammensetning av ulike bakteriestammer som kan «samarbeide» for å oppnå høyere mengder GABA allerede under fermentering.

I denne studien har det ikke blitt gjort noen mikrobiologiske analyser av produktene eller av syrekulturene. Ettersom denne studien viste at syrekulturene YF-L901 og YC-183 hadde svært ulik evne til å produsere GABA, ville det være av interesse å undersøke det bakteriologiske innholdet i disse to kulturene, samt de ulike stammenes evne til å produsere GABA. Det vil også være av interesse å granske mikrofloraen i tettemelk, og undersøke evnen til å produsere GABA i bakteriestammene i tettemelk, samt om sammensetningen av kulturen har betydning for omsetningen av aminosyrer, spesielt med tanke på mengde GABA i ferdig produkt. I tillegg vil det være av interesse å undersøke hva som forårsaker økt mengde av aminosyrer mot slutten av holdbarhetstiden i tettemelk.

Det vil også være aktuelt å undersøke hvilke teknologiske faktorer som har betydning for produksjon av GABA, ettersom konsentrasjonen av GABA var på ulikt nivå i de ulike produksjonene av kommersiell tettemelk, og ettersom det tidligere er rapportert høyere mengder GABA i kefir (Grønnevik et al. 2011). Ettersom det ble observert en spesiell to-trinns produksjon av GABA i yoghurt med syrekultur YC-183 som ikke tidligere har blitt vist, vil det være interessant å undersøke om dette forekommer for flere GABA-produserende yoghurtkulturer, om det kommer av temperaturendringen som oppstår ved lagring, og om det påvirkes av balansen mellom streptokokker og laktobasiller i mediet.

6 REFERANSER

- Al-Wadei, H. A. N., Ullah, M. F. & Al-Wadei, M. (2011). GABA (γ -aminobutyric acid), a non-protein amino acid counters the β -adrenergic cascade-activated oncogenic signaling in pancreatic cancer: A review of experimental evidence. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55: 1745 - 1758.
- Aoki, H., Furuya, Y., Endo, Y. & Fujimoto, K. (2003). Effect of γ -aminobutyric acid - enriched Tempeh-like fermented soybean (GABA-Tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67 (8): 1806 - 0808.
- Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, 24 (2): 238-242.
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. (2012). Gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113: 411-417.
- Bekal, S., Beeumen, J. V., Samyn, B., Garmyn, D., Heinini, S., Diviès, C. & Prevóst, H. (1998). Purification of *Leuconostoc mesenteroides* Citrate Lyase and Cloning and Characterization of the citCDEFG Gene Cluster. *Journal of Bacteriology*, 180 (3): 647 - 654.
- Brown-Esters, O., Mc Namara, P. & Savaiano, D. (2012). Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, 22 (2): 98-103.
- Bütikofer, U. & Ardö, Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 337: 24 - 32.
- Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M. & Hugenholtz, J. (2002). Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11): 5656 - 5662.
- Chr.Hansen. (2008). *F-DVS YC-183 Yo-Flex Product Information*. 3 s.
- Christensen, J., Dudley, E., Pederson, J. & Steele, J. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76 (1-4): 217-246.
- Cotter, P. D. & Hill, C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (3): 429-453.

- de Kruif, C. G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9 (3–6): 183-188.
- de Vos, W. M. & Hugenholtz, J. (2004). Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology*, 22 (2): 72-79.
- den Hengst, C. D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O. P. & Kok, J. (2005). Probing Direct Interactions between CodY and the oppD Promoter of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 187 (2): 512-521.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M. & Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, 56 (2): 351-355.
- Duboc, P. & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11 (9): 759-768.
- Engels, W. J. M., Alting, A. C., Arntz, M. M. T. G., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., Smit, G. & Visser, S. (2000). Partial purification and characterization of two aminotransferases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 involved in the catabolism of methionine and branched-chain amino acids. *International Dairy Journal*, 10 (7): 443-452.
- Evenstad, A. (2008). *Vekst og metabolisme til Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis c1 i UHT melk*. Masteroppgave. Ås, Norge: Universitetet for miljø og biovitenskap, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. 132 s.
- Fernández, M. & Zúñiga, M. (2006). Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical reviews in Microbiology*, 32: 155 - 183.
- Fondén, R., Leporanta, K. & Svensson, U. (2006). Nordic/Scandinavian Fermented Milk Products. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented Milks*, s. 156 - 173. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (2000). Starter Cultures. I: Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (red.) *Fundamentals of Cheese Science*, s. 54 - 97. Gaithersburg, Maryland: Asoen Publishers, Inc.
- Gardner-Fortier, C., St-Gelais, D., Champagne, C. P. & Vuillemard, J.-C. (2013). Determination of optimal conditions for γ -aminobutyric acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *International Dairy Journal*, 32 (2): 136-143.
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21 (9): 601-606.

