

Siv Steie 198

NORGES LANDBRUKSHØGSKOLE

MEIERIINSTITUTTET

MELKENS LØPNING

VED

A. H. STRAND

AS-NLH, 1983

forelest
24.8 - 27.8

NORGES LANDBRUKSHØGSKOLE

MEIERIINSTITUTTET

MELKENS LØPNING

VED

A. M. STRAND

ÅS-NLH, 1983

INNHOLD	SIDE	
1.	Innledning.	1
2.	Kaseinets struktur og egenskaper	3
2.1.	Konstruksjon	3
2.2.	Syntese	12
2.3.	Strukturmodeller	14
2.4.	Bindinger i micellen	20
2.5.	Stabilitet	22
2.6.	Felling	26
3.	Faser i løpningsprosessen	27
3.1.	Den innledende fasen, enzymfasen	27
3.1.1.	Enzymaktivitet og løpestyrke	30
3.1.2.	Forhold som påvirker enzymaktiviteten	36
3.1.2.1.	Temperaturen	37
3.1.2.2.	Surhetsgraden	38
3.1.3.	Melkekoagulerende enzymer	41
3.1.3.1.	Vegetabiliske enzymer	41
3.1.3.2.	Animalske enzymer	46
3.1.3.2.1.	Kalveløpe	46
3.1.3.2.2.	Pepsin	55
3.1.3.3.	Mikrobielle løpeenzymer	57
3.1.3.4.	Blandede proteinaser og urene preparater	67
3.1.3.5.	Restaktivitet i myse	67
3.1.3.6.	Immobilisering, gjenvinning	68
3.1.3.7.	Koagulasjon uten bruk av løpeenzymer	71
3.1.3.8.	Metoder for identifisering av løpepreparater	72
3.2.	Koagulasjon og geldannelse	76
3.2.1.	Løpningstemperaturen	79
3.2.2.	Substratfaktorer	82
3.2.2.1.	Kaseinkonsentrasjon og viskositet	83
3.2.2.2.	Melkens fettinnhold	84
3.2.2.3.	Melkesaltene	85
4.	Teknologiske faktorer	89
4.1.	Melkens temperaturhistorie	89
4.1.1.	Kjølelagring	90
4.1.2.	Varmebehandling	93
4.2.	Homogenisering og mekanisk behandling	97
4.3.	Tilsetning av kalsiumklorid	98
4.4.	Melkens syrning	101
4.5.	Justering av tørrstoffinnholdet	103
4.6.	Løpemengden	105
4.7.	Skjæring og myseavgang	106
4.7.1.	Bestemmelse av gelfasthet	106
4.7.2.	Skjæringens og røringens betydning for myseavgangen	117
4.7.3.	Temperaturens og surhetsgradens betydning for myseavgangen	120
4.7.4.	Andre faktorer av betydning for myseavgangen	122
5.	Spørsmål til oppsummering av "Melkens løpning"	124

1. INNLEDNING

Melkekoagulerende enzymer har vært nyttet i ostefremstillingen så langt tilbake man kjenner til at ost har vært laget. Det var kjent at både planter, mikroorganismer og visse dyreorganer inneholdt stoffer som førte til at melken koagulerte. Forskjellige dyrs fordøyelsesorganer er særlig rike på den slags enzymer og ett av dem, chymosinet, som bl.a. finnes i kalvens løpemave, er det enzym som har fått størst betydning for fremstilling av "løpe"-oster. Tilsvarende enzymer fra sau og geit nyttes også til spesielle ostetyper (særlig i Italia) og i enkelte land har også vegetabiliske preparater blitt anvendt kommersielt.

Interessen for bruk av mikrobielle løpepreparater har vært stor de senere år og en rekke ystingsforsøk med ekstrakter fra diverse mikroorganismer har vært utført bl.a. fra *Bacillus*, *Serratia* og diverse muggtyper. Særlig har ekstrakter fra *Mucor miehei* vist interessante resultater. Alle proteolytiske enzymer synes å kunne koagulere melk under optimale betingelser, men i praksis vil de fleste slike enzymer gi en for dyptgående proteolyse og/eller opphopning av komponenter med vond (besk, bitter) smak i osten. De fleste ystingsforsøk med andre enzymer enn chymosin har derfor gitt lite oppmuntrende resultater, men fordøyelsesenzymet pepsin har vist seg å kunne erstatte løpen delvis for enkelte ostetyper. Løpepreparater med opptil 50% pepsin finnes i handelen.

Med "løpe" og "osteløpe" har det hittil vært forstått preparater som er fremstilt av kalvens løpemave d.v.s. i det vesentlige chymosin, og vil bli brukt slik her. Betegnelsen løpe-ost (kontra surmelksost) vil imidlertid sannsynligvis i fremtiden bli beholdt for all ost der ostemassen er felt ut med enzymer, også andre enn chymosin. På samme måte vil uttrykket "løpning" bli beholdt.

Den generelle proteolytiske effekt av enzymene vil bli behandlet nærmere i sammenheng med ostens modning. Her skal

vi se litt nærmere på selve fellingsprosessen som er av så stor interesse for ystingsteknikken. En rekke forskere har vist at dette er en prosess som foregår i to faser:

1. Den enzymatiske omdannelsen av kaseinet til såkalt parakasein.
2. Parakaseinets koagulasjon i nærvær av kalsiumjoner.

Mest kjent av de eldre teorier omkring dette emne er svensken HAMMARSTEN'S fra 1877, som gikk ut på at kaseinet p.g.a. løpens proteolytiske aktivitet ble spaltet til et ustabilt parakasein, og et løselig myse-albumin. Sammen med Ca-joner dannet parakaseinet et uløselig gel. Teorien var basert på at kaseinet var homomolekylært og ble med små variasjoner understøttet av en rekke forskere.

Først ved demonstrasjonen av kaseinets heterogenitet og separering i forskjellige fraksjoner ble det gjort nye fremskritt i forståelsen av løpens effekt på kaseinet.

LINDERSTRØM- LANG og medarbeidere (1929) og senere andre forskere, viste at kaseinet slik det foreligger i melken er en blanding av forskjellige kaseinfraksjoner. Det er et reversibelt dissosierbart system som består av forskjellige komplekser løselig knyttet sammen. LINDERSTRØM-LANG fremsatte den teorien at en eller flere av disse kaseinfraksjonene tjente som beskyttelseskolloider for de øvrige, som ellers dannet uopløselige kalsiumsalter. Chymosinets virkning skulle da bestå i en enzymatisk hydrolyse av de kaseinfraksjoner som tjente som beskyttelseskolloid, og derved fremkalte kaseinets koagulasjon.

Den spesifikke frigjøring av ikke-protein-nitrogen (NPN) som løpen forårsaker fra kaseinet ble av ALAIS et.al. (1953) vist å gå forut for koagulasjonen og å være helt forskjellig fra den påfølgende generelle langsomme proteolyse som enzymet senere var årsak til. NITSCHMANN & KELLER(1955) viste at

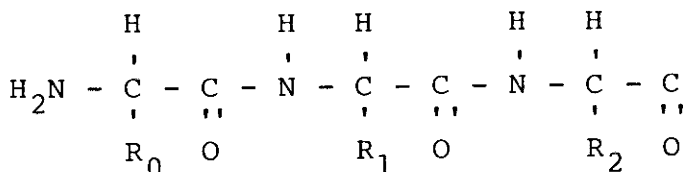
Det frigjorte NPN stammet fra α -fraksjonen av kaseinet, nærmere bestemt κ -kaseinet, og danner nå basis-metode for å følge primærfasen eller enzymfasen i koagulasjonsprosessen. Dette gjør det mulig å studere de to faser, som vanligvis overlapper hverandre, adskilt.

2. KASEINET'S STRUKTUR OG EGENSKAPER

2.1. Konstruksjon.

Proteinmolekylenes komplekse oppbygging gjør det svært vanskelig å finne en definert kjemisk forklaring på deres fysikalske egenskaper. Dette gjelder for relativt enkle proteiner, men særlig for de mer sammensatte, slik som kasein. (Sammenliknet med den forskningsinnsats som er gjort på proteiner med medisinsk og ikke meierimessig bakgrunn er kaseinet også relativt lite utforsket?) Hva vet vi så om strukturen i proteiner i sin alminnelighet og kaseinet i særdeleshet?

Aminosyrene er alle proteinenes byggestener. Peptidkjeden er proteinenes primære struktur:



R_1 og R_2 representerer sidekjedene av aminosyrene.

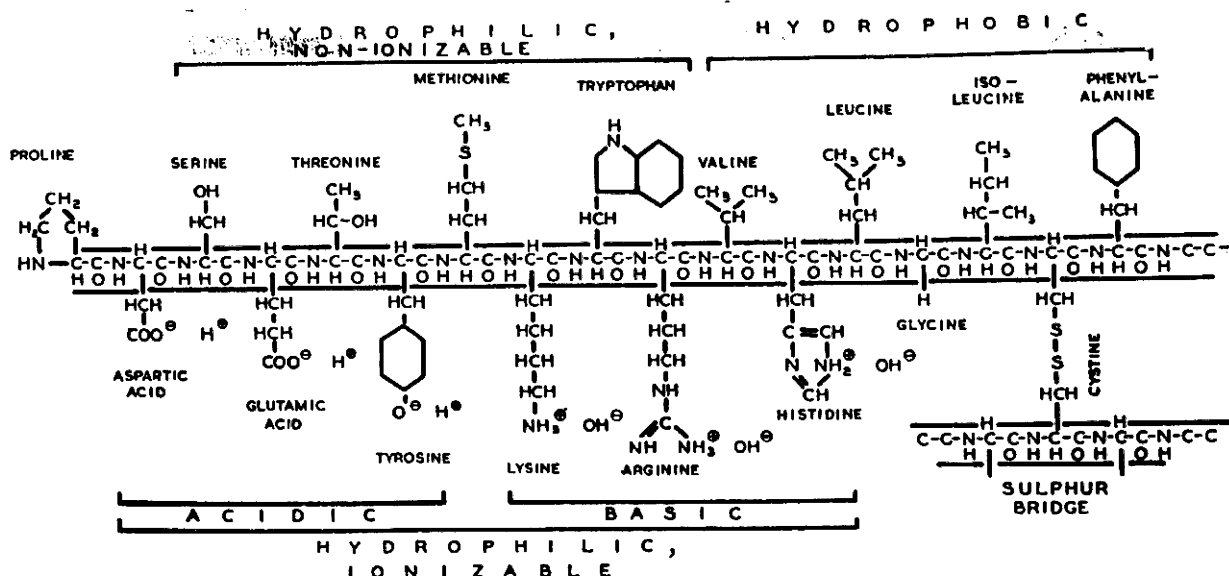


Fig. 2.1.1. Karakteristikk av aminosyrene i modellprotein etter HILL & HILLS 1961. Aust. J. Dairy Techn. 16 (2) 125.

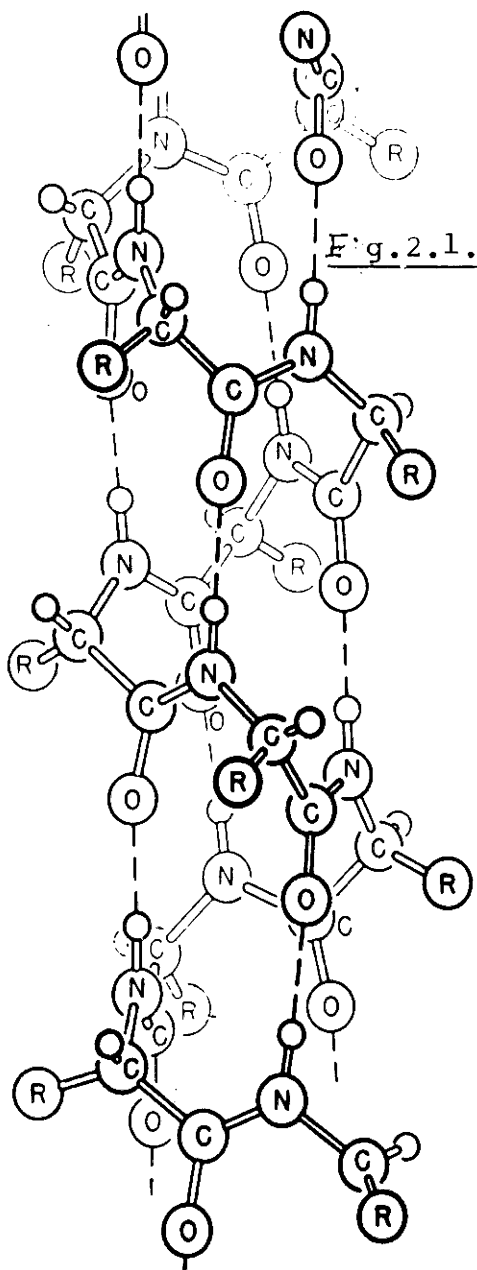


Fig. 2.1.2.

Alt etter hvilke aminosyrer som inngår i sidekjedene og den rekkefølgen de har, vil dette være bestemmende for proteinets karakter. Som vist i fig. 2.1.1. har de respektive aminosyrerestene forskjellige egenskaper, noen sure, andre basiske, noen hydrofile, andre hydrofobe, samtidig som faseting og størrelse vil variere i rommet. I tillegg til peptidbindingen, som er den gjennomgående hovedbindingen i kjeden, vil man også ha en tendens til dannelse av hydrogenbindinger mellom nærstående $C = O$ og $N - H$ grupper. Disse sekundære bindingene er mest stabile når peptidkjeden er formet som en spiral (helix). Dette blir da en mulig sekundære struktur av proteinet som vist i fig. 2.1.2. For mange proteiner mener en at en stor del av molekylet foreligger i denne formen. Men så uensartet som de forskjellige sidekjedene er i peptidkjeden, er det lite realistisk å forestille seg denne som en rett eller regelmessig "spiral". På grunn av sidekjedenes forskjellige stereokjemiske egenskaper vil proteinkjeden folde seg sammen i mer og mindre regelmessige former. Dette kan man kalle proteinets tertiære struktur, og denne er kjent for f.eks. hemoglobin og myoglobin, se figur 2.1.3.

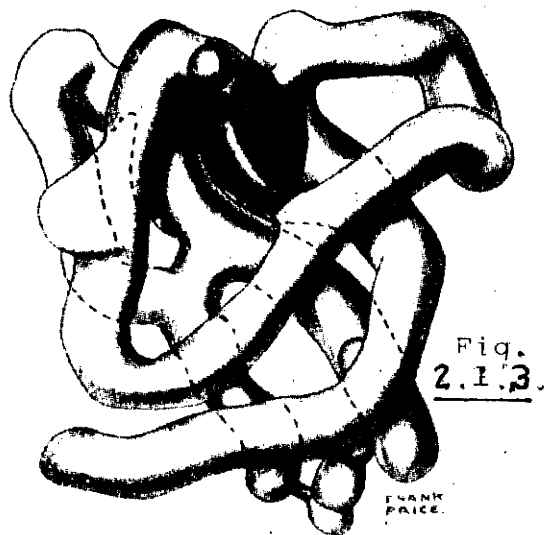


Fig. 2.1.3.

Proteinet forekommer imidlertid sjelden som enkle molekyler, disse er mer og mindre polymerisert. Proteinkomplekset kan bestå av fra noen få (to molekyler hos insulin) til mange tusen enkeltmolekyler, slik som i kasein.

Nyere analysemetodikk har vist at de enkelte kaseinmolekyler langt fra er ensartet i sin oppbygning. Det ble tidlig vist at kaseinet

elektroforetisk bestod av tre forskjellige fraksjoner benevnt som Alfa, Beta og Gammakasein. Alfafraksjonen består imidlertid av to hovedtyper av kasein, det såkalte α_s , som er fellbart med kalsiumjoner og det såkalte Kappakaseinet som ikke er fellbart med kalsiumjoner. Det er Kappakaseinet som gir kaseinet dets stabile kolloiddisperse karakter i nærvær av kalsium. α_s -kaseinet er imidlertid heller ikke ensartet, men kan deles i hovedtypene α_{s1} og α_{s2} , i tilnærmet forhold 3:1.

Det såkalte Gammakaseinet har vist seg å være et C-terminalt fragment av Betakasein, noe som skriver seg fra en enzymatisk hydrolyse av dette kaseinet. Denne fraksjonen kan derfor ikke betegnes som en spesifikk egen kaseintype.

En annen kaseinbetegnelse, α_{s1} I har vist seg å være α_{s1} med avspaltet aminosyrene 1 til 23.

Det skal betydelig større konsentrasjon av kalsiumjoner til for å felle I-fragmentet enn hele kaseinmonomeren, selv om evnen til å binde kalsium er like store i begge typer. Dette mener en skyldes avspaltingen av den hydrofobe N-terminale gruppen i α_{s1} kaseinet. (KAMINOGAWA et al 1980)

Som spesifikke hovedtyper av kasein regner en nå med α_{s1} , α_{s2} , β og κ -kasein, som forekommer tilnærmet i forholdet 3:1:3:1.

Figurene 2.1:4,5,6 og 7 viser aminosyresekvensene i de respektive kaseintypene. (Ribadeau-Dumas et al, 1973).

BRIGNON, G., B. RIBADEU-DUMAS, J.C. MERCIER. J.P. PELISSIER og B.C. DAS, 1977. FEBS LETTERS 76 (2) 277.

RIBADEAU-DUMAS, B. et al. 1973, Neth. Milk Dairy J. 27.

KAMINOGAWA et al, 1980. J.D.S. 63 (2) 223- 227

Høgt innhold av
fosfor
vedvaskes forsiktig

10-13 P - eske

H-Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser-Gln-Glu-Thr-Tyr- 20
 P P P P P
 Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys- 40
 P P P P P
 Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser-Ser-Glu-Glu- 60
 P P P P P
 Ser-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys- 80
 P P P P P
 Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Glu-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr- 100
 P P P P P
 Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr- 120
 P P P P P
 Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu-Ser-Thr-Ser-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp- 140
 P P P P P
 Met-Glu-Ser-Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-Thr-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg- 160
 P P P P P
 Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu- 180
 P P P P P
 Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val- 200
 P P P P P
 Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu-OH 207

780in
10 protein
& cystein

Teorifisk navn
cir 100mgte samm
to millioner

- 7 -

Primærstrukturen av α_{s2} -kasein
 Figur 2.1.5.
 (BRIGNON et al., 1977)

Høgt innhold av proteiner ↓

Utprega mycoplasma

5 P-kasein SS protein

10 H. Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-20
 → 30 kasein
 Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-40
 Ser Lys
 Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-60
 70 Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-80
 His
 90 Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-100
 110 Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Gln-Pro-Phe-Thr-120
 130 Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Pro-Leu-Leu-Leu-140
 Arg
 150 Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-160
 170 Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-180
 190 Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-200

Genside

209 Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val.OH.

Primærstrukturen av β-kasein, type A.

Figur 2.1.6. (RIBADEAU-DUMAS et al. 1973)

Som det fremgår av figurene 4,6 og 7 eksisterer det også genetiske varianter av de nevnte kaseintyper der enkelte aminosyrer i peptidkjedene kan være erstattet med andre. I fig.-4 har en vist aminosyresekvensen for α_{s1} kasein, genetisk type B. For den genetiske type A mangler aminosyrene nr. 14-26. For type D er aminosyre nr. 53, Alanin, byttet ut med Threoninfosfat og for type C, er nr. 192, Glutamin, erstattet med Glysin.

På samme måte er de genetiske varianter merket av i peptidkjeden for β -kasein i fig.-6 og for κ -kasein i fig.-7.

I tabell-1 har en satt opp noen typiske forskjeller mellom de fire kaseintypene.

Tabell-1. Karakteristikk av kaseintypene (SCHMIDT, 1980)

	<i>g/li</i> 10	<i>20</i>		
	α_{s1}	α_{s2}	β	κ
Amino-syrer	199	207	209	169
Molekylvekt	23 600	25 200	24 000	19 000
Cystein- rester	0	2	0	2
Fosfat- ester- grupper	8-9	10-13	5	1-2
Karbohydrater	0	0	0	galactose galactosamin N-acetylneuramin- syre
Chymosin- følsomhet	+	-	+	+++
Calcium- følsomhet	++	+++	+	-

Deler av kaseinets peptidkjede er overveiende hydrofil, mens andre deler er hydrofobe. Generelt gir et høyt innhold av prolinrester høy hydrofobitet, hvilket gjør kaseinmonomerene selvassosierende i vandig løsning. Dette er mest utpreget for β -kasein som inneholder 35 prolinrester, mens α_{S1} har 17 og κ -kaseinet 19.

Ved 4^o C og pH 6,6 forekommer β -kaseinet i ren løsning vesentlig som monomerer (enkeltmolekyler), men danner trådformete polymerer ved høyere temperaturer.

Bare κ -kaseinet og α_{S2} inneholder Cystein i peptidkjeden og har dermed muligheten for polymerisering via disulfidbindinger, noe som imidlertid knapt synes å forekomme i praksis.

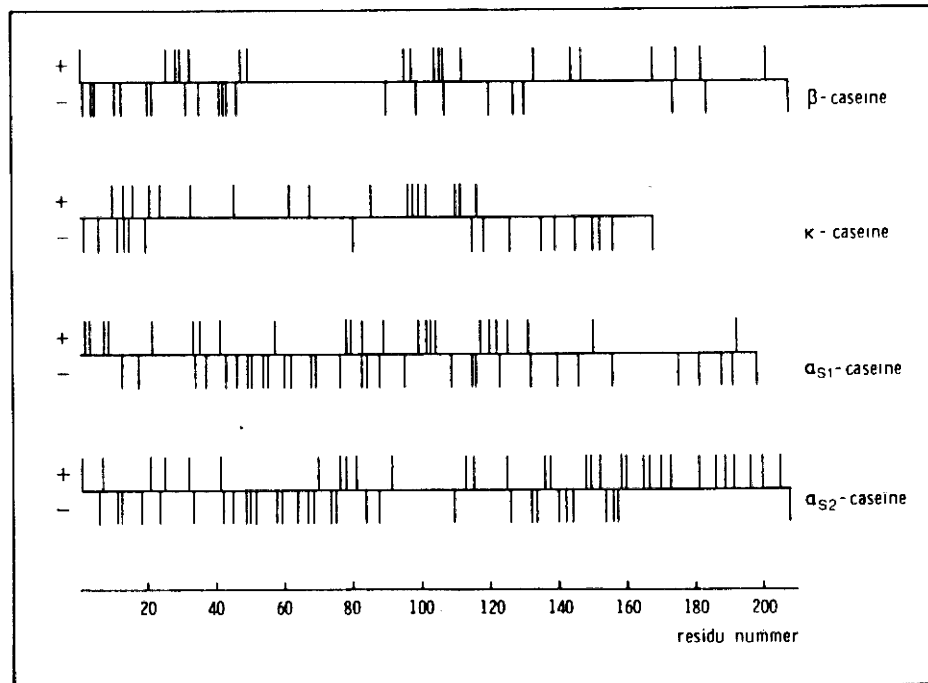


Fig. 2.1.8 Laddingsfordelingen i kaseinet, skjematisk etter SNOREN & RIEL.

SNOREN, T. H. M. & J. A. M. van RIEL, 1979.

Voedingsmiddelteknologi 12 (16) 28.

2.2. Syntese.

Utgangspunktet for kaseinsyntesen er frie-aminosyrer fra blodplasma + aminosyrer som syntetiseres i sekresjonscellene. Via budbringer-RNA og overførings-RNA etableres aminosyrene i riktig rekkefølge til peptider på ribosomene, som har nær tilknytning til cellenes endoplasmatiske reticulum. En går ut fra at de respektive kasein-typene syntetiseres individuelt, men det finnes også andre teorier.

Kaseinpartiklene i Golgi-vakuolene, nær det endoplasmatiske reticulum, er små, 5-10 nm \emptyset , og disse er da sannsynligvis de minste primærpartikler hvor samtlige kaseiner foreligger. (Fig.2.2.1.) Samtidig skjer også en fosforylering. Dette gjør det mulig med en videre assosiering av primærpartiklene via fosfatrestene. Via kalsiumfosfat vil nå subpartiklene aggregerer til såkalte miceller av størrelse på ca. 100 - 200 nm og med molvekter på ca. 100 000 000 D.

Antallet fosfatgrupper i de respektive kaseintyper kan variere noe på grunn av forskjellige grader av fosforylering under syntesen. De tidligere kaseintypebetegnelsene α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} og α_{s6} har således identisk aminosyresekvens, men er forskjellige i antall fosfatgrupper. Alle betegnes nå som α_{s2} . Dette kaseinet er vesentlig mer Ca^{++} -ømfindtlig enn både α_{s1} og β -kasein. α_{s2} hydrolyseres ikke av Chymosin, men det spaltes lett av originær melkeprotease på samme måte som β -kasein. Ved oppvarming inngår det lett kompleksforbindelse med β -laktoglobulin, på samme måte som κ -kasein, og er med på å øke micellens varmestabilitet (SNOREN, 1979).

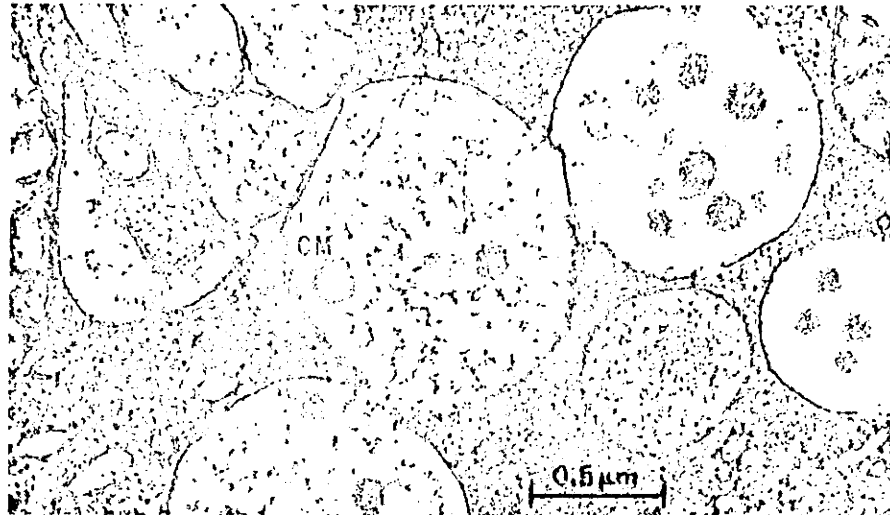


Fig.2.2.1. Submiceller og miceller i Golgivakuoler (A) og micelle tømt ut i det alveolare hulrom (B). (CARROL et al., 1970.)

Bare κ -kaseinet inneholder karbohydrat i form av galaktose, galaktosamin og N-acetyl-neuraminsyre.

Karbohydratet er knyttet til peptidkjeden med glycosidbindinger. Selve tilknytningen synes å skje i melkesekresjonscellenes Golgiapparat ved hjelp av enzymet Sialyltransferase, som finnes i store mengder her (KELLER et al., 1979). Tilknytningen skjer i den c-terminale delen av peptidkjeden, særlig i områdene ved aminosyrene nr. 131, 133 og 135.

κ -kaseinets ^{lave} ringe innhold av fosfatgrupper (1-2) forklarer dette kaseinets gode løselighet i nærvær av kalsiumjoner.

Ved en forstørrelse på 100 000 ganger av kaseinpartikler i melk, fremstår micellene som aggregerte globulære småpartikler, nærmest sfærisk i fasong, fig.2.2.1.Selve micellen kan betraktes som en mikroskopisk polyelektrolyt-gel med et vanninnhold på vel 66 %. Omtrent fjerdeparten av dette er kjemisk bundet.

Forskjellige metoder har vært anvendt til å bestemme micellens volum. På grunnlag av sedimenteringsegenskaper har en kommet til at det totale volumet er 3 - 4,5 ganger volumet av det "tørre" nettverk, tilsvarende ca. 3 ml pr. g kasein. Micellens sfæriske størrelse er målt mellom 40 og 280 nm ved elektronmikroskopering, men bare halvparten av dette ved ultrasentrifugering. På grunnlag av lysdispersjonsmålinger er størrelsen målt til mellom 80 og 110 nm og med ultramikroskopering til mellom 5 og 120 nm. Den alt dominerende partikkelstørrelse i melken synes å foreligge i området 80 - 120 nm, tilsvarende molekylvekt på mellom 81 og 266 millioner.

2.3. Strukturmodeller.

I årenes løp har det vært fremsatt mange hypoteser om micellenes struktur og oppbygning. Grovt sett kan en dele inn de lanserte micellemodeller i tre grupper:

Modell
1.

En har da for det første det en kan kalle kjerne/skallmodeller, som ikke tar hensyn til eksistens av submiceller. De fleste modellene innen denne kategorien går ut på at

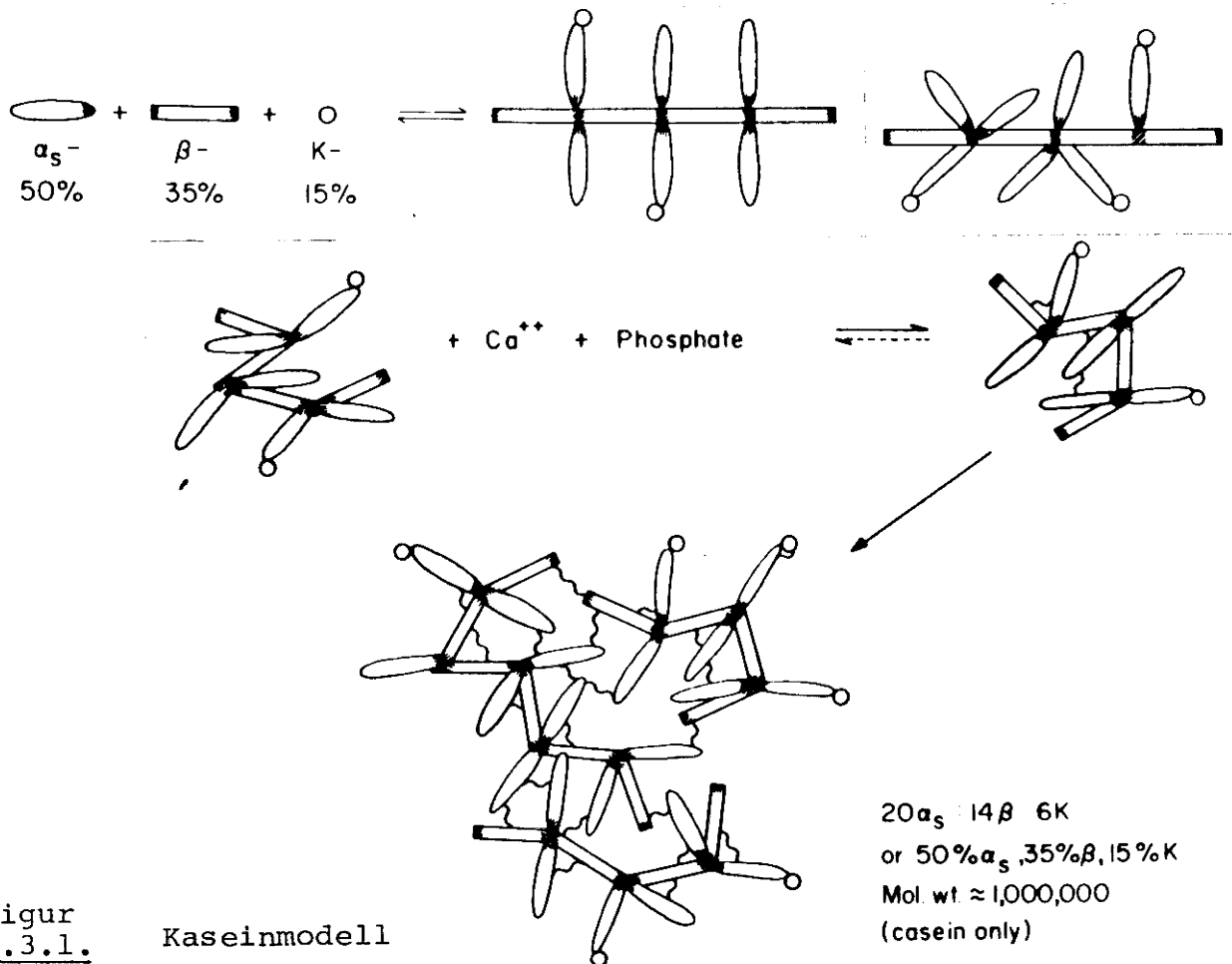
KELLER, et al. 1979. Biochemica et Biophysica Acta 566

(2), s. 266.

α -kasein og β -kasein danner en indre kjerne med κ -kasein i det ytre sjikt, som en slags beskyttelseskolloid (WAUGH'S modell og PAYENS modell), men det finnes også forslag på den omvendte ordning, med κ -kaseinet som kjerne og de øvrige kaseiner i det ytre sjikt (PARRY & CARROL).

Modell 2.

Den andre typen av modeller er de som bygger på en mer jevn fordeling av de respektive kaseintyper gjennom hele micellen, men også uten å ta hensyn til muligheten av submiceller. Det er imidlertid forutsatt at micellen må ha en så åpen struktur at store enzymmolekyler, som f.eks. løpe, kan komme til og hydrolysere proteiner i micellens indre. I ROSES modell (fig. 2.3.1.) er β -kaseinet foreslått som det gjennomgående strukturelement hvortil det er knyttet α_s og κ -kasein.



Figur 2.3.1. Kaseinmodell etter ROSE, 1969.

PAYENS, T.A.S. 1966. J. Dairy Sci. 49, s. 1317.
WAUGH, D.F. 1967. MILK PROTEINS vol. II Academic Press.
PARRY, R.M., and R.J. CARROLL 1969, Biochim. Biophys. Acta 194, s. 138.
ROSE, D. 1969, Dairy Sci. Abstr. 31 (4) s. 171.

I GARNIER og RIBADEAU-DUMAS's modell er det foreslått at et κ -kasein-trimer fungerer som et utgangspunkt for polymerisering av α_s og β -kaseiner til et tredimensjonalt nettverk (fig.2.3.2.) I Rose's modell inngår kalsiumfosfat som bestanddel av micelle-nettverket, men dette er neglisjert i siste modell.

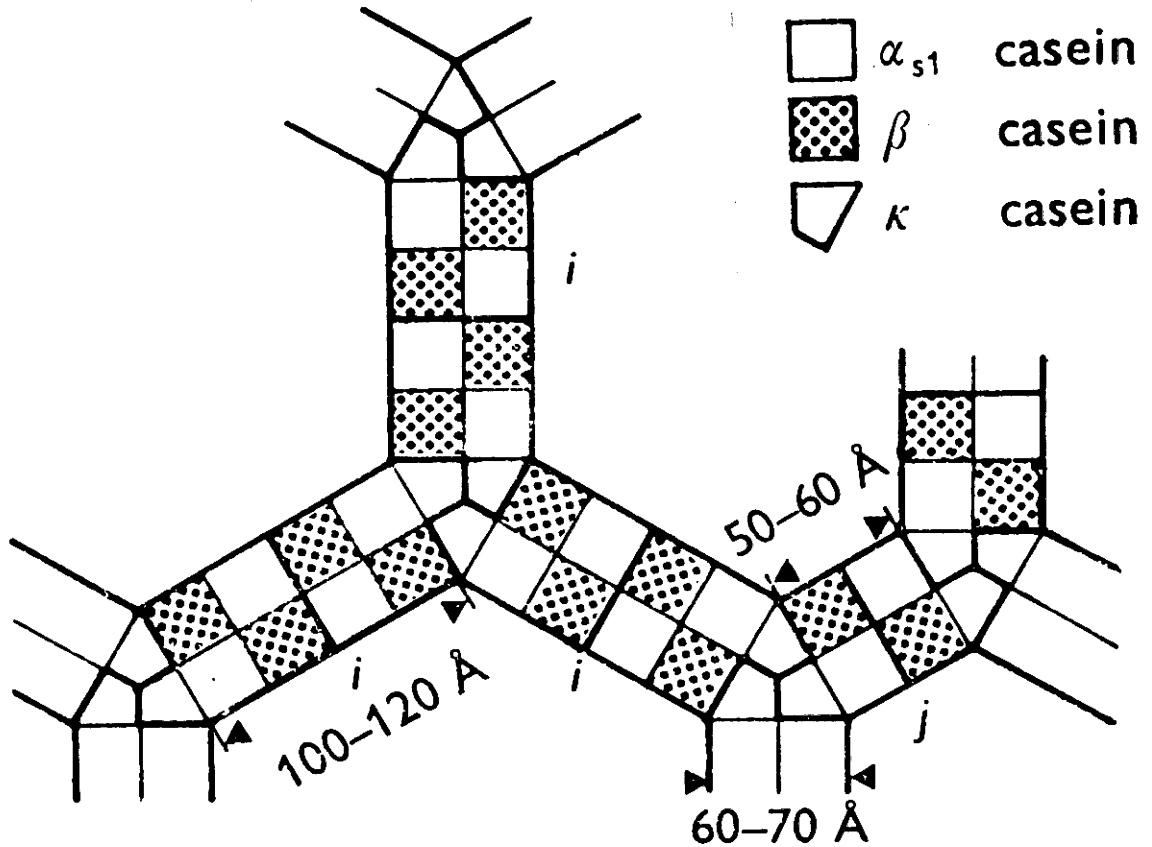


Fig.2.3.2 Strukturmodell etter GARNIER & RIBADEAU-DUMAS, 1970.

Modell 3. (MORR, DOWNER)

Den tredje typen av modeller er de som bygger på eksistens av submiceller, noe som i følge nyere forskningsresultater synes å være det mest sannsynlige.

I MORR's modell fra 1967 er det foreslått submiceller på ca. 30 nm, der de enkelte kaseintyper forekommer i tilnærmet

GARNIER, J. and B. RIBADEAU-DUMAS, 1970. J. Dairy Sci. 48, 1010.

MORR, C.V. 1967, J. Dairy Sci. 54 s. 1555.

støkiometrisk forhold og hvor disse ved hjelp av kalsiumfosfat knyttes sammen til store-miceller (fig. 2.3.3.)

