Effekt av 3 ulike gjær på dannelse av smak og aromakomponenter i blåmuggost

Three species of yeast: The effects on the formation of flavor componentes in blue cheese

Lars Udahl

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap
Masteroppgave 30 stp. 2012

Forord

Denne oppgaven ble til etter eget ønske om å jobbe med blåmuggost, og ideen til problemstillingen kom fra Roger K. Abrahamsen. Oppgaven ble påbegynt vårsemesteret 2010. All produksjon av ost og analyse av osten skjedde på Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB) på Ås, ved Institutt for Kjemi Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM). Oppgaven ble gjennopptatt og avsluttet vinteren 2012. TINE SA leverte melk, innpakkingsmateriale, løpe til osten, og de gav verdifull veiledning i produksjon av blåmuggost.

Jeg er dypt takknemlig for all hjelp jeg har fått fra mine veiledere Roger K. Abrahamsen og Siv B. Skeie. De har stilt støttende opp fra begynnelse til slutt, og har kommet med svært nyttige tilbakemeldinger.

På IKMB fikk jeg praktisk hjelp av Arnold Olsen og Geirfinn Lund til produksjon av ost på pilotanlegget. Tusen takk for all hjelp. På laboratoriet ble jeg hjulpet med teknisk utstyr, analysemetoder, kjemikalier og dyrkingsmedier. Takk til alle som jobbet der: Kari Olsen, May Aalberg, Tone Molland og May-Brit Abrahamsen.

Jeg ønsker å takke alle som har hjulpet meg med drift av gården mens jeg har jobbet med oppgaven. Mange av dere har brukt mange timer i fjøset og på jordet. Både under gjennomføring av forsøkene og under skrivearbeidet, har deres hjelp vært en forutsetning for at jeg har kunnet jobbe med denne oppgaven. Jeg vil også takke min familie for all støtte.

Ås, 14. mars 2012

Lars Udahl

Sammendrag

I denne oppgaven ble effekten av gjær i blåmuggost undersøkt med fokus smak og produksjon av flyktige aromakomponenter. Blåmuggsot ble produsert og tilsatt gjær. 3 gjærtyper ble brukt under forsøket, disse ble sammenlignet med kontrollost. Gjærtypene var: *Debaromyces (D.) hansenii*, *Kluyveromyces (K.) marxianus* og *Saccharomyces (S.) cerevisiae*. Ostene ble analysert kjemisk, mikrobielt og sensorisk. Vaskingen hadde ingen vesentlige effekter i osten og dens kjemiske sammensetning. Sensorisk analyse gav ingen signifikante utslag, men dette skyldtes trolig metodikken. De kjemiske resultatene viste klare forskjeller. To gjærtyper *Saccharomyces cerevisiae* og *Debaromyces hansenii* skilte seg tydelig ut fra konrollosten med hensyn til dannelse av aromakomponenter. *Kluyveromyces marxianus* skilte seg svakt fra konrollosten, ved en litt kraftigere proteolyse enn kontrollosten. *Saccharomyces cerevisiae* hadde økt produksjon av flyktige aromakomponenter, trolig gjennom å stimulere vekst av *Penicillium (P.) roqueforti*, en tidligere kjent egenskap til *Saccharomyces cerevisiae*. Denne forskjellen i dannelse av aromakomponenter var den mest fremtredende i oppgaven. *Debaromyces hansenii* hadde svakere aromakomponentproduksjon sammenlignet med alle andre oster i forsøket. Dette skyldtes mest sannsynlig, en tidligere kjent evne, til å hemme *Penicillium roqueforti*, ostens viktigste produsent av smak.

Abstract

In this paper the influence of yeast on the flavor in blue cheese was investigated. Under the production, the cheese was added 3 species of yeast: D*ebaromyces (D.) hansenii*, *Kluyveromyces (K.) marxianus* og *Saccharomyces (S.) cerevisiae*. Chemical and microbiological analyzes of the cheese was carried out, along with sensory testing. Washing of the cheese had no relevant effect on the aroma component production. The sensory testing gave no results, most likely since a wrong method of testing was being used. Chemically, several significant differences was found. *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaromyces hansenii* had opposite effects on the cheese-ripening. *Kluyveromyces marxianus* had a minor increase in proteolytic activity. *Saccharomyces cerevisiae* had a clearly higher production of flavor components compaired to the control cheese. This is most likely due to a formerly known interaction with *Penicillium (P.) roqueforti*. With the result that *P. roqueforti*, gets increased growth and flavor protuction. *Debaromyces hansenii* had weaker development of flavor components, most likely due to inhibition of *P. roqueforti*, a formerly known effect of this yeast.

Innholdsliste

1. Innledning....1
2. Teori....2
2.1 Gjær....2
2.2 Debaryomyces hansenii....2
2.3 Kluyveromyces marxianus....3
2.4 Saccharomyces Cerevisiae....4
2.5 Gjær i blåmuggost- forekomst og kilder....5
2.6 Effekt av gjær i meieriprodukter....5
2.7 Nedbryting av ost....6
2.7.1 Lipolyse....6
2.7.2 Proteolyse....8
3. Materialer og metoder....11
3.1 Forsøksdesign....11
3.2 Produksjon av ost....13
3.2.1 Melkebehandling....13
3.2.2 Ysting....13
3.2.3 Forming av ost....14
3.2.4 Lager, salting, prikling og pakking....14
3.3 Mikrobielle analyser....15
3.4 Kjemiske analyser....16
3.4.1 pH-verdi....16
3.4.2 Tørrstoff....17
3.4.3 Analyser av Nitrogen holdige stoffer....17
3.4.4 Organiske syrer....18
3.4.5 Flyktige aromakomponenter....19
3.4.6 Fettinnhold....20
3.4.7 Saltinnhold....20
3.5 Sensoriske analyser....21
3.5.1 Smak....21
3.5.2 Synlig muggvekst....23
3.6 Databehandling og statistikk....23
3.6.1 ANOVA....23
3.6.2 Prinsipal komponent analyse....25
4. Resultater....26

4.1 Statistiske resultater....26
4.1.1 Variansanalyse av dager gammel 60 ost....26
4.1.2 Variansanalyse av ost yngre enn 60 dager....27
4.1.3 PCA....30
4.2 Mikrobiologiske analyser....33
4.3 Kjemiske resultater....36
4.3.1 pH....36
4.3.2 Tørrstoff....37
4.3.3 Vann i fettfri ost....38
4.3.4 Salt....38
4.3.5 Salt i ostens vann....39
4.3.6 Orotinsyre....40
4.3.7 Pyrodruesyre....41
4.3.8 Melkesyre....42
4.3.9 Eddiksyre....43
4.3.10 DL-Pyroglutaminsyre....44
4.3.11 Ikke-protein Nitrogen....45
4.3.12 Forhold mellom peptider + aminosyrer og ikke-protein Nitrogen....46
4.3.13 Fett....47
4.3.14 Acetaldehyd....48
4.3.15 Etanol....49
4.3.16 Aceton....50
4.3.17 2-propanol....51
4.3.18 2-metyl-propanal....52
4.3.19 Diacetyl....53
4.3.20 N-pentan....54
4.3.21 3-metyl-butanal....55
4.3.22 2-metyl-butanal....56
4.4 Sensoriske analyser....57
4.4.1 Synlig muggvekst....57
4.4.2 Smak sensorisk....58
5. Diskusjon....59
5.1 Prinsipalkomponentanalyse....59
5.2 Mikrobiologiske analyser....60
5.3 Kjemiske analyser....62

5.3.1 pH....62
5.3.2 Tørrstoff....62
5.3.3 Salt....63
5.3.4 Salt i ostens vann....63
5.3.5 Orotinsyre....64
5.3.6 Pyrodruesyre....64
5.3.7 Melkesyre....64
5.3.9 DL-Pyroglutaminsyre....65
5.3.10 Ikke-protein Nitrogen....66
5.3.11 Forhold mellom peptider + aminosyrer og ikke-protein Nitrogen....66
5.3.12 Fett....67
5.3.13 Acetaldehyd....67
5.3.14 Etanol....68
5.3.15 Aceton....69
5.3.16 2-propanol....70
5.3.17 2-metyl-propanal....70
5.3.18 Diacetyl....71
5.3.19 n-Pentan....71
5.3.20 3-metyl butanal....71
5.3.21 2-metyl butanal....72
5.4 Sensoriske analyser....72
5.4.1 Synlig muggvekst....72
5.4.2 Smak....73
5.5 Samlet vurdering av resultatene....75
5.6 Videre undersøkelser....77
6. Konklusjon....77
Referanser....78

1. Innledning

I studier av blåmuggost blir gjær ofte funnet, og flere av studiene har vist at det kan finnes interaksjoner mellom gjær og andre mikroorganismer i osten. Gjær kan påvirke mikroorganismer i ost på tre måter, enten ved å hindre eller redusere vekst av tilsatte mikroorganismer, hindre eller redusere vekst av uønskede mikroorgamisner, eller påvirke kjemisk sammensetning gjennom fermentering, proteolyse og lipolyse av osten. (Jakobsen & Narvhus, 1996)

Det finnes svært mange typer gjær hos ulike blåmuggostprodusenter. Det er allikevel en del gjærarter som går igjen. For eksempel ble *Debaromyces hansenii* og *Candida (C.) famata* (imperfekt form av *D. hansenii*) funnet i gjentatte studier av blåmuggost. En studie av *Saccharomyces cerevisiae* fant grunn til å undersøke potensialet for dannelse av aromakomponenter hos denne arten. (Hansen & Jakobsen, 2001)

Idéen til denne oppgaven kom fra Roger K. Abrahamsen, som har hatt kontakt med TINE avdeling Selbu, som produserer blåmuggost. I den forbindelse ble det stilt spørsmål om hvilken effekt gjæren har på blåmuggost, og om hvorvidt gjæren kan ha en positiv innvirkning på ostens smak.

Produksjonen av ost tok utgangspunkt i en resept overlevert fra TINE meieriet Selbu. Det ble også gjennomført en studietur til Selbu for å se produksjonen i praksis. Ønsket var at resultatet skulle være i størst mulig grad overførbare og nyttige med henhold til TINEs produksjon.

Hensikten med oppgaven er å se på om utvalgte gjær, tilsatt vasket og uvasket blåmuggost, har målbare effekter på kvaliteten generelt, og aromakomponter spesielt, til moden ost. Samt undersøke om eventuelle slike effekter vil kunne bidra til at smaksopplevelsen av osten blir endret markant mot en sterkere og mer intens smak.

2. Teori

2.1 Gjær

Gjær er eukaryote encellede sopper, mange av typene hører til slekten Ascomycetes. De fleste gjær er fakultativt aerobe og vokser derfor best ved tilgang på oksygen. De fleste eukaryote celler har mitokondrier, i disse skjer det oksidativ fosforylering som omdanner NADH og FADH2, med energi fra sitronsyresyklusen og β-oksidasjon av fettsyrer, til ATP (Champe et al., 2005, s. 81). Formering av gjær skjer stort sett ved knoppskyting, men enkelte gjær kan danne filamenter. Filamenter kan gi egenskaper gjæren ellers ikke har. Noen typer gjær har kjønnet formering. Hapolid gjær har ett sett kromosomer, mens dipolid gjær har to kopier av hvert kromosom i hver celle. Hver gjær har to typer (kjønn) hapolide gjærceller kalt a og α. Typen a kan kun formere seg sammen med α og omvendt. Noen hapolide gjærceller kan omdanne seg til diploide celler. Dette skjer ved at cellene fusjonerer, før funksjon mellom cellekjernene. Både dipolide og hapolide celler formere seg ved knoppskyting. Dipolide celler kan også formere seg med mieose, der ascus dannes, og som igjen lager 4 hapolide ascosporer. (Madigan et al., 2006, s. 449,457,469–473) Noen sopper har dobble navn, imperfekte sopp har eget navn og er ukjønnede utgaver av andre (kjønnede) sopper. Imperfekt sopp kan ha mistet evnen til å formere seg kjønnet. Imperfekt sopp lever ofte i andre omgivelser og kan se forskjellig ut sammenlignet med sine kjønnede slektninger. («Imperfekte sopper», 2012)

2.2 Debaryomyces hansenii

Debaryomyces hansenii ble først isolert fra sjøvann, men finnes i mange miljøer med lav vannaktivitet. Og i produkter som ost, kjøtt, vin, øl, bær, frukt, jord og søte matvarer. Det er to typer *D. hansenii*, var. *fabryi* og var. *hansenii*, og det som skiller dem er maksimal vekst temperatur. *D. hansenii* er perfekte hapolid gjær som reproduseres vegetativt ved knoppskyting. *D. hansenii* danner noen ganger pseudomycelum. (Breuer & Harms, 2006) *Candida famata* er en underart av *D. hansenii*. (Nishikawa et al., 1996)