- Grønnevik, H. (2012). *Kefir and Kefir grains: diversity of chemical properties and microflora, paper III*. Philosophiae Doctor (PhD). Ås, Norway: Norwegian University of Life Sciences, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science.
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. (2012). Corrigendum to “Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage” [Int Dairy J 21 (2011) 601–606]. *International Dairy Journal*, 25 (1): 1-2.
- Guimont, C. (2002). Change of free amino acids in M17 medium after growth of *Streptococcus thermophilus* and identification of a glutamine transport ATP-binding protein. *International Dairy Journal*, 12: 729-736.
- Hansen, B. V., Houlberg, U. & Ardö, Y. (2001). Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal*, 11 (4–7): 225-233.
- Hartmann, R. & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2): 163-169.
- Haug, I. (1996). *Bakteriologiske og teknologiske aspekter vedrørende produksjon av tettemelk*. Hovedoppgave. Ås, Norge: Norges landbrukshøgskole, Institutt for næringsmiddelfag. 83 s.
- Hertzler, S. R. & Savaiano, D. A. (1996). Colonic adaption to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64: 232 - 236.
- Hertzler, S. R. & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103 (5): 582-587.
- Huang, J., Mei, L., Sheng, Q., Yao, S. & Lin, D. (2007). Purification and Characterization of Glutamate Decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 Isolated from Fresh Milk. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15 (2): 157-161.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M. & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57 (3): 490 - 495.
- Jolly, L., Vincent, S. J. F., Duboc, P. & Neeser, J.-R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 367 - 374.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 209 - 224.

- Kieronczyk, A., Skeie, S., Olsen, K. & Langsrud, T. (2001). Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. *International Dairy Journal*, 11 (4–7): 217-224.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le Bars, D. & Yvon, M. (2004). The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *International Dairy Journal*, 14 (3): 227-235.
- Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G. & Yvon, M. (2006). Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus Lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (5): 1114 - 1122.
- Kim, J. Y., Lee, M. Y., Ji, G. E., Lee, Y. S. & Hwang, K. T. (2009). Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (1): 12-16.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T. & Itoh, T. (1998). Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 169 - 175.
- Kitts, D. D. & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (16): 1309 -1323.
- Ko, C. Y., Lin, H.-T. V. & Tsai, G. J. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, 48: 559 - 568.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16 (9): 945-960.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1 (2): 177-187.
- Kumar, S. & Punekar, N. S. (1997). The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycological research*, 101 (4): 403-409.
- Le Bars, D. & Yvon, M. (2008). Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (1): 171 - 177.
- Lindsay, R. C., Day, E. A. & Sandine, W. E. (1965). Green Flavor Defect in Lactic Starter Cultures. *Journal of Dairy Science*, 48 (7): 863-869.