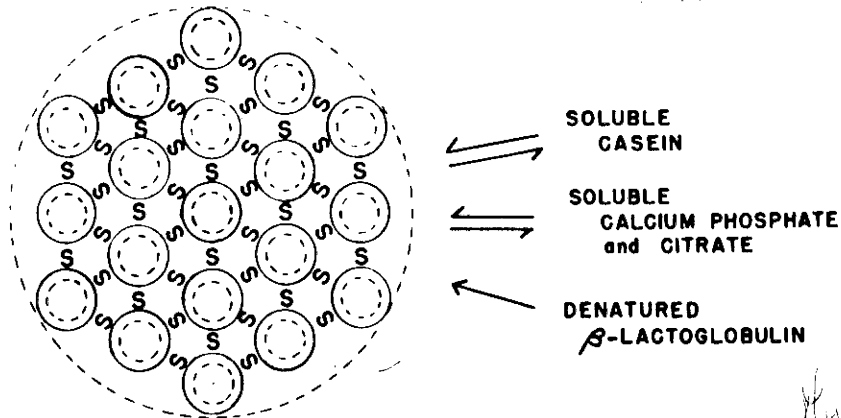


Fig. 2.3.3. Morr's proposed model (1967)

Hjerte rett i denne modellen

I DOWNEY's modell fra 1974 er slike submiceller mer detaljert skissert (fig. 2.3.4.)

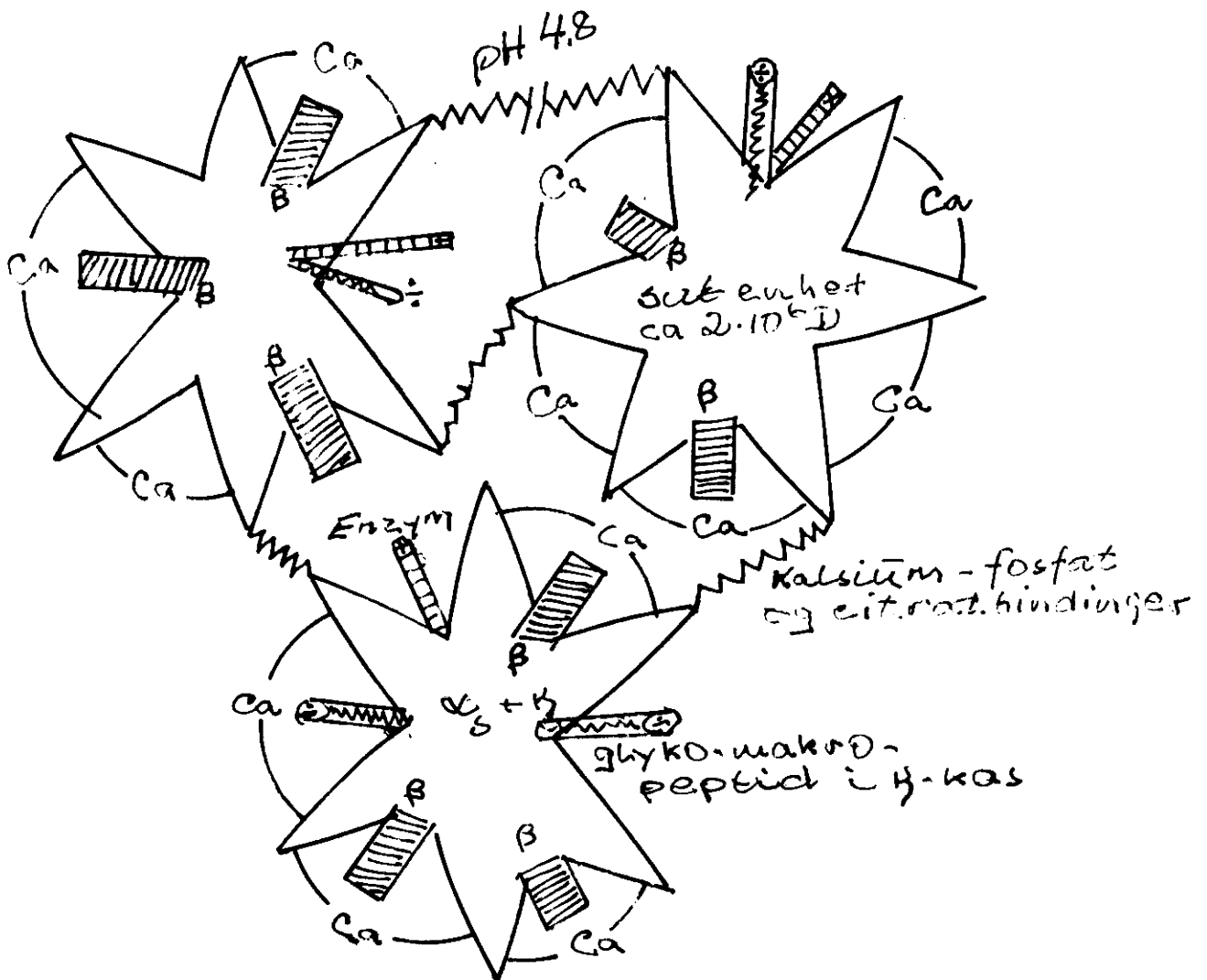


Fig. 2.3.4 Kaseinmodell etter DOWNEY, 1974.

Modellen er basert på sub-enheter på $2 \cdot 10^6 D$ av de tre kaseintyper og disse er da bundet sammen med kalsiumfosfatbindinger. Kalsium har en stabiliserende effekt på sub-enhetene og den negative overskuddsladningen på κ -kaseinet bidrar til å holde hele micellestrukturen i løsning. Videre er modellen åpen, slik at den tillater passasje av store enzymmolekyler, som f.eks. cymosin og pepsin. Originær lipase etc. er knyttet til sub-enhetene.

En annen modell, postulert av SLATTERY, 1973, (fig.2.3.5.) er basert på submiceller av størrelsesorden 2 nm bestående av ca. 30 kaseinmonomerer. Han antok at κ -kaseinet var konsentrert i visse deler av submicellene med orientering utad og at disse aggregerte til miceller ved hjelp av hydrofobe krefter.

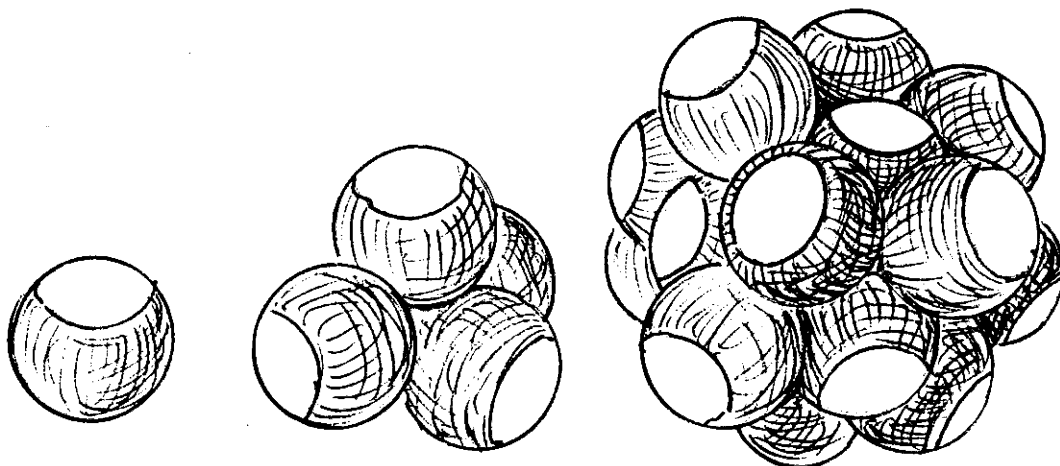


Fig.2.3.5. Micellemodell etter SLATTERY, 1973. Den kvite delen av submicellen forestiller Kappakasein, skraverte deler, de øvrige kaseintyper.

Med utgangspunkt i Slatterys modell har SCHMIDT, ^{NB!} 1980, angitt en modell som kan forklare de fleste fenomener i tilknytning til micellens natur (Fig.2.3.6.). Det antydes her at antallet av hydrofile grupper i de respektive kaseintyper er bestemmende for størrelsen på submicellene, slik at de hydrofobe grupper innesluttet i submicellens indre og med de hydro-

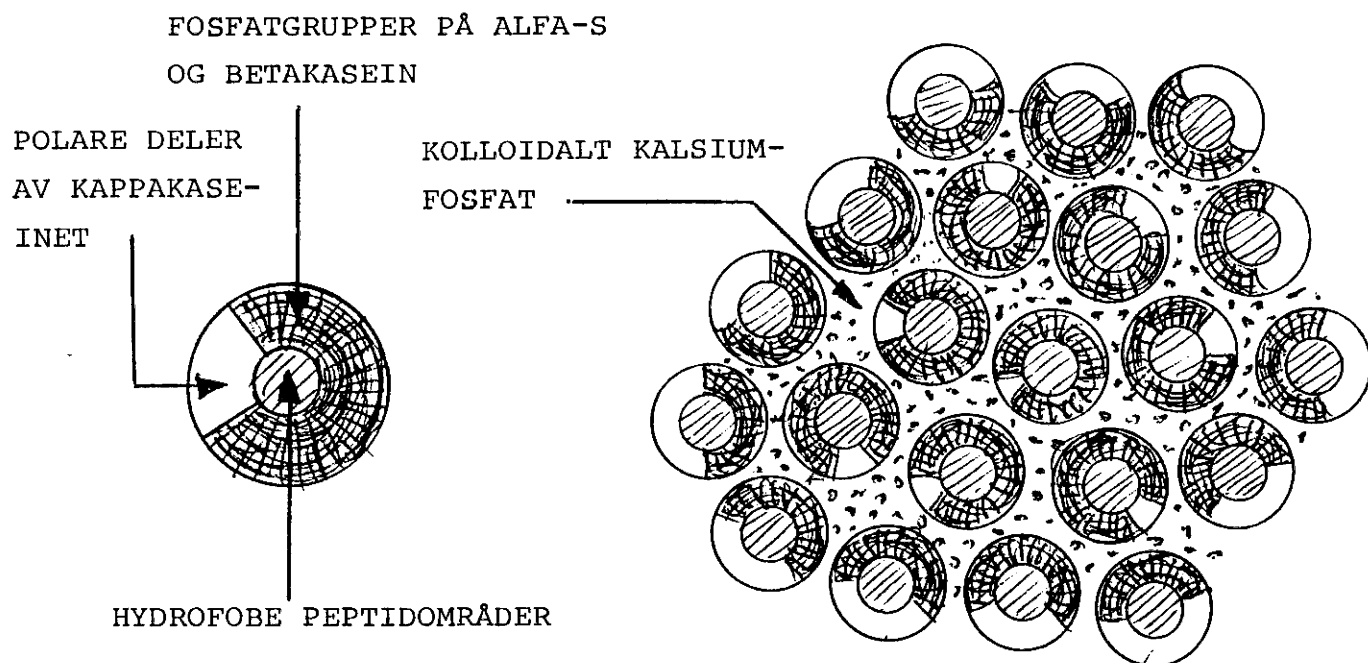


Fig. 2.3.6 Micellemodell etter SCHMIDT, 1980.

NB!

file grupper i et slags skall. Forholdet mellom de forskjellige kaseintyper i submicellen kan variere betraktelig, således også innholdet av κ -kasein. Submiceller med et lavt innhold av κ -kasein vil bli begravet i det indre av micellen, mens submiceller med et høyt innhold av κ -kasein vil orientere seg i micellens ytre. Hele strukturen bindes sammen med, og stabiliseres, ved hjelp av finfordelt kolloidalt kalsiumfosfat bundet til fosfatgruppene i α_s og β -kaseinene. Når hele overflaten av micellen er dekket med polart κ -kasein vil veksten stanse. I melk med et høyt innhold av κ -kasein vil micellene bli relativt mindre og mer stabile enn i melk med et lavt innhold av κ -kasein.

Gjennomgående if kasein orienterer seg i ytre micelle og inne kasein hydrofil karakter

2.4. Bindinger i micellen.

Hydrogenbindinger.

Slike bindinger forekommer særlig i **sekundær-** og **tertiærstrukt**uren av protein, men ikke alle proteiner har disse strukturer i utpreget grad (avhengig av aminosyre-sidekjedene). Prolin f.eks. bryter helixstrukturen. Spektralanalyser av kasein syns å tyde på at sekundærstrukturen hos dette protein er lite fremtredende. Hydrogenbindinger som stabilisatorer mellom monomerene synes heller ikke særlig sannsynlig, da disse vil være sterkere bundet til vann.

Di-sulfidbindinger.

Det har vist seg vanskelig å fastslå i hvilken grad disulfidbindinger forekommer som kryssbindinger innen og mellom primærstrukturene. Cysteinrester som sitter langt fra hverandre i kjeden kan muligens ha betydning for tertiærstrukturen. Selv om disulfidbindinger forekommer i κ -kaseinet ^(og κ_{s2}), synes disse å ha mindre betydning for dets stabilitet og heller ikke kan det være drivende kraft for micelle-dannelsen.

Interne elektrostatiske krefter.

Joniserbare hydrofile sidekjedene synes i det vesentlige å være eksponert mot løsningsmidlet, men spiller en rolle for assosiering av α_{s2} kaseinet. Positive og negative ladede aminosyrerester bidrar derfor ikke isærlig grad til å stabilisere de øvrige kaseintyper, men kan synes å ha en stabiliserende rolle for micellestrukturen, kanskje i forbindelse med kalsium. Kalsiuminnholdet i micellen er langt høyere enn det som skal til for å felle isolert α_{s1} og β -kasein ved romtemperatur.

κ -kasein og α_{s1} danner komplekser ved blanding etter isolering av de to fraksjoner. En kan her simulere kaseinmiceller ved tilsetning av Ca^{++} ved pH 6,7. Slike miceller blir gjerne noe større enn de naturlige. DOSAKO et al., 1980, har vist at kompleksforbindelse av α_{s1} og κ -kasein i miceller er av hydrofob

art og at elektrostatiske krefter ikke har noen betydning her. Fosfatets rolle som stabilisator av micellen synes å være mindre enn kalsiumets. Fjernes fosfatet blir micellen mindre stabil, men går ikke helt i oppløsning slik som når kalsium fjernes med EDTA.

Kolloidalt kalsiumfosfat

Over 60% av melkens kalsium er på en eller annen måte assosiert med kaseinmicellen. Hvordan vites ikke med sikkerhet. En god del forekommer som såkalt Kolloidalt fosfat (CaHPO_4 m.v.) Det synes å være to typer av jonebindinger til micellen, muligens et ytre ladet dobbeltlag som ikke er så fast bundet og et indre system av fastere bundet kalsium-fosfat. Dette har betydning for micellens stabilitet, men selve den stabiliserende mekanisme er hittil ikke helt klarlagt.

Interne hydrofobe krefter.

Dersom apolare aminosyrerester kan virke innover i micellen, mot andre apolare grupper, vil dette påvirke micellens totale vannbindingsevne. Slike indre hydrofobe krefter er temperatursensitive, økende effekt med stigende temperatur, men helt minimale under 5°C .

β -kasein (i mindre grad κ og α_{s1}), synes å kunne diffundere ut av micellen ved 1°C .

α_{s1} ; β og κ -kaseinet er ifølge aminosyreinnholdet rikt på apolare aminosyrerester.

Reagenser som primært virker på hydrofobe grupper (f.eks. urea og natriumdodecylsulfat) løser opp micellestrukturen til enheter på ca. 10 nm.

2.5. Stabilitet.

Kaseinmiceller er bemerkelsesverdig stabile. Selv ved ultrasentrifugering vil de ikke kollapse, men kan igjen redispergeres ved oppløsning av sentrifugatet. De er også meget varmebestandige og tåler relativt høye steriliseringstemperaturer uten å bli ødelagt.

På grunnlag av sedimenterings-karakteristikken (sentrifugering), har en forsøkt å estimere tettheten av miceller i melk. Denne er av størrelsesorden 10^{12} partikler pr. cm^3 . Dette gir en midlere avstand på $0,36 \mu\text{m}$ mellom de enkelte miceller. På tross av den kinetiske energi partiklene har, holdes de likevel distribuert i løsningen.

Denne stabiliteten henger nøye sammen med micellens størrelse. Alle forhold som innvirker på denne får også konsekvenser for stabiliteten. Kaseinmicellens størrelse og dispersjon lar seg reversibelt påvirke av likevekten mellom kalsium, magnesium, fosfat og citrat-joner, likesom hydrogenjonekonsentrasjonen og temperaturen har effekt på stabiliteten.

Varmekoagulasjon er en karakteristisk reaksjon for proteiner. Mens albuminer og globuliner varmekoagulerer ved korttidsoppvarming til temperaturer mellom $50-100^\circ$, vil ikke kaseinet felles selv ved vesentlige høyere temperatur. Varmekoagulasjonen av kasein kan bare foregå dersom det er kalsiumjoner tilstede. Kaseinet skiller seg i så måte fra de andre proteinene. Selve mekanismen i den rene varmekoagulasjon er lite kjent. En har stort sett nøyd seg med å konstatere kjemiske, fysikalske og tildels biologiske forandringer i det "denaturerte" proteinet. Graden av denaturering kan variere med små strukturelle endringer til et fullstendig irreversibelt re-arrangement av peptidkjedene.

Under innvirkning av varme kan det oppstå pH-forskyvninger som fører til destabilisering av kasein-micellen, særlig ved påvirkning av likevekten mellom kolloidalt og løselig kalsium. Høyere temperatur bevirker en overgang av løselig kalsiumsalter til den kolloidale fase.

Kalsiumjonenes effekt får man også et godt eksempel på ved den utfnocking som lett skjer med melk eller fløte i kaffe, som er tilberedt på hardt vann.

Kaseinmicellens stabilitet mot varme svekkes sterkt ved økende mengder av kolloidalt kalsiumfosfat.

Melk med dårlig varmestabilitet synes også å inneholde større mengder av fosfat. Sammenhengen mellom varmestabilitet og sesongvariasjoner i fosfatinholdet er vist i figur 2.5.1.

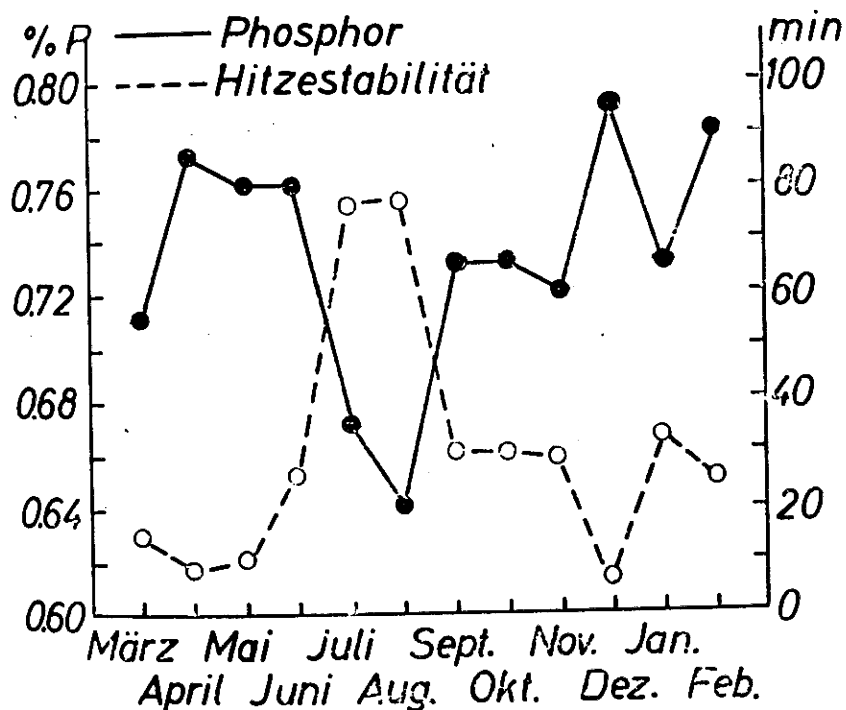


Fig. 2.5.1.

Sesongvariasjoner i melkens fosforinnhold og dens varmestabilitet. (Etter Kirchmeier)

Kaseinets glutaminsyreinnhold synes også å spille en rolle i forbindelse med varmestabiliteten. Sammenhengen mellom varmestabilitet og sesongvariasjon i glutaminsyre er vist i fig. 2.5.2. Glutaminsyrens frie karboksylgruppe spiller her åpenbart en rolle som brohode. Varmelabil melk synes ikke å inneholde noe vesentlig mindre κ -kasein enn annen normal melk, men det er mulig at κ -kaseinet på en eller annen måte ligger feil orientert i micellen.

Proteolytisk aktivitet som fører til hydrolyse av kaseinet og varmeinduserte kompleksdannelser mellom kasein, serumproteiner og laktose, medfører irreversible endringer i micellens stabilitet.

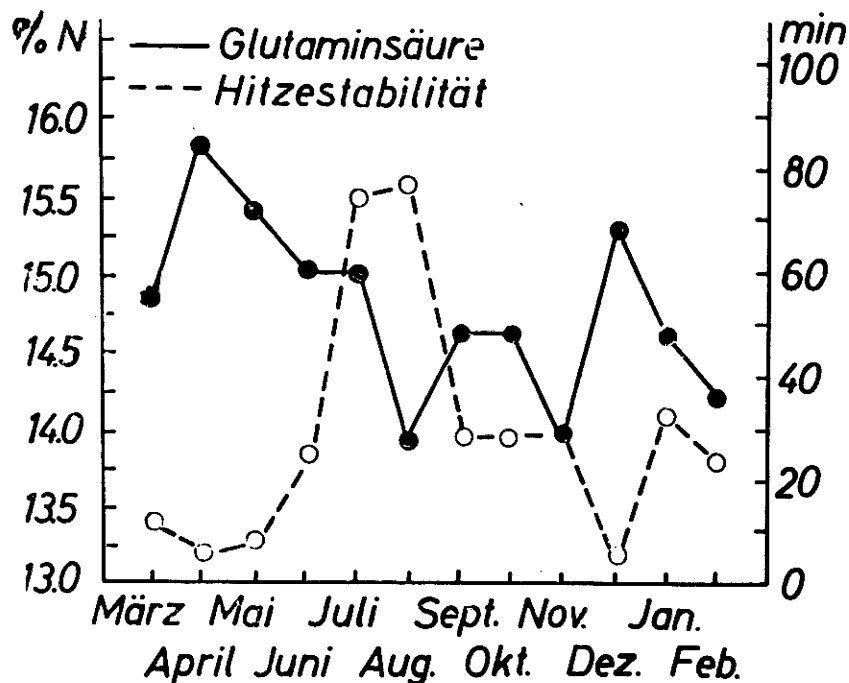


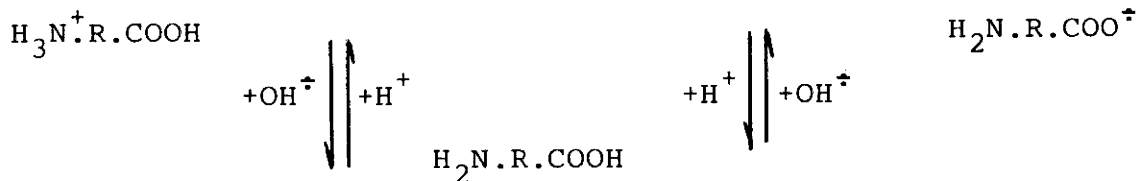
Fig. 2.5.2.

Sesongvariasjoner i melkens glutaminsyreinnhold og dens varmestabilitet. (Etter Kirchmeier)

Høgt innhold av glutaminsyre
mindre varmestabilitet.

2.6. Fellingen.

Utfelling av protein ved dets isoelektriske punkt er ingen særegenhet for kasein, men dette proteinets høye fosforinnhold og spesielle oppbygning gjør at fellingen her blir svært utpreget. P.g.a. kaseinets heterogene oppbygning er det imidlertid riktigere å snakke om et isoelektrisk område fremfor et isoelektrisk punkt. Dette område ligger mellom pH 4,6 og pH 4,9, og her har proteinet et minimum av løselighet. På den sure siden av det isoelektriske område har kaseinpartiklene en positiv overskuddsladning, på den alkaliske siden er partiklene negativt ladet:



Reaksjonene er reversible. Utfelt kasein i det isoelektriske område kan bringes i løsning som katjoner med syre og som anjoner med base (lut).

At kalsiumkaseinat-fosfat-komplekset kan holdes i kolloidal løsning skyldes utelukkende κ -kaseinets hydrofile karakter, som igjen skyldes den sukkerholdige komponent i dette spesielle kaseinet. Denne delen av peptidkjeden i κ -kaseinet kalles også glyko-makropeptidet og omfatter de 64 siste aminosyrerestene i monomeren. Det er denne delen som løpeenzymet spalter fra. Dermed fjernes størstedelen av de negative overskuddsladninger som stabiliserer løsningen.

En har kunnet beregne at den negative overskuddsladningen blir redusert med 7/8 etter løpebehandlingen.

Ved dehydrering og avladning, slik som ved innvirkning av løpe, vil micellene destabiliseres og aggregere, men det tredimensjonale nettverket vil også trekke seg sammen, hvilket skjer under synæresen. Serumet vil da presses ut av nettverket omtrent som når man kryster vann ut av en svamp.

% NPN

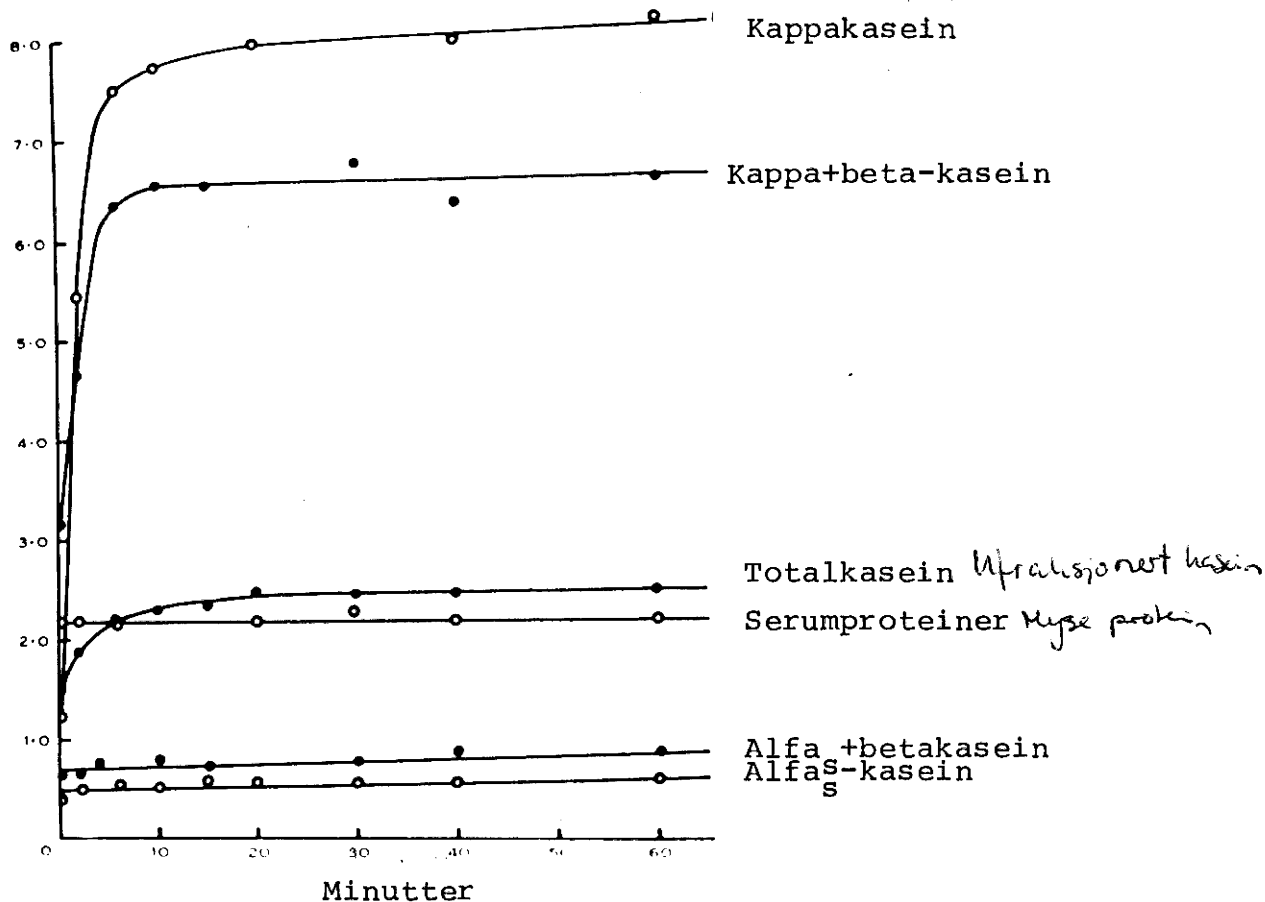


Fig. 2.6.1. Frigjøring av NPN i 12% trikloreddik-syre etter behandling av forskjellige kaseintyper med chymosin.

Løpens virkning på phen-met-bindingen i κ -kaseinet skjer raskt. NPN løselig i 12% trikloreddiksyre kan brukes som et mål for denne aktiviteten. På fig. 2.6.1 er vist endel registrering av NPN på forskjellige kaseinater. En ser at en etter den første hastige stigningen i $\text{NPN}_{12\%}$ også får en videre langsom stigning. Dette er løpens mer langsomme proteolytiske virkning som betegnes som tertiærfasen. Under denne fasen blir α -kaseinet til å begynne med spaltet i to komponenter med forskjellige elektroforetisk vandrings-hastighet, den ene med høyere, den andre med lavere mobilitet enn selve α -kaseinet. Deretter skjer det en analog oppdeling av begge disse komponenter. Det er de lavmolekylære, relativt sure peptider, som først spaltes fra, noe som resulterer i at den resterende høymolekylære del får stadig lavere elektroforetisk mobilitet. Stort sett foregår nedbrytingen av β -kaseinet på samme måte. (Mer om den videre nedbryting under ostens modning.)

3. FASER I LØPNINGSPROSESSEN

Ved ysting av løpeoster har en under melkens koagulasjon og videre behandling endel faguttrykk som brukes til å karakterisere de forskjellige faser av prosessen:

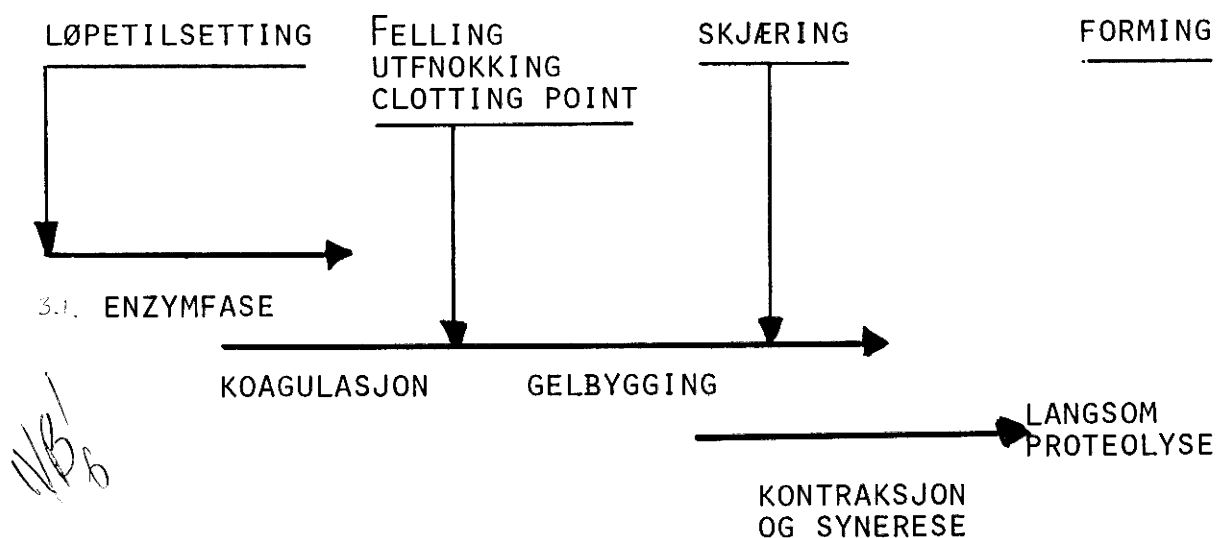


Fig. 3.1 . Faser i løpningsprosessen.

3.1. Den innledende fase, enzymfasen.

Det har gjennom tidene eksistert mange teorier om hva slags type av reaksjon man hadde under den innledende enzymfase ved melkens løpning. Ifølge HAMMARSTEN (1872) ble "dikalsiumkaseinatet" under chymosinets innvirkning spaltet i en kalsiumfattig vannopløselig proteose, den såkalte myseeggehvite, og et dikalsiumparakaseinat med høyt innhold av kalsiumfosfat. Både HAMMARSTEN og VAN SLYKE (1914) mente at omdannelsen av kasein til parakasein var en ren proteolytisk prosess. HOLTER (1932) målte proteolysens omfang under koagulasjonen og fant at det under normale forhold ble spaltet mindre enn 1 peptidbinding pr. kaseinmolekyl. Han mente derfor at HAMMARSTEN's teori om kaseinets proteolytiske spaltning i parakasein og myseeggehvite ikke kunne være korrekt.

HAMMARSTEN, 1872. Uppsala läkarfor. Forsch. 8, 63

VAN SLYKE & BODWORTH, 1914. AGR. EXP. St. BUL. 31. N.Y.

HOLTER, 1932. Biochem. Zeitung 255, 160

Så sent som i 1950 (CHERBULIEZ & BAUDET) mente en at koagulasjon kunne inntre uten splitting av peptidbindinger i molekylet. ALAIS et. al 1953 viste at den raske frigjøring av NPN (ikke proteinnitrogen) fra kaseinet, forut for koagulasjonen, var vesensforskjellig fra den generelle langsomme proteolyse som enzymet også katalyserer.

NITSCHMANN & KELLER (1955) demonstrerte at dette NPN, som var løselig i 12% trikloreddiksyre (TCA), kom fra α kaseinet. Etter at WAUGH & von HIPPEL (1956) hadde identifisert κ -kaseinet som en subfraksjon av α -kaseinet ble dette og andre kasein-fraksjoner isolert av WAKE & Mc. KENZIE (1959, 1961) og virkningen av løpen på de enkelte fraksjoner studert. Resultatene fra disse forsøk demonstrerer tydelig at NPN-12% TCA dannes fra κ -kaseinet under den innledende enzymfase. De andre proteinkomponenter påvirkes bare av den generelle langsomme proteolyse. Ifølge Waugh & Gillespie (1958) omdannes κ -kaseinet til para- κ -kasein 300-1000 ganger raskere enn hydrolysen av f.eks. α_s og β -kasein.

Arbeidet ved SCIRO i Australia (HILL 1968) har vist at avspaltningen av NPN 12% TCA virkelig skyldes en hydrolyse av en peptidbinding mellom fenylalanin og metionin i κ -kaseinet. Som det går frem av figur.2.1.7, vil det polypeptidet som spaltes ha en lengde på $169 \div 105 = 64$ aminosyrerester.

κ -kaseinets stabiliserende effekt skyldes det høye innholdet av karbohydrat som er knyttet til aminosyrene threonin 131, 133 og 135 med glykosidbindinger.

CHERBULIEZ & BAUDET, 1950. *Helv. Chim. Acta*, 33, 398.

ALAIS et al 1953. *Helv. Chim. Acta*, 36, 1955

NITSCHMANN & KELLER, 1955. *Helv. Chim. Acta* 38, 942

WAUGH & von HIPPEL, 1956. *J. Am. Chem.* 78, 4576.

WAUGH & GILLESPIE, 1958, *Disc. Farady Soc.* 25, 186.

WAKE, 1959, *Aust. J. Biol. Sci.*, 12, 479

Mc. Kenzie & WAKE, 1961. *Biochem. Biophys. Acta*, 47, 260.

Glykomakropeptidet som frigjøres inneholder i middel 30% karbohydrat i form av:

- 4,3% **N-acetyl galaktosamin**
- 15,2% galaktose
- 11,4% neuraminsyre (sialsyre)

Det er demonstrert at en avspalting av neuraminsyre fra glykomakropeptidet, ved å behandle dette med neuraminidase reduserer κ -kaseinets stabiliserende effekt. (En reduksjon på 20% ved 69% avspalting). Løpeenzymet viser imidlertid ingen neuraminidaseaktivitet.

Det har vært mye uklarhet om selve reaksjonstypen eller hva slags løpefølsom binding det er som brytes ved fraspaltingen av makropeptidet.

Dersom det var en peptidbinding som ble brutt, skulle man i ett av spaltingsproduktene kunne påvise en ny N-terminal aminosyre. Dette hadde man til å begynne med vanskeligheter med å påvise. Det ble imidlertid i 60-årene funnet en ny C-terminal gruppe i para- κ -Kaseinet.

I 1965 fant imidlertid DELFOUR et. al. at glykomakropeptidet virkelig inneholdt en ny N-terminal methioninrest. Denne hadde tidligere ikke blitt registrert da den så lett blir ødelagt ved hydrolyse.

Spaltingen av Phen-met-bindingen i κ -kaseinet under enzymfasen, fører til en ny COOH-terminal gruppe som foreligger i dissosiert form og dermed vil gjøre miljøet surere. Dette har vært nyttet som et mål for å finne hvor mange slike peptidbindinger som frigjøres. MOCQUOT & GARNIER (1965) nyttet en pH-stat (med nøyaktighet innen 0,001 pH-enhet) og fant på grunnlag av slike målinger at det ble hydrolysert en peptidbinding pr. mol κ -kasein dersom molvekten på dette ble satt til 55 000.

Følsomheten på phen-met-bindingen er ikke bare spesifikk for chymosinet, men også for en rekke andre proteolytiske enzymer.

Spesifikke aminosyresekvenser i nærheten av den følsomme binding har stor betydning for ustabiliteten i denne peptidbindingen. SCHATTENKERK & KERLING, 1973, har demonstrert dette godt i forsøk med peptider av forskjellig lengde og sammensetning. Fig. 3.1.1.

103	104	105	106	107	108	x	x	x	x	$\frac{E}{S} = \frac{1}{10\ 000}$
Leu	Ser	Phe	Met	Ala	Ile	Pro	Pro	Lys	Lys	$t_{\frac{1}{2}}$ minutter
_____										240
_____										150
_____										45
_____										20
_____										10

totalt eller tillegg.