Debaryomyces hansenii kan vokse i salte omgivelser, opp til 4.0 M (Breuer & Harms, 2006). *D. hansenii* er mye brukt som eksempel for demonstrasjon av osmotoleranse hos mikroorganismer. I moderat salte omgivelser, 1.0 M, økes respirasjonen sammenlignet med vekst i mindre salte omgivelser.(Sánchez et al., 2008) Og gjærens metabolisme endres slik at gjæren også brukter fermentering for å skaffe seg nok energi i tilstrekkelig tempo. (Calahorra et al., 2009) Når *D. hansenii* dyrkes med stor tilgang til oksygen, forbrukes mindre glukose til fermentering og respirasjon, sammenlignet med *Saccharomyces Cerevisiae*. Ved liten tilgang på næringstoffer foretrekker *D. hansenii* respirasjon framfor fermentering, men etanolproduksjonen blir ikke stoppet helt. Der er enzymet P-fruktokinase som begrenser hastigheten til glykolysen til *D. hansenii*. (Sanchez et al., 2006) Vekst av *D. hansenii* ble inhibert av atmosfære med 25 % CO_2 og 0,3 % O_2. (Tempel & Nielsen, 2000) I en studie av gjær isolert fra sjøvann vokste og formerte ulike varianter av *D. hansenii* seg med et minimumstemperaturområde fra 6 °C til 8 °C. (Norkrans, 1966) Under gode forhold kan *Debaryomyces hansenii* vokse i omgivelser med pH 3-10, mens ved 10 °C og høy vannaktivitet er veksten begrenset, hvis pH ikke er mellom 4 og 6 (Norkrans, 1966). Produsenten av D. hansenii (LAF-3) hevder at deres stamme av D. hansenii vokser godt på 12 °C. (Chr Hansen A/S, 2011a)

I *Candida famata* isolert fra saltlake, brukt til salting av blåmuggost, ble det funnet at denne gjæren var lipolytisk og forbrukte laktose, glukose, galaktose, melkesyre og sitronsyre. Noen av stammene produserte et brunlig pigment. Gjær som ble testen i studien, viste ikke proteolytisk aktivitet. (Tempel & Jakobsen, 1998) Produsenten av LAF-3 skriver i sin produktinformasjon at gjæren skal ha aminopeptidaseaktivitet, som skal kunne hindre bitter smak i osten. (Chr Hansen A/S, 2011a)

2.3 Kluyveromyces marxianus

Kluyveromyces marxianus har blitt isolert fra en rekke habitater og produkter som blant annet: Druer, kloakk fra sukkerfabrikk, råtnende løv fra planten *Agave sisalana*, hirseøl, maismel, astmatisk hoste og melk fra kyr med jurbetennelse. *K. marxianus* og slekten *Kluyveromyces* har gjennomgått en rekke navnendringer fra arten ble funnet i 1888. Nå er arten *K. marxianus*

utgangspunktet for navngivingen for slekten *Kluyveromyces* som har 6 arter. Gjæren formeres ved knoppskyting (Pessione et al., 1990). Effekten av *Kluyveromyces marxianus* har blitt studert på mange substrater, men få studier har undersøkt karbonbalanse og fysiologi. For denne gjæren trenger ikke pH være høy, en studie av Sinigaglia et al. (1998) viste pH-optimum til å være 3,5, og minimal pH til å være 2,5. Det ble påvist at *K. marxianus* hadde god produksjon av insulinase på medier med pH 3,5 (Kalil et al., 2001). Minimal vannaktivitet for *K. marxianus* er 0,922, og temperaturområdet for gjæren er 2-45 °C med optimal temperatur på 28 °C (Sinigaglia et al., 1998). *Kluyveromyces marxianus* er fakultativt anaerob men kan ikke vokse helt uten oksygen. (Fonseca et al., 2008)

2.4 Saccharomyces Cerevisiae

Gjæren *Saccharomyces cerevisiae* er også kjent som bakegjær, og som toppgjær i ølprodukjson. Denne arten er en av de mest kjente eukaryote artene, og det er definert mange hundre stammer (Legras et al., 2007). Stammene kan ha tildels svært ulike fenotyper innenfor krav til miljø, ulik evne til fermentering, ulik knoppskyting, osmotisk sensitivitet. (Hampsey, 1997) *S. cerevisiae* er ofte brukt som modellorganisme når formering av gjær skal forklares. *S. cerevisiae* har både aseksuell og seksuell formering (Madigan et al., 2006, s. 457). Det er vanskelig å isolere *Saccharomyces cerevisiae* fra naturen og fra planter. De fleste vingjær er domestiserte og kommer fra kjellere. Det er funnet stammer av *S. cerevisiae* i vin og brød, frukt, ost og fermenterte melkeproduker og ørrettarmer. (Legras et al., 2007)

Saccharomyces cerevisiae har evnen til å omdanne glukose svært raskt sammenlignet med *D. hansenii*. Ved mangel på oksygen dannes etanol, men ved fri tilgang på oksygen dannes ikke etanol (Sanchez et al., 2006). Under gode forhold kan noen stammer av *Saccharomyces cerevisiae* tåle saltkonsentrasjoner ned til 1,7 M (Breuer & Harms, 2006). I en studie av Almagro et al. (2000) ble det hevedet at ved 8 °C vokste *S. cerevisiae*, mens vekst var ikke var mulig ved denne temperaturen når Na^+ eller K^+ var tilsatt i konsentrasjonen 0,5 M. Maksimumstemperatur for *S. cerevisiae* var 48 °C. *Saccharomyces cerevisiae* kan vokse ved pH ned til 2,5, men blir påvirket av konserverende syrer som eddiksyre, med 10 gl^{-1} eddiksyre er minimums-pH 4,5 (Taherzadeh et al., 1997).

2.5 Gjær i blåmuggost- forekomst og kilder

Det er godt kjent at det forekommer gjærvekst i blåmuggost, og mange ulike arter er funnet, blant annet: *Debaryomyces hansenii* (Besancon et al., 1992, Hansen & Jakobsen, 2001, Roostita & Fleet, 1996), *Kluyveromyces marxianus* (Roostita & Fleet, 1996), *Kluyveromyces lactis* (Álvarez-Martín et al., 2007), *Saccharomyces Cerevisiae* (Hansen & Jakobsen, 2001, Roostita & Fleet, 1996). Flere av studiene viser at antallet gjær i blåmuggost kommer opp i konsentrasjoner rundt log 6 til log 8 av kolonidannende enheter (kde) (Roostita & Fleet, 1996, Tempel & Jakobsen, 1998). Selv om gjær kan påvises i konsentrasjoner opp til log 4 i vanlig rå melk levert til Danablu produksjon (Tempel & Jakobsen, 1998), dreper pasteurisering gjæren (Engel et al., 1994). Til tross for at melkeprodukter har vært pasteurisert kan gjær bli isolert fra mange slike produkter (Fleet & Mian, 1987). Saltlaker har vært undersøkt av van den Tempel & Jakobsen (1998), og det ble funnet gjær i staltlakene til 4 av 4 undersøkte meierier med produksjon av Danablu. *Candida famata* var den mest dominerende arten. I en studie av saltlaker utført av Seiler & Busse (1990) ble det isolert 365 ulike typer gjær fra 11 osteprodusenter. Osteprodusentene lagde myke, halvfaste og faste oster. Videre viste studien at *D. hansenii* dominterte i mange av lakene, og at *Kluyveromyces marxianus* og *Saccharomyces cerevisiae* også dominerte i flere saltlaker, selv om gjærfloran var spesifikk for hvert meieri.

2.6 Effekt av gjær i meieriprodukter

Gjær kan påvirke meieriprodukter generelt positivt. De kan hindre eller redusere vekst av uønskede organismer, og de kan redusere eller hindre vekst av tilsatte mikroorganismer, samt påvirket produktet igjennom en interaksjon mellom seg og andre mikroorganismer (Narvhus & Gadaga, 2003). Gjær kan påvirkte produktet direkte, siden gjær kan være lipolytisk og svakt proteolytisk, og gjær forbruker ulike sukker typer og produserer nedbrytningsprodukter, og på den måten endrer gjær dermed osten kjemisk. I meieriprodukter er gjær ofte sett på som et problem som kan redusere holdbarheten, som Fleet & Mian (1987). En produktfeil som gjær kan lage, er gjærsmak. Gjær er viktig i produksjonen av rødkittost, siden gjær er en vital del som forbereder skorpen for vekst av *Brevibacterium linens* ved å heve pH gjennom nedbrytning av

melkesyre. (Seiler & Busse, 1990) Produsenten av gjæren brukt i forsøket, informerer om at gjæren som selges, påvirker i noe forskjellig grad; smak, karbondioksidproduksjon, reduksjon av bitter smak i osten, og sukkerrester i osten. *Debaromyces hansenii* skal gi en mild og smøraktig smak, mens *Kluyveromyces marxianus* gir en sterk gjæraktig og fruktig smak. LAF-3 (D. hansenii) skal også konkurrere med uønskede mikroorganismer og heve pH på ostens overflate. LAF-4 (*Kluyveromyces marxianus*) er produsert for å bidra til smaksutvikling i ost (Chr Hansen A/S, 2011b). (Chr Hansen A/S, 2011a)

2.7 Nedbryting av ost

Smak i ost kommer fra aromastoffer som i hovedsak blir dannet under nedbryting av proteiner og fett under modning av osten. Nedbrytingen skjer enzymatisk og kjemisk. Proteiner brytes ned og danner aminosyrer, mens fett hydrolyserer og danner frie fettsyrer. Både frie fettsyrer og aminosyrer brytes videre ned til aromakomponenter. (Molimard & Spinnler, 1996) Nedbryting av fett er hovedkilden til smak i blåmuggost. I dansk blåmuggost er det funnet opp til 25% frie fettsyrer av totalt fett. Fett i ost danner en fett-protein-vann-fase som gjør at kjemiske reaksjoner kan skje. I denne fasen kan aromakomponenter oppstå, og fettet kan ta opp fettløselige smaksstoffer produsert i den vannløselige fasen i osten. (Collins et al., 2003)

2.7.1 Lipolyse

Fett kan brytes ned til molekyler som har sterk smak. Lipolyse beskriver omdanningen fra fettkuler i melk til aromakomponenter i ost. Det er mellom 3,5 og 5 gram fett pr 100 ml melk fra storfe. I melk finnes fett som triglyserider (ca 98 %), som stort sett ligger i fettkuler, og mindre mengder fett finnes som frie fettsyrer, diglyserider og monoglyserider. Fettkulene er innkapslet i en fettkulemembran som holder fettkulen flyende i melk. Membranen er dannet av fosfolipider, proteiner, glykoproteiner, triglyserider, kolesterol, enzymer og andre molekyler. Fettkulemembranen blir skadd under homogenisering, og lipolysehastigheten kan bli svært stor. Størrelsen til fettkulene varierer mye. Fettsyresammensetningen til melkefett av storfe er

kompleks. De mest vanlige fettsyrene er stearinsyre og palmininsyre. Lengden på de andre fettsyrene spenner seg fra $C_{4:0}$, til $C_{18:3}$, og det meste av fettet er mettet. Smaksdannelse i ost skylles ikke oksidering av fettsyrer, men harsk smak kan skylles oksidering. Ulike lipaser kan kutte esterbånd som holder fettsyrer på triglyseridet. Frie fettsyrer kan i seg selv bidra til ostens smak, og kortere fettsyrer har sterkere smak enn lange fettsyrer. Smaken av friefettsyrer er viktig i harde italienske oster. Heksansyre har en pikant smak som kan minne om smaken i blåmuggost. Lipasene som finnes i ost, kan komme fra melk, løpe, tilsatte kulturer og NS-bakterier. Melkesyrebakterier bidrar mest til lipolysen i cheddar og norvegia-type oster, mens i muggoster som for eksempel camembert og roquefort, er det muggsopp i slekten *Penicillium* spp. som bidrar mest til lipolysen. *Penicillium roqueforti* har to ulike lipaser. Melkesyrebakterier har kun intracellulære lipaser, og effekten av celleautolyse og påvirkning av lipolyse er ukjent. Forskjeller i lipolyitske egenskaper hos melkesyrebakterier ser ut til å være stammespesifikke. For eksempel de ulike stammene AM2 og HP av *Lactococcus (L) lactis* subsp. c*remoris* danner ulike nivåer av metylketoner av ulike lengder. AM2 stammen lager fettsyrer med et oddetalls karbonatomer, mens HP stammen lager fettsyrer med et paret antall karbonatomer. *(Collins et al., 2003)*

Frie fettsyrer kan brytes ned til smaksstoffer som metylketoner, laktoner, estere, aldehyder, alkaner og sekundære alkoholer. Metylketoner blir dannet av mugg, som *P. roqueforti,* og metylketoner er spesielt viktige smakskomponeter fra fett i blåmuggost. Metylketoner i blåmuggost kan brukes som energikilde av *P. roqueforti* og brytes ned til CO_2 ved behov. De metylketonene som gir mest smak i blåmuggost er 2-heptanon og 2-nonanon, grenseverdiene for å kjenne smak av metylketoner er generelt små, og smaken av disse stoffene kan minne om "sopp", "mugg" og "blomster". Det er derimot ikke sikkert at fettsyrer er eneste kilde til metylketoner. Under dannelse av metylketoner hos *Penicillium* spp. brytes fettsyrer ned ved β-oksidasjon. Optimal pH for dannelse av metylketoner er pH 5-7, i mycel hos *P. roqueforti*, det samme pH område moden ost har. (Collins et al., 2003)