- Liu, S.-Q. (2002). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 115 - 131.
- Liu, S. Q., Asmundson, R. V., Holland, R. & Crow, V. L. (1997). Acetaldehyde Metabolism by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* under stress conditions. *International Dairy Journal*, 7 (2–3): 175-183.
- Liu, S. Q., Holland, R. & Crow, V. L. (2003). The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *International Journal of Food Microbiology*, 86 (3): 257-269.
- Lucey, J. A. & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30 (7): 529-542.
- Marty-Teyssset, C., Posthuma, C., Lolkema, J. S., Schmitt, P., Divies, C. & Konings, W. N. (1996). Proton Motive Force Generation by Citrolactic Fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology*, 178 (8): 2178 - 2185.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P. & Bardowski, J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. I: Mozzi, F., Raya, R. R. & Vignolo, G. M. (red.) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, Novel Applications*, s. 3 - 34. USA: Blackwell Publishing.
- Mazur, R., Kovalovská, K. & Hudec, J. (2011). Changes in selectivity of gamma-aminobutyric acid formation effected by fermentation conditions and microorganisms resources. *journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1 (2): 164-171.
- Mucchetti, G., Locci, F., Massara, P., Vitale, R. & Neviani, E. (2002). Production of Pyroglutamic Acid by Thermophilic Lactic Acid Bacteria in Hard-cooked Mini-Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 85 (10): 2489-2496.
- Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H. & Yamada, H. (2011). Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *International Immunopharmacology*, 11 (12): 2246-2250.
- Nakae, T. & Elliott, J. A. (1965). Production of Volatile Fatty Acids by Some Lactic Acid Bacteria. II. Selective Formation of Volatile Fatty Acids by Degradation of Amino Acids. *Journal of Dairy Science*, 48 (3): 293-299.
- Nakagawa, T., Yokozawa, T., Kim, H. J. & Shibahara, N. (2005). Protective effects of gamma-aminobutyric acid in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology*, 51 (4): 278 - 282.

- Narvhus, J. A., Thorvaldsen, K. & Abrahamsen, R. K. (1990). Quantitative determination of volatile compounds produced by *Lactococcus* ssp. using direct automatic headspace gas chromatography. *Brief Communications and abstracts of Posters vol. II.XXIII International Dairy Congress, Montreal, Canada*: 522.
- Niven, G. W., Knight, D. J. & Mulholland, F. (1998). Changes in the concentrations of free amino acids in milk during growth of *Lactococcus lactis* indicate biphasic nitrogen metabolism. *Journal of Dairy Research*, 65: 101-107.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y. & Suzuki, I. (1999a). Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. *international Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 163-166.
- Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., Kobayashi, M., Kimoto, H., Suzuki, I. & Aso, H. (1999b). *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*, 145 (6): 1375-1380.
- Nomura, M., Kobayashi, M., Ohmomo, S. & Okamoto, T. (2000). Inactivation of the Glutamate Decarboxylase Gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5): 2235 - 2237.
- Peng, J. & Lee, M. (2009). The study on the optimum fermentation conditions of the TTES-12 GABA tea production. *New Biotechnology*, 25, Supplement (0): S232.
- Pihlanto, A., Virtanen, T. & Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20 (1): 3-10.
- Ramos, A., Jordan, K. N., Cogan, T. M. & Santos, H. (1994). ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Citrate and Glucose Cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (6): 1739 - 1748.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W. & Sukhoom, A. (2013). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *International Journal of Food Microbiology*, 167 (2): 170-176.
- Rimaux, T., Vrancken, G., Pothakos, V., Maes, D., De Vuyst, L. & Leroy, F. (2011). The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. *Food Microbiology*, 28 (3): 597-604.
- Roberts, E. & Frankel, S. (1950). γ -Aminobutyric Acid in Brain: It's Formation from Glutamic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 187: 55 - 63.

- Robinson, R. K., Lucey, J. A. & Tamime, A. Y. (2006). Manufacture of Yoghurt. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented Milks*, s. 53 - 75. Oxford, UK: **Blackwell Science Ltd**.
- Robinson, R. K. & Tamime, A. Y. (2006). Types of fermented milks. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented milks*, s. 1 - 10. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12 (2-3): 163-171.
- Ruijsenaars, H. J., Stingele, F. & Hartmans, S. (2000). Biodegradability of Food-Associated Extracellular Polysaccharides. *Current Microbiology*, 40: 194 - 199.
- Rørosmeieriet. (2011). *Økologisk Tjukkmjøl*k: Rørosmeieriet as. Tilgjengelig fra: <http://www.rorosmeieriet.no/index.php/okologiske-produkter/tjukkmjolk> (lest 02.10.2013).
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B. & Recio, I. (2014). Peptidomics for Discovery, Bioavailability and Monitoring of Dairy Bioactive Peptides. *Food Research International* (0).
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394 - 406.
- Saxelin, M., Korpela, R. & Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. I: Mattila-Sandholm, T. & Saarela, M. (red.) *Functional dairy products*, s. 1 - 16. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd.
- Saxelin, M. & Mäyrä-Mäkinen, R. K. A. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. I: Mattila-Sandholm, T. & Saarela, M. (red.) *Functional dairy products*, s. 1 - 16. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd.
- Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z. & Spasov, Z. (2006). Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (2): 112-123.
- Skeie, S., Kieronczyk, A., Næss, R. M. & Østlie, H. (2008). Lactobacillus adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese. *International Dairy Journal*, 18 (2): 158-168.
- Smit, B. A., Engels, W. J. M., Wouters, J. T. M. & Smit, G. (2004). Diversity of l-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (3): 396-402.