Figur 3.1.1. Effekten av forlengelse av kappakaseinfragment med forskjellige aminosyrer på hydrolysehastigheten av Phe - Met - bindingen. Etter SCHATTENKERK & KERLING, 1973.

Lengden av peptidet og hva a.s. som går i rekkefølge har betydning for hydrolysen.

3.1.1. Enzymaktivitet og løpestyrke (Storch/Segelckes lov)

En rekke ytre faktorer virker inn på enzymets aktivitet, så som temperatur, surhetsgrad, tilstedeværelse av spesifikke inhibitorer, affinitet til substratet osv.

Dersom vi holder alle disse faktorene konstante vil den enzymatiske reaksjonshastigheten bare være bestemt av mengdeforholdet mellom enzym og substrat.

Dersom det i et medium er et stort overskudd av enzymet i forhold til sitt spesifikke substrat vil reaksjonshastigheten øke tilnærmet lineært med en økning av substratmengden. En sier da at enzymreaksjon er av første orden.

Økningen i reaksjonshastighet vil etter hvert gradvis avta når substratmengden øker. Den maksimale reaksjonshastigheten nås når alt disponibelt enzym er engasjert i substratet. En videre økning av substratmengden nå har ingen effekt på reaksjonshastigheten. Under disse forhold sier en at enzymreaksjonen er av nullte orden. Mellom disse soner har man en blandet enzymkinetikk.

Til enhver tid er reaksjonshastigheten $v = \frac{V(S)}{K_m + (S)}$, der (S) er den aktuelle substratkonsentrasjon.

V den maksimale reaksjonshastighet og

K_m = Michaelis konstant (mol/l).

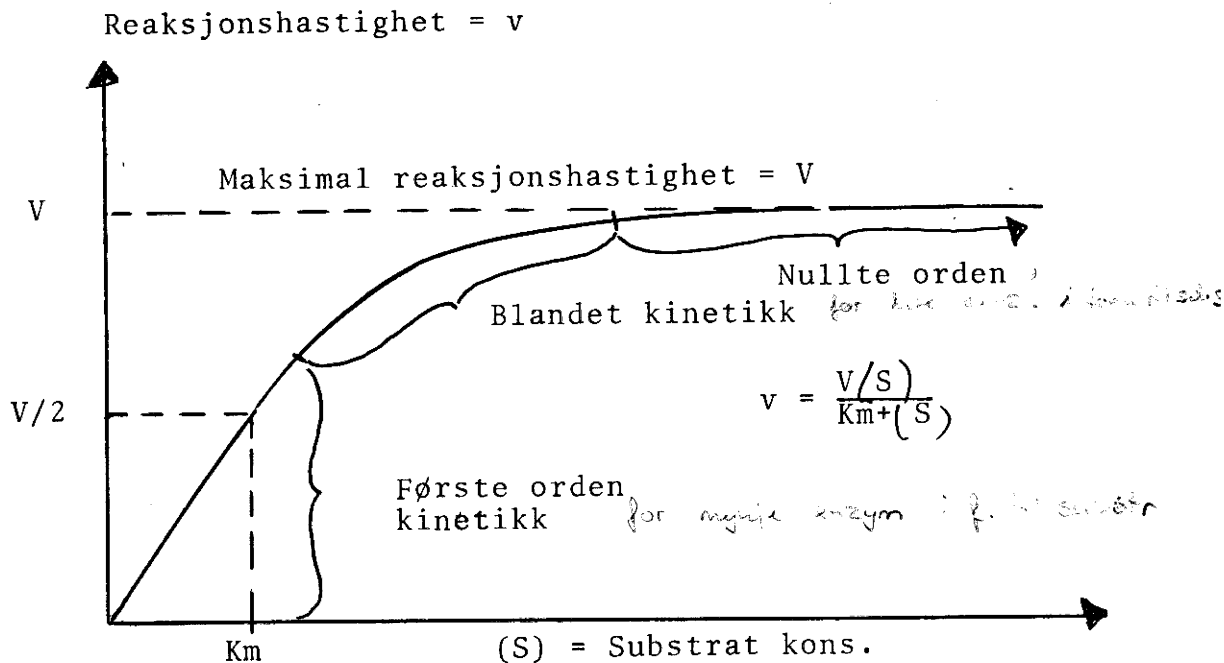


Fig. 3.1.1.1. Forholdet mellom enzym og substratmengde på reaksjonshastigheten.

Så lenge reaksjonen er av nullte orden, d.v.s. at enzymet er mettet med substrat vil reaksjonshastigheten bli bestemt av enzymkonsentrasjonen og vil øke lineært med denne.

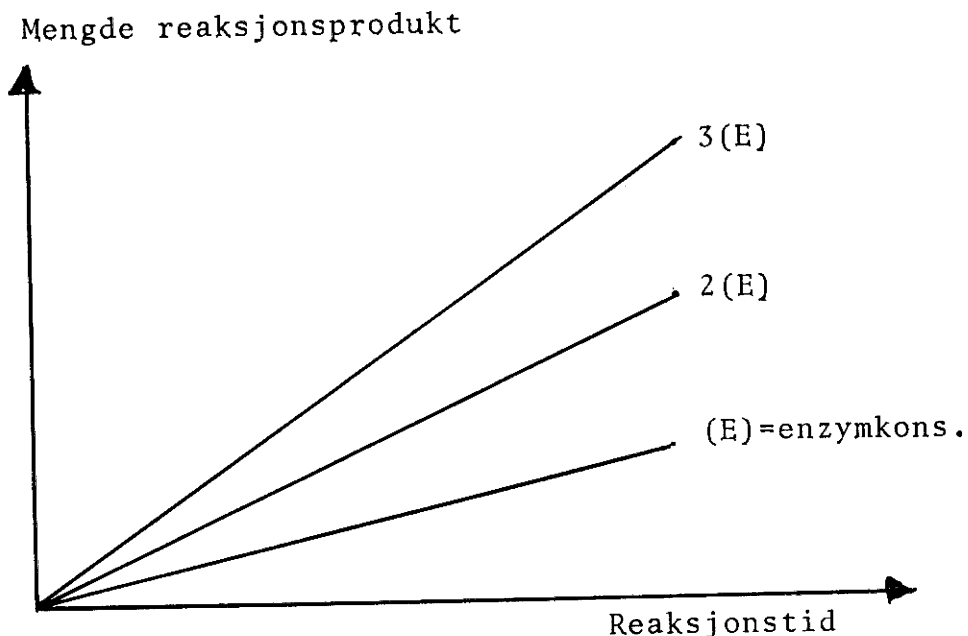


Fig.3.1.1.2. Effekten av enzymkonsentrasjonen når kinetikken er av nullte orden.

Det er disse forhold som ligger til grunn for STORCH & SEGELCKES lov (1874) som sier at koagulasjonstiden er omvendt proporsjonal med løpemengden under konstante betingelser d.v.s. samme melk, løpepreparat, temperatur o.s.v.

$$\underline{T \cdot (E) = k} \quad \text{eller} \quad \underline{T = \frac{k}{(E)}}$$

$$\begin{aligned} \text{Tid} &= T \\ \text{M. reakt.} &= k \\ \text{enz. (E)} & \end{aligned}$$

Ved de løpemengder som er aktuelle å nytte i praksis, får man en kinetikk av nullte orden og STORCH/SEGELCKES lov nyttes sålede ved kalkulasjon av løpens styrke.

Ved å estimere koagulasjonstida som et mål for reaksjonshastigheten gir loven imidlertid ikke full proporsjonalitet da den bare gjelder for enzymfasen i prosessen. Selve fellingen av parakaseinet tar sin tid uavhengig av enzymkonsentrasjonen.

Forskjellige indirekte metoder har tidligere vært nyttet til å fastlegge reaksjonshastigheten for enzymfasen. SMITH & BRADLY (1937) inaktiverte enzymet med formaldehyd etter bestemte innvirkningstider og felte det dannede parakasein med kalsiumklorid. De betraktet enzymfasen som avsluttet når det ikke ble felt ut mer parakasein og væsken over fellingen var klar. Som foran nevnt resulterer enzyeffekten i at det fraspaltes et glykomakropeptid fra K-kaseinet med et visst innhold av N. Dette nitrogenet som er løselig i 12% Trikoreddigsyre betegnes som "ikke protein nitrogen" (NPN) og kan bestemmes i filtratet etter en felling med 12% tri-klor-eddigsyre. Denne metoden nyttes nå i utstrakt grad til å følge enzymvirkningen. Enzymfasen ansees som avsluttet når den maksimale mengde NPN er nådd. (Se fig. 2.6.18. I praksis er imidlertid denne metoden for omstendig til bestemmelse av løpestyrken. I stedet har man forsøkt å minimalisere effekten av den feil man får, når koagulasjonstiden estimeres som et mål for reaksjonshastigheten, ved sammenlikning av løpepreparater. Dette gjøres på den måten at man prøver seg frem til den konsentrasjon av to forskjellige preparater som gir tilnærmet samme koagulasjonstid før den mer seriøse sammenlikning av preparatene gjøres. Fortynningen av preparatene blir da den utslagsgivende faktor.

Løpestyrke (RU = Rennin Units) angis som antall deler melk en del løpe kan koagulere i løpet av 40 min. ved 35°C.

For flytende preparater er styrken vanligvis 15 000 (8-20000), for tørrpreparater 150 000.

Overnevnte definisjon på løpestyrke gir rom for store variasjoner i resultatet, først og fremst fordi substratet ikke er nærmere definert, men også fordi estimeringen av koagulasjonen kan skje på så mange måter. Flere metoder er i bruk og en viser til de detaljerte metodebeskrivelser. (Se forskriftene for øvelsene i meieriteknologi).

Dersom koagulasjonstiden observeres i sekunder vil den abso-

lutte løpestyrke generelt være gitt i følgende formel:

$$\text{Løpestyrke} = \frac{\text{Deler melk}}{\text{Deler løpe}} \cdot \frac{2\,400}{\text{Observert koagulasjonstid i sekunder}}$$

I praksis vil det være nøyaktig nok å bestemme et løpepreparats styrke i forhold til et standard-preparat (med en absolutt styrke etter en nærmere spesifisert metode).

Ved slike sammenlikninger forsøker en som foran nevnt å innstille forsøksbetingelsene slik at avviket i koagulasjonstid blir minimalt. Produktet K i STORCH/SEGELCKES lov vil være forskjellig for forskjellige preparater. For preparatene A og B vil $\frac{K_A}{K_B}$ angi den relative forskjell.

Er T_s og T_u koagulasjonstidene for henholdsvis standard- og ukjent preparat og $(E)_s$ og $(E)_u$ de respektive enzymkonsentrasjoner henholdsvis, vil omregningsfaktoren bli:

$$\frac{T_s \cdot (E)_s}{T_u \cdot (E)_u} \quad \text{omregningsfaktor}$$

Denne faktoren blir enda mer praktisk om en i stedet for (E) innfører D, fortynningen av preparatene.

En har at $D = \frac{1}{(E)}$ og formelen blir da:

$$\text{ukjent styrke} = \text{standardstyrke} \cdot \frac{T_s \cdot D_u}{T_u \cdot D_s}$$

Produsenter av løpepreparater oppbevarer standardpreparater som fornyes fra tid til annen etter å være testet mot samme substrat. Som substrat nyttes ofte BERRIDGE's, som består av beste sort "low heat", skummet melk, 60 g rekonstituert i 500 ml 0,01 m CaCl_2 . Løsningen må minst stå en time før bruk, helst stå 20 timer ved $+2^\circ\text{C}$.

Selv om man på denne måten har forsøkt å redusere effekten av eventuelle variasjoner i substratet, vil heller ikke tørrmelk være et 100% stabilt produkt.

For å kunne bestemme styrken av en chymosinstandard uavhengig av variasjoner i melken, foreslo RAYMOND et al, 1973 å anvende et syntetisk hexapeptid som inneholdt den løpefølsomme bindingen. Konstitusjonen var: H-Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-O-Me. I stedet for Methionin har en satt inn Norleusin som er mer stabil enn Methionin, og det er innført en nitrogruppe på fenylalanyl-resten som dermed virker som cromofor gruppe og gjør det mulig å følge hydrolysen spektrofotometrisk ved 310 nm.

Som enzymstandard (pCU) har en innført den enzymmengden som i løpet av ett sekund hydrolyserer ett nanomol ($M \cdot 10^{-9}$) av hexapeptidet.

Krystallinsk chymosin hadde en styrke på $3.76 \cdot 10^9$ enheter pr. mol enzym, mens pepsin hadde en styrke på $4.44 \cdot 10^{10}$ enheter pr. mol enzym.

De KONING et al, 1978, anvendte hexapeptidet †

Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-Ile-O-Me, og en rekasjon med ninhydrin for å bestemme den proteolytiske aktivitet. For pepsin og chymosinmengder som ga samme melkekoagulerende effekt viste pepsinet omtrent 9 ganger større aktivitet enn sistnevnte på hexapeptidet. Hexapeptider som substrat synes derfor bare å egne seg til kontroll av aktiviteten på rene preparater.

RAYMOND et al, 1973. J. Dairy Sci., 56, 419

De KONING et al, 1978. Neth. Milk Dairy J., 32, 232

3.1.2. Forhold som påvirker enzymaktiviteten.

Som kjent er enzymene svært spesifikke biokatalysatorer, slik at substratets art har avgjørende betydning for enzymets affinitet og virksomhet. Dette forholdet er kanskje mest utpreget for substrater med en enkel kjemisk sammensetning, mens proteiner med sin kompliserte oppbygning og muligheter for substratanalogier vil kunne hydrolyseres på forskjellig måte og grad av de forskjellige proteinaser.

Foran har vi sett at pepsinet hydrolyserer korte peptider (Hexapeptider) relativt sterkere enn lange (f.eks. κ -kasein). κ -kaseinet foreligger som kjent i to genetiske varianter, A og B, og dessuten forekommer variasjoner i sammensetning og mengde av glykomakropeptidets karbohydratdel, CASTLE & WHEELLOCK, 1971, viste at K_m for chymosinets spesifikke hydrolyse av κ -kaseinet var avhengig av karbohydratssammensetningen i det aktuelle κ -kasein.

Kvalitative variasjoner i substratets sammensetning (genetisk betinget eller ikke) kan vanskelig reguleres i praksis.

Denaturering

Større muligheter til påvirkning av enzymenes aktivitet har man ved å innstille reaksjonsbetingelsene og ved ytre påvirkning av substrat eller enzym. Begge er av proteinnatur og kan denatureres i større eller mindre grad, f.eks. ved sterk varmebehandling. Dette kan inaktivere enzymet eller føre til strukturelle endringer i substratet som hindrer enzymet i å virke på de følsomme bindingene. Ved varmebehandling av melk vil en dessuten få dannet forskjellige kompleks-forbindelser som påvirker løpningsevnen.

Denaturering av serumprotein

Primærfasen av løpningen blir hemmet for varmebehandlet melk, i følge ELFAGM & WHEELLOCK, 1976. Både β lactoglobulin og α -lactalbumin synes å kunne danne kompleksforbindelser med κ -kasein, slik at en får denne effekten. Ved temperaturer over

CASTLE & WHEELLOCK, 1971, Biochem. I. 119, 12

ELFAGM & WHEELLOCK, 1976. J. Dairy Res., 44, 367.

74°C synes serumproteinene å denaturere lettere i melk enn de gjør i myse. Dette skyldes sannsynligvis κ -kaseinet i melken. Det er også funnet at α -lactalbumin denaturerer i sterkere grad når β -lactoglobulin er tilstede enn alene. Det synes å bindes til en aggregert form av β -lactoglobulinet.

Kjemiske Stoff

Forskjellige kjemiske stoffer kan virke spesifikk inhiberende eller aktiverende på de respektive enzymer. Forekomst av slike stoffer i melk synes være lite undersøkt. Dette forholdet har vel også kanskje størst teoretisk interesse. (Anvendelse av spesifikke proteinaseinhibitorer for å stoppe uønsket hydrolyse i forskjellige produkter kan imidlertid tenkes å bli teknologisk interessant).

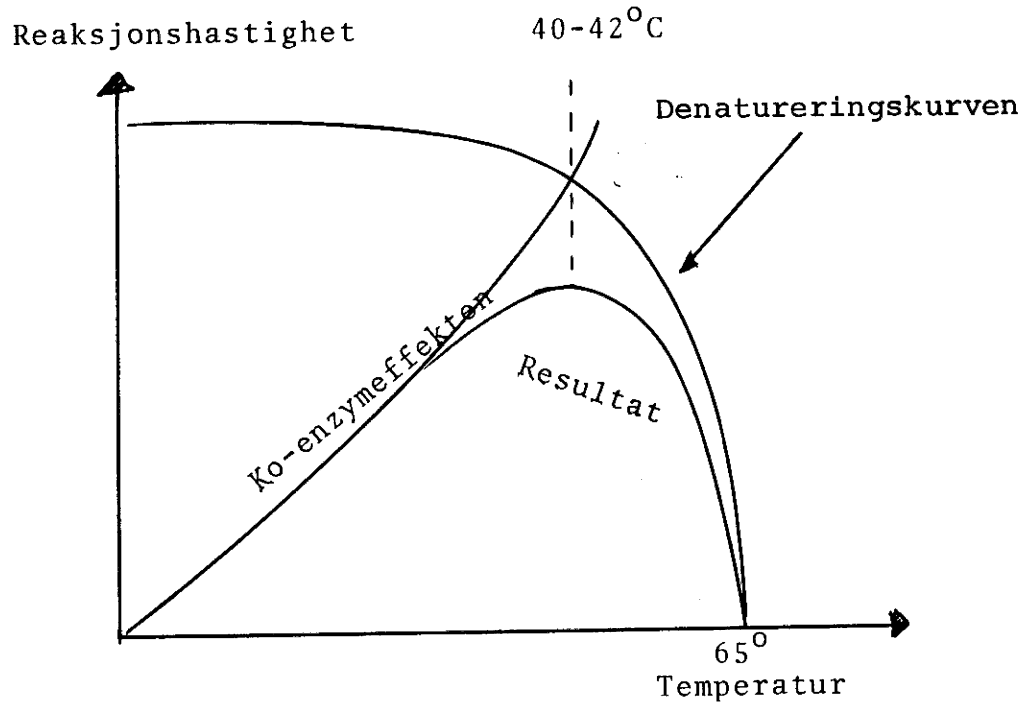
NB! De faktorer som i praksis har størst betydning for å kunne påvirke enzymaktiviteten når substrat og enzymkonsentrasjoner er gitt er uten tvil temperaturen og surhetsgraden.

Viktig: temperatur
surhetsgrad.

3.1.2.1. Temperaturen.

Som andre kjemiske reaksjoner, vil de reaksjonene som er katalysert av enzymer være svært følsomme for endringer i temperaturen. Vanligvis vil reaksjonshastigheten øke med stigende temperatur. På grunn av enzymets protein-natur vil imidlertid dette etter hvert som temperaturen øker gjennomgå en denaturering som inaktiverer enzymet. Konsentrasjonen av dette avtar og dermed reaksjonshastigheten. Forholdet er anskueliggjort i fig. 3.1.2.1.1.

Chymosinet som er et animalsk enzym, har en optimumstemperatur som synes å ligge i nærheten av legemstemperaturen, men de forskjellige forsøksdata som er oppnådd varierer noe. Optimaltemperaturen for enzymvirkningen synes å være den samme som den som er funnet for hele løpeprosessen, d.v.s. 40-42°C for kalveløpe. Chymosinet ødelegges i løpet av noen minutter ved en temperatur på 60-65°C.



Figur 3.1.2.1.1. Temperaturens effekt på reaksjonshastigheten.

Denatureringen av proteinet er en prosess som er vesentlig mer temperaturfølsom enn de vanlige kjemiske og enzymatiske reaksjoner. For disse siste gjelder at en økning på 10°C gir en fordobling av reaksjonshastigheten:

kjemiske } reaksjoner $Q_{10} = 2$
enzymatiske }

For denatureringsprosesser finner en at reaksjonshastigheten øker med en faktor på 14 og oppover for temperaturkvotienten på 10:

$$Q_{10} \approx 14 \quad ?$$

3.1.2.2. Surhetsgraden.

Variasjoner i mediets pH vil ha betydning for jonekarakteren til amino- og karboksyl-gruppene på overflaten av enzymproteinet og vil derfor også virke inn på katalysatoreffekten som enzymet har. Mer ekstreme variasjoner i pH vil i tillegg til

pH 3 - ionekarakter
- denaturering

dette kunne denaturere proteinet i betydelig grad. Typisk effekt av pH på enzymaktivitet er vist i fig. 3.1.2.2.1. Aktiviteten faller raskt på begge sider av det optimale område der selve optimalpunktet er mindre sterkt markert. (Kurven har klokkefasong).

Reaksjonshastighet

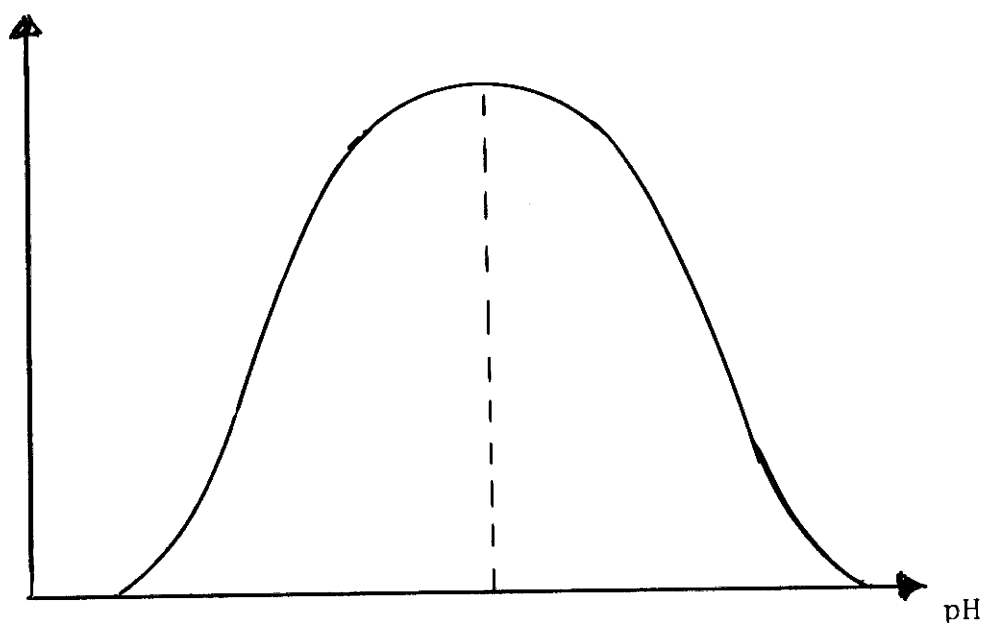


Fig. 3.1.2.2.1. Surhetsgradens effekt på enzymaktiviteten.

Når en skal angi optimalt pH-område for et enzym vil også arten av substratet eller hvilken spesifikk effekt av enzymet en sikter til, måtte oppgis. Mens pH-verdier fra 4,0 til 5,7 er rapportert som optimum for chymosinets omdannelse av kasein til parakasein, er den optimale pH-verdi for generell proteolytisk aktivitet av PELTOLA (1950) angitt til 4,8 overfor kasein, 3,7 overfor hemoglobin (BERRIDGE 1945) og 3,3 for serumalbumin (FOLTMANN 1959).

BERRIDGE, 1945, Biochem. J., 39, 179.

FOLTMANN, 1959, Acta Chem. Scandinavia 13, 1927.

PELTOLA, 1950, Suomen Kem. 23-B.4.

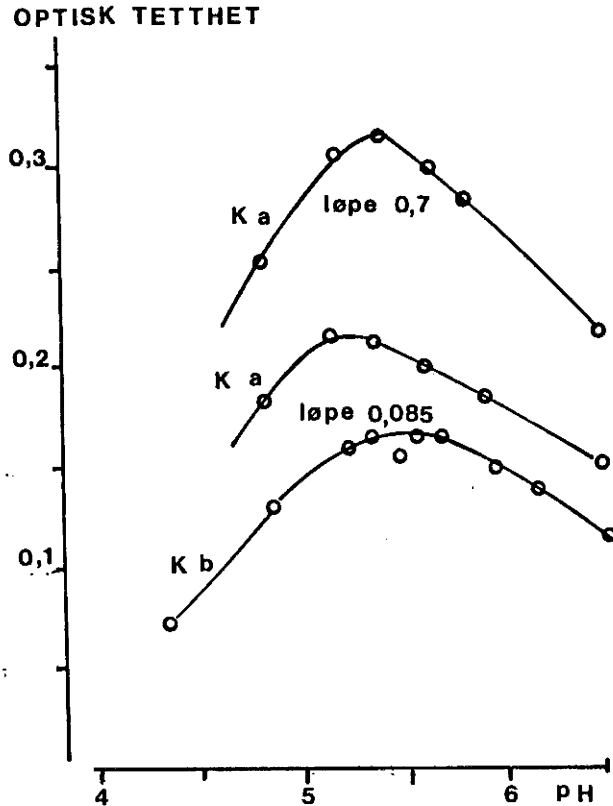


Fig. 3.1.2.2.2.

Frigjøring av NPN med forskjellige løpe og kaseintyper.

HUMME, 1972 fant at pH-optimum for den spesifikke, begrensede proteolyse av kappa-kaseinet lå i området 5.3, men fant noe forskjellige resultater med forskjellige løpekonsentrasjoner og kaseinpreparater. Fig. 3.1.2.2.2. Effekten er estimert ved måling av frigjort N-acetyl-neuraminsyre, spektrofotometrisk registrert.

Den spesielle proteolytiske effekt løpen og andre koagulerende enzymer har på κ -kaseinet foregår raskt ved pH-verdier langt over de verdier som er optimale for den generelle proteolytiske aktivitet og under forhold der denne aktiviteten er ekstremt lav. En skal huske på at chymosinets hovedoppgave er å fordøye melken i kalvens mave der pH ligger på 2,8-4,5

3.1.3. Melkekoagulerende enzymer.

De forskjellige proteinhydrolyserende enzymer, protinaser, inndeles i fire grupper i henhold til karakteristiske særdrag, som vist i det følgende:

<u>Klasse</u>	<u>Eksempel</u>
1 Serin-proteinaser eller såkalte alkaliske proteinaser	Trypsin, trombin, plasmin
2 Sulfhydryl-proteinaser	Papain, bromelin, ficin
3 Metalloproteinaser	Aminopeptidase, carboksyptidaser
4 Carboksyproteinaser eller såkalte sure proteinaser <i>løpning av melk,</i>	Chymosin, pepsin

Inndeling av proteinaser etter HARTLEY, 1960.

De fleste enzympreparater som har vist seg egnet til løpning av melk i praksis tilhører gruppen sure proteinaser.

Sure proteinaser hydrolyserer vanligvis peptidbindinger flankert av aromatiske hydrofobe aminosyrer, men aminosyrene i 2 - 5 posisjoners avstand fra den aktuelle binding kan også være avgjørende for hydrolysen.

3.1.3.1. Vegetabiliske enzymer

En rekke planter inneholder sterke proteolytiske enzymer. De best kjente eksempler fra vårt land er kanskje Tettegras (Pinguicula vulgaris) og Soldogg (Drosera rotundifolia)nyttet bl.a. til koagulering av tettemelk. Proteinaserne her har åpenbart betydning for at plantene skal kunne fordøye de insektene de fanger. Flere slike planteproteinaser har tradisjonelt vært

brukt ved fremstilling av ost og brukes fremdeles til fremstilling av lokale spesialiteter i forskjellige deler av verden. Endel preparater blir kommersielt fremstilt til forskjellige formål.

I Portugal og Spania finnes bl.a. en bløt saumelks-ost (Serra) med et ekstrakt av Artiskokk (Cynara cardunculus). Samme enzym har også blitt forsøkt til fremstilling av Edamerost og Cheddarost med mindre godt resultat (bitter ost og pastaaktig konsistens). Til Camembert og blåmuggost ble enzymet funnet brukbart, men en fikk et noe dårlig utbytte, (VIEIRA DE SÁ & BARBOSA, 1972). Cynara cardunculus-løpen hydrolyserer Beta-kaseinet raskere enn vanlig osteløpe gjør under ostens modning. (BARBOSA et al, 1976). Det er konkludert med at enzymet synes å egne seg bedre for sauemelk enn for kumelk.

Den melkeaktige saften fra unge frukter av Melontreet (Carica papaya) inneholder et kraftig proteolytisk enzym kalt papain. Enzymet består egentlig av to forskjellige fraksjoner med noe forskjellig evne til å koagulere melk. Enzymet brukes bl.a. til mørning av kjøtt, men gir for sterk proteolyse ved anvendelse til ost og har derfor nå nærmest historisk interesse i ystingssammenheng.

Ekstrakter fra Fiken (Ficus carica) har også vært anvendt til ysting bl.a. av Cheddarost (KRISHNASWAMY et al, 1961). Osten fikk relativt tidlig en bitter smak som imidlertid avtok ved lagring. Kvaliteten og utbyttet var noe lavere enn for kontrolløst fremstilt med kalveløpe. Ficus-løpen synes å bestå av to eller tre forskjellige komponenter med forskjellig aktivitet overfor melkeprotein, (KRAMER & WHITAKER, 1964). En komponent har typisk chymosinlikende egenskaper. En annen proteolytisk

VIEIRA DE SÁ & BARBOSA, 1972, J. Dairy Res., 39, 335.

BARBOSA et al, Le Lait, 56, 551.

KRISHNASWAMY et al, 1961. Food Tech., Champaign 15, 482.

KRAMER & WHITAKER, 1964, J. Biol. Chem., 239, 2178.

faktor koagulerer melken, men dette koaglet løses deretter opp igjen, (ZUCKERMAN-STARK, 1967).

Ficus-emzymet, Ficin, synes å gi altfor sterk proteolyse til å kunne anvendes på tradisjonelle faste løpeoster.

Bromelin (Bromelain) fra Ananas har også sterke proteolytiske og melkekoagulerende egenskaper. (Enzymet kan felles ut fra fruktsaften med alkohol og ammoniumsulfat). Bromelin har vært forsøkt til ysting, men synes å gi altfor sterk proteolyse. Det brukes til mørning av kjøtt. Et annet planteekstrakt som har gitt brukbar kvalitet på osten er utvunnet av Withianiabær (Withania coagulans), men utbyttet har vært dårlig, bl. a. var det et stort fettap under ystingen av Cheddarost. Enzymet synes å være i bruk ved fremstilling av spesielle oster.

Positive resultater hevdes også å være oppnådd med ysting av ekstrakter fra gresskar (Cucurbita pepo). Enzymet er svært likt kalveløpe i mange henseender og ostekvaliteten ble god, (BERKOWITZ - HUNDERT & LEIBOWITZ, 1963).

Et annet gresskarenzym fra Bernicasa cerifera har også vist seg å ha gode melkekoagulerende egenskaper, men har bare svak proteolytisk aktivitet. (RAMAMURTI & JOHAR, 1964). En fant ingen usmak på osten ved anvendelse av dette enzymet.

I en undersøkelse over en rekke vegetabiliske proteinasers melkekoagulerende og proteolytiske egenskaper fant ILANY - FEIGENBAUM et al, 1966, at gresskarløpe var svært lik kalveløpe, mens løpeekstrakt fra melon skilte seg lite fra Ficin. Karakteristiske forskjeller ble observert i enzymenes evne til å produsere lavmolekylære fraksjoner fra kasein.

ZUCKERMAN - STARK, 1967. Enzymologia 32, 380.

BERKOWITZ - HUNDERT & LEIBOWITZ, 1963. Enzymologia 25, 257.

RAMAMURTI & JOHAR, 1964. Naturwissenschaften 51, 88.

ILANY - FEIGENBAUM et al, 1966. Enzymologia 31, 274.

Ystingsforsøk med ekstrakter fra forskjellige deler av Søtvier (Solanum elaeagnifolium) har også gitt godt utbytte og like god kvalitet som for ost ystet med kalveløpe ifølge GAONA & TREVINO, 1977.

FODA et al, 1976, undersøkte løpningseffekten av ekstrakter fra grønne bær av Solanum torvum ved pH 6.5. Løpningstiden ble redusert med økende ekstraktmengde (1 - 8%) men ikke proporsjonalt. Temperaturen lå mellom 35 og 37°C.

Forsøk med anvendelse av vegetabilsk løpe gjøres sporadisk, men den store interessen for slike preparater, som erstatning for kalveløpe, synes å mangle. Sannsynligvis vil de fleste plante-proteinaser gi en så spesiell nedbygging av kaseinet at tradisjonelle oster blir utypiske i smak og konsistens.

I tabell 3.1.3.1.1. er det listet opp de fleste planteslekter som omfatter arter hvis ekstrakter har vært nyttet ved fremstilling av ost.

GAONA & TREVINO, 1977. XV.Inf. de Investigación, Inst.
Tecnológico, Div. Ciencias Agro. y
Maritimas, Monterrey, Mexico.

FODA et al, 1976. Agr. Res. Rev., 54, 145.

Tabell 3.1.3.1.1. Oversikt over slekter hvis arter har vært nyttet
i ystingssammenheng.

Achillea millefolium	Vanlig ryllik
Ananas sativa	Ananas
Arctium minus	Småborre
Asclepias	Silkeurt
Bellis perennis	Vanlig tusenfryd
Bryonia doicia	Rød gallebær (klatrende staude)
Carica papaya	Melontre
Carlina acaulis og-corymbosa	Stjernetistler
Centaurea nigra og - scabosa	Svart knoppurt og fagerknoppurt
Chrysanthemum parthenium	Krageblom
Cirsium acaule og - arvense	Dvergtistel og åkertistel
Cucurbita pepo	Gresskar
Cynara cardunculus og-humilis	Artiskokk
Dipsacus sylvestris	Kardeborre
Drosera intermedia og- rotundifolia	Soldogg
Euphorbia lathyrus	Kross-vortemelk (også medisinsk urt)
Ficus carica	Fiken
Galium verum	Gul maure
Heracleum sphondylium	Kyst-bjørnekjeks
Impatiens glandulifera	Kjempespringfrø
Malva sylvestris	Apotekerkattost
Pinguicula alpina og-vulgaris	Fjell-tettegras og vanlig tettegras
Polygonatum multiflorum	Storkonvall
Ranunculus flammula og-lingua	Grøftesoleie og storsoleie
Ricinus communis	Vanlig oljefrøplante
Rumex acetosa	Engsyre
Senecio jacobaea	Svineblom
Solanum torvum og dulcamara	Søtvier og slyngsøtvier
Strebulus asper	-
Theobroma cacao	Kakaobusken
Urtica dioica	Stornesle
Withania coagulans	-

3.1.3.2. Animalske enzymer. NB!

Chymosin, kalveløpe fra løpemaven, (Abomasum) hos spekalv, er det viktigste melkekoagulerende enzymet av animalsk opprinnelse. Trypsin og chymotrypsin fra bukspyttkjertelen, (Pankreas) har også melkekoagulerende egenskaper, men gir for sterk proteolyse og har derfor ikke kommet til anvendelse ved fremstilling av ost.

Fordøyelsesenzymet pepsin hos pattedyr har en meget sterk proteolytisk effekt overfor kasein og en rekke andre proteiner. Vanligvis testes aktiviteten overfor hemoglobin. Pepsin er svært lik Chymosin i mange henseender og man var tidligere i tvil om dette var to forskjellige enzymer. Etter at begge enzymene er renfremstilt og aminosyresekvensene bestemt er de karakteristiske forskjeller klarlagt. En viktig forskjell er at den generelle proteolytiske aktivitet for pepsinet har et mye lavere pH-optimum enn chymosinets. Den spesielle proteolytiske effekten som spalter kappa-kaseinet og gir årsak til koagulasjon er imidlertid omtrent som for løpe ved den aktuelle surhetsgrad i melken. Pepsin har derfor i stigende grad kommet til anvendelse som løpeerstatning da dette ikke synes å ha negative effekter på ostens kvalitetsegenskaper selv om en noe langsommere modning kan påregnes.

Små mengder pepsin forekommer alltid i kalveløpe, men i den senere tid har de fleste løpeprodusenter blandingsløper med 50% pepsininnhold og mer.

3.1.3.2.1. Kalveløpe.

De kommersielle løpepreparater fremstilles fra kalvens løpemave. Løpemaver fra 2-10 ukers gamle kalver som utelukkende er blitt føret med melk, egner seg best. Løpemavens chymosininnhold avtar etter hvert som dyret får tilskudd av vanlige føreidler, mens derimot pepsininnhold øker.

Den fabrikkmessige framstilling av løpeekstrakter skriver seg fra begynnelsen av 1870 årene da den først ble opptatt av franskmannen.

LEON KRICK og like etter av dansken CHR. HANSEN.

De første vitenskapelige studier over framstillingen skriver seg fra SOXHLET (1877). De prinsipper som han foreslo for framstilling, gjelder fremdeles, selv om metodene kan være noe forskjellig i de enkelte fabrikker.

Kalven skal være 2 uker eller eldre, utelukkende oppfødd på melk og den skal ikke ha mat 10 timer før slakting. Det er heller ikke heldig å transportere kalven over lengre avstand før slakting.

Så snart den er slaktet, tas løpemaven ut idet en passer på å få med alt av fremste del og helst litt av overgangen eller innløpet til løpemaven, da den sterkeste konsentrasjonen av løpe finnes her. Utløpet av maven er mindre verdifullt (Se figur 3.1.3.2.1.1.)