Det finnes mange ulike estere i ost, og disse dannes når fettsyrer reagerer kjemisk med alkoholer. Estere kan gi ost en fruktsmak. Metylketoner kan brytes ned enzymatisk til sekundere alkoholer som; 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, *P. roqueforti* er derfor indirekte produsent av disse alkoholene. Laktoner blir stort sett produsert kjemisk av melkefett sammen med varme og vann,

men *P. roqueforti* kan danne $C_{12:0}$ laktoner. Økt lipolyse er trolig årsak at det finnes mer laktoner i blåmuggost sammenlignet men cheddarost, men smaken av laktoner er ikke dominerende i blåmuggost. Aldehyder produseres stort sett gjennom proteolyse. Enkelte mikroorganismer kan danne acetaldehyd fra aminosyrer, men rettkjedede aldehyder blir produsert igjennom β-oksidasjon. (Collins et al., 2003)

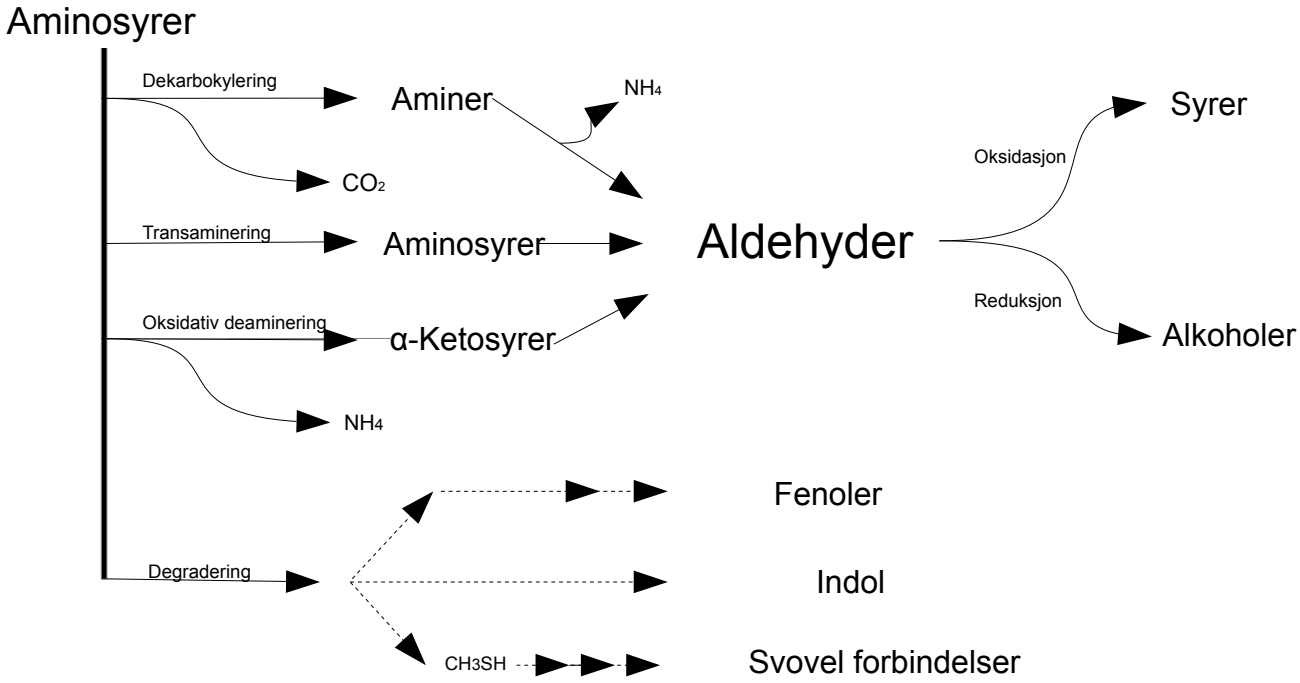
2.7.2 Proteolyse

Under modning av ost blir proteiner brutt ned gjennom komplekse prosesser. Proteolysen har flere effekter på osten. Når proteinnettverket i ostemassen brytes ned, endres teksturen, pH stiger og vannaktiviteten senkes. Produktene som blir dannet under nedbrytingen gir smak direkte, men produktene kan også brytes videre ned igjennom; deaminering, dekarboksylering, transaminering og andre reaksjoner. Enzymer katalyserer proteinnedbryting og kan komme fra mange kilder. Løpe og tilsatte proteinaser, melken og tilsattte og ikke tilsatte mikroorganismer. De tilsatte mikroorganismene er melkesyrebakterier og eventuelle tilleggskulturer som *Penicillium roqueforti, Penicillium camemberti, Propionibacterium* spp., *Brevibacterium linens* mf. Ikke tilsatte mikroorgamisner som man finner i ost er blant andre ulike gjær og ulike non-starter melkesyrebakterier (McSweeney & Sousa, 2000, Settanni & Moschetti, 2010, Tempel & Jakobsen, 1998).

Løpe brukes for å koaguler melk til ostemasse. Chymosin er det viktigste enzymet i løpe fra dyr, men løpe består også av andre enzymer; som ulike pepsiner. Chymosin spalter κ-kasein, mellom de to animosyrene Phe_{105} og Met_{106}. Under modning av ost, har løpe mange effekter på proteolysen, men graden av påvirkning på ostenes proteolyse varierer, i for eksempel sterkt varmebehandlede oster er effekten liten. I melk er det enzymer fra somatiske celler og et plasminsystem. Plasmin kan bryte ned kasein til polypeptider. Plasmin kan bli påvirket av både plasmin inhibitorer og plasminogen. På sin side kan plasminogen bli påvirket av plasminogenaktivatorer, som igjen kan bli inhibert av plasminogenaktivatorinhibitor. Plasminsystemet bryter ned α_{s2}-kasein og β-kasein. (McSweeney & Sousa, 2000)

Melkesyrebakterier er lite proteolytiske, og i melk vil vekst av melkesyrebakterier til log 9 produsere svært lite frie aminosyrer. I ost bidrar melkesyrebakterier med proteolytiske enzymer etter at bakteriene har lysert og enzymene slippes ut av cellen. På denne måten kan melkesyrebakterier lage en del aminosyrer av proteinet i osten. *Penicillium roqueforti* har flere proteolyse relaterte enzymer. Av disse finnes det ekstracellulære enzymer og bredspektrede enzymer. Konsentrasjon av aminosyrer varierer med typen ost, og er viktige for å gi osten sin karakteristiske smak. (McSweeney & Sousa, 2000)

Produksjon av en rekke kjemiske forbindelser som; ammoniakk, aminer, aldehyder, fenoler, indoler og alkoholer, skyldes nedbryting av frie aminosyrer i ost. Mange av nedbrytingsproduktene er med å gi osten smak sin karakteristiskere smak. (McSweeney & Sousa, 2000) Figur 1 viser generell nedbryting av aminosyrer, figuren er hentet fra McSweeny & Sousa (2000).



Figur 1: Generell nedbrytning av aminosyrer. Hentet fra: (McSweeney & Sousa, 2000)

Det er ikke funnet sammenheng mellom mengde amin i ost og mengden frie aminosyrer, siden aminosyrer er involvert i svært mange reaksjoner. I en studie av blåmuggost fra Tyskland ble det funnet 8 aminer, mens i en studie av camembert ble det funnet mange flere aminer. Aminer blir

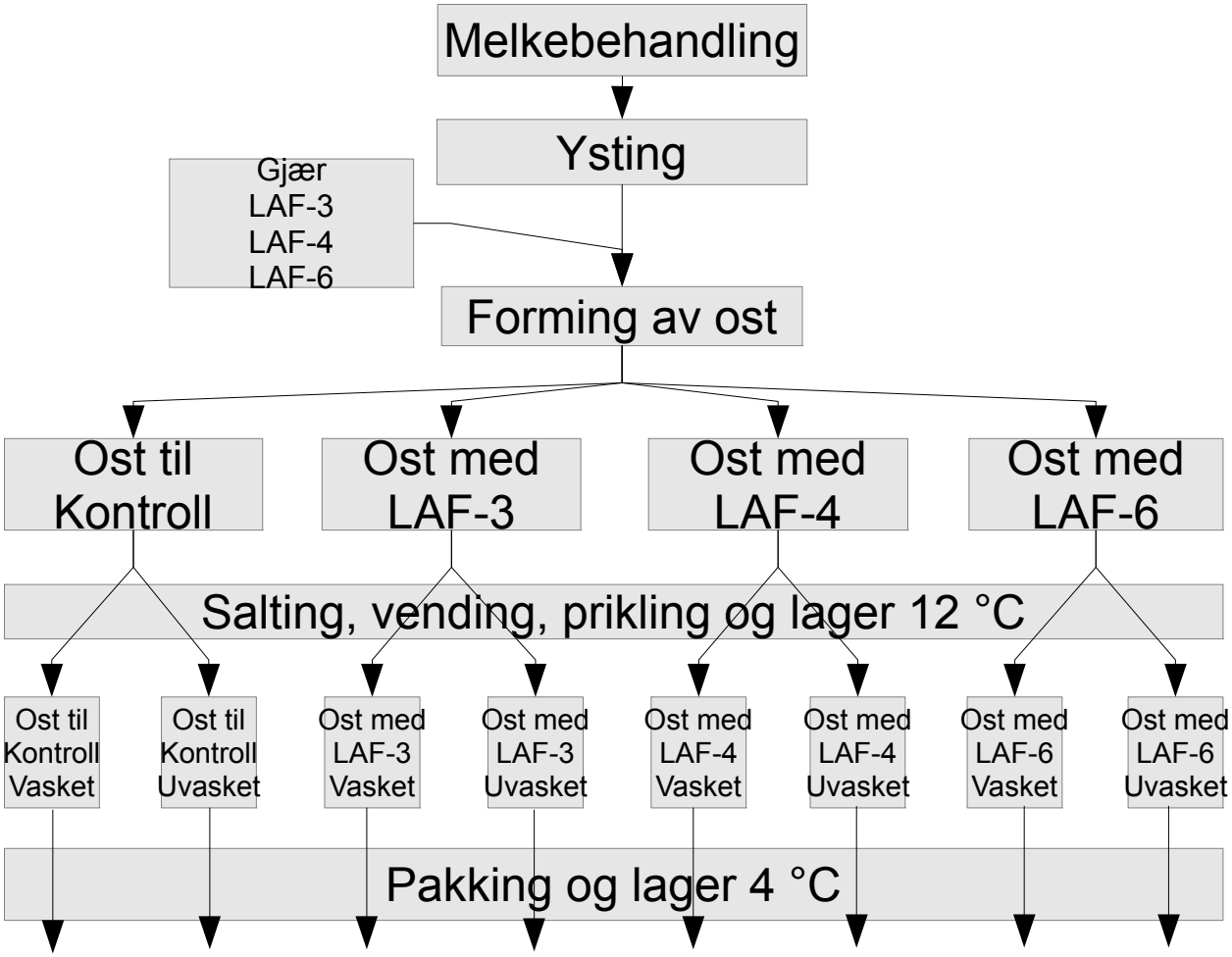
dannet ved dekarboksylering, og de fleste aminene funnet i ost stammer fra aminosyrene Tyrosin og Histidin. (McSweeney & Sousa, 2000)

Under lagring, ved lav pH, omdannes aminosyrer til animer, men ettersom pH øker, omdannes aminer til aldehyd via strecker-reaksjonen. Transaminering kan også produsere aldehyder igjennom et mellomstadium etterfulgt av dekarboksylering eller strecker-reaksjon. Aldehyder er lite stabile og blir rask brutt ned til syrer og alkoholer. Til tross for at aldehyder ikke konsentreres opp i ost, antas det at aldehyder er viktige smakskomponerer i mange oster. Aminosyrene leucin og isoleucin er utgangspunktet for den flyktige aromakomponenten 3-metyl-butanol, mens threonin kan omdannes til acetaldehyd. Gjær kan produsere acetaldehyd når alkoholdehydrogenase er mindre aktiv enn pyrodruesyredekarboksylase. Svovelforbindelsene dannet i ost kommer fra meteonin. α-ketoglutarat som finnes i ost kommer fra glutamat. (McSweeney & Sousa, 2000)

3. Materialer og metoder

3.1 Forsøksdesign

Forsøksdesignet ble utviklet av Lars Udahl høsten 2009, og utført vårsemesteret 2010. Blåmuggost ble ystet, og før ostemassen ble ført over i osteformene ble forsøket splittet i 4 splitt. I 3 av de 4 splittene ble det tilsatt gjær av ulik type. Den siste splitten ble brukt som kontroll ost uten tilsatt gjær. Før pakking ble ostene på nytt splittet i to grupper der en gruppe ble vasket og den andre gruppa ble ikke vasket. Forsøksdesinget er framstilt grafisk i figur 2. Forsøket ble ikke randomisert av praktiske årsaker, og for å redusere faren for krysskontaminasjon av gjæren. All behandling og håndtering av osten skjedde i følgende rekkefølge; kontrollost, ost med *D. hansenii* (LAF-3), ost med K. marxianus (LAF4) og ost med *S. cerevisiae* (LAF-6), med den hensikt å redusere smitte til kontrollosten spesielt, men også å redusere faren for tilfeldig smitte på annen ost. Forsøket ble gjentatt 3 ganger. Gjæren som ble tilsatt var kommersielt tilgjengelig som frysetørket kultur, og produsert av Chr Hansen. Gjæren ble solgt under merkevarenavnene LAF-3 (*Debaromyces hansenii* var. *hansenii*), LAF-4 (*Kluyveromyces marxianus subsp. marxianus*) og LAF-6 (*Saccharomyces cerevisiae*).