- Smit, B. A., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Engels, W. J. M., Meijer, L., Wouters, J. T. M. & Smit, G. (2005). Identification, Cloning, and Characterization of a *Lactococcus lactis* Branched-Chain α -Keto Acid Decarboxylase Involved in Flavor Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1): 303-311.
- Smit, B. A., Engels, W. J. M. & Smit, G. (2008). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Starrenburg, M. J. C. & Hugenholtz, J. (1991). Citrate Fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3535 - 3540.
- Tamime, A. Y. & Robinson, R. K. (1993). *Yoghurt Science and Technology*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd.
- Tamime, A. Y., Skriver, A. & Nilsson, L.-E. (2006). Starter Cultures. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented Milks*, s. 11 - 52. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Tanous, C., Gori, A., Rijnen, L., Chambellon, E. & Yvon, M. (2005). Pathways for α -ketoglutarate formation by *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 15 (6-9): 759-770.
- Torriani, S., Gardini, F., Guerzoni, M. E. & Dellaglio, F. (1996). Use of response surface methodology to evaluate some variables affecting the growth and acidification characteristics of yoghurt cultures. *International Dairy Journal*, 6 (6): 625-636.
- van Vliet, T., Lakemond, C. M. M. & Visschers, R. W. (2004). Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9 (5): 298-304.
- Waagepetersen, H. S., Sonnewald, U. & Schousboe, A. (1999). The GABA Paradox: Multiple Roles as Metabolite, Neurotransmitter, and Neurodifferentiative Agent. *Journal of Neurochemistry*, 73 (4): 1335 - 1342.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006a). Colloidal Particles of Milk. I: *Dairy Science and Technology*, s. 109-157. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006b). Fermented milks. I: *Dairy Science and Technology*, s. 551 - 573. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006c). Lactic Fermentations. I: *Dairy Science and Technology*, s. 357-397. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006d). Milk Components. I: *Dairy Science and Technology*, s. 17-108. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press.

- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006e). Milk: Main Characteristics. I: *Dairy Science and Technology*, s. 3-16. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Watanabe, Y., Hayakawa, K. & Ueno, H. (2011). Effects of co-culturing lab on GABA production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 11 (1): 3-13.
- WHO. (2013). *Fact Sheet: High Blood Pressure*: WHO. Tilgjengelig fra: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/185917/Fact-sheet-World-Health-Day-2013-Eng-final.pdf (lest 02.10.2013).
- Williams, A. G., Noble, J. & Banks, J. M. (2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 11 (4-7): 203-215.
- Wright, A. v. & Axelsson, L. (2012). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. I: Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. & von Wright, A. (red.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov Gyldager, H. & Tamime, A. Y. (2006). Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented Milks*, s. 174 - 216. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Yang, S.-Y., Lü, F.-X., Lu, Z.-X., Bie, X.-M., Jiao, Y., Sun, L.-J. & Yu, B. (2008). Production of g-aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids*, 34 (3): 473 - 478.
- Yvon, M. & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11 (4-7): 185-201.
- Ziadi, M., Bergot, G., Courtin, P., Chambellon, E., Hamdi, M. & Yvon, M. (2010). Amino acid catabolism by *Lactococcus lactis* during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 20 (1): 25-31.

VEDLEGG

Se egen CD med vedlagt alle rådata fra innledende forsøk og hovedforsøk, samt masteroppgaven.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no