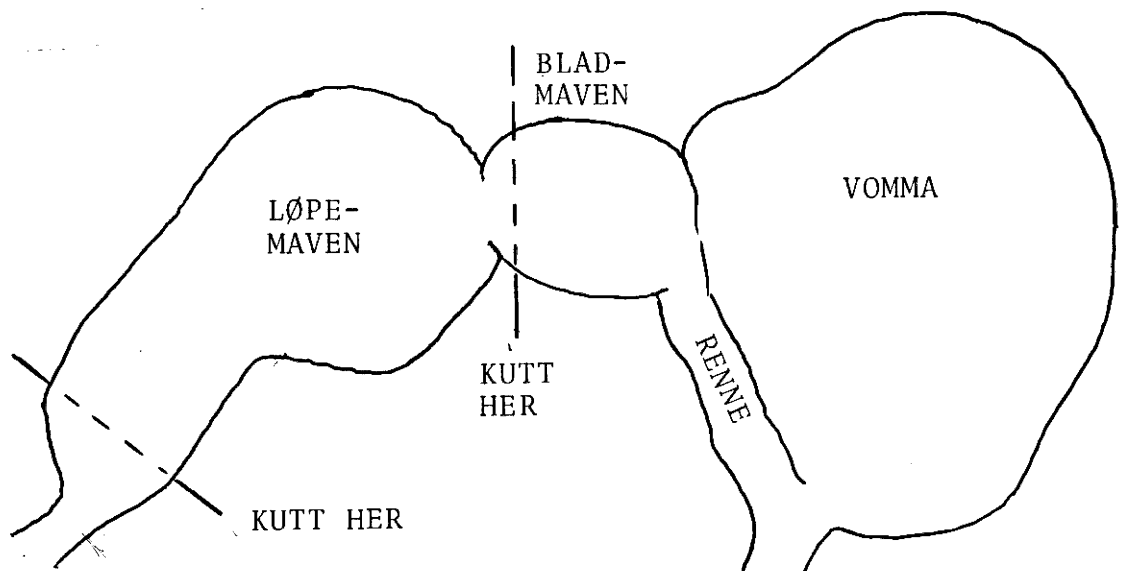


Fig.3.1.3.2.1.1. Fõrmaven består av vomma (fõrlagret) og nett-maven (oppgulpingsorganet). Denne er lite utviklet hos spekalver. Den fordøyende mave er bladmaven (uten kjertler) og løpemaven (ABOMASUM).

Innholdet i mavene blir nå klemt ut, men innsiden vaskes ikke. Utenpå blir de rensset for fett og bindevev. Som konservering av mavene, før forsendelse til fabrikk, ble de tidligere tørret, enten ved innblåsing av luft eller ved oppskjæring og utspiling. Nå nyttes overveiende dypfrysing. HAGYARD 1974, har sammenliknet effekten av tørring og frysing og fant at løpe fra tørrede mager viste en større aktivitet enn den fra frosne maver, henholdsvis 60,1 mot 46,8 RU/ml.

På løpefabrikkene blir magene malt opp og ekstrahert, vanligvis med 5-10% saltløsning. Ekstraksjonsvæsken er gjerne tilsatt et konserveringsmiddel da ekstraksjonen kan gå over flere døgn. Tymol og borsyre er vanligvis brukt. I løpemaven foreligger størstedelen av enzymet i en inaktiv form som zymogen eller prochymosin. Det neste trinn i prosessen blir derfor en aktivisering av enzymet.

Prochymosin ble allerede i 1932 renfremstilt av KLEINER & TAUBER. Disse viste også at zymogenet kunne aktiviseres og overføres til chymosin ved hjelp av hydrogenjoner. Ved pH 5,3 gikk aktiveringen langsomt, men svært raskt ved pH 1. I praksis brukes en surhetsgrad på mellom 4,7 og 5,0 pH.

Løpeekstraktet er alltid forurenset med pepsin og pepsinogen. Det siste aktiveres til pepsin ved pH 4,6. Da pepsinet hydrolyserer enzymproteinet i chymosinet ved lave pH-verdier kan ikke aktiveringen av chymosinogenet skje ved for høy surhetsgrad og over for lang tid. Etter at aktiveringen av chymosinogenet er fullendt blir derfor pH hevet til 5,9-6.0 med svak ammoniakk for å oppnå maksimal stabilitet på preparatet.

(Figur 3.1.3.2.1.2.)

HAGYARD; 1974. Aust.J. Dairy Tech., 29, 181.

KLEINER & TAUBER, 1934. J. Biol. Chem., 107,161.

% TAP I AKTIVITET ETTER 48 TIMER

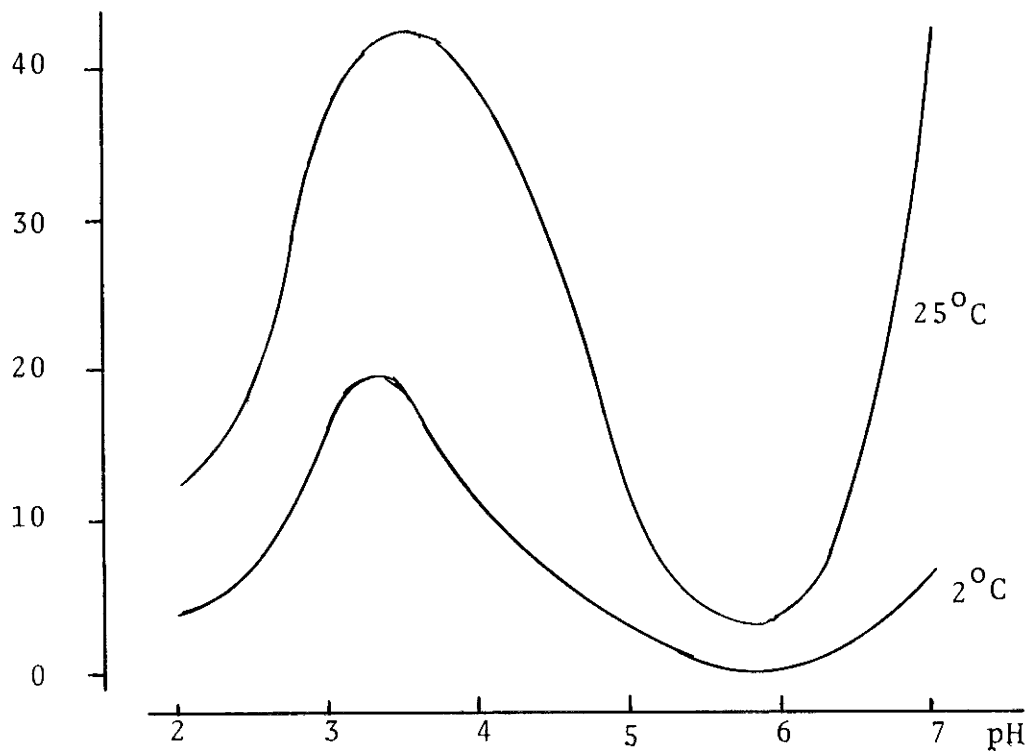


Fig. 3.1.3.2.1.2. Chymosinets stabilitet ved forskjellige temperaturer og surhetsgrader (FOLTMANN 1959).

Størst stabilitet har en i området pH 5,5-6,2. Ved å heve pH til 7,0 ødelegges enzymet raskt. Ved pH 3,5 er også stabiliteten dårlig, det er mer stabilt på begge sider av denne pH-verdi. Under pH 5,0 virker også NaCl inaktiverende. I 1 M saltløsning tapes aktiviteten dobbelt så raskt ved pH 3,8 og fire ganger så raskt ved pH 2,5 enn uten salt i løsningen. Rysting virker også inaktiverende på enzymet. Varme denaturerer enzymproteinet. Dette kan også nedbrytes av andre proteolytiske enzymer, f. eks. pepsin. Blodserum virker inaktiverende på enzymet.

En var tidlig klar over at det under aktiveringen av enzymet skjedde en avspalting av peptider som åpnet for den virksomme delen av enzymproteinet med hensyn på substratet. Skjematisk kan dette illustreres som vist på figur 3.1.3.2.1.3.

De positive ladningene i aktivasjonssegmentet og de negative ladningene i den resterende del av zymogenet, i området for den aktive del av molekylet, bevarer dette i en inaktiv form. Ved lave pH- verdier blir de elektrostatiske kreftene svekket, slik at et rearrangement av strukturen kan foregå og en får en irreversibel aktivering ved en begrenset proteolyse.

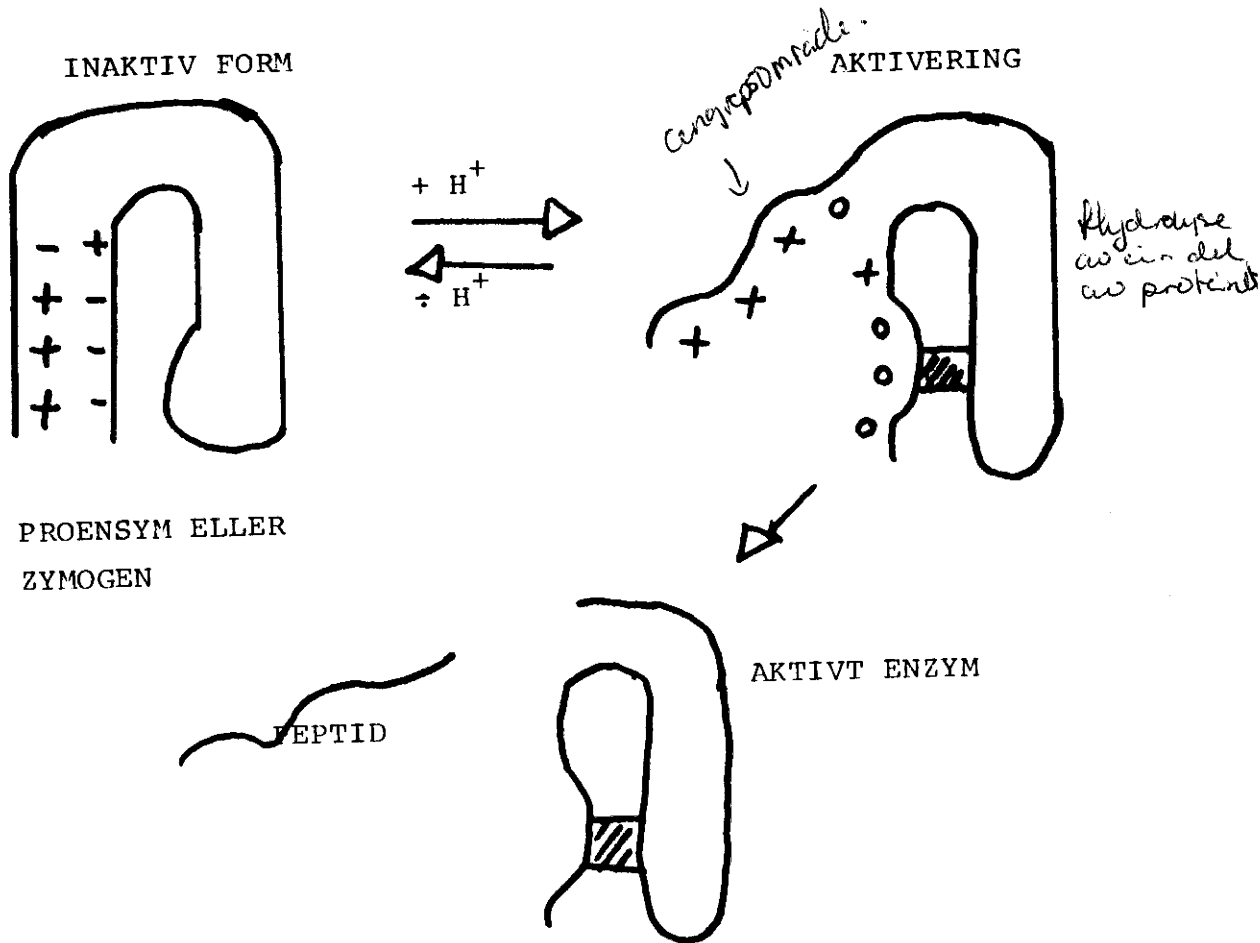


Fig. 3.1.3.2.1.3. Aktivering av fordøyelsesproteaser vist skjematisk. (Etter FOLTMANN et al, 1973).

Etter at FOLTMANN, et al, 1977 hadde bestemt aminosyresekvensen i prochymosin og ditto chymosin i 1979, er dette forholdet blitt nærmere klarlagt.

Den totale aminosyresekvensen på 365 rester i prochymosin er vist i figur 3.1.3.2.1.4.. Zymogenet inneholder to asparaginsyrerester i det aktive området, hvilket er typisk for gruppen av sure proteaser (fordøyelsesenzymmer) som chymosinet tilhører. Sammenlikner en f.eks. med svinepepsin, finner en at 204 aminosyrerester er identiske. På plass nr. 290 har chymosin A en asparaginsyrerest, mens B-typen har en glysinrest.

Både pepsin og chymosin inneholder tre sulfidbroer på samme sted i peptidkjeden. Den store likheten i oppbygningen gjør at tertiærstrukturen av proteinet blir svært ensartet.

I zymogenet har man alanin som terminal aminosyre, mens glysin er den terminale gruppen i det aktive enzymet.

Dersom aktiveringen av prochymosinet skjer ved en pH lavere enn 2,5 skjer det en hydrolyse av bindingen 27-28 i peptidkjeden og en får dannet det såkalte Pseudochymosin. Ved pH mellom 4 og 5 skjer hydrolysen i bindingen 44-45 og en får det "ekte" chymosinet.

NB! pH = 4-5 for å få dannet chymosin
Pseudochymosin blir imidlertid også omdannet til chymosin ved pH 5,5. (PEDERSEN et al, 1979).

Umiddelbart etter ekstraksjonen er preparatet temmelig uklart og må derfor klares. Dette gjøres ved at ekstraktet tilsettes en løsning av kali-alun, deretter en ekvivalent mengde kali-umfosfat. Ved pH høyere enn 4,0 dannes det aluminiumhydroksyd som absorberer chymosinet. Enzymet blir igjen eluert ved fosfattilsetningen og aktiviteten blir ikke påvirket. Grumset blir fjernet ved filtrering.

FOLTMANN. et al, 1977. Proc. natl. Acad Sci., 74, 2321.

FOLTMANN et al, 1979. J. Biological Chem., 254, 8847.

PEDERSEN et al, 1979. Eur. J. Biochem., 94, 573.

X Prochymosin [chymosin (pH 4-5)]

pH < 2,5 = Aktiv pseudochymosin

Ala-Glu-Ile-Thr-Arg-Ile-Pro-Leu-Tyr-Lys-Gly-Lys-Ser-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Lys-Glu	5	10	15	20
His-Gly-Leu-Leu-Glu-Asp-Phe-Leu-Gln-Lys-Gln-Gln-Tyr-Gly-Ile-Ser-Ser-Lys-Tyr-Ser	25	30	35	40
Gly-Phe-Gly-Glu-Val-Ala-Ser-Val-Pro-Leu-Thr-Asn-Tyr-Leu-Asp-Ser-Gln-Tyr	45	50	55	60
Phe-Gly-Lys-Ile-Tyr-Leu-Gly-Thr-Pro-Pro-Gln-Glu-Phe-Thr-Val-Leu-Phe-Asp-Thr-Gly	65	70	75	80
Ser-Ser-Asp-Phe-Trp-Val-Pro-Ser-Ile-Tyr-Cys-Lys-Ser-Asn-Ala-Cys-Lys-Asn-His-Gln	85	90	95	100
Arg-Phe-Asp-Pro-Arg-Lys-Ser-Ser-Thr-Phe-Gln-Asn-Leu-Gly-Lys-Pro-Leu-Ser-Ile-His	105	110	115	120
Tyr-Gly-Thr-Gly-Ser-Met-Gln-Gly-Ile-Leu-Gly-Tyr-Asp-Thr-Val-Thr-Val-Ser-Asn-Ile	125	130	135	140
Val-Asp-Ile-Gln-Gln-Thr-Val-Gly-Leu-Ser-Thr-Gln-Glu-Pro-Gly-Asp-Val-Phe-Thr-Thr	145	150	155	160
Ala-Glu-Phe-Asp-Gly-Ile-Leu-Gly-Met-Ala-Tyr-Pro-Ser-Leu-Ala-Ser-Glu-Tyr-Ser-Ile	165	170	175	180
Pro-Val-Phe-Asp-Asn-Met-Met-Asn-Arg-His-Leu-Val-Ala-Gln-Asp-Leu-Phe-Ser-Val-Tyr	185	190	195	200
Met-Asp-Arg-Asp-Gly-Gln-Glu-Ser-Met-Leu-Thr-Leu-Gly-Ala-Ile-Asp-Pro-Ser-Tyr	205	210	215	220
Tyr-Thr-Gly-Ser-Leu-His-Trp-Val-Pro-Val-Thr-Val-Gln-Gln-Tyr-Trp-Gln-Phe-Tyr-Val	225	230	235	240
Asp-Ser-Val-Thr-Ile-Ser-Gly-Val-Val-Val-Ala-Cys-Glu-Gly-Gly-Cys-Gln-Ala-Ile-Leu	245	250	255	260
Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Lys-Leu-Val-Gly-Pro-Ser-Ser-Asp-Ile-Leu-Asn-Ile-Gln-Gln	265	270	275	280
Ala-Ile-Gly-Ala-Thr-Gln-Asn-Gln-Tyr-Asp-Glu-Phe-Asp-Ile-Asp-Cys-Asp-Asn-Leu-Ser	285	290	295	300
Tyr-Met-Pro-Thr-Val-Val-Phe-Glu-Ile-Asn-Gly-Lys-Met-Tyr-Pro-Leu-Thr-Pro-Ser-Ala	305	310	315	320
Tyr-Thr-Ser-Gln-Asp-Gln-Gly-Phe-Cys-Thr-Ser-Gly-Phe-Gln-Ser-Glu-Asn	325	330	335	340
His-Ser-Gln-Lys-Trp-Ile-Leu-Gly-Asp-Val-Phe-Ile-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Ser-Val-Phe	345	350	355	360
Asp-Arg-Ala-Asn-Asn-Leu-Val-Gly-Leu-Ala-Lys-Ala-Ile	365	370		

asp ligg i aktiv område

Figur 3.1.3.2.1.4. Aminosyresekvensen i prochymosin.

Molekylvekt 35 652 D. Etter FOLTMANN et al, 1977.

Prochymosin
 365 ÷ 42 = 323
 4077D 35652D

204 aminosyrer er like i pepsin og chymosin.

I moderne løpeproduksjon har en tatt i bruk metoder som gelfiltrering og ultrafiltrering for å konsentrere og rense enzymekstraktene. Ved slike metoder er det også mulig å få en mer fullstendig utvinning av løpeenzymer. CLARKE (1972) beskriver således en metode der det er mulig å få en vesentlig bedre utnyttelse av enzymaktiviteten i ekstraksjonsløsningen.

Det er også foreslått å ta ut magesaft fra levende spekalver med fistel. I følge CISNEROS et al (1972) kunne en i løpet av 6 måneder ta ut en chymosinmengde tilsvarende 70 tørrede kalvemager.

Det ferdige produkt bør inneholde konserveringsmidler som borsyre, natriumbenzoat eller natriumklorid i tilstrekkelig mengder til å hindre vekst av mikroorganismer.

Egnetheten til de forskjellige konserveringsmidler for løpe er undersøkt av ZALAZAR & REINHEIMER, 1980. Disse fant at natriumbenzoat (2 g/100 ml) med tilsetning av noe etanol var det beste konserveringsmidlet.

Løpeekstraktet omsettes vanligvis på plastkanner som er godt lukket. Ekstraktet må oppbevares på et mørkt og kjølig sted. Det må ikke utsettes for lys eller lufttilgang. Oppbevart på denne måte vil løpeekstraktet bare tape ca. 1% i styrke pr. måned. Sterk syre eller base ødelegger enzymet hurtig. Løpe og ostefarve må derfor ikke blandes sammen ved ystemelkens løpelegging da ostefarveløsningen er alkalisk.

Krav til løpepreparat

Et godt løpeekstrakt skal ha en pH på ca. 6,0. Preparatet skal være helt klart og ha en frisk lukt. Holdbarheten må være god, og det skal være fritt for mikroorganismer og fremmede stoffer. Sammensetningen og styrken på preparatet skal være oppgitt.

CLARKE, N. H., 1972. N.Z.J. Dairy Sci. and Technol. 7, 142.

CISNEROS et al, 1972. Le Lait 52, 517.

ZALAZAR & REINHEIMER, 1980. Le Lait 60, 591.

Den vanligste formen for osteløpe er de velkjente flytende preparater med løpestyrke ca. 1: 15 000. Det finnes imidlertid både mere primitive løpepreparater (løpepasta, oppmalt Abomasum, brukes bl.a. i Alpene og Middelhavslandene) og produkter med større renhetsgrad enn den vanlige osteløpen.

Ved fraksjonert felling med natriumklorid kan ekstraktet renses for pepsin og det fremstilles bl.a. et løpepulver med aktivitet ca. 10 x det flytende preparatet. Løpetabletter fremstilles også, særlig til bruk i tropiske land. BERRIDGE, 1943, fremstilte krystallinsk chymosin med en løpestyrke på 1: 5 000 000.

Det er også gjort forsøk på å fremstille løpe av lam og killingmager. ANIFANTAKIS & GREEN, 1980, undersøkte slik løpe og fant at denne inneholdt mindre pepsin enn kalveløpe. Killingløpen inneholdt imidlertid en proteinase som manglet i lam- og kalveløpe. Ingen lipolytisk aktivitet på melkefett kunne påvises. DEIANA et al, 1980, har fremstilt italiensk saumelksost (Fiore Sardo) med løpe fra lam og killingmager. Disse preparatene hadde imidlertid også en viss lipolytisk aktivitet. Forsøksosten ble like god eller bedre enn kontrollosten.

I Norge finnes det ingen produksjon av kalveløpe eller andre løpepreparater. Slakteriene tar heller ikke vare på magene til dette formål.

BERRIDGE, 1943. Nature 151, 473.

ANIFANTAKIS & GREEN, 1980. J. Dairy Res., 47, 221.

DEIANA et al, 1980. Latte, 5, 191.

3.1.3.2.2. Pepsin.

Pepsin hører, som Chymosin, til de sure proteinaser med pH-optimum for proteolytisk aktivitet ved relativt lave pH-verdier (1,5-5,0), de fleste i pH-området 2,0-4,0. pH-optimum varierer med hvilket protein enzymet virker på. Pepsin har pH-optimum ved pH 2,0 for de fleste proteiner, mens optimum for løpe på hel-kasein, ligger nærmere pH 5.8, men bare 3,5 overfor serumalbumin, (SHINDO & ARIMA 1979). Pepsinmolekylet består av en peptidkjede på 321 aminosyrerester med molvekt 35 500 D. Propepsin eller pepsinogen har en molvekt på 42 000 D. Aktivering av zymogenet til aktive enzym blir katalysert av pepsinet ved lave pH-verdier. Dette resulterer i fraspalting av en rekke mindre peptider fra den N-terminale enden av polypeptidkjeden. Dersom pH ikke er lav nok vil hydrolysen bli ufullstendig og det blir igjen et relativt stort peptid som virker inaktiverende på enzymet. Dette spaltes imidlertid fra ved pH under 2.0.

Pepsinogenet har isoelektrisk punkt ved pH 3,7, mens dette for det aktive enzym er i underkant av 1,0. Pepsinet er temmelig stabilt ved lave pH-verdier, men inaktiveres raskt opp mot nøytralpunktet. Pepsinogenet derimot er meget stabilt i pH-området 7-9.

For storfe-løpe fant VELARDE, 1981,

maksimum lagringsstabilitet i pH-området 5,3-5,6, der det ikke var noen merkbar endring i aktiviteten i løpet av 10 uker selv ved en så høy temperatur som 25°C.

Som foran nevnt er pepsinet svært likt Chymosinet i oppbygning og virkning på substrat. Det er imidlertid vist at overfor en oksydert B-kjede av insulin som substrat er det tre bindinger som pepsinet hydrolyserer upåvirket av løpe, mens løpe hydrolyserer én binding som pepsin ikke tar. Figur 3.1.3.3.7.

SHINDO & ARIMA, 1979 Jap. J. Dairy Food Sci., 28, A177.

VELARDE, 1981. Reviste de Instituto de Laticinios Candido Tostes, 36, 17.

Skorten på kalveløpe i de senere år har gjort at interessen for ysting med pepsinpreparater har vært stigende. Selv om enkelte undersøkelser tyder på at det kan være små forskjeller i utbytte (THOMASOW, 1980), og koagelstruktur (EINO et al, 1979) mellom løpe- og pepsinystinger for enkelte ostetyper, synes ikke disse forskjeller å være så store at de har noen praktiske konsekvenser. Heller ikke en noe sterkere nedbryting av Alfa-kaseinet under ostens modning (BERG & VRIES, 1976) har gitt bitter smak eller dårligere kvalitet på osten. De fleste undersøkelser konkluderer med at det ikke er noen signifikant forskjell i kvaliteten på ost ystet med løpe og pepsin.

De fleste forsøkene er utført med pepsin fra storfe eller gris, men også hønsepepsin har vært anvendt: GUTFELD & ROSENFELD, 1973, opplyser at 50% av osteproduksjonen i Israel skjer med hønsepepsin. GORDIN et al, 1978, ystet så forskjellige oster som Emmentaler, Kashkaval, Edamer, Danbo, samt forskjellige ferskoster, med hønsepepsin, med godt resultat. STANLEY et al, 1980, har ystet Cheddarost med kommersielt fremstilt hønsepepsin, men fant at forsøksosten ikke kunne måle seg med tilsvarende ost ystet med kalveløpe eller blandinger av løpe og svinepepsin, hverken i utbytte eller kvalitetsegenskaper. Proteolysen ble for omfattende, konsistensen for løs og osten fikk en bitter smak.

Ifølge ERNSTRØM, 1961, har svinepepsinet liten løpningsaktivitet ved en pH på 6,8, men hadde større aktivitet enn løpe ved pH 6,6. FOX, 1969 fant også at svinepepsinet hadde dårlig koagulasjonseffekt ved pH over 6,68, mens bovint pepsin ikke skilte

Svinepepsin
Best ved pH 6,6

THOMASOW, 1980. Milchwissenschaft, 35, 212.

EINO et al, 1979. Can. Inst. Food Sci., Techn. J., 12, 149.

BERG & VRIES, 1976. NIZO-RAPPORTEN, R. 103.

GUTFELD & ROSENFELS, 1973.

GORDIN et al, 1978. XX IDF-kongressrapport D 476.

STANLEY et al, 1980. ^{Canadian} Inst. Food Sci. Technol. J., 13, 97.

FOX, 1969. J. Dairy Res., 36, 427

ERNSTRØM, 1961. Milk Prod. J. 52,8.

seg fra chymosin i denne henseende. Svinepepsinet var også mer temperaturømfintlig enn storfepepsin og løpe og ble inaktivert ved 44°C. Det er en vanlig oppfatning at svinepepsinet stort sett blir inaktivert under de fleste ystingsprosesser og at dette er årsaken til en noe langsommere modning av slik ost. Dette synes ikke å være tilfelle med bovint pepsin.

3.1.3.3. Mikrobielle løpeenzymer.

I de bestrebelsene som er gjort i å finne substitutter til kalveløpe er det også nyttet en rekke mikroorganismer med ekstracellulære proteinaser som utgangspunkt, både bakterier, mugg og gjær.

Av bakterielle proteinaser som har vært utvunnet er det særlig forskjellige arter av Bacillus som har vært kilden. Preparater har vært laget av B. subtilis, - polymyxa og - mesentericus. Disse består av flere forskjellige proteinaser, både alkaliske, nøytrale og sure. Rensingen av slike ekstrakter byr derfor på problemer og ystingsforsøkene som har vært utført har vist motstridende resultater. Stort sett har man fått en for utstrakt proteolyse og en for løs konsistens på osten. For enkelte halvbløte oster synes det imidlertid å ha vært oppnådd brukbare resultater, særlig for preparatet "Mesenterin" fra B. mesentericus, men fett og N- tap til mysa har vært større enn for ystinger med kalveløpe. Mesenterin har et pH- optimum på 9,0. Ved pH 6,6 er den proteolytiske aktiviteten på preparatet 4 x større enn for chymosin, porcine- og bovin pepsin. Brukt til ysting må pH reguleres ned til 5,8 - 6,2 med melkesyre for ikke å få altfor sterk proteolyse. (MESROB & STOEVA, 1978). Saltlakeost og KASHKAVAL er fremstilt med "Mesenterin" av DIMITROV et al, 1980, med godt resultat.

MESROB & STOEVA, 1978. Milchwissenschaft, 33, 483.

DIMITROV et al, 1980. Nahrung, 24, 869.

HUSEK & TEPLY, 1978, har anvendt "Mikrozym" fra B.subtilis sammen med svinepepsin og fant at løpningseffekten fra de to enzymer var additiv, men at proteolysen var svakere enn tilsvarende blanding med chymosin. Blandingen var ikke lagringsstabil.

KONDRATENKO et al, 1977, har tatt ut en patent på fremstillingsprosess for ost basert på løpningsenzymer fra B.subtilis og B. mesentericus, som hevdes å gi ost av bra kvalitet.

Preparater fremstilt fra muggsopp synes imidlertid å ha større likhet med tradisjonelle løpe enn de bakterielle preparater. Særlig har de proteolytiske enzymene fra Mucor pusillus og miehei vist positive resultater og kommet i anvendelse ved kommersiell ysting. Disse er da også sure proteinaser på linje med chymosin og pepsin.

DENISOW et al, 1982, renfremstilte en proteinase fra preparatet "Renninopusillin P 10 x" med pH- optimum mellom 2,5 og 3,0 med molvekt 42 000 D. Enzymet var relativt termostabilt. (50% reduksjon i aktivitet etter 10 min ved 55°C).

Ifølge ETOH et al, 1979, er det stor likhet mellom mieheiløpe og pusillus- løpe. Molvektene ble bestemt til henholdsvis 38 000 og 42 000 D med isoelektriske punkter henholdsvis pH 3,9 og 4,1.

Det er rapportert en rekke positive resultater fra ystinger med Mucor miehei-preparater. (Rennilase, Hannilase, Fromase, Miki og Marzym).

DENISOW et al, 1982. Prikladnaja Biochemija i Mikrobiologija, 18, 48.

ETOH et al, 1979. Agr. Biol. Chem., 43, 209.

HUSEK & TEPLY, 1978. IDF XX. Int. Dairy Congress D 474.

KONDRATENKO et al, 1977. U S-patent nr. 4 048 339.

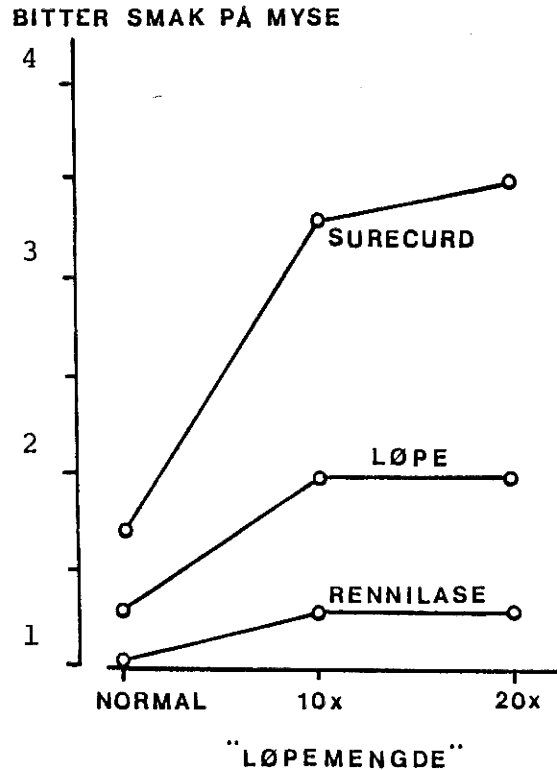
Blant andre er det av AARNES, 1971, ystet Jarlsbergost og Norsk Saint Paulin med Rennilase, ved Meieriinstituttet. Forsøksosten var av like god kvalitet som kontrollosten ystet med løpe og det var ingen praktiske problemer forbundet med ystingen. Myseavgangen under ystingen var bedre enn for løpe. Forsøksosten ble litt løsere i konsistens og modnet noe **raskere** enn kontrollosten.

Pusillus-løpen (Novry, Novadel, Meito, Emporase) har en mindre spesifikk proteolyse enn mieheiløpen og er mer Ca_2Cl -ømfintlig enn denne. Proteolysen synes å gå for langt ved lang lagring av osten og anbefales derfor bare til oster som har kort modningstid. Mucorenzymene synes å hydrolysere Betakaseinet sterkere enn løpe. Spesielt enzymet fra Mucor pusillus.

Et annet preparat som har fått en viss kommersiell anvendelse er preparatene Surecurd og Suparen fremstilt fra muggsoppen Endothia parasitica. Det dreier seg også her om en sur proteinase som imidlertid er noe mer termolabil enn Mucorløpene. Oppvarming til 60°C i 5 min er nok til å inaktivere enzymet.

Parasitica-preparatene synes også å hydrolysere betakaseinet sterkere enn løpe under ostens modning. Brukt sammen med enkelte syrekulturer gir det bitter smak på osten og det anbefales ikke brukt alene til faste løpeoster.

Ysting av Norsk Saint Paulin med Surecurd ga typisk bitter ost. En prøve på løpepreparatets evne til å gi bitter smak på myse ble utført og sammenliknet med Rennilase og kalveløpe, vist i figur 3.1.3.3.1. (AARNES, 1971).



Figur 3.1.3.3.1. Dette er en hurtigprøve for testing av løpepreparaters evne til å gi bitter smak i myse. Pasteurisert melk syrnes med 1% syre og løpelegges med 10-20 ganger den normale løpemengden som nyttes til ystingen. Etter skjæring inkuberes mysa i 8 timer ved 30°C før smaksbedømmelse. Økende bitterhet med stigende skala.

GUDBJØRG GJERDE, 1971, undersøkte løpningsaktiviteten for endel aktuelle løpepreparater ved forskjellige temperaturer, vist i figur 3.1.3.3.2. Disse resultatene stemmer godt med de som er funnet i en undersøkelse av HAMDY & EDELSTEN, 1971, vist i figur 3.1.3.3.3.

GJERDE, 1970. Hovedoppgave NLH.

HAMDY & EDELSTEN, 1970. Milchwissenschaft, 25, 450.

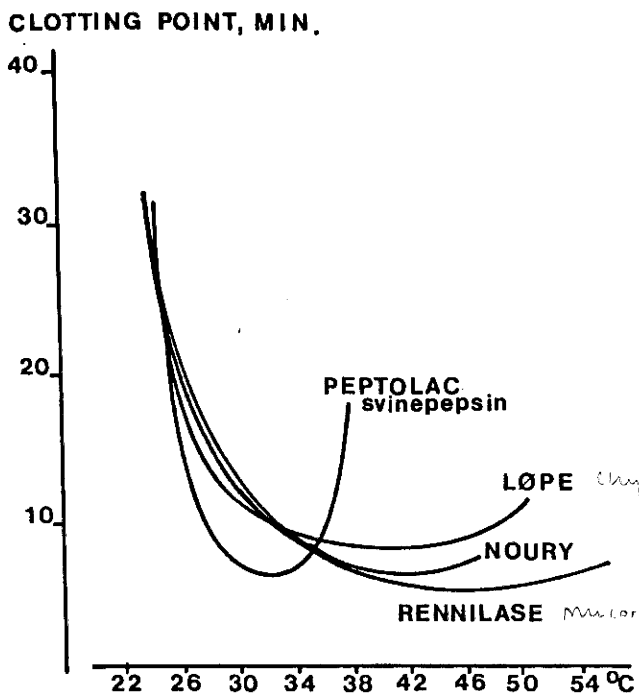


Fig. 3.1.3.3.2.

Relativ koagulasjonstid for endel preparater ved forskjellige temperaturer. Etter GJERDE, 1970.

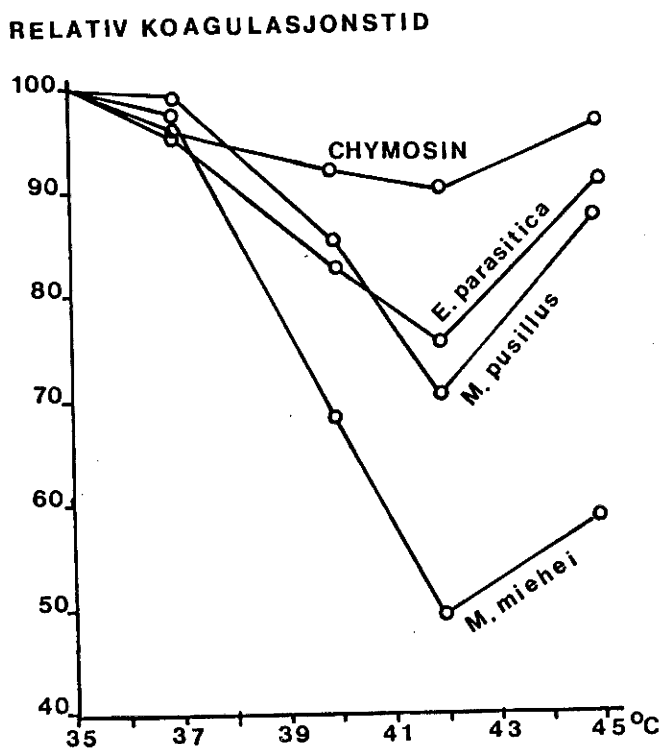


Fig. 3.1.3.3.3.

Relative koagulasjonstider etter HAMDY & EDELSTEN, 1971.