Figur 2: Forsøksdesign: Melk ble ystet, ostemassen ble splittet i 4, 3 deler ble tilsatt ulik gjær, 1 del ble kontrollost. Før pakking ble forsøket splittet i 2, der en del ble vasket.

3.2 Produksjon av ost

Ystingen fant sted på UMB, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap sitt pilotanlegg med tilhørende fasiliteter og teknisk personell vinteren 2010. Før ystingen ble det gjennomført prøveysting, der målet var å gjennomgå ystingsprosessen samt å gjennomføre et forsøk med salting for bestemmelse av saltingstid. Melken som ble brukt i forsøket ble levert fra TINE SA.

3.2.1 Melkebehandling

Skummet melk og fløte med 25 % fett ble pasteurisert ved 72 °C i minimum 15 sekunder. Under oppvarming før pasteurisering ble 80 % av fløten homogenisert ved temperatur på 50 °C og 175 bar. Fløten ble fettstandardisert sammen med skummet melk til 5,2 % fett i ferdig ystemelk.

3.2.2 Ysting

Fettstandardisert ystemelk ble temperert til 31,0 °C med feilmarginene +0,3/-0,2 °C i et dobbelt-O-kar, rørehastigheten var satt til 4. Ystemelka ble tilsatt mesofil heterofermentativ DL kultur fra Chr Hansen med navnet FLORA-DANICA. Forhold kultur til melk basert på vekt er 1:8000. Frysetørket blåmuggkultur av typen Penicillium roqueforti ble tilsatt til samme tid i dosen 10ml kultur til 100 liter ystemelk. I 1 liter vann ble 1125g $CaCl_2$-$2H_2O$ løst (kokt), dosen tilsatt ystemelk tilsvarte 34,9 g tørr $CaCl_2$-$2H_2O$ pr 100 liter ystemelk. Kalsiumløsningen ble tilsatt ystemelka sammen med DL-kulturen og muggkulturen. Melka ble rørt i 20 minutter etter bakteriekulturen ble satt til, hele tiden på hastighet 4. Løype ble tilsatt melka: 17,09 gram pr 100 liter. Løypen var av typen 75% chymosin og 25 % bovinpepsin av styrke 1:15000 med 180 ±10 IMCU ml^{-1}. Løypen ble rørt inn i melka i 3 minutter på hastighet 5. Melkas bevegelse ble redusert til et minimum etter omrøringen var ferdig. Forventet koaguleringtid uten røring var 50 minutter. Koagelet ble undersøkt manuelt før skjæring. Skjæringen tok 5 minutter, og hastigheten økte fra 2-4 gradvis igjennom skjæringprosessen. Størrelsen på ostekornene var ca 1 x 1 x 2 cm^3. Tabell 1 viser behandling med røring, henstand og temperaturregulering ostemassen fikk etter skjæring og frem til myseavtapp.

Tabell 1: Ysteprosess etter skjæring av ostemasse til myseavtapp.

Aktivitet	Hastighet røreverk	Tid i minutter	Temperatur i varmekappe
Slutt Skjæring	4	-	31
Henstand	AV	10	31
Røring	3	1	31
Henstand	AV	5	31
Røring	3	1	31
Henstand	AV	5	31
Røring	3	1	31
Henstand	AV	5	31
Røring	3	4	33
Røring	4	6	33
Henstand	AV	20	33
Røring	4	5	33
Henstand	AV	10	33
Røring	4	5	33
Henstand	AV	10	33
Røring	4	5	33
Henstand	AV	10	33
Røring og myseavtapp	4	5	33

3.2.3 Forming av ost

Ved myseavtapp ble ostemassen overført til 4 ulike bakker, hvor 3 av bakkene ble tilsatt ulike gjærtyper, den 4. bakken ble ikke tilsatt gjær. Det var ønskelig å tilsette gjær i konsentrasjonen 10000 celler pr gram ost. Ostemassen ble overført til perforerte osteformer, ostemassen ble ikke presset i formene. Umiddelbart etter siste formen var fylt, ble alle ostene snudd. Ferdig modent ost hadde diameter på 11 cm og høyde på 7 cm.

3.2.4 Lager, salting, prikling og pakking

Osten ble overført til et venderom, der osten ble lagret de første 48 timene, på venderommet var temperaturen 25 °C og luftfuktigheten var svært høy, > 90% relativ luftfuktighet. Osten ble snudd etter 15 min, 60 min, 90 min, 4 timer og 24t. Osten ble tatt ut av form ved 48 timers alder.

Osten ble lakesaltet i 7 timer, og osten ble snudd etter 1, 2 og 3 timer. Saltlaken var mettet og varmebehandlet før bruk. Saltlaken som ble brukt var fra samme kilde. Ostene med ulik gjærtype tilsetning ble hold i adskilte saltingskar. Etter salting ble ostene satt i perforerte plastkasser og overført til lager som hadde temperatur på 12 °C og relativ luftfuktighet > 80 %. Osten ble snudd 3 dager etter ysting. Etter 6 dager ble osten priklet fra begge sider og tørrsaltet. Osten ble snudd i denne prosessen. Under tørrsaltingen ble ost etter ost lagt i bakke med salt, og salt ble strøket rundt osten. Det kunne derfor ikke bli samme mengde salt på hver ost. Osten ble satt tilbake på lageret, der den ble snudd etter 11, 18 og 24 dager etter ysting. Etter 28 dager ble osten pakket. Før pakking ble halvparten av ostene vasket. Innpakkingsmaterialet var original emballasje brukt på Norzola fra TINE. Etter pakking ble osten oppbevart på kjølerom fram til dag 60 etter ysting. På lageret ble det notert ett avvik; lageret sviktet og temperaturen steg til over 18 °C på et tidspunkt. Luta på lageret virket tørr når feilen ble oppdaget. Det er uvisst hvor lengde svikten varte. Feilen ble oppdaget ved 28 dager etter ysting 2, og 14 dager etter ysting 3. Ost fra ysting 1 var på kjølelageret, og ble ikke påvirket av avviket.

3.3 Mikrobielle analyser

Melk, ostemasse og ost (dag 2 til dag 60 etter ysting), ble undersøkt for innhold av gjær. Det ble brukt Dichloran Rose-Bengal Chloramphénicol (DRBC) agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) for påvising av gjær. DRBC agar er godt egnet for påvising av gjær fra blåmuggost (Viljoen et al., 2004). Prøveopparbeidelsen var ulik for melk, ostemasse, ost (overflate) og ost kjerne. Prøvene fra overflaten til osten ble tatt ut ved at en sterilisert ostehøvel skar av en skive, 2-3 mm tykk, fra ostens flate overflate. Fra denne skiva ble 11,000 g ±0,005 g overført til en steril omnimixer. Prøven ble fortynnet med 99ml 2 % NaCitrat vann ved 45 °C. Prøven ble homogenisert i mixeren. Prøvene fra ostens kjerne ble tatt ut ved hjelp av en steril ostesøker, etter at en del av osten ble fjernet med steril kniv. Osten ble homogenisert og fortynnet på samme måte som for prøvene fra overflaten. Ostemassen ble hentet ut under ystinga og ble fortynnet på samme måte til 10^{-1}, men homogenisert i en Stomacker maskin. Melk kunne styrkes ut eller fortynnes uten spesiell prøvebearbeidelse. Etter prøvene var fortynnet og homogenisert, ble de fortynnet ytterligere etter behov opp til 10^{-8} med Ringers løsning. Fortynnet prøve ble

spredt på DRBC-agaren ved hjelp av plateutstryking.

Melk, ostemasse, og ost dag 2 etter ysting, ble undersøkt for vekst av koliforme bakterier ved innstøping på Violet Red Bile Agar (VRBA). Melk ble undersøkt på fortynningene 10^{-0} og 10^{-1}, mens ostemasse og ost ble undersøkt på fortynningene 10^{-1} og 10^{-2}.

3.4 Kjemiske analyser

Prøveuttak til kjemiske analyser ble utført på følgende måte, med mindre annet ikke er spesifisert for den enkelte analyse. En sektor av av en flat ost ble skåret ut som ble beskrevet i IDF (2008a), dvs standarden IDF 50:2008(E) figur A.8. Prøve ble deretter revet og blandet. Prøvene ble oppbevart i en lukket plastpose fram til analysen ble utført. Tid før analyse var opp mot 8 timer.

3.4.1 pH-verdi

pH-verdi ble ikke undersøkt med hjelp av noen standardisert metode, noe den burde ha vært.

pH i fersk ost, opp til 48 timer etter ysting, ble målt ved hjelp av et kalibret pH meter. Elektroden ble satt direkte inn i osten, en liten mengde ionebyttet vann ble tilført rundt elektroden, og pH fikk 120 sekunder til å stabilisere seg. PH målingen ble utført flere ganger på samme ost, og resultatet ble den pH verdi som først ble avlest 3 ganger.

I ost 6, 30 og 60 dager etter ysting ble pH mål ved hjelp av kaliberet pH-meter. Osten ble revet og blandet, en liten mengde ionebyttet vann ble tilsatt prøven. Prøven hadde minimalt 10 minutter med stabiliseringstid. Elektroden ble satt inn i prøven, og pH ble avlest. Avlesing ble gjentatt flere ganger i samme prøve fram til én pH verdi var avlest 3 ganger.

3.4.2 Tørrstoff

Ostens tørrstoff ble undersøkt etter metoden beskrevet i IDF (1982, s. 35–36), som heter IDF Standard 4A:1982. Da ble 5,000 g ±0,5g revet ost nøyaktig veid inn på i et beger av aluminium med kjent vekt. Prøvene sto tildekket i romtemperatur før prøven ble tørket i tørkeskap med 102 °C ± 1 °C, i minst 20 timer. Prøvene ble etter tørking satt i eksikator, for avkjøling før veiing. Det ble utført 3 paralleller for hver ost.

Tørrstoffet ble beregnet ut fra forholdet mellom vekten av prøven etter tørking, og vekten av prøven før tørking, der begerets vekt var trukket i fra for begge prøvene. Forholdet ble ganget med 100 % og oppgitt i % tørrstoff.

3.4.3 Analyser av Nitrogen holdige stoffer

Det ble analysert for flere N-holdige stoffer i osten, ved 4, 30 og 60 dager etter ysting. Det var et mål om å finne innhold av Totalt Nitrogen (TN), Løselig Nitrogen (LN) og TCA løselig Nitrogen (TCA-LN) og forholdene mellom disse. Totalt Nitrogen kan regnes om til rå protein i osten. Løselig Nitrogen ved pH 4,6, viser innholdet av ikke-protein Nitrogen som peptider og aminosyrer. TCA-LN viser innhold av små peptider og aminosyrer.

Totalt Nitrogen ble analysert etter IDF (1986), dvs IDF Standard 20 A: 1986. 12,500 g ± 0,005 g finrevet ost ble veid inn i en omnimixer, og 50 ml 0,5 M trinatriumcitratløsning ved 50 °C ble tilsatt beholderen sammen med 50 ml destillert vann ved 50 °C. Beholderen ble satt i vannbad på 50 °C i 30 minutter, før omnimixeren ble kjørt til massen var homogen (ca 1 minutt ved hastighet 5). Alt innholdet i beholderen ble overført til 250 ml målekolbe. Isopropylalkohol ble brukt for å redusere skummingen. Da løsningen oppnådde romtemperatur, ble kolben tilsatt destillert vann til 250 ml. Denne løsningen ble brukt som grunnlag for TN, LN og TCA-LN prøvene. 50 ml av grunn-løsningen ble overført til en målekolbe og fyrtynnet til 100 ml med destillert vann. 1 ml ble overflørt til merket oppsluttningsrør, og nøyaktig vekt ble notert. Det ble

laget 3 parallelle oppsluttingsrør for hver prøve. For analyse av LN ble ikke løselig protein felt ut ved at grunn-løsningen ble senket til isoelekrisk punkt for kasein (pH 4,67). Dette ble gjort ved at 50 ml 0,564 M HCl, ble tilsatt grunn-løsningen. Utfelt protein ble skilt fra løsningen ved hjelp av filtrering med S & S hvitbåndfilter. 2 ml filtrert LN prøve ble veid nøyaktig i oppsluttingsrør, i 3 paralleller. For prøven med TCA-LN ble det tatt utgangspunkt i 25 ml filtrert LN-løsning, som ble pipettert over til en målekolbe og tilsatt 25 ml 24% triclorideddiksyre (TCA). Løsningen ble lagert ved 4 °C i over 18 timer før den ble filtrert ved hjelp av S & S hvitbåndfilter. 4 ml filter TCA-løsning ble veid nøyaktig inn i oppsluttingsrør. Alle prøvene fra TN, LN og TCA-LN ble behandlet på samme måte etter innveiingen. I oppsluttingsrøret ble en kjeldal tablett og 3 ml konsentrert svovelsyre tilsatt. Tabletten inneholdt 1,5 gram K_2SO_4 og 0,0075 gram Selen. Oppsluttingsrøret ble satt i varmeblokk og kokt ved 420 °C i 60 minutter. Oppsluttingsrørene ble destillert og titrert i en automatisk Kjeltec maskin. Det ble kjørt nullprøver for korrigering av mengde titer. Formlene brukt for utregning av TN, LN og TCA-LN finnes i vedlegg 1. Titreringsvesken var saltsyre 0,05 mol x l^{-1}. Parallellene ble påvirket kraftig rett før og etter skifte av kjemikalier, derfor ble flere resultater forkastet, og det medførte manglende data for enkelte oster. Resultatene ble behandlet, utliggere ble fjernet, og differanse mellom 2 paralleller ble satt til maksimalt verdi ca 10% av laveste verdi. Grensene før paralleller ble strøket, ble satt til TN: 0,2 % Nitrogen (maks, min verdi alle prøvene var 2,16%, 4,43%), LN: 0,01 (maks, min verdi alle prøvene var 0,14%, 0,54%) og TCA-LN: 0,005 % Nitrogen (maks, min verdi alle prøvene var 0,08%, 0,36%).

3.4.4 Organiske syrer

Organiske syrer ble analysert ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography (HPLC) etter metoden beskrevet i Skeie et al. (2008). Der ble 2 gram ost veid inn i et Belcorør og tilsatt 5ml ionebyttet vann, 0,7 ml 0,5 M H_2SO_4, og 20,0 ml CH_3CN. Rørene med innhold ble vendt i en vendemaskin av typen Multimix i 30 minutter, og deretter ble rørene sentrifugert 15 minutter ved 3500 rpm. Med en sprøyte på 10 ml med filter ble supernatanten overført til HPLC-glass og forseglet med septa og plastkork. Prøvene ble analysert med autoinjektor og pumpe fra 200

serien til Perkin Elmer, og LC ovn 101 fra samme produsent. Fra Bio Rad ble det benyttet en forkolonne (30 x 4,6 mm id), og en kolonne (minex HPX-87H, 300 x 7,8 mm id). Mobilfase var 5 mM H_2SO_4, flow var satt til 0,4 ml min^{-1}, kolonnetemperatur var satt til 32 °C. UV-detektor benyttet var fra Perkin Elmer, 200 serie. Standarder ble brukt for kvantifisering. Stoffene som metoden påviste var: Sitronsyre, α-ketoglutarsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, eddiksyre, urinsyre, DL-pyroglutamin syre, maursyre, laktose, glukose og galaktose. I noen av prøvene viste det seg at toppen for galaktose kom ikke når den skulle, derfor er galaktose ikke tatt med i resultatene.

3.4.5 Flyktige aromakomponenter

Det ble brukt Head space gas chromatography (HSGC) for å analysere prøvene for flyktige aromakomponenter. Metoden er beskrevet i Skeie et al. (2008). 10 gram prøve ble veid opp i en headspaceflaske og forseglet med hjelp av teflonbelagt septum og en aluminiumsring. Prøvene ble lagret ved < -18 °C, og tint i kjøpeskap før analyse. Utstyret brukt var: HP 7694 Headspace sampler med 6890 GC-system med flammeionisasjonsdetektor, og interface fra Perkin Elmer i 900 serien, med Whatman 75-32 hydrogengenerator med trykk på 1,6 bar. Ekvilibreringstemperaturen ble satt til 60 °C, manifoldtemperaturen var 70 °C og ekvilibreringstiden var 90 min. 1 ml ble injisert i løp av 30 sekunder, og injiseringstemperaturen var 180 °C. GC-temperaturene økte etter følgende mønster: 33 °C i 1 min, varming til 40 °C i løp av 60 sekunder, 40 °C i 120 sekunder, varming til 70 ° C i løp av 120 sekunder, 70 °C i 2 minutter, varming til 130 °C i løp av 120 sekunder, 130 °C i 3 minutter. Bæregass var N_2, 5,0 ml min^{-1}. CIP-SIL 5 CB GC-kolonne med kolonnelengde på 25 meter ble brukt, indre Ø 0,53 mm, filmtykkelse på 5 µm. Mellom hver prøve ble systemet renset med en prøve vann. Det ble brukt standarder for kvantifisering av resultatene. Resultatene ble sammenlignet med standardene og behandlet med programvaren Total Chrom. HSGC ble brukt for å undersøke ost for disse stoffene: acetaldehyd, etanol, aceton, 2-propanol, n-pentan, dimetylsulfid, 2-metyl-propanal, 1-propanol, diacetyl, 2-butanon, 2-butanol, etylacetat, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanal, 1-butanol, 2-pentanon, 2.3-pentadione, n-pentanal, acetoin, n-heptan, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol.

3.4.6 Fettinnhold

Fettinnholdet i melk ble bestemt ut fra standarden IDF 226:2008(e), Gerbers metode (IDF, 2008b). Fettinnholdet i osten ble bestemt ut fra standarden fra IDF Standard 222:2008, van Gulliks metode (IDF, 2008c).

3.4.7 Saltinnhold

Saltinnholdet i osten ble målt med hjelp av *Model 926 Chloride Analyser*. Prøven av ost ble tatt ut på følgende måte: En liten sektor av osten ble skåret ut, ca 15 gram, som beskrevet i IDF Standard 50:2008(E) figur A.8, og overført til, en homogenisator, og tilsatt ionebyttet vann til vekten av ost + vann var totalt nøyaktig 20 ganger vekten av osten. Homogenisatoren var en laboratorie mixer i rustfritt stål. Det ble ikke brukt en omnimixer, fordi den ikke kunne inneholde stor nok mengde produkt og vann. Før homogenisering ble beholderen med produkt og vann satt i vannbad på 55 °C i 30 minutter. Under homogenisering ble all ost oppløst. Blandingen ble filtrert med sortbåndsfilter. Den filtrerte prøven (100µl) ble titrert med kalibret *Model 926 Chloride Analyser*. Avlesingen av *Model 926 Chloride Analyser* ble omregnet til prosent salt i opprinnelig prøve.

3.5 Sensoriske analyser

Det ble utført 2 typer sensoriske analyser i løpet av forsøket. Målet med disse analysene var å finne ut om forsøksfaktorene påvirket ostenes smaksintensitet i vesentlig grad, og om muggveksten på ostene var påvirket av forsøksfaktorene.

3.5.1 Smak

Smaksforskjeller i osten ble undersøkt med rangeringsmetode der målet var å se om noen av forsøksfaktorene resulterte i vesentlig mer intens smak. Rangeringstesten fant sted på UMB Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, sitt rom for sensoriske undersøkelser. Den sensoriske bedømmelsen av smaksstyrken ble utført for hver ysting. Undersøkelsen av smaksintensiteten fant sted 60 dager ± 7 dager etter ysting. Tidspunktet for undersøkelsen ble satt til dette tidspunktet i ostens utvikling, siden Norzola ville på dette tidspunktet vært i butikken eller hos forbruker. Det ble ikke undersøkt for forskjeller mellom ystingene for egenskapen smaksintensitet. Smakstyrke ble definert slik: "*Intensity or concentration of flavour, ranging from bland or tasteless to a concentrated intense flavour.*" etter Lawlor et al. (2003). Dommerne var ansatte og studenter, ved IKBM på UMB og de var trente i, eller hadde noe erfaring med sensorisk bedømmelse generelt. Ingen var spesielt trent for sensorisk bedømmelse av blåmuggost. Det var 6 dommere for hvert oppmøte, hver dommer fikk 2 sett prøver à 8 prøver, totalt 16 prøver. Normalt antall prøver ved rangeringstest er 4-6 prøver pr sett prøver (Berg et al., 2005, s. 28).

På grunn av ostens størrelse ble det ikke brukt samme ost under sensorisk analyse som under kjemisk og mikrobiell analyse. Ostens overflate ble fjernet med kniv og kjernen av osten ble delt inn i terninger á ca 1 cm^3. 5-20 terninger fra en ost ble overført til petriskåler merket med et tilfeldig nr mellom 100 og 999. Petriskåler med terninger fra alle 8 ostene fra hver ysting, ble satt på et brett i tilfeldig rekkefølge.

Før bedømming fikk dommerne mulighet til å smake på blåmuggost. Det hadde to funksjoner. Det ble gjort i den hensikt at første prøve ikke skulle bli for overaskede og dominerende. Men viktigere ble det gjort for å kalibrere dommerne så langt det lot deg gjøre. Før bedømmelsen fant sted ble det også gjennomgått at det var smaksstyrken som var egenskapen som skulle bedømmes, ikke andre smaker, tekstur, farge o.l. Under bedømmingen ble dommerne spurt om å rangere petriskålene, etter smaksintensiteten til innholdet. Dommerne fikk andledning til å skrive kommentarer om smaksfeil. Dommerskjema finnes i figur 3.

Rangeringstest: Blåmuggost

Navn:_____ Dommer nr:_____

Prøve omgang nr:_____ Dato:_____

De 8 prøvene du får skal rangeres etter økende grad av smaks intensitet.

Definisjon (engelsk): *Intensity or concentration of flavour, ranging from bland or tasteless to a concentrated intense flavour.*

Hvis en prøve har en ubehagelig smak (ikke salgsvare) legg til det i kommentar feltet.

Ragnerings rekkefølge intensitet	1 minst	2	3	4	5	6	7	8 størst
Prøvekode								
Kommentar								

Figur 3: Dommerskjema rangeringstest

Dommersvar som ikke var korrekt utfylt ble forkastet. Rangeringen dommerne gav osten, ble overført til en poengskala. 1 poeng til den svakteste osten, og 8 poeng til den sterkeste osten. Poengsummene ble summert for hver ost, og ble analysert med ANOVA.

3.5.2 Synlig muggvekst

Én tilfeldig ost fra hver av de 4x2 splittene i forsøket ble fotografert ved dag 60 (±3 dager), dette ble gjentatt for alle 3 ystingene. Under arbeidet med oppgaven hadde det blitt lagt merke til at overflaten til osten virket forskjellig. Det ble bestemt under databehandlingen at bildene kunne brukes til å dokumentere vekst av mugg på overflaten. Bildene ble brukt for å undersøke om forsøksfaktorene påvirket arealet av mugg på overflaten til osten. Osten på bildene ble gitt poeng etter hvor stor del av overflaten det ble funnet synlig muggvekst, tabell 2 viser sammenhengen mellom areal dekket av mugg og antall poeng osten fikk. Bedømmelsen ble av praktiske grunner utført av forfatteren, ostens identitet ble gjemt under bedømmelsen slik at osten var anonymisert. Poengene ble senere koblet sammen med ostens identitet.

Tabell 2: Poengskala sensorisk analyse muggvekst

Andel av overflaten dekket av mugg	Poeng
0-19 %	1
20-39 %	2
40-59 %	3
60-79 %	4
80-100%	5

3.6 Databehandling og statistikk

For å undersøke responsene ble det brukt to statistiske metoder. Variansanalyse (ANOVA) og prinsipal komponent analyse (PCA). Noe rådata ble behandlet matematisk før responsene ble klare for statistisk analyse.

3.6.1 ANOVA

ANOVA er en engelsk forkortelse av for variansanalyse, og blir brukt for å undersøke statistisk

sammenheng mellom responser og forsøksfaktorer. ANOVA ble utført på datamaskin ved hjelp av programmet Minitab® 16.1.0. Responsene som ble undersøkt ble samlet i 3 grupper; responser fra moden ost (ost 60 dager etter ysting), responser fra ost under modning (ost 30 dager etter ysting), og responser fra ung ost (ost 6 dager etter ysting eller yngre).

Variansanalysen som ble gjennomført var av typen Gerneral Linear Model (GLM). Det ble brukt Tukeys metode med parvise sammenligninger der konfidensnivået ble satt til 95,0. P-verdier ≤ 0,05 ble sett på som signifikante. Modellene som ble brukt var forskjellige ut fra gruppene som ble analysert. I vedlegg 2 vises resultatet fra analysen, med p-verdier. Moden ost ved 60 dager etter ysting ble analysert med modellen: **ysting gjær(ysting) vasket**. Tilfeldig faktor var Blokk. Blokk betyr her ysting. Faktoren *gjær* ble nøstet sammen med blokk, fordi gjæren ble tilsatt som en del av et splitt på forsøket. *Vasket* ble ikke nøstet til tross for at det var ønskelig på grunn av for få gjentak. Faktoren gjær ble prioritert. Det ble ikke undersøkt for interaksjoner mellom forsøksfaktorene på grunn av for få gjentak. Noen av responsene manglet data for enkelte oster (utliggere). Disse ble analysert i egen ANOVA der kun responser med samme mønster av manglende data var inkludert. De responsene som manglet data var stort sett fra kjeldalanalysene.

Det var ikke mulig å bruke nøstet modell for resultatene til og med dag 30 etter ysting, grunnet for få gjentak. For gruppene med responser fra 0 til 6 dagers ost, og 30 dagers ost, ble det brukt samme modell: **gjær ysting** og tilfeldig faktor var **ysting**. Det ble brukt en u-nøstet modell siden det ikke var mulig med nøstet modell, fordi det ikke var nok gjentak for at faktoren *gjær* kunne gis en p-verdi med en nøstet modell. Også ved denne modellen ble responser med manglene data analysert i egen variansanalyse. For hver respons oppgav minitab p-verdi for hver av de faktorene som lå inne i modellen.

3.6.2 Prinsipal komponent analyse

Responsene som ble brukt i variansanalysen ble også undersøkt med prinsipal komponent analyse der dimensjonaliteten ble redusert med mininalt tap av varians. Analysen ble gjort ved hjelp av data maskin og programvaren *The Unscrambler® v9.7*. Kun data fra moden ost (ost 60 dager etter ysting) ble analysert.