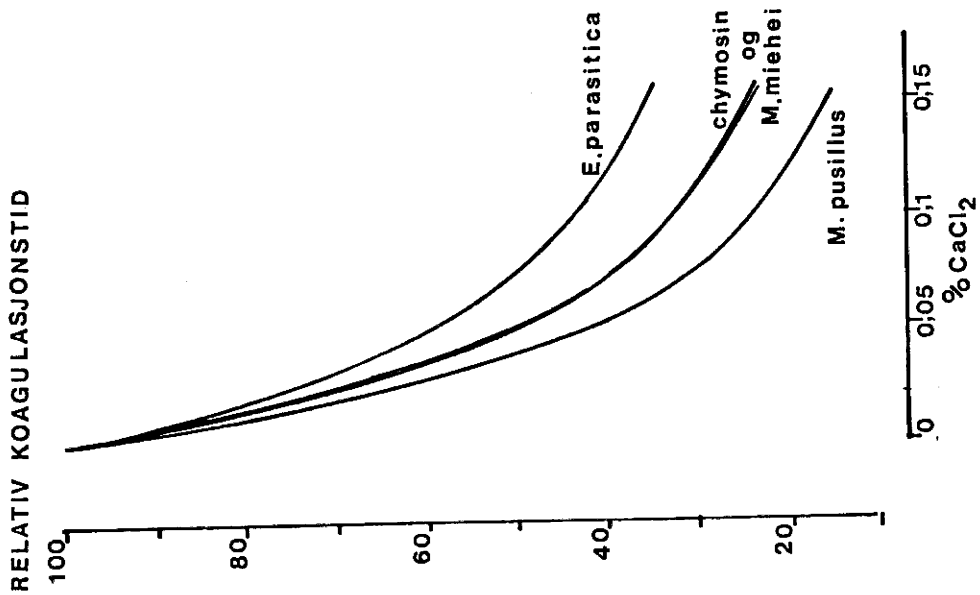
I en sammenlikning av preparatene Rennilase, Fromase og Marzym fant REPS, 1979, en noe høyere optimumstemperatur for disse mieheiløpene, hele 58-62°C, mens optimum for løpe lå mellom 40 og 44°C, for Meito 42 og 45°C og for Suparen 42°C hvilket stemmer bra med resultatene funnet av GJERDE, HAMDY & EDELSTEN. De sistnevnte har også undersøkt effekten av NaCl og CaCl₂ på Fungus-preparatene og kalveløpe, vist i figur 3.1.3.3.4. og 3.1.3.3.5. En ser at saltene har noe forskjellig virkning på løpningsevnen til de forskjellige preparater. REPS, 1979 fant tilsvarende verdier i sine forsøk.

Med 0,02% CaCl₂ - tilsetning var løpningsaktiviteten den samme som for chymosin, mens tilsetninger over dette ga en relativt sterkere løpningsaktivitet for miehei-løpene.

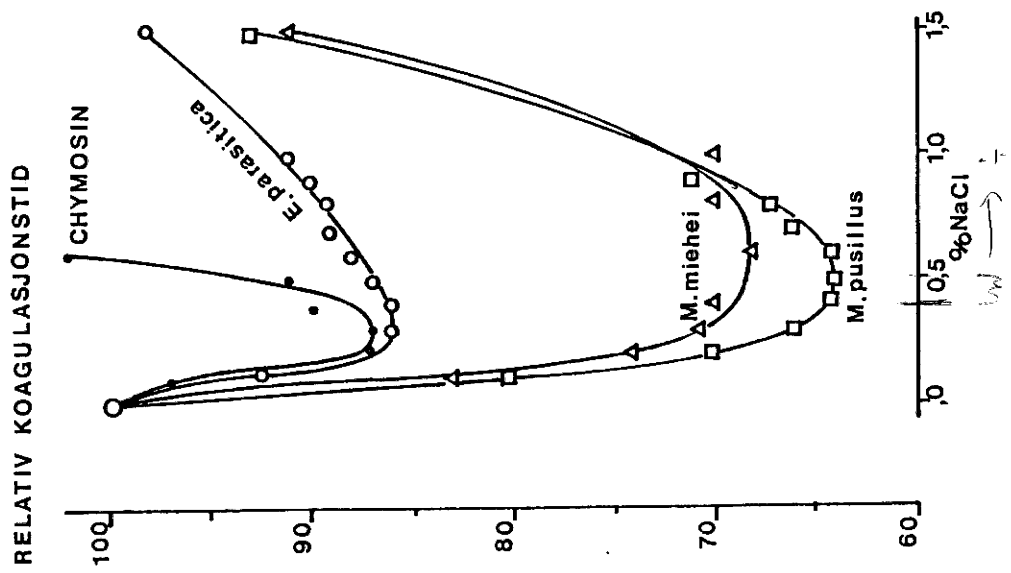
Termoresistensen til endel løpepreparater er undersøkt av STANLEY et al, 1980, vist i figur 3.1.3.3.6. Som man ser er svinepepsin meget termolabilt, mens kyllingpepsin og mieheiløpe er relativt lite påvirket ved den aktuelle temperatur, 50°C, som vel må karakteriseres som en høy ettervarmingstemperatur ved ysting. Kalveløpe og denne halvblandet med svinepepsin er også vesentlig mer påvirket av temperaturen enn mieheiløpe og kyllingpepsin.

REPS et al, 1979. Le Lait, 59, 1.

STANLEY et al, 1980. Can.Inst. Food Sci.Techn. J. 12,149.



Figur 3.1.3.3.5.



Figur 3.1.3.3.4.

Effekter av NaCl og CaCl₂ på koagulasjonstiden for forskjellige preparater. Etter HAMDY & EDELSTEN' 1971.

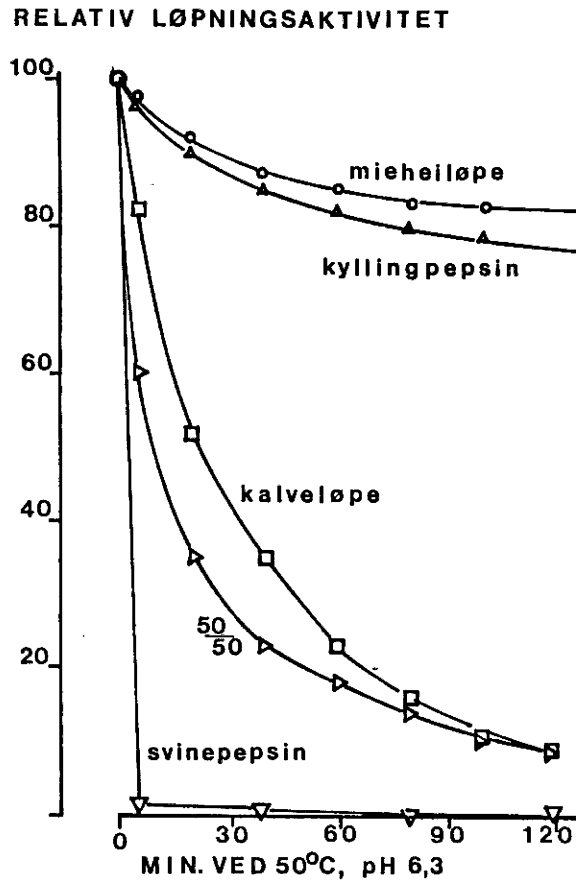


Fig. 3.1.3.3.6. Varmetoleranse for fem løpepreparater.

Etter STANLEY et al, 1980.

RAMEI & WEBER, 1981, fant at ysting med Marzym II, et mer termolabilt preparat av miehei-løpe, ga en St. Paulinost av like god kvalitet som ysting med kalveløpe, og at ingen teknologiske tillempninger var nødvendig.

Ekstrakter fra muggen Rhizopus oligosporus har også melkekoagulerende egenskaper, men med relativt lav proteolytisk aktivitet. KRISHNASWAMY et al, 1976, ystet Cheddarost med et slikt enzym med godt resultat, mens RAO et al, 1979, fikk en noe lav bedømmelse av de organoleptiske egenskaper på sin Cheddarost.

JEDRYCHOWSKI et al, 1977, ystet Edamerost, polsk St. Paulin og Camembertost med proteinase fra muggsoppen Byssochlamys fulva med tilfredsstillende resultat. Det var ingen teknologiske problemer og utbyttet ble som for løpeost. Nedbyggingen av kaseinet og innholdet av flyktige syrer var imidlertid høyere enn for kontrollosten, særlig for Camembert-osten.

Forsøk med fremstilling av løpepreparater fra Aspergillus-artene niger, ochraceus og versicolor er også utført, men synes ikke å ha kommet til praktisk anvendelse. (FODA, 1980.)

Melkekoagulerende enzymer har også vært fremstilt fra muggsoppene Thamnidium elegans (USSR-patent 691487, 1979) og Absidia ramosa (SANNABHADTI & SRINIVASAN, 1978), og fra gjærtyperne Cryptococcus albidus (MARTINI et al, 1979,) og Monascus kaoli-
any, (TSAI et al, 1978.)

RAMEI & WEBER, 1981. Le Lait, 61, 458.

KRISHNASWAMY et al, 1976. J. Food Sci. Technol., 13, 187.

JEDRYCHOWSKI et al, 1976. Acta Alimentaria Polonica, 3, 29.

FODA, 1980. Microbiologia Espaniola 32, 103.

RAO et al, 1979, Nahrung, 23, 621.

SANNABHADTI & SRINIVASAN, 1978. Ind. J. Dairy Sci., 31, 58.

MARTINI et al, 1979. Dairy Sci. Abstr., 41, 7945.

TSAI et al, 1978. Int. J. Pept. Prot. Res., 12, 293.

3.1.3.4. Blandede proteinaser og urene preparater.

Da de forskjellige proteinaser gjerne har forskjellige optimale pH-områder for størst stabilitet og lagrings-evne kan dette være vanskelig å oppnå i blandingspreparater. Sammensetningen må også gjøres slik at forholdet mellom koagulasjonsaktivitet (MC) og proteolytisk aktivitet (P) holdes på et nivå som ikke avviker for mye fra kalveløpe. Vanligvis er det sett som en fordel at forholdet $\frac{MC}{P}$ er størst mulig. I et blandingspreparat kan for eksempel svinepepsin nyttes til å redusere P med et ellers proteolyseaktivt enzym.

Ved blanding av forskjellige proteinaser kan det også oppstå synergistiske og hemmende effekter. Urenheter i preparatet kan således være årsak til hemningseffekt for koagulasjon eller gi uheldige omsetninger i osten under modning. Preparater som har en viss lipaseaktivitet (Løpepasta) er bevisst brukt på enkelte italienske oster, men vil for de fleste tradisjonelle faste løpeoster virke kvalitetsreducerende. Små urenheter i preparatene kan imidlertid også ha positive effekter. Således fant BERRIDGE, 1955, at ysting med krystallinsk chymosin ga en Ceddarost med lite utviklet smak, mens tilsetning av de urenheter som var fjernet under krystalliseringen av enzymet ga en ost av like god kvalitet som kontrollosten.

3.1.3.5. Restaktivitet i myse.

Myse inneholder størstedelen av det tilsatte løpeenzymet. Dersom myse skal nyttes til produkter som krever en ikke varmebehandlet myse, for å unngå en denaturering av serumproteinene, er det viktig å være oppmerksom på restløpe-aktiviteten i mysa. Varmetoleransen øker for følgende løpepreparater i stigende orden: Svinepepsin, bovinpepsin, chymosin, pusillusløpe, og miehei-løpe. Varmetoleransen er imidlertid pH-avhengig og øker med synkende pH for samtlige preparater i området 7,0-5,2, i følge DUERSCH & ERNSTRØM, 1974.

N.I.Z.O. Paper 1647.

BERRIDGE, 1955. N.I.R.D. Paper 1647.

DUERSCH & ERNSTRØM, 1974, J. Dairy Sci., 57, 590.

HYSLOP et al, 1979, bestemte "døds"-tids-temperaturen i pH-området 4,5 - 6,5 for miehei-løpe, pusillus-løpe, chymosin og 50/50 pepsin-chymosinblanding. Disse fant også at varmetoleransen for samtlige preparater økte med synkende pH. De midlere koeffisienter i det undersøkte område var henholdsvis: 4,22, 4,62, 5,40 og 5,23°C. For å oppnå 90% inaktivering av enzymene i løpet av 15 sek ved pH 6,0., måtte mieheiløpen varmes til 77°C, pusillusløpen til 71°C og chymosin samt fifty/fifty til 67°C. Ifølge DUERSCH & ERNSTRØM, kan en regne med 95% inaktivering for samtlige preparater ved lavpasteurisering (62,2°C i 30 min, pH ikke angitt).

Dersom varmebehandling ikke er mulig foreslår GREEN, 1976, å la myse gå gjennom en kollonne med immobilisert enzyminhibitor.

3.1.3.6. Immobilisering av løpeenzymer, gjenvinning.

En immobilisering av de enzymer som skal brukes til løpning av melken ville foruten å være besparende også redusere den proteolytiske effekt av løpen under ostens modning. (Figur 3.1.3.6.1.)

*Dr dikk
enskelig?*

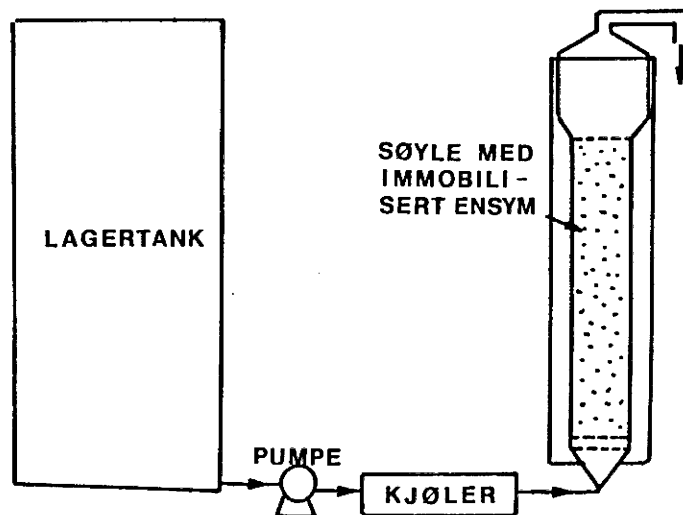


Fig.3.1.3.6.1. Prinsipp for behandling av melk med immobilisert løpepreparat.

HYSLOP et al, 1979. J. Dairy Sci., 62,1227.

GREEN, 1976. J. Dairy Res. 44, 159.

*Problem
1. Reinhold
2. reduksjon i aktivitet*

Muse: Så lag pH at ein unngår mikrobiologisk velst.

Endel forsøk på dette området har vært utført, men resultatene har hittil ikke vært altfor lovende.

1
2
CHERYAN, 1975, immobiliserte flere løpepreparater på porøst glass i en fluid bed reaktor. Behandlingstiden var 3 min ved 15°C. Akkumulering av protein til glasset og tilsvarende reduksjon i enzymaktivitet var et stort problem. Halveringstiden på enzymet var 4 timer.

Ut seg ildyt gjennom flere praktiske dager med prøvetid i stor målestokk med løpning

TAYLOR et al, 1978, undersøkte flere forskjellige bærere for pepsin og fant at en kovalent binding til glass eller Titan eller adsorbsjon til aluminiumhydroksyd var de mest hensiktsmessige materialene, men fant ingen brukbar praktisk løsning på proteinavleiringsproblemet. De samme problemer hadde ANGELO & SHAHANI, 1979, med chymosin immobilisert på "Sepharose 4B". SHINDO et al, 1980, brukte parafinvoks til immobilisering av chymosinet og forsøksosten (Gouda) var av like god kvalitet som kontrollosten. SACHSE & LANGHAMMER, 1981, undersøkte en rekke bindingsmaterialer og 8 forskjellige metoder for binding av chymosinet og fant at alkylamin/glass ga det mest stabile produkt, men fant ingen tilfredsstillende løsning på de foran nevnte praktiske problemer.

NADUDVARI-MARKUS, 1981, immobiliserte E. parasitica-enzym på 12 forskjellige materialer. DEAE-cellulose ga best aktivitet og holdbarhet. Da immobiliseringsteknikken gjør det mulig å nærmest skille mellom løpningeffekt på melk og generell proteolyse under ostens modning har interessen for andre proteinaser enn de tradisjonelt sure igjen blusset opp. Således har OMIYA et al, 1979, oppnådd gode resultater i eksperimenter

CHERYAN, 1975. Diss.Abst.Int., 35, 4932.

TAYLOR et al, 1978. D:S:A:, 40, 523.

ANGELO & SHAHANI, 1979. J. Dairy Sci., 62, 64.

SHINDO et al, 1980. Milchwissenschaft, 35, 527.

SACHSE & LANGHAMMER, 1981. Nahrung, 25, 281.

NADUDVARI-MARKUS, 1981. Nahrung, 25, 293.

OMIYA et al, 1979. J. Food Sci., 44, 1584.

med immobilisering av alkalisk proteinase fra B. subtilis. på Dowex MWA-1. Det ble fremstilt Cheddarost av god kvalitet av melk som ble behandlet i en slik kollonne. OMIYA, 1981, hevder å ha oppnådd en halveringstid på 30 dager (50°C, pH 7,0) på en slik immobilisert alkalisk proteinase uten problemer med proteinavleiring i kollonnen. Det koaglet som ble dannet hadde en fasthet på linje med vanlig løpekoagel dannet med chymosin. Det hevdes at prosessen skal kunne anvendes til kommersiell fremstilling av ost.

UF For å spare på løpebehovet har det også vært foreslått å gjenvinne løpeenzym fra ostemyse. CHOJNOWSKI et al, 1979, ultrafiltrerte myse til et 20 ganger konsentrat. En tilsetning på 10% av dette til ystemelken reduserte løpebehovet til det halve.

kan med eventuelt kisset nihitt

DZIUBA & CHOJNOWSKI, 1982, har anvist en metode til gjenvinning av 35 - 65% av restløpen i myse ved fraksjonert felling med alkohol slik at enzympresipitatet skilles fra serumproteinene. Presipitatet sentrifugeres fra og kan brukes på nytt, direkte, eller etter tørring.

MARETENS & NAUDS, 1976 har gitt en oversikt over de teknologiske muligheter for løpepreparater i IDF Ann. Bull. Doc. 91.

DE KONING et al, 1981, har gitt en oversikt over de forskjellige løpesubstitutters egenskaper og muligheter for sparing av kalveløpe.

OMIYA, 1981. Jap. J. Dairy Food Sci., 30, 11.

DZIUBA & CHOJNOWSKI, 1982. Milchwissenschaft, 37, 148.

MARETENS & NAUDS, 1976. IDF Ann. Bull. Doc. 91.

DE KONING et al, 1981. Zuivelzicht, 73, 469.

CHOJNOWSKI et al, 1979. Le Lait, 59, 449.

3.1.3.7. Koagulasjon uten bruk av løpeenzym.

Siden kaseinmicellene i melk er stabilisert ved de negative overskuddsladninger er det vist at destabilisering kan foregå ved hjelp av katjoniske elektrolytter. Dersom et fast sammenhengende gel skal oppnås på denne måten må molvekten av den aktuelle elektrolytt være av en viss størrelse. Røring under tilsetningen av elektrolytten er også helt essensielt.

Ved tilsetning av bovint metyl-serumalbumin ved 0°C fikk GREGORIO & SISTO, 1981, et koagel som var svært likt løpekoagellet. Gelet viste gode synereseegenskaper og ga klar myse med lavere fett og tørrstoffverdier enn myse fra løpekoagellet.

I tabell 3.1.3.7.1. er gjengitt de nødvendige mengder av noen katjoniske polyelektrolytter som skal til for å koagulere 100 ml rekonstituert skummet melk 11,1% (vekt/volum). Etter GREGORIO & SISTO, 1981.

<u>Katjonisk polyelektrolytt</u>	<u>Molvekt</u>	<u>Tilsatt</u>	
		<u>Gram</u>	<u>Mol x 10⁶</u>
Polyetylenimin	30-40000	0,5	14
Poly-L-lysinhydrobromid	50 000	0,6	12
Salmin	4 250	0,88	207
Cetyl-trimetyl-ammoniumbromid	71 000	0,46	6,5
Metylserumalbumin	78 000	1,1	14

Forfatterne peker på at estrifisert protein kan tenkes å være praktisk anvendelig som koagulasjonsmiddel i næringsmiddel-sammenheng, også til fremstilling av ost.

GREGORIO & SISTO, 1981. J.- Dairy Res., 48, 267.

3.1.3.8. Metoder for differensiering av løpepreparater.

På grunn av det mangfold av løpepreparater som etter hvert har kommet på markedet, har det også blitt behov for metoder for kontroll og identifikasjon av løpe og løpesubstitutter. Spørsmålet er bl.a. tatt opp av det internasjonale meieri-forbundet (IDF) og en rekke forskere har befattet seg med problemet. Kvantitative analyser på dette feltet er vanskelige, men visse karakteristiske egenskaper kan registreres. Dette kan også gi grunnlag for visse mengdemessige vurderinger.

De enkleste metodene en har er de såkalte agartestene som gir beskjed om spesifikk hydrolyse av kasein (Kaseinagar) og om preparatet er amylaseaktivt eller ikke (Stivelsesagar).

Kasein:

Ved å tilsette preparatet i utstansede hull på ferdigstøpt kaseinagar dannes det soner av hydrolysert protein som er karakteristisk for de respektive preparater. Denne metoden er imidlertid så grov at den bare kan brukes til identifikasjon av rene preparater.

Stivelsesagar

Tilsvarende teknikk kan anvendes på stivelsesagar for registrering av amylaseaktivitet. Denne egenskapen er spesiell for de mikrobielle preparatene med unntak av *E. parasitica*-løpe. I tilfelle av amylaseaktivitet får en en klar ufarget sone rundt hullet når gelen overhelles med jodløsning.

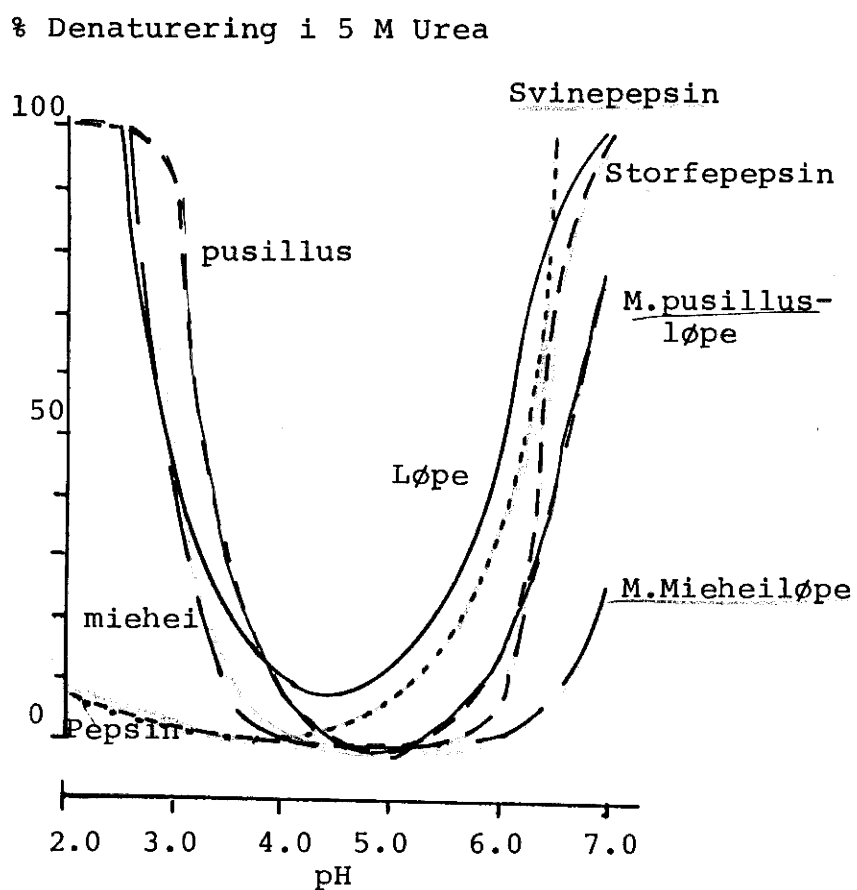
av amylase reaktant

Amylaseaktiviteten kan også bestemmes kvantitativt på spektrofotometer ved måling av redusert fargeintensitet i en standard jod/stivelsesløsning. Denne metoden skal kunne registrere ned til 5% innblanding av mikrobielt preparat i animalsk løpe.

pH

Stabiliteten av løpen ved forskjellige pH-verdier kan også nyttes til karakterisering av preparatets sammensetning. Ved pH 6,95 vil pepsin inaktiveres i løpet av 15 min og kan skilles fra de andre typene på denne måten. Ved pH 2,0 kan man skille mellom chymosin og *E. parasitica*-løpe. Sistnevnte inaktiveres vesentlig raskere ved denne pH-verdien.

Inaktivering av enzymene i 5 M urea ved forskjellige pH-verdier gir også grunnlag for karakterisering av preparatet. (Figur 3.1.3.8.1.)



Figur 3.1.3.8.1. pH-selektiv denaturering i urea.
Etter MULVIHILL & FOX', 1976.

Enzymene kan også identifiseres ved hjelp av elektroforese på grunnlag av forskjellig vandringshastighet, enten på papir eller forskjellige typer av gel. De forskjellige fargebåndene som dannes sammenliknes så med prøver av standardpreparater.

Enda mer avansert kan identifiseringen gjøres ved å bytte teknikken med den såkalte isoelektriske forkusering. Dette er en elektroforeseteknikk der en gel (oftest tynnsjikt) innsatt med en amfolytt gir en pH-gradient fra 3,5 ved anoden til 9,5 ved katoden. Flere prøver kan avsettes ved siden av hverandre til sammenlikning. P.g.a. tapt overskuddsladning vil vandringsen stoppe opp i det isoelektriske punkt for de respektive komponenter.

For analyse av preparater med ukjent opprinnelse kan de her omtalte metodene anvendes systematisk som vist i figur 3.1.3.8.2.

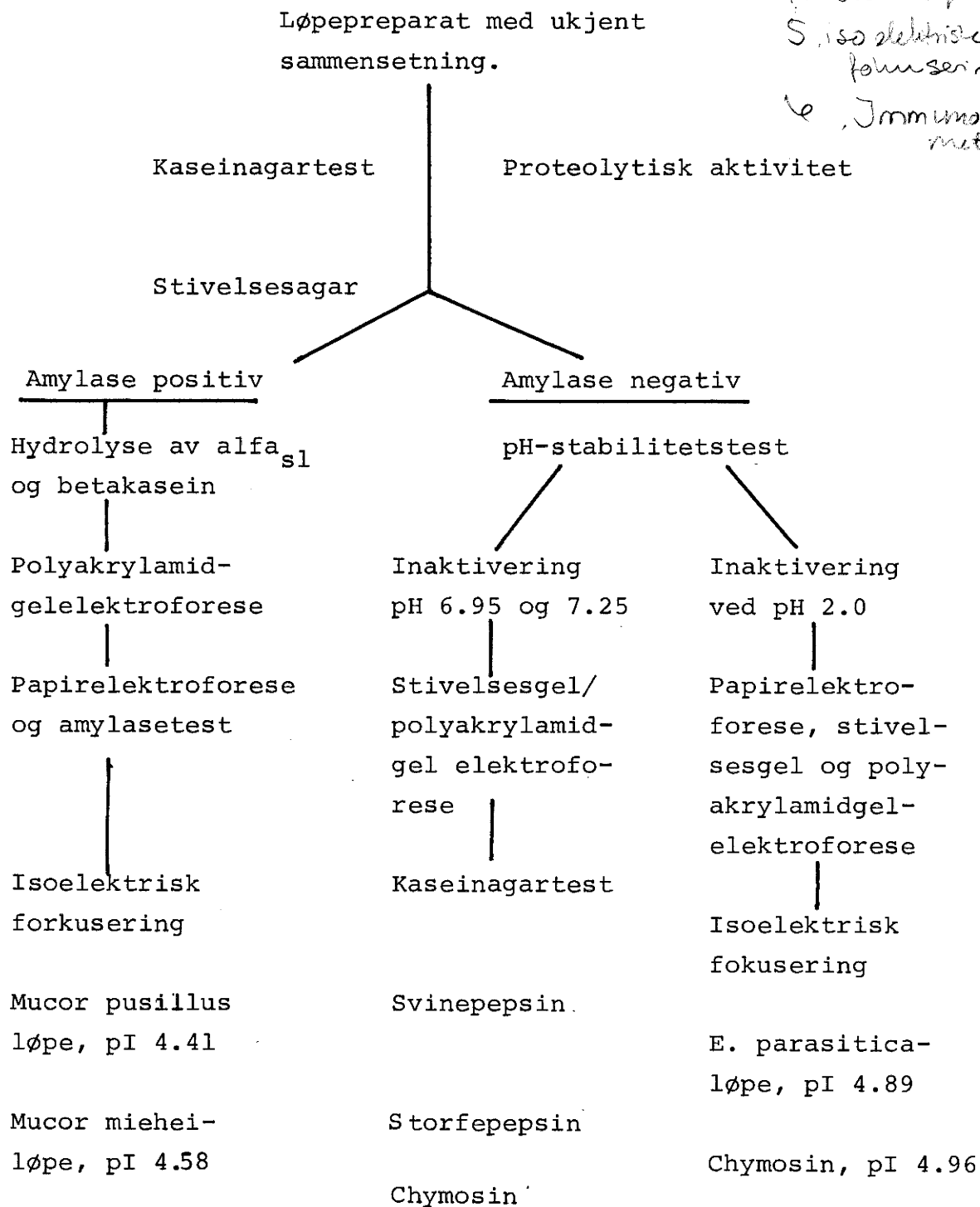
Endelig skal også nevnes at immunologiske metoder med fordel kan nyttes til identifisering av enzymene. Problemet er gjerne å skaffe egnede sera. Ved lagning av slike er det svært viktig at det injiseres helt rene preparater i kaninene for å få dannet såkalte monospesifikke antikropper. Immunologisk teknik kan til og med anvendes på ost for å finne ut hvilket løpepreparat som har vært anvendt. Teknikken kan også kombineres med elektroforese- og diffusjonsteknikker for kvantitative bestemmelser (MARTINY & HARBOE COLLIN et al, 1982), og mengder ned til 1% kan registreres.

COLLIN et al, 1982. J. Dairy Res., 49, 221.

IDF, BULL, 1980. Doc. 126.

MARTINY & HARBOE, 1978. 20. Int.Meierikongress, Brief. Com., 445.

1. Kaseinagartest (nydros)
2. Stivelsesagar (amylase)
3. Stabilitet ved pH for
4. elektroforese
5. isoelektrisk fokusering
6. Immunologiske met



Figur 3.1.3.8.2.

Foreslått fremgangsmåte ved analyse av ukjent løpepreparat. IDF Doc.126.

3.2. Koagulasjon og geldannelse.

Det er åpenbart, bl.a. vist ved elektronmikroskopiske undersøkelser, at ved den enzymatiske felling av kaseinet i melken, ved en normal pH, dannes det også en gitterstruktur, d.v.s. et ekte gel og ikke bare en utfnokking p.g.a. ^{at} partiklenes hydraksjon og ladning tapes. Fig. 3.2.1.

CaPO₄
CaSO₄

Forutsetningen for at et normalt koagel skal kunne dannes er at systemet inneholder nok tilgjengelig kalsiumfosfat. Kalsiumfosfatene spiller en avgjørende rolle for gelasjonen og gelets egenskaper. Mens kolloidalt kalsiumfosfat-citrat virker stabiliserende på den opprinnelige micellestrukturen, vil dette etter den enzymatiske omdannelse av κ -kaseinet, på en eller annen måte, bidra til å knytte primærartiklene sammen i mikroaggregater, som igjen stadig knytter seg sammen til større enheter, slik at man til slutt får ett eneste sammenhengende nettverk eller gel av parakasein-kalsium-fosfatkomplekset.

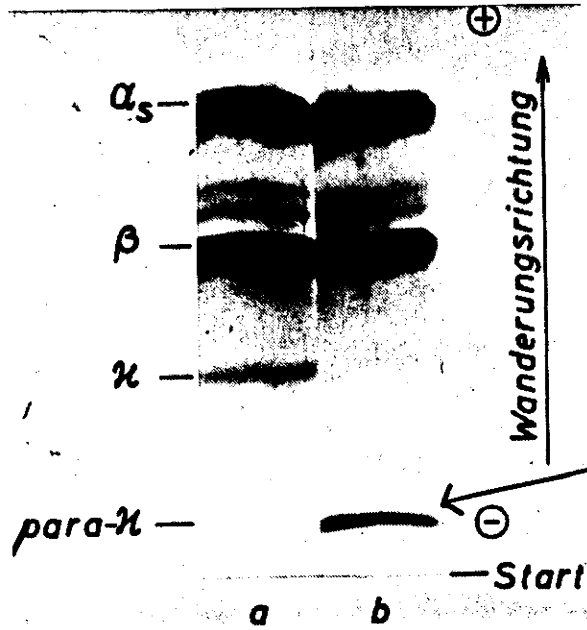
Populært kan det kanskje sies slik: Kalsiumfosfatsitrat-komplekset virker "innover" i kasein-micellene, d.v.s. hjelper til å stabilisere den opprinnelige micellestrukturen, men virker "ut-over" etter den enzymatiske omdannelse av κ -kaseinet.

Etter den enzymatiske påvirkning på kaseinet i melken, ble det forholdsvis tidlig konstatert en øket ledningsevne i løsningen. Dette mente en måtte bero på en blottlegging av funksjonelle kjemiske grupper i kaseinet, slike som amino-karboksyler og fosforyl-grupper.

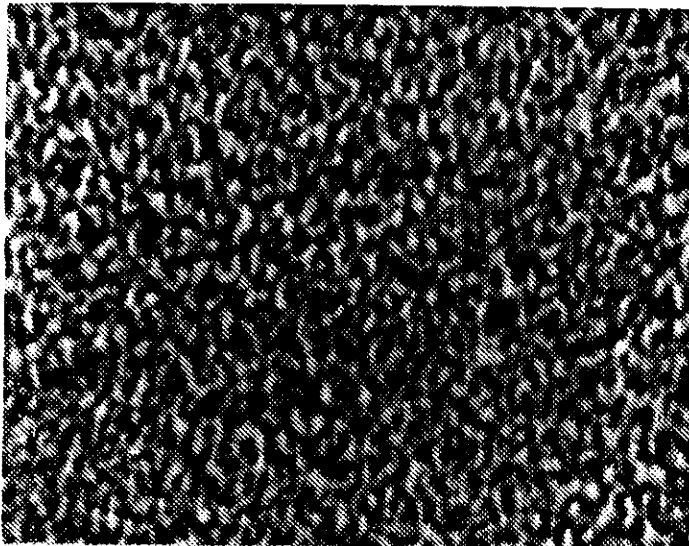
I følge KNOOP & PETERS (1976) skjer aggregeringen av micellene ved elektrostatisk tiltrekning mellom de positive ladninger på arginin-, lysin- og histidinrestene i para κ -kas. i den ene micelle og de negativt ladede sidekjeder i α_s og β -kas. i den andre micellen. Den nettstrukturen som dannes, krever mindre energi enn en "indre" felling av micellen. Felling av partikulært kasein skjer dersom nettverksdannelsen hindres ved røring.

KIRCHMEIER, 1975. Deutsche Molkerei-Zeitung 13, 386.

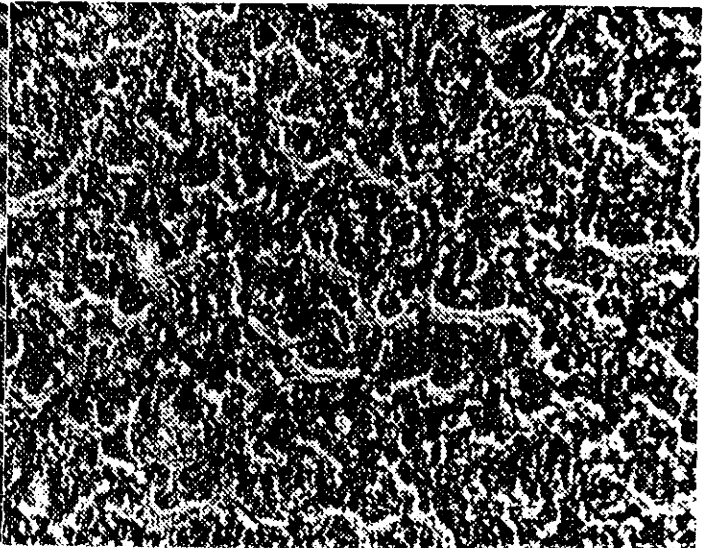
KNOOP & PETERS, 1976. Milchwissenschaft 31, 338.



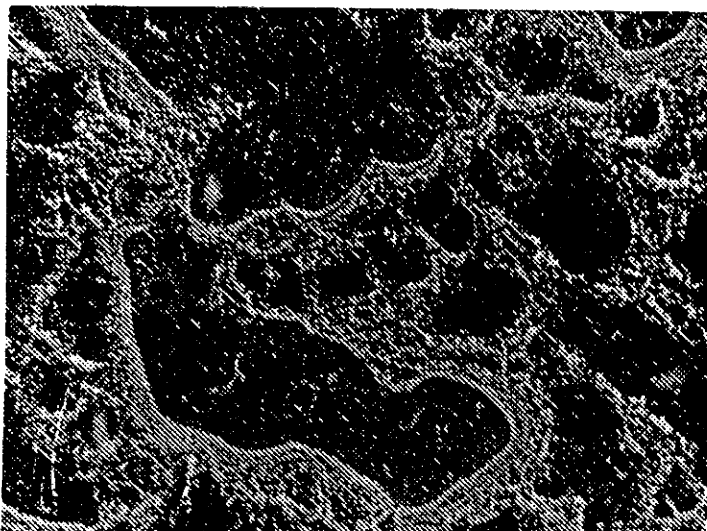
b) Hydrolysert kappakasein mister det meste av den negative overskuddsladningen og blir hengende etter ved elektroforese.



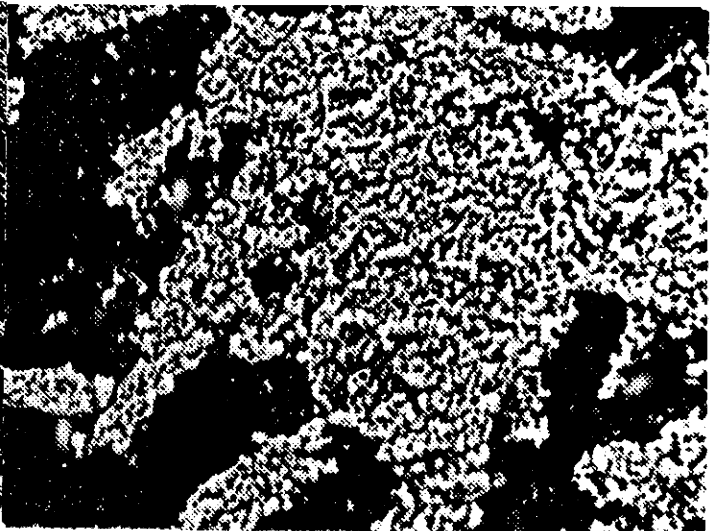
1. Kaseinet homogent i melk



2. Polymerisering, fasevending



3. Gel dannet



4. Kontraksjon av gel

Fig. 3.2.1. Elektronfotos av melk under løpning (Kirchmeier -75)

For å oppnå et normalt gel, er tilstedeværelsen av kalsiumjoner eller tilsvarende toverdige joner nødvendig.