PCA analysen ble utført ved bruk av full modell med kryssvalidering, og dataene var sentrerte og likt vektlagt. Responsene fra moden ost ble det i 3 grupper: *Organiske syrer*, *signifikante responser* (uten organiske syrer, uten flyktige aromakomponetner) og *flyktige aromakomponenter*. De signifikante responsene var kun responser fra ost som var signifikant ulik 60 dager etter ysting. Utdata fra programvaren var "scores" og "loadings" i biplot for det antallet prinsipale komponenter som var ønsket. Det var kun PC1 og PC2 som ble bruk.

4. Resultater

Osten ble analysert både kjemisk, mikrobiologisk og sensorisk. Målet med disse analysene var å undersøke gjærens påvirkning på osten generelt og smaken spesielt.

I teksten, tabellene og figurene i dette resultatkapittelet finnes uttrykk som forsøksfaktor og respons. Med forsøksfaktoren *gjær* menes; ost som er, eller som ikke er, tilsatt gjær. Det finnes 4 kategorier innenfor denne forsøksfaktoren. Kontroll; er ost som ikke er tilsatt noe gjær. LAF-3 er ost som ble tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) gjær under ysting. På samme måte er LAF-4 tilsatt K. marxianus (LAF4) gjær og LAF-6 tilstatt *S. cerevisiae* (LAF-6) gjær i ostemassen. Respons er analyser som har blitt utført og gitt et tall, eller flere analyser som sammen har laget grunnlag for et tall etter databehandling.

4.1 Statistiske resultater

4.1.1 Variansanalyse av dager gammel 60 ost

I tabell 3 kan man se alle p-verdiene for de responsene som ble signifikant påvirket av forsøksfaktorene. Det ble 10 signifikante responser for faktoren *Gjær*, 11 responser for faktoren *Ysting*, og til slutt 2 signifikante respons for faktoren *Vasket*. De signifikante responsene for faktorene *Gjær* og *Vasket*, og utvalgte andre parametre er beskrevet i detalj i dette kapittelet. Derimot er ikke alle responsene som hadde signifikant effekt av faktoren *Ysting* beskrevet her. Det ble analysert for flere stoffer vha HPLC og HSGC, de stoffene som ikke er listet i tabellen ble ikke funnet signifikant påvirket av noen forsøksfaktor. Alle p-verdier kan finne i vedlegg 2.

Av de responsene som var ikke-signifikante er noen viktigere enn andre. Den sensoriske analysen av smak (styrke) ble funnet til å ikke være signifikant påvirket av forsøksfaktorene, det ble heller ikke forholdet mellom ikke-protein Nitrogen og totalt Nitrogen. Heller ikke pH ble funnet å være signifikant forskjellig ved dag 60 etter ysting.

4.1.2 Variansanalyse av ost yngre enn 60 dager

Tabell 5 viser hvilke responser som var signifikant påvirket av av forsøksfaktorene *gjær* og *ysting,* ved dag 30, det ble funnet 6 signifikante responser for forsøksfaktoren gjær, og 8 signifikante responser for forsøksfaktoren ysting. Tabell 4 inneholder resultatene fra variansanalysen for responsene målt mellom dag 1 og dag 6, det ble funnet 7 signifikante responser for forsøksfaktoren *Gjær*, og 10 signifikante responser for forsøksfaktoren *Ysting*. Variansanalysen ble ikke nøstet for prøver registrert mellom dag 1 og dag 30 på grunn av få observasjoner. Det ble utført full HPLC og HSGC analyse av ostene, kun de stoffene som ble funnet signifikant forskjellige er listet i tabellene. Utslaget på etylacetat ved dag 4 er trolig en feil, som skylles vannrester i kolonnen etter en skylling..

Tabell 3: Signifikante p-verdier basert på ANOVA av kjemiske, mikrobiologiske og sensoriske analyser ved dag 60 etter ysting.

Type analyse	**Respons**	**p-verdi**		
		Gjær	**Ysting**	**Vasket**
Kjemisk	Salt	<0,001		
	Salt i ostens vann	<0,001		
	Tørrstoff		0,001	
	Vann i fettfri ost		0,001	
	Sitronsyre		<0,001	
	α-ketoglutarsyre		0,002	
	Orotinsyre	0,006	0,028	
	Pyrodruesyre	<0,001		
	Ravsyre		0,005	
	Melkesyre	<0,001		
	Eddiksyre	<0,001		
	Urinsyre		0,038	
	DL-Pyroglutaminsyre	0,049	0,001	
	TN (%N)		<0,001	
	LN	0,028		
	(TCA-LN)/LN			0,020
	Vann/protein		<0,001	
	Fett		0,014	
	Acetaldehyd	0,029		
	Etanol	0,003		
	Aceton	0,015		
	2-propanol	0,019		
	n-pentan		0,001	
	2-metyl-propanal	0,036		
	Diacetyl	0,003		
	2-butanon		0,012	
	Etylacetat		<0,001	
	3-metyl-butanal		0,016	
	2-metyl-butanal		0,004	
	Acetoin		0,006	
	n-heptan		0,035	
	pH			
	Fett/Tørrstoff			
	Vann i fettfritt tørrstoff			
Mikrobiologisk	Gjær overflate	0,032		
	Gjær kjerne	<0,001		
Sensorisk	Synlig muggvekst overflate			<0,001
	Smak (styrke)			

Tabell 5: Signifikante p-verdier basert på ANOVA av kjemiske og mikrobiologiske analyser ved dag 30.

Type analyse	**Respons**	**p-verdi**	
		Gjær	Ysting
Kjemisk	pH	0,014	
	α-ketoglutarsyre	0,006	
	Pyrodruesyre	0,022	
	Melkesyre	0,002	
	TCA-LN/LN	0,019	0,011
	Tørrstoff		<0,001
	Sitronsyre		0,012
	Eddiksyre		0,011
	DL-Pyroglutaminsyre	0,037	0,019
	TN		0,047
	Vann/protein		0,007
	Acetaldehyd	0,050	
	Aceton	0,024	
	n-pentan	0,043	0,034
	2-metyl-propanal	0,007	0,017
	Diacetyl	0,033	
	3-metyl-butanal	0,038	
	2-metyl-butanal	0,019	
	TCA / TN		
	LN		
	LN/TN		
Mikrobiell	Gjær overflate dag 30		
	Gjær kjerne dag 30		

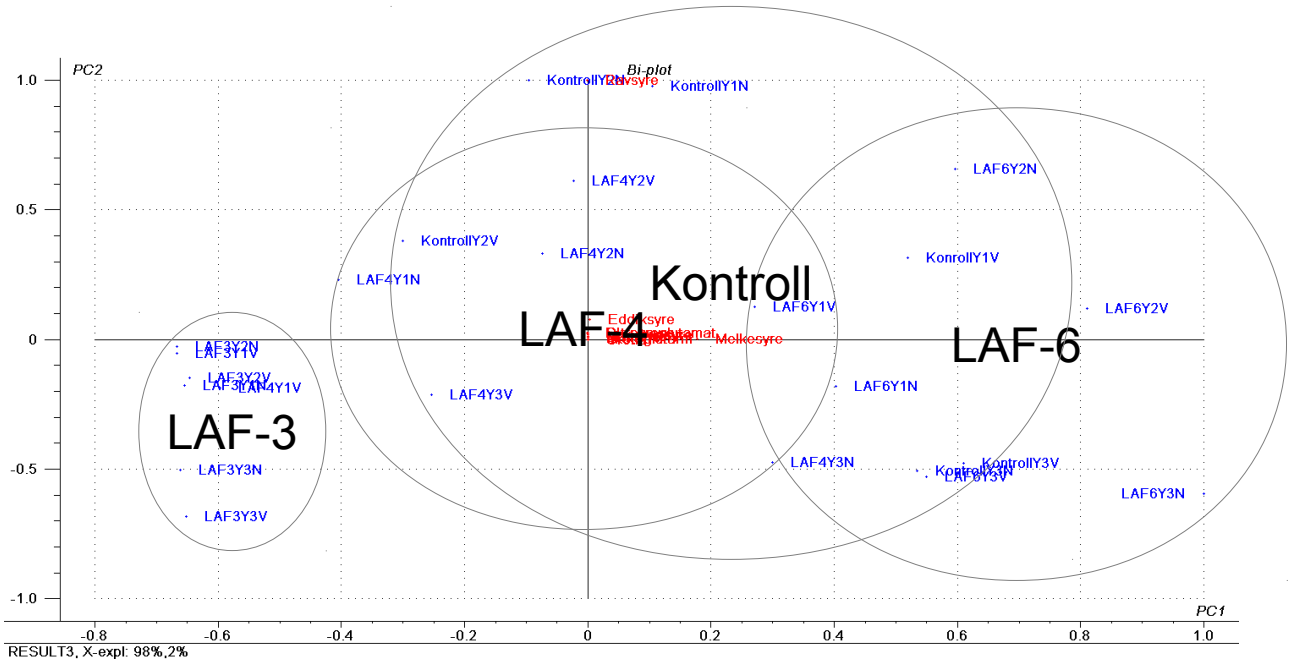
Tabell 4: Signifikante p-verdier basert på ANOVA av kjemiske og mikrobiologiske analyser fra dag 1 til dag 6.

Type analyse	**Respons**	**p-verdi**	
		Gjær	Ysting
Mikrobiell	Gjær ostemasse	<0,001	
	Gjær overflate Dag 2	<0,001	
	Gjær overflate Dag 4	<0,001	
	Gjær overflate Dag 6	0,014	
	Gjær kjerne Dag 2	0,034	
	Gjær kjerne Dag 4	0,011	
	Gjær kjerne Dag 6		
Kjemisk	TCA-LN		0,013
	TCA-LN/LN		0,034
	Orotinsyre		<0,001
	Pyrodruesyre		0,001
	Ravsyre		<0,001
	Maursyre		0,005
	Urinsyre		0,010
	Propionsyre/acetoin		0,001
	DL-Pyroglutamin syre		0,007
	Laktose		0,008
	Acetaldehyd		0,004
	2-propanol		0,001
	n-pentan		0,039
	2-butanol		0,001
	Etylacetat	0,001	
	2-pentanon		0,018
	Acetoin		0,006
	3-metyl-1-butanol	0,033	
	pH 24 timer		
	pH 48 timer		
	pH 6 dager		
	Tørrstoff 24 timer		
	Total Nitrogen %N		
	Løselig Nitrogen		
	LN/TN		
	TCA-LN/TN		

4.1.3 PCA

Det ble utført 3 prinsipalkomponentanalyser hvor en av analysene dreide seg om de organiske syrene. Den andre analysen tok for seg alle faktorer som var funnet signifikante i variansanalsyen med unntak av organiske syrer og flyktige aromakomponenter. Den tredje prinsipal komponent analysen undersøke de flyktige aromakomponenter i osten.

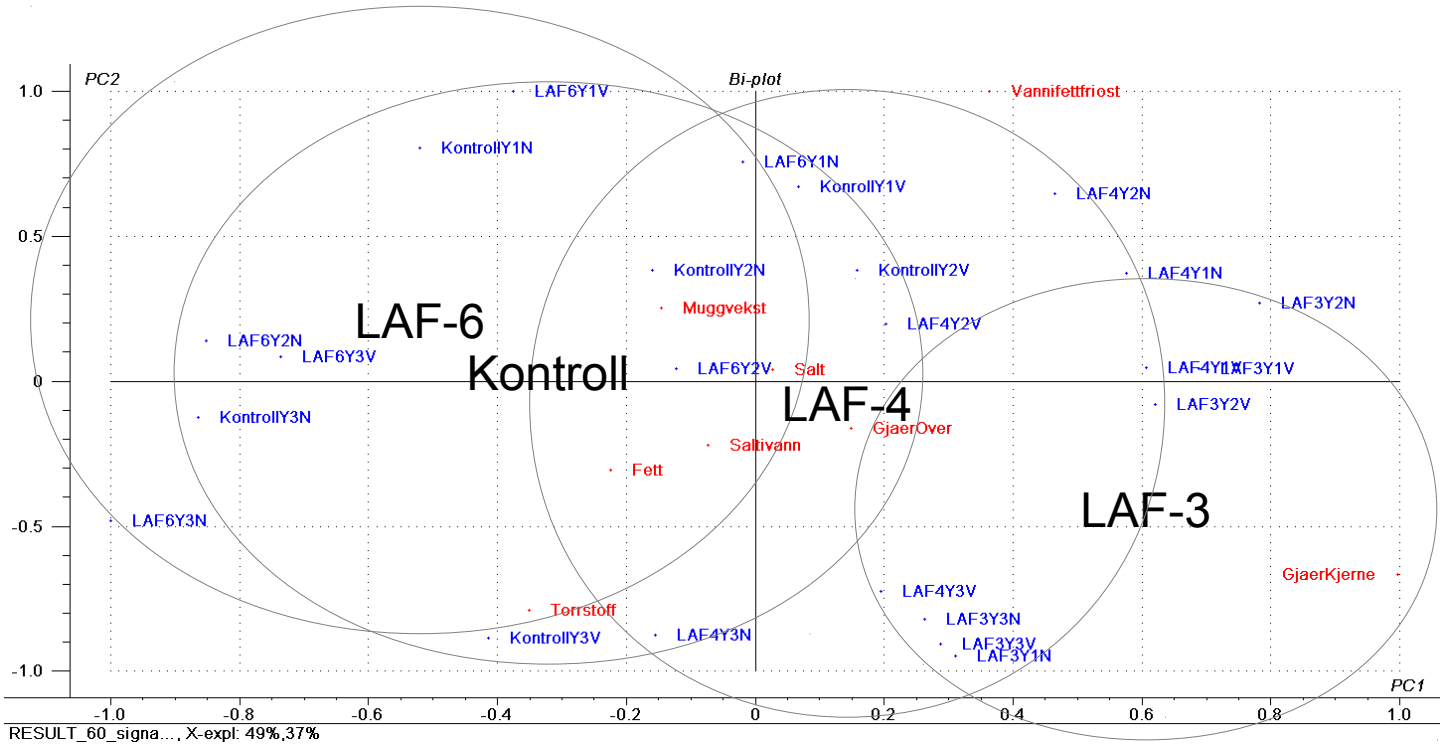
I PCA som kun undersøkte organiske syrer, se figur 4, ble det funnet at PC 1 forklarer 98% av variasjonen. Det er én organisk syre, melkesyre, som forklarer variasjonen i PC 1. Av figuren kan man se at alle *D. hansenii* (LAF-3)-ostene ligger i en klynge til venstre for midten. Osten tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) ligger også i en klynge, men denne ligger godt til høyre for midten. K. marxianus (LAF4) -klyngen legger seg mellom *D. hansenii* (LAF-3) og LAF6. Spredningen i kontrollgruppen er større og blander seg med både *K. marxianus* (LAF4) og *S. cerevisiae* (LAF-6). PC 2 forklarer bare resterende 2 % av variasjonene i de organiske syrene. Ravsyre er spesielt viktig for PC2. Ingen gjærtyper skiller seg spesielt ut med hensyn til PC2.