I rene kalsiumkaseinat-oppløsninger, av samme konsentrasjon som i melk, dannes det ikke et gel, men bare fnokkaktige utfellinger når løsningen tilsettes løpe. Settes sekundært kalsiumfosfat til en slik løsning, dannes det et normalt koagel.

Det er da nærliggende å anta at kaseinmolekylene, under koagulasjonen blir knyttet sammen med bindinger over kalsiumjonene og fosforsyrerestene med de frigjorte amino- og karboksyl-grupper. Denne polymerisering gir kaseinet en uendelig stor molekylvekt og det dannes et nettverk eller gel som stadig øker i utstrekning.

Til å begynne med er koaglet løst og lite sammenhengende. Fastheten øker etter hvert, samtidig som ostevevet begynner å trekke seg sammen og avgi myse (synerese). Oppdelingen av koaglet eller skjæringen kan begynne når dette har fått en erfaringsmessig, riktig fasthet (se fig. 4.7.1.4.). Den tiden som går med fra parakaseinets utfnokking til gelet har fått den riktige fasthet for skjæring betegnes som gelasjonsperioden eller ventetiden.

Det normale ostevev er et stort aggregat av sammenkjedede parakasein-partikler, og hulrommene i nettverket er fylt med melkens øvrige bestanddeler. Disse hulrom står i forbindelse med hverandre ved små kapillærer. Kapillærene kan være svært finporete til relativt grove, og mysa vil derfor være mer eller mindre fast bundet i kapillærene. Dette har bl.a. betydning for saltopptak og svinn under lakesaltingen. Koaglet har evne til både å oppta og avgi vann, d.v.s. svelle eller kontrahere.

Fastheten på gelet påvirkes av mange faktorer, så som kaseinets hydratasjon, ² miljøets pH, ³ temperaturen, ⁴ elektrolyttkonsentrasjonen og ⁵ nærvær av andre hydrofile kolloider. Ostevevets egenskaper og struktur bestemmes stort sett av kaseinets kvalitetsegenskaper i det øyeblikk det omdannes til parakasein.

3.2.1. Løpningstemperaturen.

Løpningstemperaturen har stor innflytelse på koaglets egenskaper og kontraksjon. Hele koagulasjonsprosessen (enzymreaksjon + koagulasjon) har et optimum ved 40-42°C. Ved høyere eller lavere temperaturer blir koagulasjonstidene lengre og ved 8-10°C og 60-65°C uteblir koagulasjonen helt. Koaglet som dannes ved optimal temperatur er fast. Ved lavere temperaturer blir det bløtere og ved høyere temperaturer blir det seigere.

Under 15°C vil reaksjonshastigheten for koagulasjonsprosessen gå langsommere enn enzymreaksjonen. Ved så lav temperatur som 8°C vil i praksis ingen koagulasjon inntre eller, med andre ord, ta uendelig lang tid. Dette, (og kalsiumfritt subtrat), har vært nyttet til å studere koagulasjonsfasen i prosessen adskilt fra enzymreaksjonen, da denne kan foregå helt ned mot 0°C.

BERRIDGE, (1942), bestemte temperatur-koeffisienten for koagulasjonsfasen, ved at like chymosinmelkeblandinger ble holdt ved 0°C til enzymfasen var avsluttet og deretter hurtig oppvarmet til forskjellige koagulasjonstemperaturer. Koagulasjonstidene ble så sammenlignet. Det ble funnet Q_{10} på ca. 14 (1,4 pr. 1°C). Forskjellige melkeprøver ga noe forskjellige koeffisienter, helt opp til en Q_{10} på 16. Samme metode ble også nyttet av STIGEN (1968) i hans hovedoppgave der temperaturkoeffisienten ble bestemt både for enzymfasen og koagulasjonsfasen. For temperaturområdet 20-30°C var $Q_{10} = 2$ for enzymfasen og $Q_{10} = 14$ for koagulasjonsfasen (som BERRIDGE). I følge PYNE (1966) er temperaturkoeffisienten for fellingsfasen avhengig av melkens innhold av kolloidalt fosfat.

En temperaturkoeffisient av størrelsesorden 14 er typisk for denaturering av proteinstoffer. For hemoglobin er f.eks. temperaturkoeffisienten bestemt til 1,3 pr. °C. BERRIDGE mente derfor at koagulasjonen var et resultat av kaseinatets denaturering.

BERRIDGE, 1942. Nature 151, 473

STIGEN, 1968. Hovedoppgave NLH.

PYNE, 1966. Gjesteforelesninger ved Meieriinst., NLH.

De forsøk som er gjort med å studere koagulasjonsfasen isolert, har vesentlig teoretisk interesse. I praksis vil de to faser av prosessen gå over i hverandre. Det kan likevel være av interesse å se på den størrelsesorden de "rene" koagulasjonstider er av, når løpetilsetning og temperatur ligger i det området man har i ystekaret.

I skummetmelk der enzymfasen var avsluttet fant STIGEN følgende koagulasjonstider:

	(Middel av 5 prøver)
ved 25 ^o C	715 sek.
" 30 "	194 "
" 32 "	114 "
" 35 "	51 "

Når enzymfasen foregikk i kalsiumfritt medium fant HOLTER, 1932, etter kalsiumkloridtilsetning, utfnokkingstider på fra 195 til 230 sek.

En ser at ved de temperaturer og løpemengder som nyttes i praksis, som gir koagulasjonstider på rundt 20 til 30 min., vil selve fellingsfasen utgjøre en relativt liten del av den totale løpningstid.

Relasjonsperioden
Ventetiden, d.v.s. den tiden det tar fra "Clotting point" til gelet har fått en passende fasthet for skjæring, vil variere omvendt proporsjonalt med temperaturen.

Såfremt melken har normale løpningsegenskaper, (nok Ca^{++} til at felling kan skje), vil den totale koagulasjonstid under ellers like forhold i første rekke gi et bilde av enzymaktiviteten, selv om forholdet er mer komplisert enn som så.

KATO et al 1980, undersøkte sammenløpingen av rent κ -kasein både ved bestemmelse av NPN i 3% TCA og med turbiditetsmålinger. Mesteparten av NPN ble frigjort i løpet av 5 min., mens aggregeringen av kaseinet først skjøt fart etter 15 min.. Dersom løsningen ble tilsatt α_s og β -kasein tok aggregeringen lengre tid.

HOLTER, 1932. Biochem.Zeit. 255,160.

KATO et al, 1980. J.Dairy Sci. 63, 25.

GREEN, 1972. J.Dairy Res., 39,55.

Ifølge GREEN, 1972, vil ikke aggregeringen starte før ca 60% av κ-kaseinet er hydrolysert.

teoretisk. Ingen praktisk relevans.

Kinetikken for koagulasjon av en vanlig kolloid sol er først satt opp av von SMOLUCHOWSKI (OVERBEEK, 1952). Hastigheten i reaksjonen er avhengig av og øker med kvadratet av antallet partikler, den absolutte temperatur og reduseres med viskositeten:

$$\frac{-dn}{dt} = K_s \cdot n^2 \quad \text{der } K_s = \frac{4 k T}{3 \eta}$$

3 - faktor som virker mot koagulasjon

der n er antall partikler, T = absolutt temperatur, k = såkalte Boltzmanns konstant og η = viskositeten.

I visse kolloide løsninger, som f.eks. kaseinløsninger, er det energibarrierer som senker koagulasjonshastigheten eller virker stabiliserende på solen. Relasjonen -dn/dt må da modifiseres med en faktor W som beskriver det relative antall partikkelkollisjoner som ikke resulterer i sammenklebing, d.v.s. koagulasjon :

$$\frac{-dn}{dt} = \frac{K_s \cdot n^2}{W} \quad \text{der } W = 2a \int_{2a}^{\infty} \exp(V_t/kT) dr/r^2$$

der a = partikkelradius og V_t = potensiell energi av et par partikler med avstand r.

Ved enzymatisk koagulasjon av melk har man imidlertid det kompliserende forhold at antallet av reaktive partikler er avhengig av hvor raskt enzymet virker på κ-kaseinet. Begynnelsekonsentrasjonene er 0, d.v.s. at n = 0 når t = 0. Med andre ord vil koagulasjonshastigheten være avhengig av enzymkinetikken (V). PAYENS, 1979, har derfor inkludert denne faktoren i likningen ovenfor:

$$\frac{d(\sum_i P_i)}{dt} = V - K_s (\sum_i P_i)^2 \quad \text{der } P_i \text{ er partikler av parakasein som}$$

ikke er aggregert.

OVERBEEK, 1952. Celloid Sci. I. s. 278, Elsv. Pub. Co. Inc.

PAYENS, 1979. J. Dairy Res. 46, 291.

DARLING et al., ¹⁹⁸¹ J. Dairy Res., 48, 189.

DARLING et al 1981, har på grunnlag av alle kjente parametre beregnet koagulasjonstider matematisk og funnet god overensstemmelse mellom disse og forsøksdata basert på variasjoner i temperatur og løpekonsentrasjon.

3.2.2. Substratfaktorer.

Så heterogent som kaseinet er oppbygget, må man vente at relativt store variasjoner vil forekomme både i sammensetning, struktur og egenskaper forøvrig. Primærstrukturen vil være genetisk bestemt, sannsynligvis også forholdet mellom de forskjellige kaseintyper. Dette vil kunne variere fra dyr til dyr og kanskje mest utpreget mellom forskjellige melkeraser. Disse forhold må ventes å ha konsekvenser for micellens oppbygging, størrelse og hydratasjon.

Melk fra enkelte dyr kan vise store variasjoner når det gjelder kaseinets partikkelstørrelse. HOSSAIN, 1976 undersøkte 102 melkeprøver med forskjellig κ -kaseininnhold, med hensyn på clotting point og gelfasthet (målt på Laktodynamograph, se Formagraph). Den lineære regressjon mellom løpningstiden og κ -kaseininnholdet var meget sterk. Løpningstiden økte med 2.53 min. for hver 0,1% økning i κ -kaseininnholdet. Gelfastheten økte med økende innhold av kasein, særlig med α_s - og β -kasein.

LOSI & CAPELLA, 1973, sammenliknet melkeprøver med henholdsvis genetisk variant A og B av κ -kasein og fant at den midlere løpningstiden for B-varianten var kortere og gelfastheten større enn for A-varianten, henholdsvis 836 og 1048 sekunder.

Ser man bort fra ulikheter i selve kaseinsammensetningen vil melkesaltene generelt ha stor betydning for micellenes stabilitet. Forholdet mellom kalsium og magnesium-salter på den ene siden og kalium/natrium-salter på den andre siden, vil kunne variere med laktasjon og helsetilstand hos kua. Forhøyet innhold av kalium og natrium kan gi melk med dårlig løpningsevne da

LOSI & CAPELLA, 1973. D.S.A. 36, (12) 1974.

HOSSAIN, 1976. Kieler Milchwirtsch.Forschungsberichte, 28(1)43.

alkaliekaseinatene blir findisperse og hydrofile. Gelet blir også bløtt og har liten kontraksjonsevne, d.v.s. dårlig myseavgang. *NB!* Et høyt innhold av kalsium vil derimot gi en lett ystbar melk med et grovdisperst kaseinsystem.

Innholdet av citrat har også stor betydning idet det binder frie Ca-joner i serum.

Disse faktorene vil imidlertid i stor grad også være avhengig av den behandlingen som melken har fått, slik som lagring (temperaturhistorie), mekanisk behandling (pumping, skumming, homogenisering) surhetsgrad o.s.v.

3.2.2.1. Kaseinkonsentrasjon og viskositet.

Det er innlysende at konsentrasjonen av kasein, d.v.s. micelle-avstanden har betydning for koagulasjonsfasen. For å oppnå et gel må de geldannende partikler få en eller annen kontakt med hverandre, slik at de ordner seg i et bestemt mønster (gitter). Den energi, eller rettere det arbeid som går med til å overvinne de Brownske bevegelser og orientere partiklene i dette mønster, blir større når avstanden mellom partiklene er stor, og når viskositeten er høy i løsningen. Økende viskositet virker derfor stabiliserende på løsningen.

*avhengig av avstand } mindre energi
avhengig av viskositet } for å danne gel*

KIRCHMEIER; 1972, fant følgende sammenheng mellom disse faktorene:

$$t(\text{koagulasjonstiden i sek}) = \frac{\eta (V_1 + V_2)}{k}$$

der η = viskositeten i vannfasen,

V_1 = disponibelt vannvolum per kaseinpartikkel,

V_2 = midlere partikkelvolum ($0.2 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3$),

k = materialkonstant avhengig av kaseinets fysisk/kjemiske tilstand ($1.48 \cdot 10^{-18} \text{ erg}$).

KIRCHMEIER, 1972. Zeitschrift Lebensmitteluntersuchung und Forschung, 149, 139.

3.2.2.2. Melkens fettinnhold.

En kvalitetsfaktor som har stor betydning for gelets egenskaper er melkens fettinnhold og hvor findisperst dette er fordelt i substratet. Fettkulene i melken blir under koagulasjonen innsluttet i koaglet. I melken forekommer fettkulene dels enkeltvis, dels samlet i aggregater. De fettkulehoper som er større enn porene i koaglet, blir holdt fast på det stedet de befant seg da koagulasjonen inntrådte. Da porene i ostekoaglet blir mindre når koaglet drar seg sammen, vil også de mindre fettkuler etter hvert bli holdt fast. Fettkulene vil da hemme myseavgivelsen idet de delvis stopper porene i koaglet. Foreligger fettkulene i form av fettkulehoper, slik som tilfellet er i melk som er blitt oppbevart en tid ved lav temperatur, får koaglet en ujevn struktur.

Disse fettkulehopene vil bli svakhetspunkter i koaglet som ved delingen lett brytes i disse punktene. Dette gir seg utslag i et større fettap i mysa.

Under ellers like vilkår har løpekoaglet fra magermelk større kontraksjonsevne og større evne til å avgi myse enn helmelkkoaglet. Helmelkkoaglet blir derimot seigere enn skummetmelkkoaglet. Årsaken til dette må ligge hos fettkulene. Fettkulene i koaglet utgjør et mekanisk hinder for massens sammen-trekning og hindrer, rent mekanisk, mysens utpressing.

Slemmer en opp kiselgur i skummetmelk og løpelegger melken, får en et koagel som er like seigt og elastisk som helmelkkoaglet. Kiselgurpartiklene virker her åpenbart på samme måte som fettkulene i koaglet.

3.2.2.3. Melkesaltene.

De fleste saltene i melka er løselige, bare kalsiumfosfat og citrat er tilstrekkelig tungtløselig til at noe av dette foreligger i uløst eller kolloidal form, vesentlig i nær tilknytning til kaseinet.

Ved dialysering (av stor melkemengde mot liten vannmengde) eller ved ultrafiltrering kan en undersøke fordelingen av løselige salter i serum. Konsentrasjonen av de viktigste joner i serum er vist i tabell 3.2.2.3.1..

Tabell 3.2.2.3.1.

Konsentrasjon og fordeling av de viktigste jonene i serum.
(Millimol)

		Katjoner			
		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
Anjoner	Frie:	2.0	0.8	20.9	36.3
Cit ⁻⁻⁻	0.3	7.0	2.0		
H ₂ PO ₄ ⁻	7.5	0.1			
HPO ₄ ⁻⁻	2.7	0.6	0.3		
Cl ⁻	30.9	0.3	0.1	0.4	0.7

Etter HOLT et al 1981.

95-96% av melkens kalium- og natrium-innhold foreligger i løst tilstand i serumet. Det samme gjør 65% av magnesiuminnholdet, 31% av kalsiuminnholdet, 53% av det uorganiske fosfatet og 89% av citratene. I løsningen foreligger ca. 35% av Ca og Mg som frie joner, ca. 55% i form av citratjoner og ca. 10% i form av fosfatjoner, men størstedelen av fosfatjonene foreligger som H₂(PO₄)⁻ (54%) og H(PO₄)⁻⁻ (36%). Dissosiasjonen for både kalsium og magnesiumfosfater/citrater er praktisk talt like stor.

En antar at den tertiære formen $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ med en Ca/P relasjon på 1.5 utgjør hovedmengden, mens det ved oppvarming dannes mer av den stabilere hydroksyformen, $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ med Ca/P relasjon 1.67. Den tertiære formen synes imidlertid å bli stabilisert av kaseinet og av magnesium og citratjonene.

Ved melkens normale pH er melkeproteinet jonisert og danner primært salter med kalsium- og magnesium -katjoner i forholdet 15:1. Den lille mengde av K og Na(4-5%) som ikke foreligger i serumet, er sannsynligvis også bundet til kaseinet som salter, i konkurranse med de øvrige katjoner. Selv om katjonbinding er det vanlige, synes anjonbinding også å forekomme, f.eks. demonstrert ved den stabiliserende effekt som citratjoner har.

Jonisert kalsium og kolloidalt fosfat er av avgjørende betydning for utkoaguleringsfasen.

Kaseinmiceller som er assosiert med kolloidalt kalsiumfosfat/citrat i en løsning av samme jonestyrke som i melk, er større enn i et system uten kolloidalt fosfat. Dette påvirker altså kaseinets dispersitetsgrad, noe som igjen har betydning for melkens ystbarhet, koaglets karakter og evne til å avgi myse. Grovdisperst kasein gir et koagel som raskt blir fast, kontraherer lett og avgir også myse lett.

Ifølge HORNE, 1981, har citratinnholdet kun innflytelse på koagulasjonsfasen ved sin evne til å binde Ca-joner. Fosfatjonene derimot, deltar aktivt i prosessen. HORNE fant at en midlere tilsetning av fosfat stabiliserte en findispers utfelling, mens mengder over og under dette punkt ga mer grovdisperse utfellinger. Øker Ca-jonekonsentrasjonen i serum øker også kaseinpartiklene i størrelse og gir en mer grovdipers utfelling.

PUHAN et al 1977, laget 13 forskjellige løsninger av 3% kasein med 18.8 mM Ca^{++} og varierende innhold Na^+ , K^+ , PO_3^{---} og citrat.

HORNE, 1981. J.Dairy Res., 49, 107.

ALAIS et al, 1970. Milchwissenschaft, 25, 514.

PUHAN et al, 1977. Dairy Sci Abstr. 39, 3942 og 3943

Med kalsium alene eller sammen med de andre saltene, ble det dannet globulære miceller. De største micellene fikk en ved lavt fosfatinnhold (57.6 nm), mens omvendt, et høyt fosfatinnhold/citratinnhold, samt natrium/kaliuminnhold ga små miceller. Tilsvarende forsøk med magnesiumjoner i stedet for kalsium ga kaseinmiceller med så uregelmessig form at størrelsesmålinger var umulig.

Ved fortykning med vann, faller kaseinpartiklene fra hverandre og løsningen blir mer findispersert. Vannfortyning og henstand gir tilslutt kaseinet den samme dispersitetsgrad som Na-kaseinat framstilt ved oppløsning av kasein i NaOH. Ved vannfortyningen senkes Ca^{++} -konsentrasjonen, kaseinet avgir bundet kalsium og blir mere findisperst.

Konsentrering
Den omvendte prosess foregår når melken dampes inn. Saltkonsentrasjonen og dermed også Ca^{++} -konsentrasjonen i melkeserumet vil da øke og kaseinpartiklene vil øke i størrelse.

ALAIS et al 1970 fant at innholdet av kolloidalt kalsium økte mer enn innholdet av løselig kalsium ved inndamping av melken. (Tabell 3.2.2.3.2.). Videre ble pH senket med ca 0,1 enhet ved konsentrering 2,5:1.

Tabell 3.2.2.3.2. Innholdet av totalt og løselig kalsium og magnesium i normal og inndampet skummet melk. Etter ALAIS et al 1970.

	Naturell melk		Konsentrert melk	
	A	B	A	B
Tørrstoff %	8,7	7,9	21,9	22,8
pH	6,73	6,78	6,63	6,65
Total Ca g/l	0,84	0,92	2,25	2,45
% løselig Ca	35,8	42,3	26,7	31,4
Total Mg g/l	0,082	0,098	0,215	0,28
% løselig Mg	81,3	63,8	72,0	64,3

4. TEKNOLOGISKE FAKTORER

Alle faktorer som påvirker elektrolyttbalansen i systemet og kaseinets hydratasjon vil få betydning for koagulasjonen, ventetid og gelets fasthet, kontraksjon og synerese.
gelasjonsperiode

4.1. Melkens temperaturhistorie.

Både kjølelagring og varmebehandling av melken viser typiske effekter.

En praktisk konsekvens av dypkjøling er en noe lengere koagulasjonstid, mest utpreget for lagret pasteurisert melk. Her finner en rapportert verdier som kan variere fra de meget moderate til mer ekstreme verdier, oppnådd under eksperimentelle forhold.

*dette gir en ildje
resmising av gjæring.*

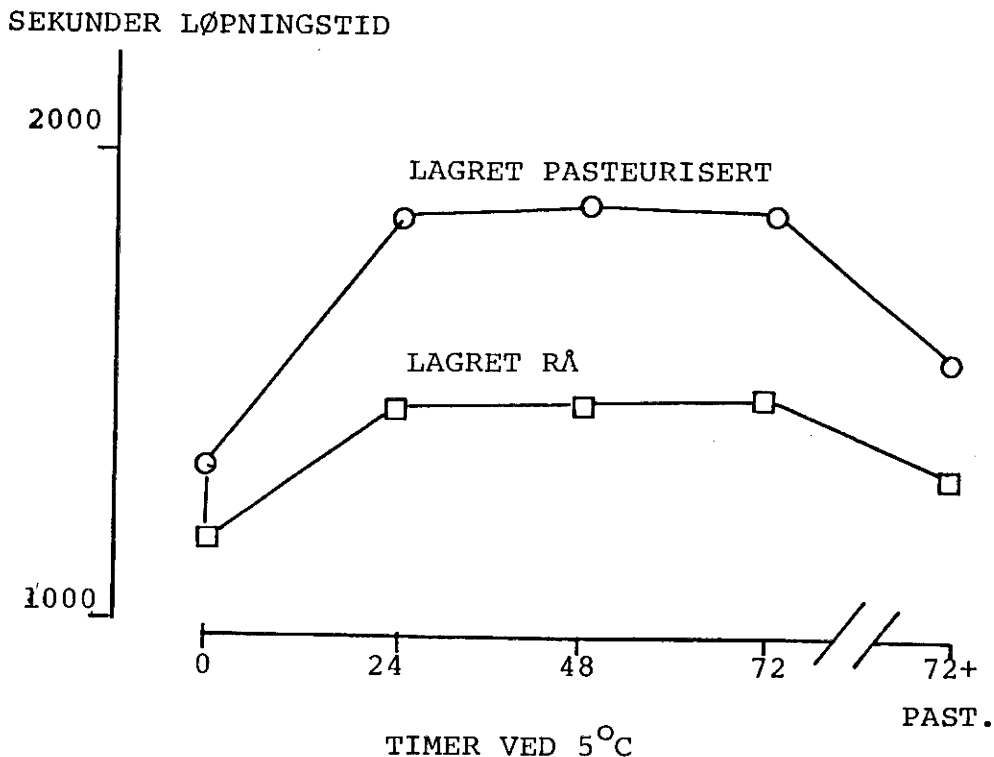
En varmebehandling tilsvarende vanlig pasteurisering virker forskjellig på fersk og kjølelagret melk. (Jevnfør fig.4.1.1.). På fersk melk vil en kunne registrere en klar forlenget koagulasjonstid fra ca 65°C og oppover med sterkere effekt jo høyere temperaturen og innvirkningstiden har vært. Ved høye pasteuriseringstemperaturer får en dessuten et løsere koagel med større vannbindingsevne.

På kjølelagret melk, som i de fleste tilfeller vil være det aktuelle råstoffet for fremstilling av ost, vil en passende varmebehandling kunne forbedre melkens løpningsegenskaper, men aldri til samme nivå som i samme melk, fersk og upasteurisert.

Se forøvrig målinger utført av NILSEN, 1981, vist i tabell 4.7.1.1.

NILSEN; 1981. Hovedoppgave ved NLH.

best løpningsegenskaper i fersk upasteurisert mjølk.



Figur 4.1.1. Effekten av kjølelagring og pasteurisering.
(Etter Quist, 1979).

4.1.1. Kjølelagring.

I moderne melkeproduksjon inngår kjølelagring av melken som et nødvendig ledd ved alle produksjonsanvendelser. Selv om en tidlig var klar over at kjølelagring av rå melk ga melk med dårligere løpningsegenskaper, har problemet blitt enda mere markert ved overgangen til tankmelkoppsamling og kjølelagring av eventuelt termisert eller pasteurisert melk på meieriene. Kjølelagringen er årsak til flere effekter som kan medvirke til dårligere løpningsevne.

1. For det første påvirkes saltbalansen i systemet. Kolloidalt kalsiumfosfat går delvis i løsning, noe som kan påvises ved en stigning i innholdet av Ca og P i de løselige forbindelsene i serumet. I følge PYNE, 1966, kan lagring av melken ved 3°C øke Ca-innholdet i serum med 7%. Det skjer altså en vandring av

kalsium og fosfat ut fra kaseinmicellene, noe som kan forklares ved øket løselighet av kalsiumfosfat og minsket dissosiasjon av fosforsyre; pH i systemet øker.

WEICHEN & KNOOP, 1978, undersøkte fordelingen av kalsium på serum og miceller etter ultrasentrifugering av melk som var lagret 24 timer ved henholdsvis 20 og 4°C. Til registreringen av fordelingen ble nyttet en isotopteknikk der en anvendte Ca⁴⁵-isotopen.

Følgende verdier ble funnet:

Melk lagret ved:	20 ⁰	4 ⁰	4 ⁰ +past.
Serum	40.6	49.4	37.1
Kasein	59.4	50.6	62.0

3.1 av de 8.8% som går ut av micellene ved 4°C var koplet til kaseinmiceller i serumet.

Noe av det kalsium som frigjøres synes også å stamme fra fosfat-gruppene på kaseinmonomerene da forholdet mellom Ca og P i løsningen er større enn relasjonene mellom Ca og P i den kolloidale fasen. Det har vært hevdet at dette fører til en økning i micellens negative overskuddsladning, hvilket skulle virke stabiliserende på systemet, men dette synes ikke å være sikkert bevist. Det er også mulig at micellen kan kompenseres for mer-tapet av Ca⁺⁺-joner med opptak av protoner.

Løpetregheten som oppstår kan best forklares med endringene i det kolloidale kalsium-fosfatsystemet, som på tross av en viss reversibilitet ved oppvarming neppe kan rekonstitueres 100% innen praktisk melkebehandling.

En annen effekt av kjølelagringen er lekkasjen av β-kasein ut fra micellen når temperaturen senkes.

Dette kan delvis skyldes løsningen av Ca-kasein-bindinger og oppløsning av det kolloidale fosfatet, men den egentlige årsak

til lekkasjen synes å være svekkelsen av de hydrofobe krefter når temperaturen senkes.

I følge flere undersøkelser skjer kaseinlekkasjen relativt raskt (i løpet av noen timer). QUIST og NIKI fant likevekt etter 24 timer. (Tabell 4.1.2.1.)

Lagring utover 24 timer har derfor mindre innflytelse på de fysiske-kjemiske endringer som skjer ved lav temperatur. Når det gjelder den kaseinlekkasjen som skjer, er gjerne mengden av løst kasein i serum bestemt etter frasentrifugering av micellært kasein. Enkelte forskere har også nyttet en felling av kaseinet med syre. Metodene her vil selvsagt ha betydning for de aktuelle mengder av løst kasein som en finner i serum. De tildels store tall som har vært funnet, behøver derfor ikke bety at dette proteinet tapes til mysa under vanlig ysting. Tvert imot tyder flere forsøk på at ved løpefelling vil også det vesentlige av ikke micellært kasein gjenfinnes i ostegelet.

Ikke bare β -kasein går i løsning, men dette kaseinet synes å være dominerende.

Hvilken betydning dette har for løpningsevnen er ikke nærmere klarlagt.

En sekundær effekt av kaseinlekkasjen har trolig større praktisk betydning idet det utlekkete kaseinet ikke lengre beskyttes mot proteolyse, på samme måte som micellært kasein. Serumskaseinet spaltes bl.a. lett av melkens native peptidase (plasmin) til γ -kasein og proteosepeptoner. I den grad dette skjer, vil proteosepeptonet representere et utbyttmessig tap. Proteosepepton omfatter den delen av β -kaseinets monomer som er rik på fosfatgrupper og kan derfor meget vel ha betydning for oppbyggingen av gelet, på grunn av tapte strukturelementer. Dessuten vil bakterielle peptidaser kunne være årsak til dannelsen av bitre peptider som kan sette usmak på produktene.

SCHAAR; 1982 har vist at tørrstoffrik melk er mindre influert av kjølelagring enn melk med lavere tørrstoffinnhold. Citratinnholdet i melken synes også å ha betydning for løseligheten av kolloidalt kalsiumfosfat.

SHAAR, 1982. Meieriteknikk, 36, 47.

4.1.2. Varmebehandling.

Den varmebehandling som er aktuell for all norsk ystemelk er * pasteuriseringen, en prosess som først og fremst er mikrobio- ^{pos} logisk begrunnet, men som også gir kjemisk/fysiske effekter på melken. ^{neg/pos}

Men bare en heving av temperaturen, til vanlig løpningstemperatur, med utgangspunkt i kjølelagret melk, vil også være en betydelig varmebehandling, spesielt når en tar tidsfaktoren i betraktning. I praksis vil imidlertid løpningstemperaturen oppnås ved en nedkjøling fra pasteuriseringstemperaturen.

Endringer i kaseinstruktur og saltbalanse, som skyldes kjølelagring, kan i vesentlig grad rekonstitueres ved varmebehandling.

Det er imidlertid noe uenighet om hvor sterk denne varmebehandlingen bør være. REIMERDERS et.al. har gått så langt som til å anbefale 60-65°C i 20-30 min. som den beste, mens andre forskere har oppnådd en stor grad av gjenbunnet kasein og saltbalanse ved kortere innvirkningstider. Langtidspasteurisering vil være en metode som neppe lar seg gjennomføre i praksis og som heller ikke synes å være nødvendig.

HADLAND har redegjort for et hovedoppgavearbeid ved Meieriinstituttet der en har sett på fordelingen av micellært og løst kasein i melk fra enkeltkyr under kjøling og oppvarming. Effekten av kjølingen varierte med melketyper. Generelt ble det vist at både lekkasje av kasein fra micellen ved kjøling og reversering av prosessen ved varming skjedde raskt. Varming ut over 10 min. ga liten effekt.

Det ble funnet over 60% reduksjon i serumprotein bare ved å varmebehandle melken til 35°C.

AOKI et.al., 1974, undersøkte innholdet av løselig kasein i melk som var rensset for serumproteiner og kjølt til 5°C. Både varmebehandlet (135°C i 15 sek) og ikke varmebehandlet melk ble

HADLAND, 1979. Meieriteknikk 33(2) 12

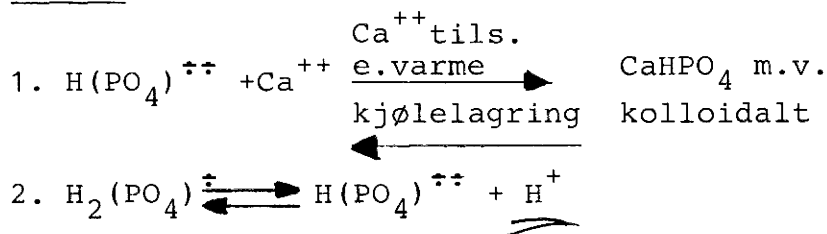
AOKI et.al., 1974. Milchwissenschaft 29, 589.

REIMERDERS et al. 1977. Milchwissenschaft, 32, 154.

analysert for fritt kasein etter 1, 2, 4, 8 og 20 timer. For ikke varmebehandlet melk fant en likevekt i systemet (maksimum fritt kasein) etter én time, mens varmebehandlet melk ga fire ganger så mye fritt kasein etter 20 timer. For begge typer melk var prosessen reversibel. Fritt kasein inneholdt lite kalsium.

Som foran nevnt vil også melkens saltbalanse i stor grad kunne gjenvinnes ved en hensiktsmessig varmebehandling. Jfr. tabell 4.1.2.1. I følge PYNE, 1966, vil varming av melken i 10 min., ved 100°C, redusere mengden av løselig fosfat med ca 50%.

Kalsium(hydrogen)fosfat er mindre løselig ved høy temperatur enn ved lav temperatur. En heving av temperaturen, f.eks. pasteurisering, vil derfor føre til en økning i den kolloidale fasen.



Figur 4.1.2.1.

En ser at når reaksjonen i likning (1) går mot høyre, vil også reaksjonen i likning (2) måtte gå mot høyre og systemet blir surere. (Det omvendte skjer ved kjølelagring).

I følge bl.a. QVIST (1979), vil ofte vanlig pasteurisering (Ltst) være tilstrekkelig for å rekonstituere de fysikalsk-kjemiske forhold i melken. (Tabell 4.1.2.1).

QUIST, 1979. Milchwissenschaft. 34, 467.

PYNE, 1966. Gjesteforelesninger ved Meieriinstituttet ved NLH.

Tabell 4.1.2.1. Innholdet av ikke-micellært kasein (%), Ca, Mg og P (millimol) i melkeserum. Etter QUIST, 1979.

Komponent	Timer kjølelagring ved 5°C					
	0	24	48	72	72+past.	
Lagret upast.	Kasein	0,13	0,55	0,51	0,60	0,14
	Kalsium	11,7	14,8	14,7	14,5	10,5
	Magnesium	4,09	4,17	4,17	4,09	3,85
	Fosfor	15,1	17,0	17,1	16,9	14,5
Lagret pasteurisert	Kasein	0,09	0,60	0,57	0,60	0,17
	Kalsium	10,7	14,6	14,6	14,5	10,3
	Magnesium	3,89	4,10	4,10	4,13	3,84
	Fosfor	14,5	17,1	16,9	16,7	13,9

Den negative effekt av pasteuriseringen, som kan observeres på fersk ulagret melk og som også manifesterer seg ved det faktum at løpningsevnen ikke kan gjenvinnes 100% ved varmebehandling av kjølelagret melk (fig. 4.1.1), har sin årsak i at det dannes varmeinduserte komplekser, i det vesentlige mellom β -globulin og κ -kasein, men også mellom andre kaseintyper og serumproteiner.

(α_{s2} og β_{lg})

Den løpetregthetseffekt som man kan registrere som følge av melkens oppvarming, viser seg å være mest utpreget i melk med høyt innhold av β -laktoglobulin, (β -lg).

McKENZIE et.al. (1971) fant at kompleksdannelsen var sterkt avhengig av β -laktoglobulinets genetiske variant (B-typen var mer reaktiv enn A-typen).

Ved kompleksdannelsen mellom β -lg og κ -kas spiller S-S-bindinger en sannsynlig rolle, men hydrofobe bindinger synes å være involvert ifølge DZIUBA, 1979.

Kompleksdannelsen mellom micellene og serumproteinene generelt, og mellom β -lg og κ -kaseinet spesielt, har betydning for den enzymatiske hydrolysen av kaseinet. Populært kan det vel sies at løpeenzymet ikke kommer til, men her kan effekten være forskjellig for de forskjellige typer av løpe.

DZIUBA, 1979. Acta Alimentaria Poloniae 5, 97.

SMITS & VAN BROUWERSHAVEN, 1980. J.Dairy Res., 47, 313.

McKENZIE et.al. 1971. J.Dairy Res., 38, 343.

Forskjellig melk vil kunne gi forskjellige resultater bl.a. avhengig av i hvilken grad pasteuriseringen påvirker kompleksdannelse mellom κ -kasein og β -lactoglobulin. Dette vil forlenge enzymfasen under løpningen. Større løpemengde kan således være påkrevet eller lengre koagulasjonstid må aksepteres.

KALEB et.al., 1982, har publisert endel utmerkede EL-mikrofotos av kaseinmiceller tatt med såkalt roterende skyggeteknikk både fra ku- og geitmelk. Ved varmebehandling, 10 min. ved 90°C, kunne det tydelig vises at micellene fikk endret overflatestruktur. Det ble dannet et partikulært belegg med butte tagger eller utløpere.

4.2. Homogenisering og mekanisk behandling av melken.

Homogenisering av ystemelken fører til at koagulasjonstiden blir kortere og koaglet blir løsere. Det kan være flere årsaker til dette.

Arbak

I naturell melk foreligger ca. 93% av kaseinet i form av miceller. Etter homogenisering er dette tallet redusert til mellom 63 og 83%. Reduksjonen i micelletallet må sees i sammenheng med den adsorpsjon av kasein som skjer på de mange nye små fettkulene som dannes under homogeniseringen. Proteinlaget rundt fettkulene består både av micellært kasein, kasein-subunits og monomert kasein.

DARLING & BUTCHER, 1978, fant at adsorberte serumproteiner lot seg vaske bort fra fettkuleoverflaten før pasteurisering, mens disse etter pasteuriseringen ble fastere bundet. Videre skjer det en øket adsorpsjon av anjoner (fosfater og citrater) til dette overflatesjiktet. Konsentrasjonen av Ca^{++} og Mg^{++} i det omliggende miljøet blir derfor økt, noe som øker koagulasjonstendensen, d.v.s. gir kortere koagulasjonstid. Homogenisert melk (både helmelk og skummetmelk) viser også dårligere varmerstabilitet og koagulerer lettere i alkohol enn naturell melk. Reduksjon i micelleantallet vil automatisk gi et svakere koagel. Forklaringen på det løsere koagel man får av homogenisert melk kan videre skyldes den mere ujevne fordeling man har i selve strukturelementet. Det kaseinet som er adsorbent til fettkulene vil etter løpningen også være bedre stabilisert mot utfelling p.g.a. anjonene. Parakaseinet som her dannes vil sannsynligvis bli relativt kompakt. Resultatet er at man i mellomrommet mellom fettkule-parakaseinaggregatene får en fortykning av gitterstrukturen. Til støtte for denne forklaring er at ved inndamping av homogenisert melk, tilsvarende den reduksjon man har hatt i melkens micelleinnhold, etter løpning, får et koagel som har normal fasthet.

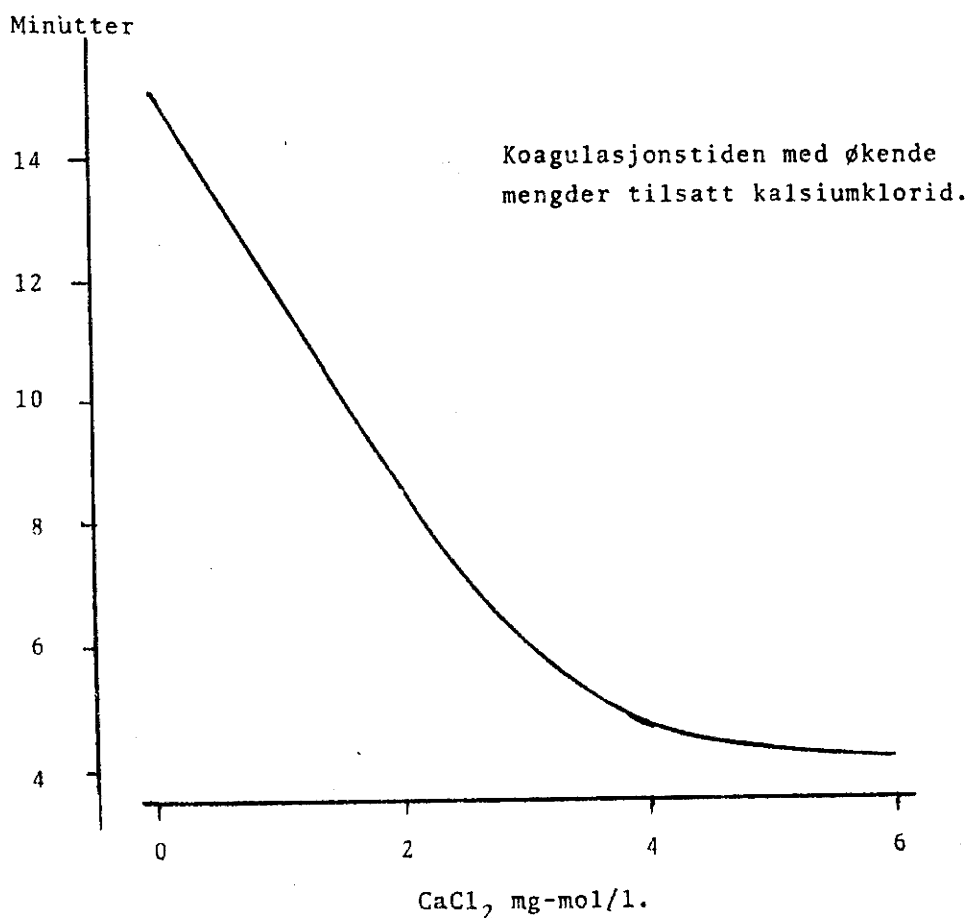
nedsett
Synes

Mekanisk behandling av melken som sterk rysting, pumping, sentrifugering og all behandling som medfører sterk skumdannelse, nedsetter koaglets evne til å dra seg sammen og avgi myse.

Årsaksforholdet er ikke nærmere klarlagt, men noen av de effekter man har av homogeniseringen vil antakelig kunne gi en delvis forklaring. Luftinnpisking i ystemelk må unngås.

4.3. Tilsetning av kalsiumklorid.

Melk som har et lavt innhold av kolloidale kalsiumsalter kan gi et koagel som er bløtt og lett danner mye ostestøv under skjæring og røring. I praksis kan en rette på dette ved å tilsette litt kalsiumklorid til melken. Tidligere har det også vært forsøkt med tilsetning av CaCl_2 i forbindelse med sekundært natrium-hydrogenfosfat, men dette synes å være lite brukt idag da den ønskede effekt vanligvis oppnås med CaCl_2 alene. (Dersom man skal tilsette natriumfosfat må dette gjøres først og deretter sette til CaCl_2 - løsningen). Tilsetningen av kalsiumklorid fremskynder clotting point, som vist i figur 4.3.1. men fastheten på gelet øker også langt raskere enn uten en slik tilsetning. Trolig blir også gelets maksimale trykkfasthet større, men våre målinger med Instron og Formagraph (figur 4.3.2.) synes ikke å gi entydige resultater her.

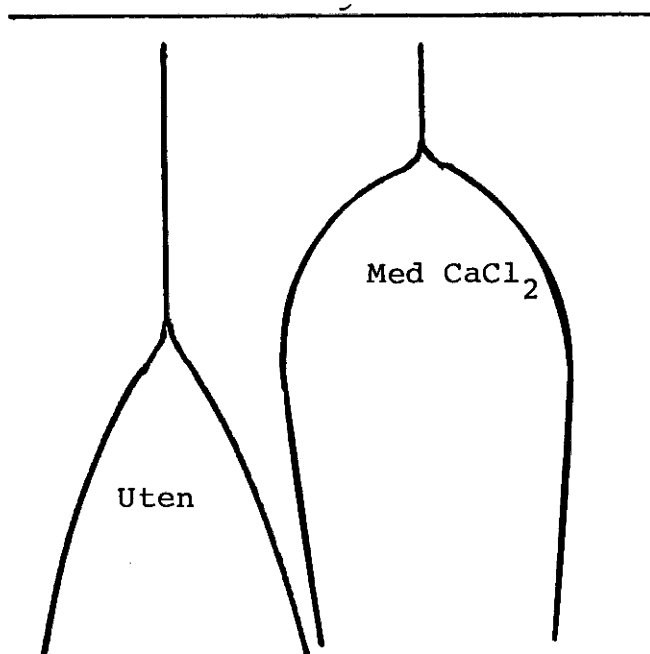


Figur 4.3.1. Fra øvelsene i melkens løpning.

Ved tilsetning av kalsiumklorid til ystemelken kunne KNOOP & PETERS, 1976, ved EL-mikrofotos av gelet vise at maskevidden i dette ble mindre enn uten slik tilsetning.

Arsåken til raskere sammenløpning ved tilsetning av kalsiumklorid tilskrives de den nøytraliserende effekten som de positive Ca-jonene har på micellenes negative overskuddsladning. På rekonstituert melk fant SIVERTSEN (1971) at CaCl_2 - tilsetning ikke ga noen økning i koaglets maksimale fasthet. Økningen i koagelfasthet gikk imidlertid raskere, d,v,s, ventetiden ble kortere.

Effekten av CaCl_2 på koagulasjonstiden avtar med økende mengder som tilsettes, jfr. figur 4.3.1.



Figur 4.3.2. Eksempel på utskrift fra Formagraph av to melkeprøver uten og med tilsetning av kalsiumklorid, 1.2 g pr. liter melk. Fra øvelsene.

x) Se avsnitt 4.7.1.

Som foran vist, vil en tilsetning av Ca^{++} -joner (eller andre toverdige joner) virke til å senke miljøets pH. Dette vil i seg selv virke koagulasjonsfremmende. Men disse jonene har også en tydelig koagulasjonsfremmende effekt selv om miljøets pH blir holdt konstant. En-verdige katjoner derimot hemmer koagulasjonen. Litium muligens unntatt. Anjonene viser en mindre regelmessig effekt når en ser bort fra de som binder Ca^{++} -joner.

Tilsetning av salter som pyrofosfat, oksalat, tartrat og citrat er undersøkt av DJONDJOROVA & PRODANSKI (1972). Disse saltene øker koagulasjonstiden. De toverdige katjoner har en forskjellig effekt på karakteren av det koagel som dannes. Settes Ca^{++} - eller Ba^{++} -joner til melk som er gjort fri for Ca^{++} -joner, vil en også få et normalt koagel med løpe. Tilsettes derimot Mg^{++} - eller Ni^{++} - joner i tilsvarende mengde, blir koaglet løsere.

PRODANSKI (1968) fant at ystbarheten på ku, sau, geit og bøffelmelk kunne justeres til samme nivå ved tilsetting av enten CaCl_2 , BaCl_2 eller MgCl_2 .

4.4. Melkens syrning.

Melkens surhetsgrad(formodningsgrad) har stor betydning både for enzymreaksjonen og selve gelasjonen. Tid til "clotting point" kortes ned og fasthetsøkningen på koaglet skjer mye raskere, slik at ventetiden blir kortere. Effekten, så langt, vil minne mye om virkningen av kalsiumkloridtilsetning (jfr. fig. 4.4.2), men i synereseegenskaper vil man få store forskjeller idet myseavgangen vil øke med økt surhet.

Ved stadig synkende pH vil en kunne tenke seg en gradvis overgang til en syrefelling av kaseinet, men ved ysting av faste løpeoster vil det aldri være aktuelt å syrne så sterkt at en kommer ned mot det isoelektriske området for kaseinet.

Surhetsgradens effekt på tid til "clotting point" er vist i figur 4.4.1. Tiden reduseres kurvlineært med at melkens surhetsgrad slik at den relative virkningen er størst ved de høyere pH-verdier.

Fig. 4.4.2. viser at både clotting point og økningen i gelfasthet skjer raskere når surhetsgraden i melka øker.

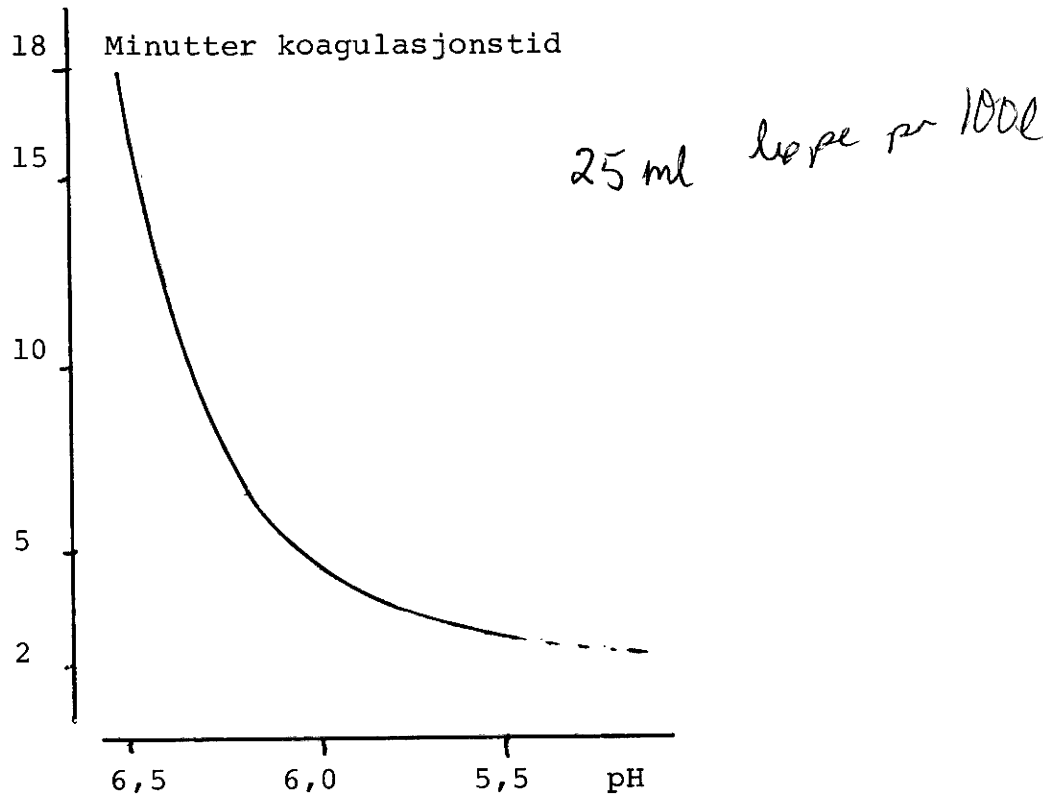
Forsøk av CLAEISSON & CLAEISSON (1970) viste at gjennombobling av melk med CO₂ til pH 6,4-6,5, som ventet, reduserte koagulasjonstiden, men koaglets fasthet og evne til å avgi myse var også bedre enn om pH ble senket tilsvarende med HCl. eller melkesyre.

Disse fant at CO₂-tilsetning var et vel så godt hjelpemiddel som CaCl₂ til å regulere ystbarheten, men synes hittil ikke å ha kommet i praktisk anvendelse.

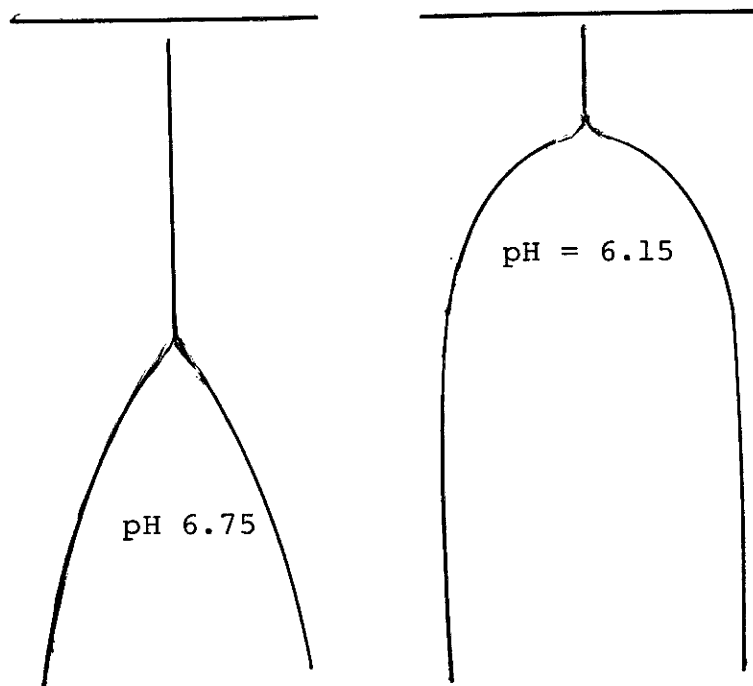
HOEL, 1981, fant at metoden var løpebesparende, slik at løpemengden kunne reduseres med 25%.

CLAEISSON & CLAEISSON, 1970, D.S.A. 32(11)792.

HOEL, 1981. Rapport nr. 83 fra Sv.Landbruk. Inst. for Husdyr og foring.



Figur 4.4.1. pH og clotting point.
Fra øvelsene.



Figur 4.4.2. Eksempel på utskrift fra Formagraph, av melk, uten (pH 6,75) og med tilsetning av melkesyre til pH 6,15, (fra øvelsene), se avsnitt 4.7.1.

4.5. Justering av melkens tørrstoffinnhold.

Ved å fortynne melken med vann før løpetilsetningen, blir koaglet bløtere, mindre elastisk, og det får en mindre kontraksjonsevne. Ved en vanntilsetning på 100% oppnås bare en fnokket utfelling, og ved enda større fortynning dannes ikke koagel i det hele tatt. Ved tilsetning av vann senkes melkens kaseinkonsentrasjon, saltkonsentrasjon, vannstoffjonekonsentrasjon og melkens konsentrasjon av kolloide fosfater. Vanntilsetningen virker også inn på kaseinpartiklenes størrelse og gir et mere findisperst kasein. Alt dette resulterer i en dårligere koagulasjonsevne og en nedsettelse av koaglets fasthet og kontraksjonsevne.

Tørrstoffinnholdet i ystemelken kan økes ved ultrafiltrering, inndamping eller ved tilsetning av tørrmelk. Man kan også yste av 100% rekonstituert melk eller melk rekombinert til forskjellig tørrstoffinnhold. SCHMUTZ & PUHAN, 1979, undersøkte løpningsforholdene i melk som var konsentrert med ultrafiltrering, inntil 4:1. Løpningstiden økte med økende konsentreringsgrad når samme løpemengde pr. volumenhet ble nyttet, mens løpningstiden i relasjon til kaseininnholdet avtok. Under forutsetning av at en kompenserer for tapet av CaCl_2 under ultrafiltreringen, d.v.s. at forholdet mellom kalsium og protein er som i utgangsmelken, vil løpebehovet være omvendt proporsjonalt med konsentreringsgraden.

Ved tilbakeføring av den mengde av serumproteiner som normalt tapes i mysa ved tradisjonell ysting, d.v.s. ultrafiltrering av mysa, varmebehandling av retentatet for denaturering av serumproteinene (5 min. ved 80°C) og tilsetning av dette til ystemelken neste dag, -fant en hos oss at koagulasjonstiden i middel økte med ca. 4 min. Større mengder av proteinkonsentratet ga tilsvarende lengre løpningstider.

Forskjellige sider ved ysting med rekombinert melk ble undersøkt i hovedoppgavearbeider^r av SIVERTSEN (1971) og NERBY (1972).

SCHMUTZ & PUHAN, 1979. Deutsche Molkerei-Zeitung, 100, 254.

SIVERTSEN, 1971. Hovedoppgave NLH.

NERBY, 1972. Hovedoppgave NLH.

Som nevnt har pasturiseringen og varmebehandlingen av melken, ved fremstillingen av tørrmelk-produktet, en vesentlig betydning for løpnings- og koagulasjonsegenskapene på den rekonstituerte melken.

Tyske undersøkelser, (VOSS -71), viser at konsentrering av melken ved 40°C til ca. 40% tørrstoff, før tørring var gunstig. Inndamping ved 60°C til omlag 50% tørrstoff, ga tydelig merkbar effekt på løpningsegenskapene. Løpningsegenskapene ble ikke påvirket ved luft-temperaturer på 150-190°C.

Tabell 4.5.1. Koagulasjonstid i min. for rekonstituert tørrmelk med ulike pasteuriseringstemperaturer.

Past. etter rekonst.	% tørrstoff g CaCl ₂ / 100 l	9		12		15		18	
		Past. f.tørk							
0	I. 0	27,0	23,5	25,5	24,8	26,8	26,3	26,8	26,9
	II. 62°C/15s.	36,0	30,5	30,8	27,3	30,0	27,0	28,8	27,8
	III. 72 " "	35,2	33,3	30,2	29,2	31,0	28,5	29,7	29,0
	IV. 82 " "	42,5	35,3	32,3	30,2	30,4	29,8	30,5	30,2
	V. 92 " "	62,3	47,2	43,8	37,8	38,5	36,0	36,3	36,3
63°C/ 30 min.	I.	36,0	31,5	30,4	28,0	30,2	28,3	30,0	28,5
	II.	40,8	32,8	32,8	30,3	31,3	29,0	31,0	28,8
	III.	42,8	34,2	33,3	32,0	31,2	31,7	31,2	31,5
	IV.	42,3	36,3	34,8	33,5	32,8	32,2	32,8	31,3
	V.	65,8	47,2	44,0	38,5	38,8	38,0	38,0	36,5

I tabell 4.5.1. er vist koagulasjonstider for skummet melk (tørrmelk) fremstilt ved forsøkslaboratoriet i Brumunddal. Melken er rekombinert til forskjellig tørrstoffinnhold, uten tilsetning av fett, med og uten repasteurisering. Det er nyttet 25 ml løpe pr. 100 l. Når pasteuriseringstemperaturen øker, øker også koagulasjonstidene. Repasteureringen har øket koagulasjonstiden noe når tørrmelken har vært svakt varmebehandlet, men har mindre å bety dersom varmebehandlingen tidligere har vært høy

Ved økende tørrstoffinnhold avtar koagulasjonstiden og effekten av CaCl₂-tilsetningen blir også mindre. KETTING et.al., 1978, fant den samme effekten på melk som var konsentrert med ultrafiltrering.

VOSS, 1971. Milchwissenschaft, 27, 264.

KETTING et al, 1979. Appendix XX. IDF-kongress D:854.

For den ikke repasteuriserte melken kan man knapt registrere noen effekt av CaCl_2 -tilsetningen når fettfritt melketørrstoff er 18%. I praksis lar det seg ikke gjøre å yste av en melk med så høyt tørrstoffinnhold. Allerede ved 15% fettfritt melketørrstoff blir myseavgangen svært dårlig. KUZNETSOV et.al. 1974, fant imidlertid at en tilsetning på 1% fettfritt tørrstoff bedret synereseegenskapene med ca. 20%.

Ved 18% ftt. får man ingen synerese. SIVERTSEN fant at det rent teknisk lar seg gjøre å yste av melk med 12% ftt.tørrstoff, men NERBY (1972) fant at ostens kvalitetsegenskaper (Saint Paulin) ble bedre når ystemelkens ftt. tørrstoffinnhold var 8,8% (normalt) sammenliknet med 11%.

Når man yster med rekonstituert melk med normalt tørrstoffinnhold synes det nødvendig å nytte noe CaCl_2 -tilsetning for å oppnå en normal koaguleringsstid.

4.6. Løpemengden.

Dersom man ser bort fra den senere generelle proteolyse, skulle enzymmengden, teoretisk, bare ha betydning for reaksjonshastigheten på omdannelsen av κ -kasein til κ -parakasein. Isolert sett vil utfnokkingen og gelasjonen av parakaseinet foregå uavhengig av den løpemengde man har anvendt til å overføre kaseinet til parakasein. Dette spesialtilfelle har man bare under forhold der man isolerer enzymfasen fra koagulasjonsfasen. I praksis vil disse prosessene overlape hverandre.

Nyttes bare små løpemengder, tar overføringen fra kasein til parakasein lang tid og den er ikke avsluttet når koagulasjonen blir synlig. En skulle da vente at kontraksjonen bare ville omfatte en del av kaseinet og at koaglets fasthet ville bli influert av dette. Ved de løpemengder som nyttes i praksis synes likevel ikke løpemengden å ha noen vesentlig innflytelse på koaglets struktur og egenskaper. Ved stigende løpemengder overføres kaseinet hurtigere til parakasein og desto hurtigere inntreer synlig koagulasjon. Variasjoner i løpetilsetning gir imidlertid ikke tilsvarende utslag i ventetiden når koaglet skjæres ved subjektiv bedømt ens fasthet.

Resultatene fra målinger av gelfasthet på Formagraph i de teknologiske øvelser tyder likevel på at også gelfastheten øker raskere ved mer ekstreme variasjoner i løpemengden, d.v.s. dobling og tredobling av løpemengden.

Ifølge GARNOT & OLSON, 1982, økte gelfastheten raskere med økende løpemengde inntil 50 mg/ml (Løpepulver fra Miles Lab., styrke ikke oppgitt) mens mengder over dette ga uendret fasthetsøkning. Den maksimale gelfastheten var uavhengig av enzymkonsentrasjonen.

Dette viser at over en bestemt minstemengde av løpe er det diffusjonen av "Parakaseinmicellen" som er avgjørende for gelasjonen.

4.7. Skjæring og myseavgang.

4.7.1. Bestemmelse av gelfasthet.

For ysteren er det viktig å kunne bedømme fasthet for skjæring mest mulig nøyaktig. Det har derfor gjennom tidene blitt utført en rekke fasthetsmålinger av koaglet med forskjellige instrumenter gjennom gelasjonsperioden. Forskjellige målemetoder gir forskjellige resultater, noe som vanskeliggjør sammenlikninger av målemetoder.

De eldste målingene baserer seg på målinger av gelets deformasjon/trykkfasthet ved bruk av forskjellige typer penetrometre foretatt på forskjellige tidspunkt under gelasjonsperioden.

Problemet med slike instrumenter er at målingene ikke kan gjøres kontinuerlig, men at man bare får én avlesning på ett bestemt tidspunkt. De forskjellige fabrikater av penetrometre egner seg også dårlig for eventuelle målinger i ystekaret.

De fleste undersøkelser som er utført over målinger av gelfasthet er gjort med forskjellige typer av viskometre. Av disse har kanskje den såkalte "Thrombelastograph" vært mest brukt, et torsjonsviskometer, også kalt "Lactodynamograph". Melkeprøven has her i en kuvette som vris 4^o frem og tilbake. Etter hvert som

GARNOT & OLSON, 1982. J. Food Sci., 47, 1912.

viskositeten øker, overføres denne bevegelsen til en neddykket sylinder i sentrum av kuvetten. Amplitudene registreres på et lysfølsomt papir via en speilannordning på sylinderooppheget. Karakteristiske størrelser er vist i fig. 4.7.1.1.

Noe av det samme prinsippet er brukt i den såkalte Formagraph, men istedet for et torsjonslegeme er det nytted et pendelprinsipp og en frem og tilbakegående bevegelse.

I motsetning til Thrombelastographen kan Formagraphen utstyres med flere kuvetter, slik at forskjellige prøver kan måles samtidig. (Bruk av Formagraph vil bli gjennomgått i øvelsene)

Hverken Formagraph eller Thrombelastographen egner seg til målinger direkte i ystekaret.

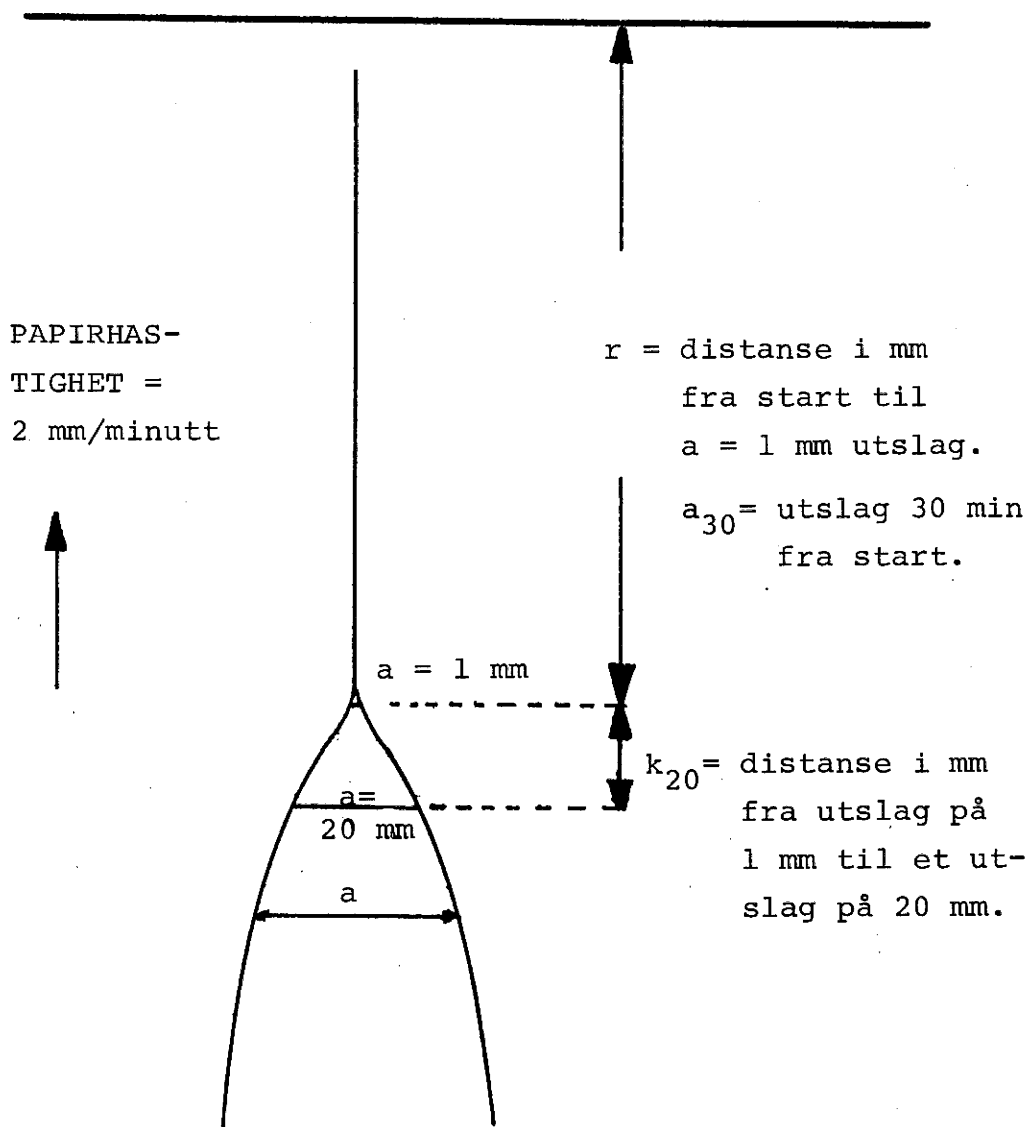
For å finn den optimale skjæringsfastheten på ostegelet tok TABACHNIKOV & DUDNIK, 1977, utgangspunkt i tidspunktet 2 x clotting point og skar gelet i intervaller fra 5 min. før til 10 min. etter dette tidspunktet. (30 g CaCl_2 pr. 100 l melk og løpe-temperatur 36° ble nytted). Synereseegenskaper og gelstruktur ble klart dårligere dersom en ventet med skjæringen til etter dette tidspunktet, d.v.s. 2 x clotting point.

VOSS, 1974, bestemte den optimale amplitude for skjæringsfasthet med Thrombelastograph til 34 mm for Edamerost og til 66 mm for Camembert.

TABACHNIKOV & DUDNIK, 1977, USA, 41(1) 436.

VOSS, 1974, IDF, B- Doc 49.

NB/6



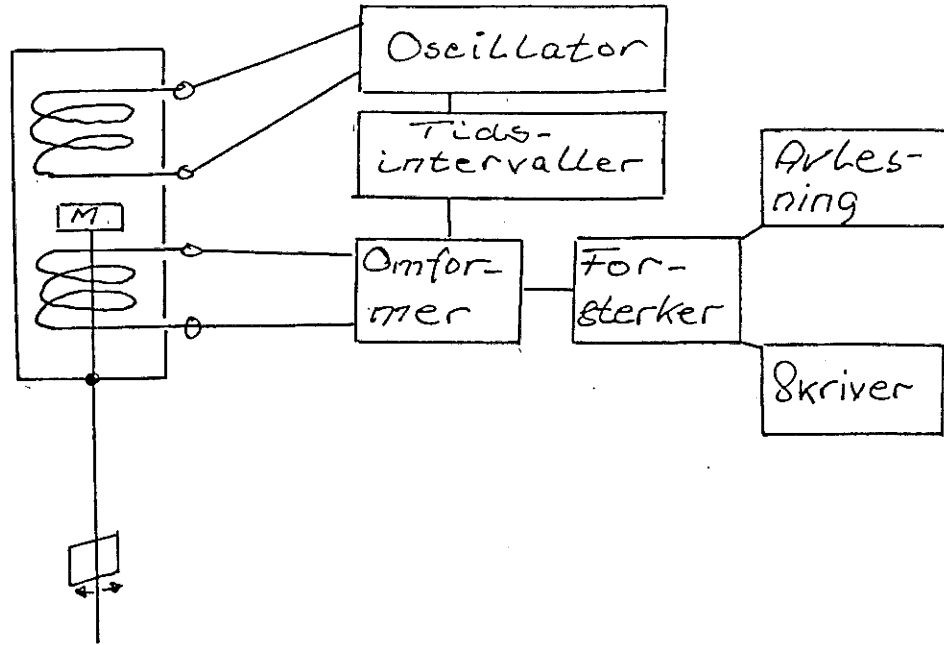
Figur 4.7.1.1. Diagram fra Formagraph.

Tilsvarende diagram fås også på Thromb-
elastograph.

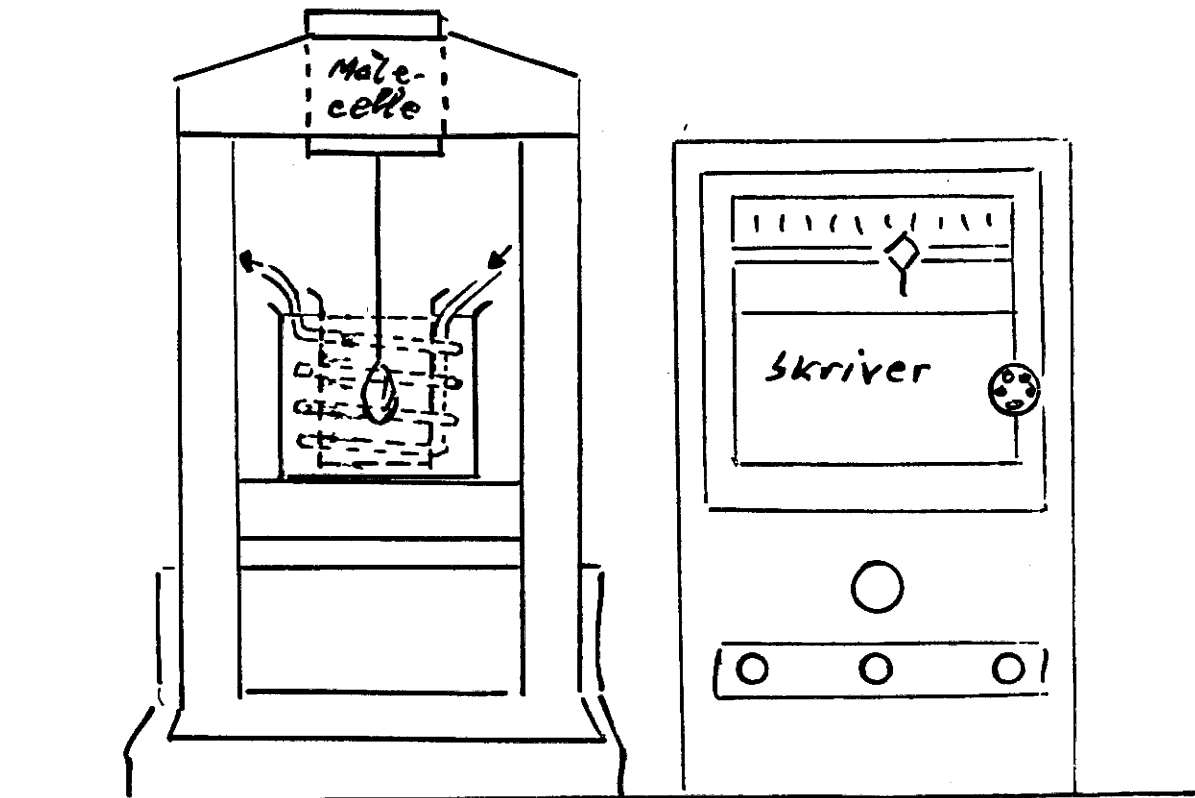
Brookfiels LVT Helipath-viskometer har også vært nyttet til kontinuerlige målinger av økningen i gelfasthet under ysting, men egner seg dårlig til direkte målinger i ystekaret.

Et nytt tilnærmet helelektronisk instrument, den såkalte "Gelograph" er utviklet med sikte på å kunne utføre enkle målinger - også i ystekaret. Det har som Formagraphen også et slags pendelformet måleorgan, men dette settes i aktive svinginger med en magnet som påvirkes av en sinusformet vekselspanning. Kuvette er derfor unødvendig. Gelets avdempning av svingningene på måleorganet registreres elektronisk via en induksjonsspole. Prinsippet er vist i fig. 4.7.1.2. Tilkoplingen til forsterker, registreringsutstyr etc. skjer via en enkel kabel, og sonden er derfor svært anvendelig.

Prinsippet med mekanisk bevegelse av et neddykket målelegeme har også vært mye nyttet til måling av gelfasthet. En rekke målinger av fasthetsøkningen i koaglet har vært utført ved vår avdeling med et Instron strekk-prøve apparat, fig. 4.7.1.3., der et dråpeformet e. kjegleformet legeme løftes med en konstant hastighet på 1 mm/min gjennom den løpelagte melken. Løftekraften registreres automatisk på et diagram som går med en hastighet på 5 mm pr. minutt.



Figur 4.7.1.2. Måleprinsippet for GELOGRAPH



Figur 4.7.1.3. Apparatoppstilling for måling av gelfasthet med Instron strekkprøveapparat.

I fig. 4.7.1.4 er vist en kurve over fasthetsøkningen i koaglet med bruk av et slikt apparat. De absolutte verdier vil her selvsagt være avhengig av form og størrelse på det legeme som nyttes ved målingene.

Stigningsforholdet på kurven forteller hvor raskt fastheten øker under de fikserte betingelser. Den maksimale fasthet som kan måles, begrenses til det punkt der gelet brister og syneresen blir synlig.

STIGEN (1968) jevnførte den subjektivt bedømte beste skjæringsfasthet i ystekaret med målt fasthet på Instron-apparatet til i middel 5,7 gram når han nyttet et kjegleformet legeme (H = 30 mm og 30 mm Ø). Variasjoner i fettinnholdet, på mellom 2,8-3,7% ga ikke målbare utslag i fasthetsøkningen.

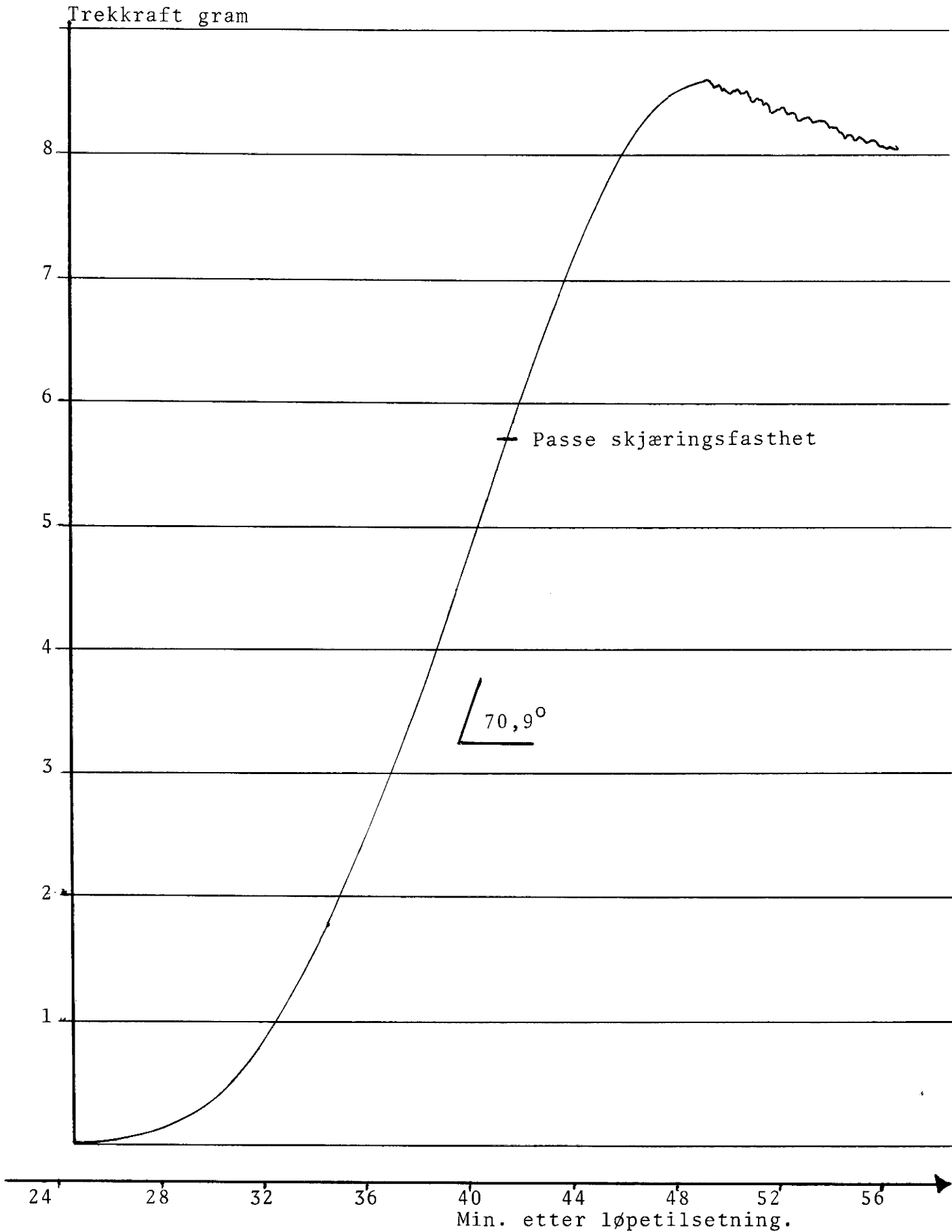
NILSEN, 1981, brukte samme metode til å undersøke hvordan kjølelagring, pasteurisering, eventuelt repasteurisering virket inn på koagulasjon og geldannelse. Resultatene fra disse målingene er vist i tabell 4.7.1.1.