Figur 4: PCA av organiske syrer. Scores og Loadings bi-plot.

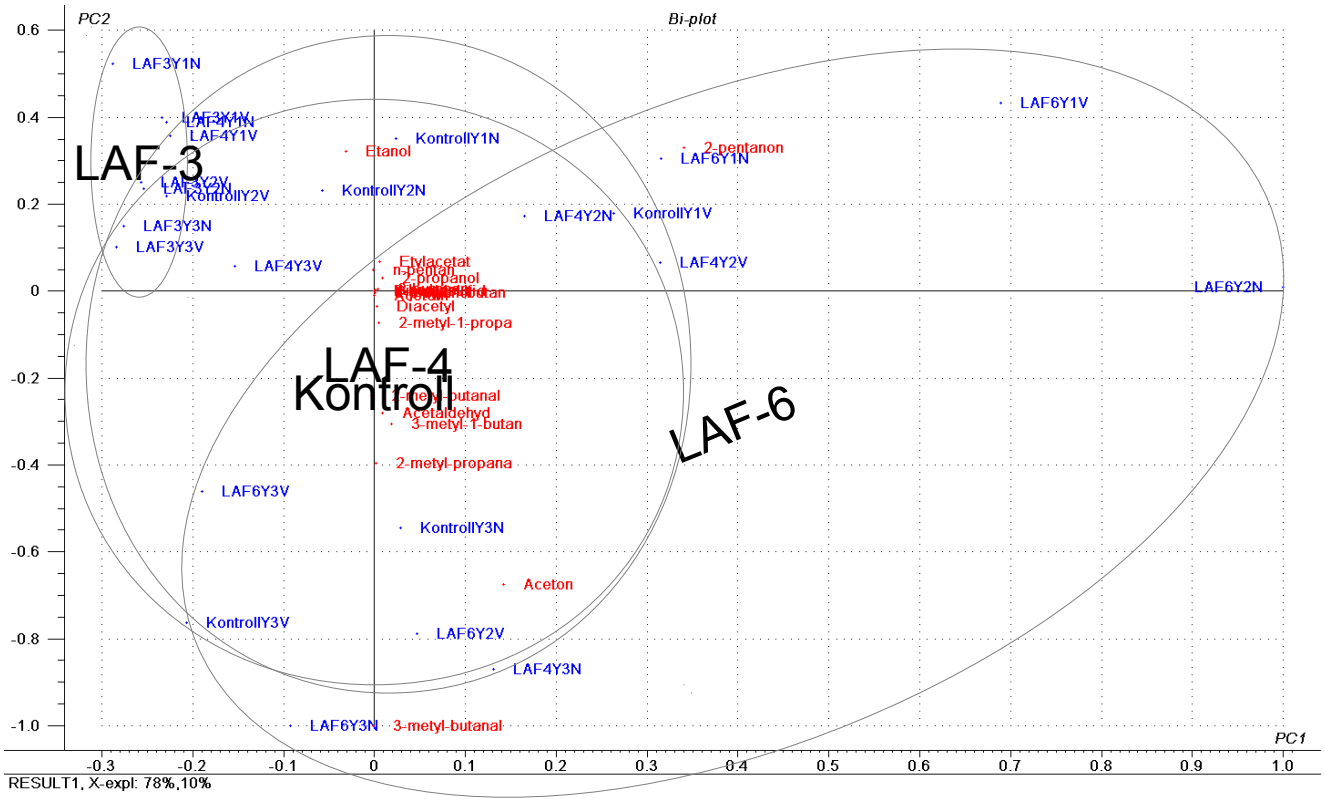
Figur 5 viser PK analyse av andre signifikante responser, ikke organiske syrer og flyktige aromakomponenter. PKA viste en klar gruppering ut fra gjærtype for prinsipal komponent 1. PK 1 forklarte 49 % av variasjonene mellom prøvene. Responser som gjær i kjernen og vann i fettfri ost mot tørrstoff var viktige forklaringsfaktorer for PK1. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) lå klart til høyre i biplottet, ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) lå klart til venstre. Ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) lå mellom ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og *S. cerevisiae* (LAF-6). Kontrollosten overlappet i stor grad med med ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6), og til en viss grad med ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4).

Det ble ikke funnet noen klar gruppering av forsøksfaktorene gjær og vasket i prinsipal komponent 2. Forsøksfaktoren ysting 3 la seg til dels nede i bipottet, mens ysting 1 og 2 sprette seg over hele områdeet. PK 2 forklarte 37% av variasjonen mellom prøvene. Viktige faktorer for PK2 var vann i fettfri ost mot gjær i kjerne og tørrstoff.



Figur 5: PCA av signifikante analyser, unntatt organiske syrer og flyktige aromakomponerer. Scores og Loadings bi-plot.

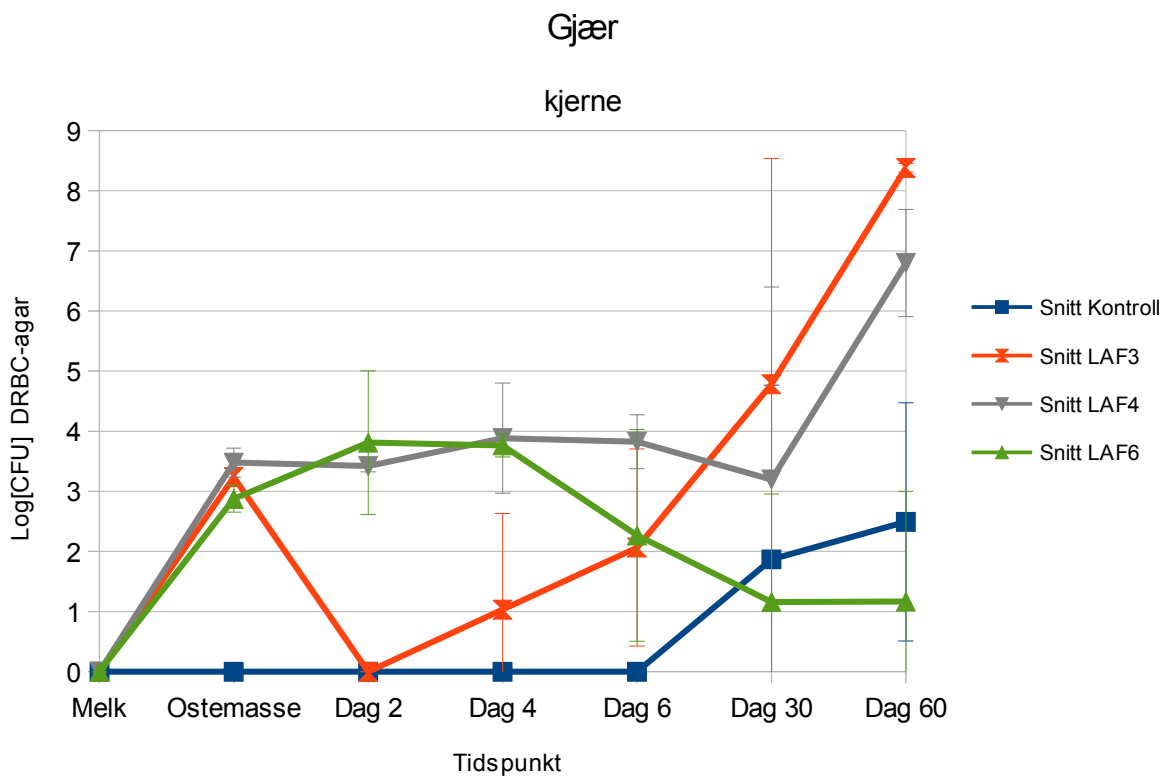
PCA av flyktige aromakomponenter vises i figur 6. Innholdet av 2-pentanon og aceton forklarer variasjonen i PC1. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3), lå langt fra alle aromakomponenten i biplottet. Mange av ostene med *S. cerevisiae* (LAF-6), har mer 2-pentanon sammenlignet med andre oster, og ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) har liten konsentrasjon av 2-pentanon, men forskjellene var ikke siginfikante. Forskjellene for i aceton innhold var signifikant forskjellige og påvirket av forsøksfatoren gjær. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde minst aceton, og ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde mest aceton. PC1 forklarer 78% av variasjonen av de flyktige aromakomponentene, mens PC2 forklarer 10%. PC2 var påvirket av flere stoffer, 3-metyl-butanal, aceton og 2-metylpropanal på en side, mens 2-pentanon og etanol på den andre siden. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde stor avstand til alle de aromatiske komponentene. Ost med *D. hansenii* (LAF-3) hadde signifikant mer etanol sammenlignet med andre oster, men allikevel var avstanden i blottet stor til etanol. Ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) omsluttet mer av aromakomponentne i både PK1 og PK2 sammenlignet med de andre ostene. Ost med *K. marxianus* (LAF4) og kontollosten overlappet hverandre i sentrum av biplotet.



Figur 6: PCA av flyktige aromakomponerer. Scores og Loadings bi-plot.

4.2 Mikrobiologiske analyser

Fra variansanalysen gikk det frem at forsøksfaktoren *gjær* hadde signifikant påvirkning på antallet kde av gjær, på overflaten og i kjernen, ved dag 60 etter ysting. I figur 7 vises utviklingen av gjær i kjernen til osten. Av tabell 3 fremgår det at p-verdien er <0,001 for denne responsen 60 dager etter ysting. Som figuren viser, ble det ikke funnet gjær i den pasteuriserte melka som ble brukt. Etter de ulike gjærtypene ble tilsatt osten, ble det funnet gjær i de ostene. Antallet kde varierte noe i ostemasse tilsatt gjær, men gjennomsnittet lå fra log 2,9 til 3,5. I ostemasse, var antall kim gjær funnet signifikant påvirket av faktoren gjær. Det ble funnet



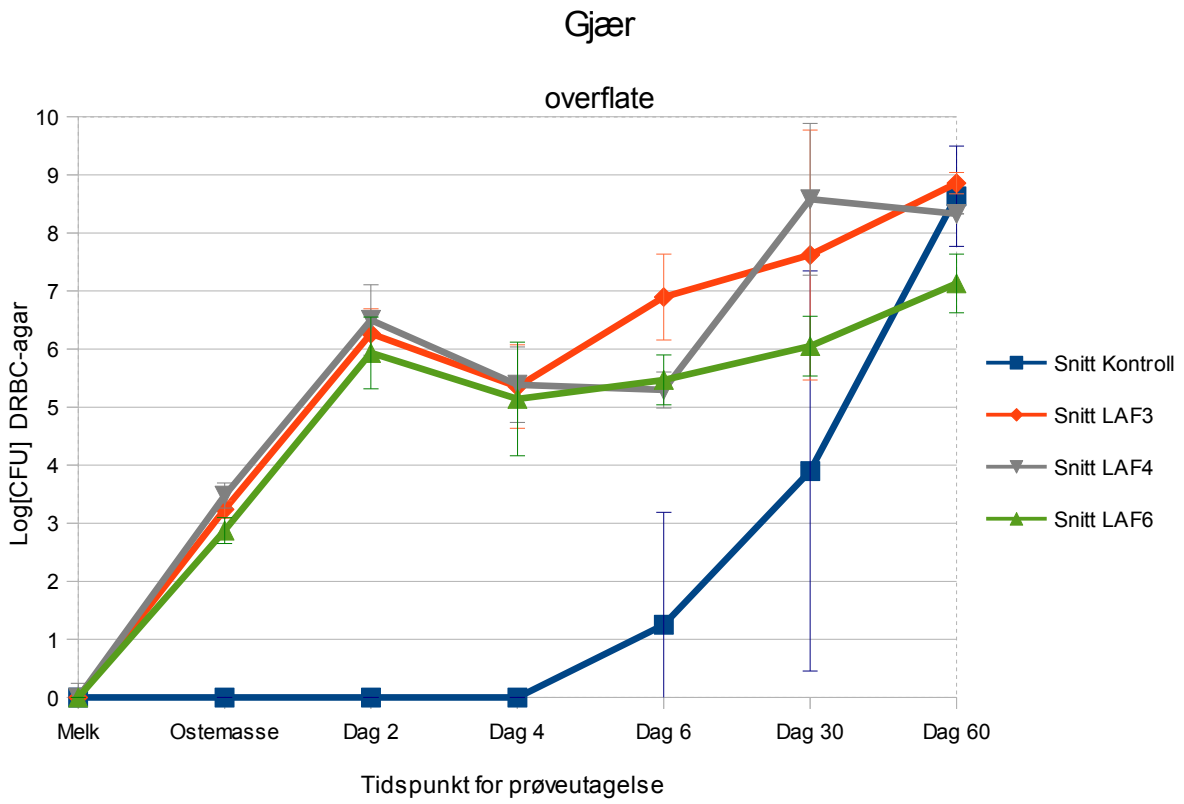
Figur 7: Vekst av gjær i ost under modning vist som log kde ml^{-1} på DRBC-agar. Prøven er tatt i kjernen til osten. Figuren viser gjennomsnittsverdiene og standardavvik for de ulike tilsetningene av gjær.