Pasteurisering av kjølelagret, rå melk, har gitt en liten økning i den maksimale koagelfasthet i dette tilfellet, men ikke reduksjon i koagulasjonstid og ventetid. Dette kan antakelig tilskrives at samtlige prøver ble forvarmet ved 30°C i 60 minutter før løpeleggingen.

I fig. 4.7.1.5 har en stilt sammen kurvene for tre forskjellige målinger av koagelfasthet, en for kumelk og to for geitmelk, tidlig og litt senere i laktasjonsperioden. På kurvene er merket av tidspunktet/fasthet for subjektivt bestemt skjæringsfasthet som for geitmelk ligger lavere enn for kumelk. (Gelet virker fastere enn det målingene på Instron viser! Det samme forholdet finner en også ved løpelegging av kumelk ved 38°C) Figuren illustrerer også de store variasjoner en kan ha i koagelfasthet, spesielt for geitmelk. (Målinger utført av NILSEN 1982).

STIGEN, 1968. Hovedoppgave ved NLH.

NILSEN, 1981. Hovedoppgave ved NLH.



Figur 4.7.1.4. Fasthetsprøve ved 30°C. Fettinnhold: 3.4%.
Løpe: Hauser, 25 ml per 100 l melk.

Malt med instron.

Tabell 4.7.1.1.1. Koagulasjons- og ventetider etter forskjellig behandling for helmelk.
 Løpelt ved 30°C. Middelerverdier etter 9 gjentak. Etter K.O.Nilsen, 1981.

Melkebehandling	Tid, minutter til:				Maks. fasthet i gram
	Kurveløft, "Clotting-point"	Skjæringsfasthet 5,7g	Ventetid	Maksimal fasthet	
Ukjølt, upasteurisert	16,3	31,6	15,3	40,6	8,9
Ukjølt, pasteurisert	17,6	33,8	16,2	40,9	9,5
Kjølt ett døgn, upasteurisert	18,2	35,8	17,6	42,5	7,5
Kjølt ett døgn, pasteurisert	20,7	39,8	19,1	47,8	8,2
Kjølt tre døgn, pasteurisert	21,7	41,2	19,5	45,3	7,0
Kjølt ett, pasteurisert og kjølt to døgn, pasteurisert	24,0	43,9	19,9	49,5	6,7

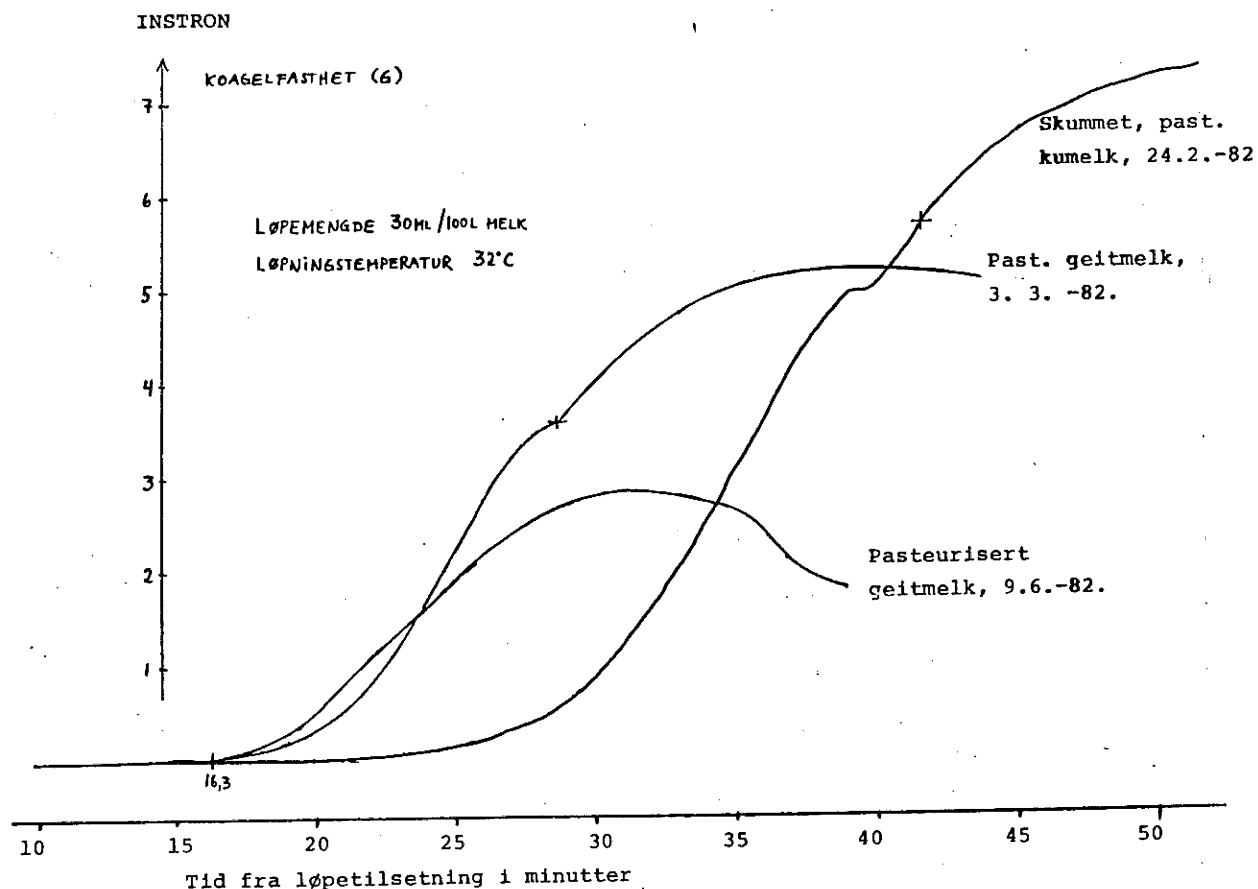


Fig. 4.7.1.5. Eksempel på gelfasthetsmåling i forskjellige melketyper.

BUDNY, 1975, har sammenliknet objektive målinger av gelfasthet med subjektiv bestemmelse av riktig skjæringsfasthet etter Instronprinsippet. Trykkfastheten er oppgitt som kg pr. flateenhet av målelegemets største diameter (kule). På grunnlag av 100 målinger ble det vist at vanninnholdet i ferskosten var signifikant påvirket av koaglets skjæringsfasthet. Den optimale gelfasthet for Edamerost lå mellom 50- og 90.10⁻⁵ kg/cm².

Innretninger for måling av gelets motstand mot mekanisk bevegelige målelegemer neddykket i ystemelken i karet, har vært utviklet, men er neppe det endelige svar på dette problemet. Andre prinsipper synes mer interessante. Således har det også vært nytted optiske metoder for registrering av koagulasjonen. Lysabsorpsjonen øker under gelasjonen, men slike målinger er sterkt påvirket av melkens fettinnhold etc.

Ultralyd har også blitt anvendt for registrering av viskositetsøkningen under gelasjonsperioden, (den såkalte "Ultraviscosøn") og MARSHALL et al, 1982, fant at denne metoden var særlig følsom i første del av gelbyggingsperioden og faktisk ga utslag før clotting point. Men målingene er også meget følsomme for temperaturvariasjoner og variasjoner i Ca-jonekonsentrasjoner. Et annet prinsipp for måling av gelfasthet er basert på forplantningen av trykkbølger i mediet, bl.a. anvendt av HATFIELD, 1981, og OLSON et al, 1982.

Fordelen med dette prinsippet er at selve målingen ikke påvirker eller bryter istykker gelet under registreringen.

To sonder med bestemt avstand blir senket ned i melken. Den ene virker som utsender av en trykkbølge, den andre som mottaker.

Serien av slike trykkimpulser blir registrert på en skriver etter å ha blitt forsterket. Figur 4.7.1.6.

Dette systemet egner seg godt til registrering av optimal skjæringsfasthet i ystekaret.

Forholdet mellom gelfasthet og tid er beskrevet av SCOTT-BLAIR & BURNETT, 1963, som:

$$G = G_{\infty} \cdot e^{-\lambda/t}$$

der G_{∞} er den maksimale gelfasthet,

λ er tiden til verdien G_{∞} / e ,

t er tiden til clotting point

GARNOT & OLSON, 1982, fant god overensstemmelse med denne relasjonen ved målinger utført etter trykkbølgeprinsippet (3 bølger per min). Dette egnet seg spesielt godt til måling av den "maksimale" gelfastheten, da en ikke, som på andre instrumenter, fikk noen reduksjon i gelfastheten selv etter målinger på flere timers varighet.

Bestemmelsen av t derimot, varierte noe med metoden som ble valgt til dette formålet.

BUDNY, 1975. Technologia Zywnosci, 6,3.

MARSHALL et al, 1982 J.Dairy Res., 49,127.

HATFIELD, 1981. J.Dairy Res., 34, 139.

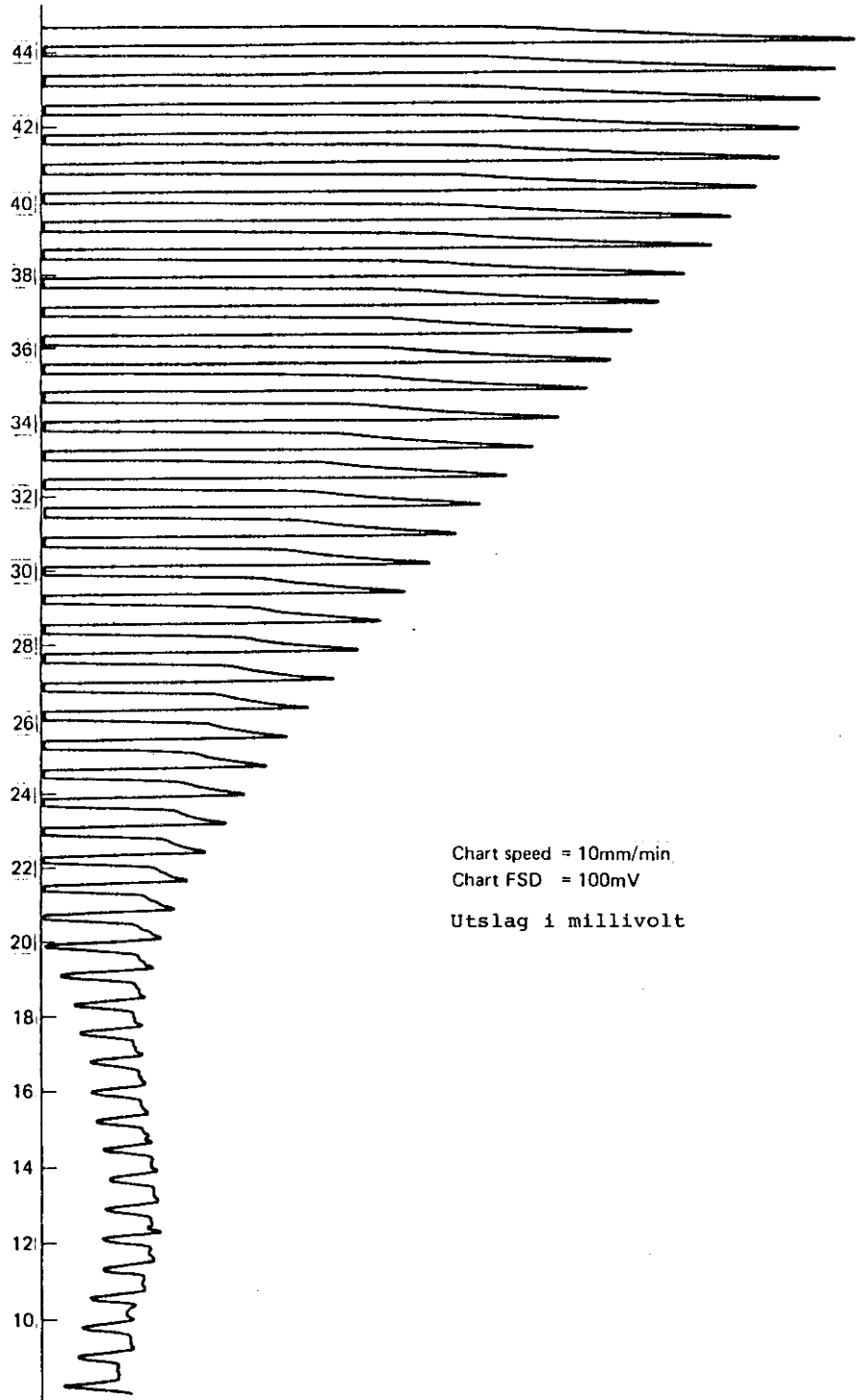
OLSON et al, 1980. J.Dairy Res., 65, 1321

" " 1982 J.Food Sci., 47,1912.

GARNOT & OLSON,1982. J.Food Sci., 47, 1912.

SCOTT-BLAIR & BURNETT, Biorheology, 1, 183.

Tid, minutter, fra løpetilsetning.



Figur 4.7.1.6. Måling av gelfasthet med trykkbølger.
Etter HATFIELD, 1981.

Millets lepins

1. Hovedtyper Kasein

- β \neq (γ) kasein - mykje prolinrestar ^{hydrofob.} - hydrolyser
- α_{S1} - } fellbart med calcium } - modner raskest
 α_{S2} - } mykje fester } hydrofob.
- κ - mykje fellbart med calcium \neq lite innh. au
- har mange glycosidbindingar ^{fester}
som gir det hydrofile egenskapen

2. Kaseinmonomer

Enkeltmolekyl av kasein prelijen

α_{S1}	=	23600	μ
α_{S2}	=	25600	μ
β	=	24000	μ
κ	=	19000	μ

3. ~~81 - 246 millioner μ~~
~~100 000 000 D.~~

4. Kaseinmicellere blir syntetisert i
i golgi og ^{per} selt ^{ribosom} sjøns celler
; utdelt av aminosyrer frå blodpl.
aminosyrer som blir syntetisert i
selt sj. celler.

I golgi kammerene skjer det ein postgjoring
viktig \rightarrow assosiering av kasein.

5. Kaseinmicellen er oppbygd av submiceller
der κ kasein er orientert ytterst fori
den er mest hydrofil mens α og β er orientert

4.7.2. Skjæringens og røringens betydning for myseavgangen (syneresen).

De bindinger som holder kaseinmicellen stabil i form og dispersitet, vil under syring og løpelegging åpnes og får dermed anledning til å virke utover. Den oppnøstede strukturen tapes, kaseinet blir trådformet og knyttes sammen via kalsium og fosfatbindinger (vesentlig over serin og treonin-syrerestene) til et sammenhengende nettverk. Melken omdannes til et gel avstivet i alle retninger av dette nettverket. De elektrostatiske kreftene som virker i gelet vil prøve å dra nettverket sammen, noe som øker trykket på den væsken som er innesluttet i gelet. Kapillarkreftene i systemet vil virke mot de kreftene som gir kontraksjon, jo sterkere desto mer finmasket nettverket er bygget opp.

Størrelsen av disse hulrommene beror sannsynligvis på parakaseinpartiklernes størrelse. Når parakaseinpartikelene er mindre, blir hulrommene mindre, mens antallet blir større. Dette vanskeliggjør myseavgangen og det kan bli vanskelig å få innstilt vanninnholdet i osten på et lavt nivå.

Et mer grovdiperst kaseinsystem (store miceller) disponerer omvendt for et mer stormasket nettverk som igjen lettere gir fra seg myse.

I følge KONOW (1959) vil kaseintrådene forsøke å dra seg sammen i mer parallelle forbandt ved hjelp av hydrogenbindinger. Dette forutsetter en viss bevegelighet på kaseintrådene. I det sammenhengende koaglet kan dette vanskelig skje p.g.a. avstivningen i alle retninger. Når man skjærer opp koaglet i små terninger frigjøres bindingen i snittflatene, slik at en større mulighet til bevegelse oppstår.

P.g.a. de indre kohe-sjonskreftene vil endel av vannet i dette nettverket presses ut. Dersom koaglet ikke skjæres, vil hele karets innhold krympe til en eneste stor osteklump. Syneresen vil da skje langsomt p.g.a. den lange vei mysa har fra klumpens indre og ut til ytterflatene.

Teoretisk kan frigjort væske fra et kapillarsystem beskrives med følgende formel:

$$Q = D \frac{F t p}{l \eta} \text{ der}$$

Q = Væskemengde per tidsenhet

D = Gelets spesifikke gjennomstrømmingsevne

F = Tverrsnittsareal av kapillarsystemet

l = Lengden av kapillarene

p = Trykkbelastningen på kapillarsystemet

t = Temperaturen

η = Væskens viskositet

Syneresen øker, som man ser, med flatearealet av kapillarer, trykk og temperatur, mens viskositeten og kapillarlengden motvirket frigjøringen av væske.

For å hjelpe på myseavgangen, oppdeles koaglet vanligvis ved skjæring (0,5-2 cm). En stor del av koaglets hulromvann blir derved frigjort. Ostemassens totale overflate økes og mysa får kortere vei fra ostekornets indre og fritt avløp i snittflatene. Ostemassens kontraksjon kan derfor foregå med større hastighet. Det er tydelig at jo tidligere og finere koaglet skjæres, desto lettere og hurtigere foregår ostevevets kontraksjon og myseavgivelse. Under skjæringen og den nærmeste tid deretter avgis vanligvis den største mysemengden. En kan regulere myseavgivelsen ved å utføre skjæringen tidlig eller sent og ved å skjære grovt eller fint. For hver halvering av osteterningen sidekant øker overflaten med 100%.

Et ostegel kan også sammenliknes med en svamp. Et ytre fysisk press vil rent mekanisk drive fuktighet ut av denne svampen. Under etterrøringen i ystekaret er gelpartiklene utsatt for et visst ytre press, dels ved kollisjoner med rørverket, eller gjensidig med andre ostekorn og indirekte ved de strømminger som oppstår i væsken.

Volumet av den frie væskemengde får dermed stor betydning. Presset på ostekornene blir større når mysemengden er liten enn når den er stor. Effekten av røringensintensiteten på myseavgangen er godt demonstrert av STIGEN (1968), som nyttet en metode etter BEEBY (1959) til å registrere myseavgangen. Resultatet er vist i fig. 4.7.2.1.

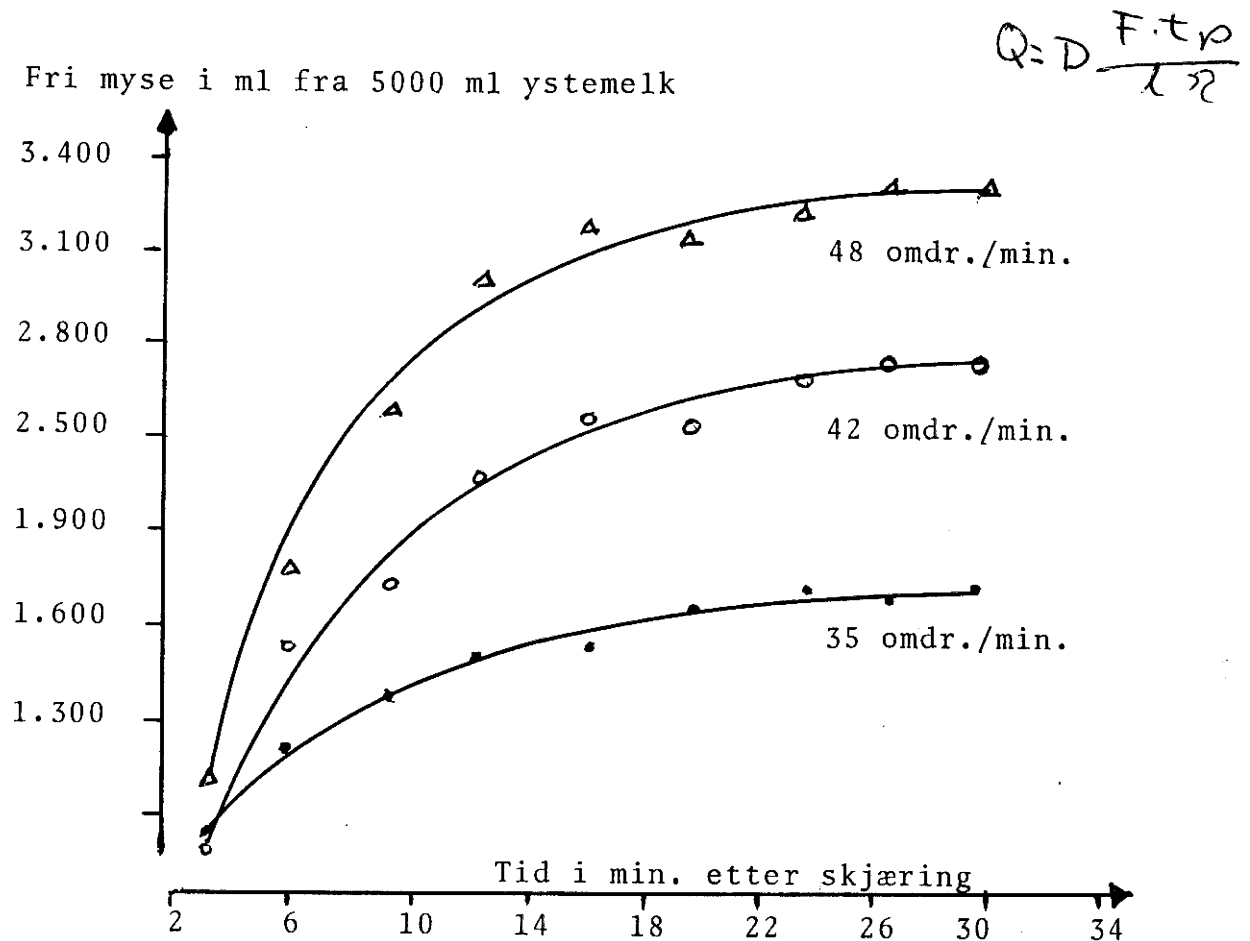


Fig. 4.7.2.1. Røringens betydning for myseavgangen (ystemelk med 3 % fett, temperatur 36°C). STIGEN -68

Forsøket viser tydelig at myseavgangen går mye raskere når røringensintensiteten øker, men også at den totale mengde frigjort myse synes å innstille seg på forskjellige nivåer. I praksis må en passe på å innstille hastigheten på røreverket, slik at ikke osteterningene knuses. Etterhvert som den frigjorte væskemengde økes, kan også røringensintensiteten tilta.

BEEBY, 1959. Aust.J.Dairy Techn. 14, 77.

STIGEN, 1968. Hovedoppgave ved NLH.

4.7.3. Temperaturen og surhetsgradens betydning for myseavgangen

Vi har foran sett at temperaturen er en faktor av betydning for frigjøring av kapillarbundet væske.

En del av vannet i koaglet er også bundet til hydrofile kolloider som hydratvann. Dette er fastere bundet til ostevevet enn kapillarvannet og lar seg ikke fjerne ved pressing eller mekanisk bearbeiding. Gelets evne til å binde hydratvann er imidlertid avhengig av temperaturen. Vannbindingsevnen er større ved lav enn ved høy temperatur. Hydratasjonsgraden er videre avhengig av parakaseinets elektriske ladning. Under ellers like vilkår vil vannbindingsevnen være minst i det isoelektriske område, og den vil derfor påvirkes av miljøets vannstoffjonekonsentrasjon.

Under ystingen er varmingen ("ettervarmingen") det viktigste hjelpemiddel man har til å regulere ostemassens vanninnhold. Under 20°C får man nesten ingen myseutskillelse, men syneresen øker med stigende temperatur inntil ca. 50°C.

Krympingen av nettverket under ettervarmingen av ostemassen til Emmentalerost er svært tydelig visualisert på EL-mikrofotos av FLÜELER, 1982.

Oppvarmingshastigheten hevdes å ha betydning for myseavgivelsen.

overflate
hinne

Ved for rask oppvarming kan massen i ostekornenes overflate trekke seg hurtigere sammen enn i kornenes indre. Dette overflatesjiktet mener en kan danne en barriere for frigjøringen av mysa i kornenes indre. Effekten er antatt å være større når ostkornene er store enn når de er små. Det anbefales derfor en varmingshastighet på 1-2°C pr. 5 min.

I et større faktorforsøk utført av PATEL, LUND & OLSON (1972) ble det undersøkt hvordan pH, varming, røring og CaCl₂-tilsetning virket inn på gelets synerese. Følgende faktorer og nivåer ble anvendt:

FLÜELER, 1982. Deutsche Molkereizeitung 35, 1172.

PATEL et al, 1972. J. Dairy Sci., 55, 1172.

<u>Forsøksfaktorer</u>	<u>Nivåer</u>			
pH	5,2	5,4	5,6	5,8
Temperatur °C	35	46,1	57,2	
Oppvarmingstid, min.	0,5	2		
Røring o. pr. min.	35	70		
CaCl ₂ %	0	0,02		

Forsøket ble utført med tre gjentak (96 x 3).

Som et mål på syneresen bestemte en vanninnholdet i ostemassen 5 min. etter sammenløpningen (turbulent koagulasjon, ikke skjæring av gelen) i relasjon til forsøksfaktorene. Temperaturen effekt er vist i fig. 4.7.3.1. og effekten av surhetsgrad og kalsiumkloridtilsetning er vist i fig. 4.7.3.2.

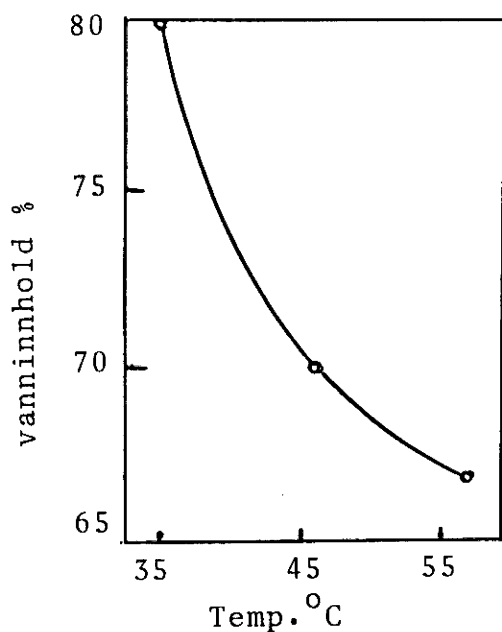


Fig. 4.7.3.1.

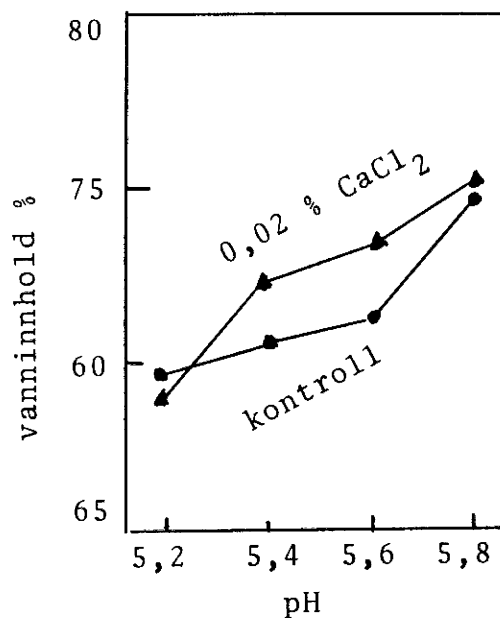


Fig. 4.7.3.2.

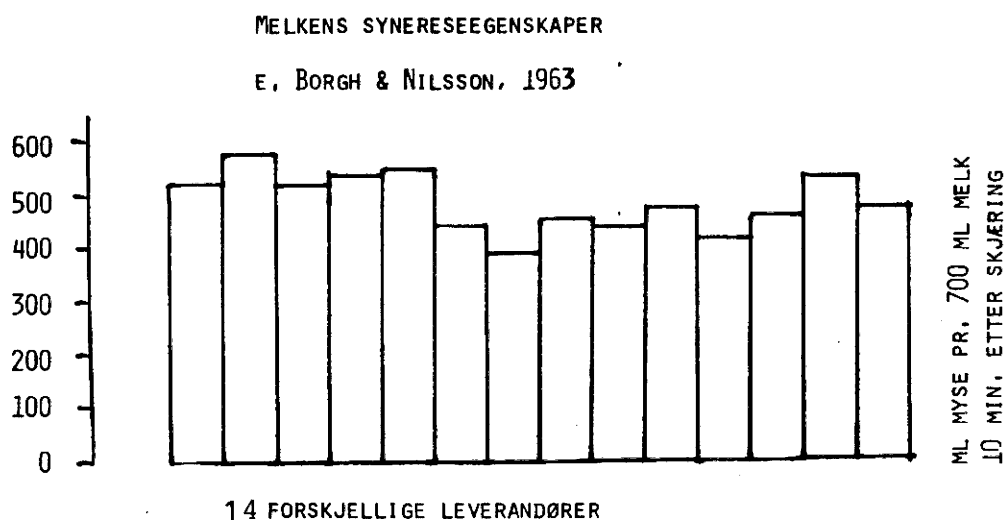
I dette forsøket kunne en ikke registrere noen effekt av sen og rask oppvarming av massen, men så har også ostemassen her hatt en noe annen struktur enn den en får ved normal skjæring av koaglet. Tilsetningen av CaCl₂ hadde en svak men statistisk sikker effekt, (kanskje vesentlig via pH-senkingen). Det samme hadde også røringseffekten.

Temperaturen og surhetsgraden er de faktorer som har den dominerende innflytelse på gelets myseavgivelse.

4.7.4. Andre faktorer av betydning for myseavgangen.

Forskjellig melk kan ha høyst forskjellige synereseegenskaper. Dette er bl.a. godt illustrert av BORG & NILSSON' 1963, som undersøkte melken fra 14 forskjellige leverandører i Alnarp med hensyn på løpningsevne og myseavgang fra koagelet.

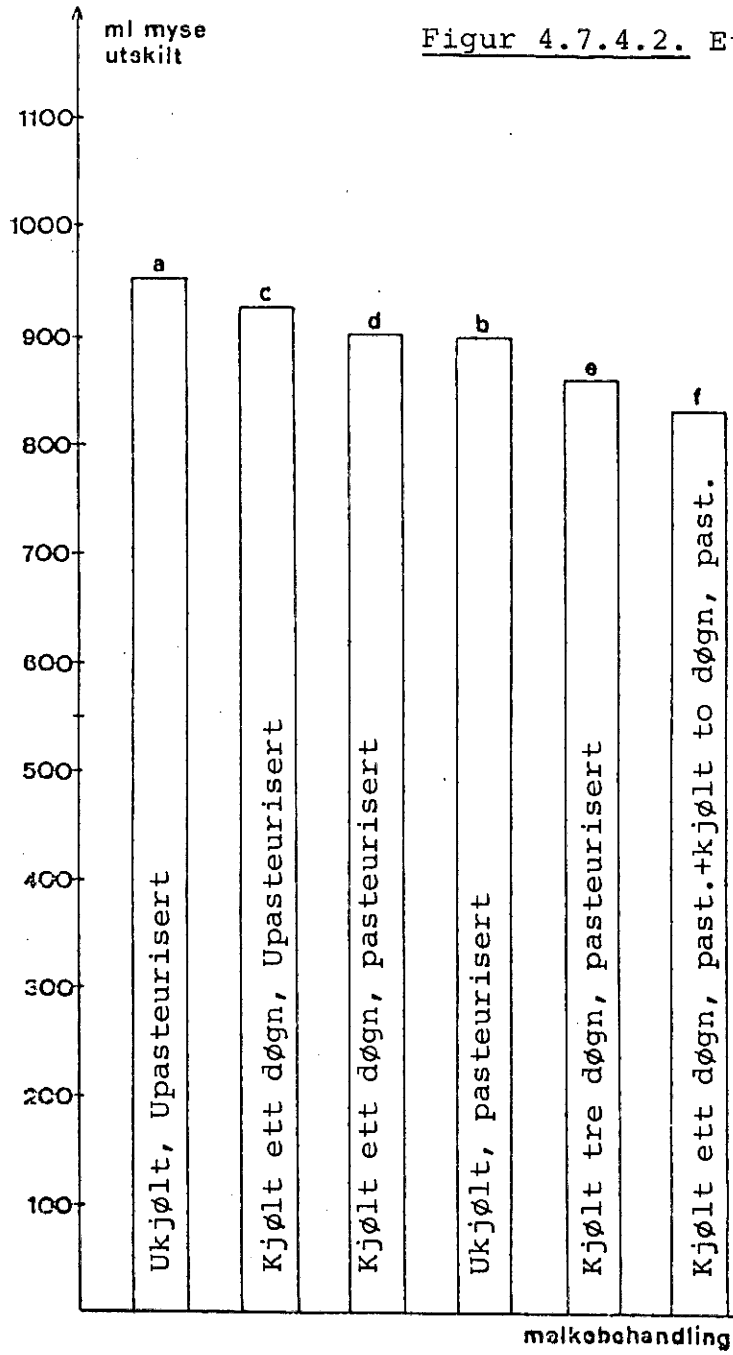
Figur 4.7.4.1. viser mysemengden 10 min etter skjæring. Som det går frem av denne var det store forskjeller i synereseegenskapene mellom besetningene. En fant imidlertid ingen sammenheng mellom koagulasjonstiden og myseavgangen. Forskjellen i mysemengde ved slutten av røringsperioden (etter 35 min) var også relativt mindre (Maksimum 617 og minimum 557 ml fra 700 ml melk).



Figur 4.7.4.1. Forskjeller i myseavgivningsevne i melk fra forskjellige besetninger.

NILSEN, 1981 undersøkte hvordan kjøling og pasteurisering virket inn på gelets evne til å avgi myse. Pasteurisering av både fersk og kjølelagret melk virket negativt inn på synereseegenskapene, figur 4.7.4.2. Gelets evne til å avgi myse var signifikant dårligere enn i fersk melk på forskjellige tidspunkter under røringsperioden.

BORG & NILSSON fant også at pasteuriseringen av melken reduserte myseavgangen, mens effekten av kjøling var mindre og usikker når det gjaldt denne egenskapen.



5. Spørsmål til oppsummering av "Melkens løpning".
1. Hvilke fire hovedtyper av kasein har man og hva er de viktigste forskjeller mellom dem?
 2. Hva forstår en med et "kaseinmonomer" og hvor stort (tungt) er dette for de respektive kaseiner?
 3. Hvor stor (tung) er en gjennomsnitts-kaseinmicelle?
 4. Hvor og hvordan syntetiseres kaseinene?
 5. Hvordan forestiller du deg oppbyggingen av kaseinmicellen og hvilke bindinger antas å stabilisere strukturen?
 6. Hvordan kan forholdet mellom kaseintypene ha betydning for micellestørrelsen?
 7. Hvordan virker melkesaltene på micellestørrelsen?
 8. Hvilken innvirkning har micellestørrelsen på stabiliteten av systemet/løpningsevnen og gelets oppbygging?
 9. Hva er forskjellen på syrefelling og løpning av kaseinet?
 10. Hva forstås med løpens spesielle og generelle effekt på kaseinet?
 11. Hvilke faktorer har størst betydning for enzymfasen i løpningsprosessen?
 12. Hvilke faktorer har avgjørende betydning for koagulasjonsfasen?
 13. På hvilke måter kan man studere de to faser adskilt?
 14. Hvor stor er Q_{10} for de to prosessene?

15. Hvilke løpepreparater er anvendelige til tradisjonelle oster og hvorfor?
16. Hvor stort (tungt) er enzymproteinet hos chymosin?
17. Hvordan aktiveres chymosinogen til chymosin?
18. Hvilke fysisk/kjemiske effekter har man av melkens kjølelagring og hvordan virker dette inn på løpnings-
evnen?
19. Hvilke fysisk/kjemiske effekter har man av melkens varmebehandling og hvordan virker dette på løpnings-
egenskapene?
20. Kombinasjon av kjølelagring og varmebehandling kan gi
noe motstridende virkninger. Hvorfor?
21. Hvordan virker følgende faktorer inn på løpningsevnen?
 - a) Kalsiumkloridtilsetning?
 - b) Vanntilsetning?
 - c) Konsentrering av melken?
 - d) Homogenisering?
 - e) Tilsetning av serumproteiner?
 - f) Syrning?
22. Hvorfor begrenses valgmuligheten til variasjon av løpe-
mengden ved praktisk ysting?
23. Hvilke prinsipper anvendes ved bestemmelse av koagel-
fasthet?
24. Hvordan virker følgende faktorer inn på synereseegen-
skapene:
 - a) Syrningen?
 - b) Temperaturen?
 - c) Skjæringen?
 - d) Røringen?