signifikante forskjeller i antall kde gjær i prøver fra kjernen både dag 2 og dag 4, men ikke dag 6

eller dag 30 etter ysting (tabell 4, tabell 5). I kontrollosten ble det ikke funnet vekst på agaren til og med dag 6 etter ysting. I kontrollosten, dag 30 etter ysting var det kun en ost av tre analyserte, som hadde vekst av gjær. Ved dag 60, ble det ikke påvist gjær i 2 av 6 kotnrolloster. På dette tidspunktet hadde gjennomsnittlig antall kim av gjær i kontollosten økt til ca log 3, det var derimot stor standardavvik. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde ikke påvist gjær ved dag 2. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde høyest innhold av alle gjærtypene ved dag 60, med log 8,4. Ost med *K. marxianus* (LAF4) hadde gjennomsnittlig kimtall av gjær på mellom log 3 og log 4 fra gjæren ble tilsatt til og med dag 30. Ved dag 30 var variasjonen i kde hos osten tilsatt *K. marxianus* (LAF4) større enn ved de tidligere målingene. Ved 60 dager inn i lagringsperioden til osten med *K. marxianus* (LAF4) gjær hadde gjennomsnittlig log kde steget til log 6,8. Utviklinga til ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) var annerledes, antall kde av gjær hadde en topp ved dag 2 etter ysting, med log 3,8. Utover i lagringstiden sank antall kde for hver gang det ble målt, og ved dag 60 var det kun i 2 av 6 oster det ble påvist gjær. I ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6), hvor det ble funnet vekst av gjær, ble kde beregnet på et svært lavt antall kolonier. Enkelte skåler med prøver tatt 60 dager etter ysting, med ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6), hadde en tendens til å være overgrodd av mugg.

Det ble også tatt prøver fra overflaten til osten og figur 8 viser gjærvekst som log kde på DRBC-agaren. Prøvene ble tatt fra overflaten til osten med unntak fra prøvene som kom fra melka og ostemassen. Kde ble funnet til å være signifikant påvirket av tilsetning av gjær fra ostemasse til og med dag 6. Det ble ikke påvist vekst i kontollostene fram til og med dag 4. Ved dag 6 etter ysting ble det påvist vekst i en av tre kontrolloster. Ved dag 30 ble det ikke funnet signifikante forskjeller i kde ml^{-1} mellom ostene, og det ble påvist vekst i to av tre kontroll-oster. Ved dag 60 ble det funnet vekst i alle kontollostene, og gjennomsnittet til ostene havnet på log 8,6. For alle ostene som ble tilsatt gjær, økte mengden kde fra ostemasse til dag 2, deretter sank kde mellom dag 2 og dag 4 etter ysting, men log-verdien lå forsatt på et gjennomsnitt på over 5. Mellom dag 4 og dag 60 hadde alle ostene tilsatt gjær økt antallet kde. Ost med *D. hansenii* (LAF-3) hadde økning for hver måling og endte på log 8,9. Ost med *K. marxianus* (LAF4) hadde en sen start og antallet kde minsket fra dag 2 fram til og med dag 6. Antallet kim økte til log 8,6 ved dag 30, variasjonen var derimot stor for osten tilsatt *K. marxianus* (LAF4). Ved siste måling ved dag 60 var kde til *K. marxianus* (LAF4) på log 8,3. Fra og med dag 4 etter ysting økte gjennomsnittet til *S. cerevisiae* (LAF-6) for hvert kontrollpunkt. Ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde etter 60

dager et gjennomsnitt på log 7,1.



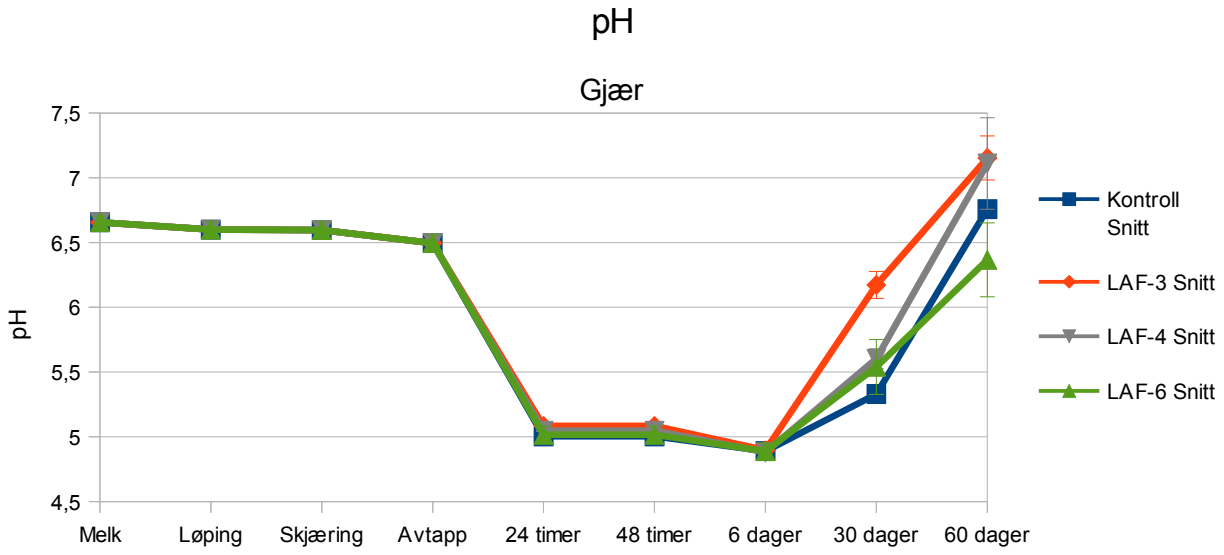
Figur 8: Vekst av gjær i ost under modning vist som log kde ml^{-1} på DRBC-agar. Prøven er tatt på overflaten til osten. Figuren viser gjennomsnittsverdiene og standardavvik for de ulike tilsetningene av gjær.

Ostemassen og osten ble også undersøkt mikrobielt på VRBA. Det ble ikke funnet vekst på disse platene.

4.3 Kjemiske resultater

4.3.1 pH

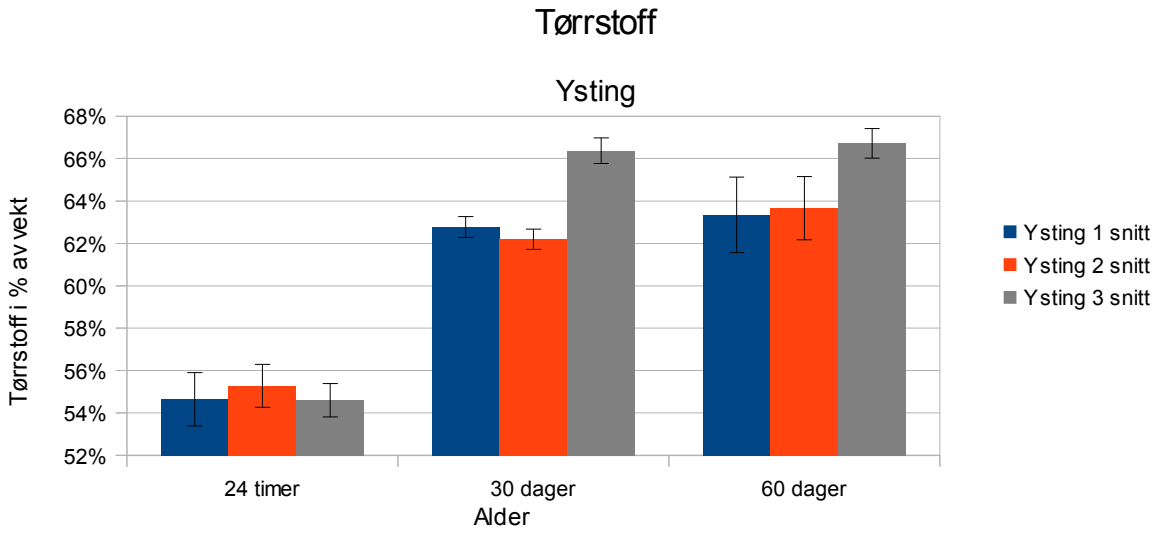
Figur 9 viser pH utviklinga under ysting og i osten. Målingene ble utført ved følgende stadier i ysteprosessen: melk, løping, skjæring, myseavtapp, ost 24 timer, ost 48 timer, ost 30 dager og ost 60 dager etter ysting. pH-verdiene var ikke signifikant forskjellig ved 24 timer, 48 timer, 6 dager og 60 dager etter ysting. p-verdien ble funnet til å være signifikant påvirket av forsøksfaktoren gjær, dag 30 etter ysting, da hadde ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) høyere pH sammenlignet med de andre ostene.



Figur 9: pH utvikling fram til 60 dager etter ysting. Figuren viser gjennomsnittsverdiene og standardavvik for de ulike tilsetningene av gjær.

4.3.2 Tørrstoff

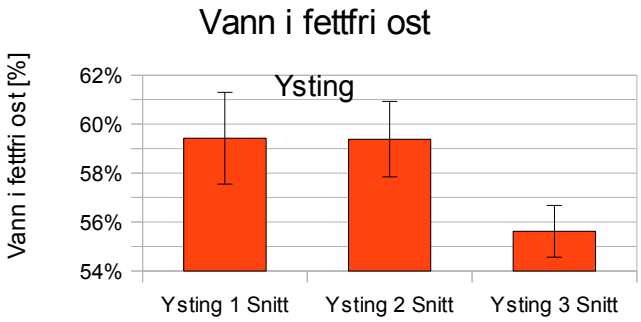
Figur 10 viser tørrstoffprosenten til ostene kategorisert med hensyn på ysting. ANOVA viste at ystingsdag påvirket tørrstoffet 60 dager etter ysting signifikant. Alle ostene, med unntak av 2, hadde tørrstoffprosent på over 54% registrert 24 timer etter ysting, men det var ingen signifikant forskjell. Tørrstoffet økte i alle ostene i løpet av hele lagringstiden. Ingen ost hadde lavere tørrstoffinnhold en 61 % ved 30 dager. Ost fra ysting 3 hadde klart høyere innhold av tørrstoff enn ysting 1 og 2 60 dager etter ysting.



Figur 10: Utvikling av ostens tørrstoff igjennom lagringstiden. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for faktoren ysting.

4.3.3 Vann i fettfri ost

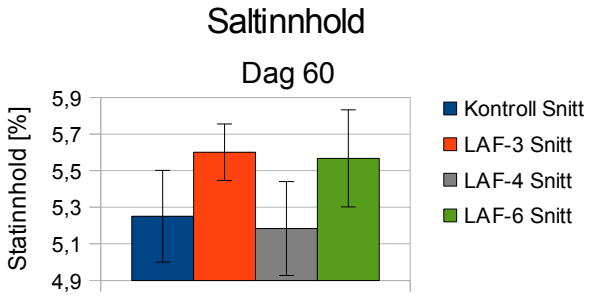
Forsøksfraktoren ysting påvirket vann i fettfri ost signifikant 60 dager etter ysting. Av figur 11 går det frem at ost fra ysting 3 hadde mindre vann i fettfri ost sammenlignet med ysting 1 og ysting 2.



Figur 11: % Vann i fettfri ost ved 60 dager etter ysting. Figuren viser gjennomsnittene og standardavvik for ost fra de ulike ystingene.

4.3.4 Salt

Saltinnholdet i osten ble signifikant påvirket av hvilken gjær osten var tilsatt, og ost med *D. hansenii* (LAF-3) og *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde høyere saltinnhold enn ost med *K. marxianus* (LAF4). Figur 12 viser at det gjennomsnittlige saltinnholdet i osten, ved dag 60, varierte mellom 5,18 og 5,60. Videre kan man se av figuren at standardavviket også varierte en del i forhold til de

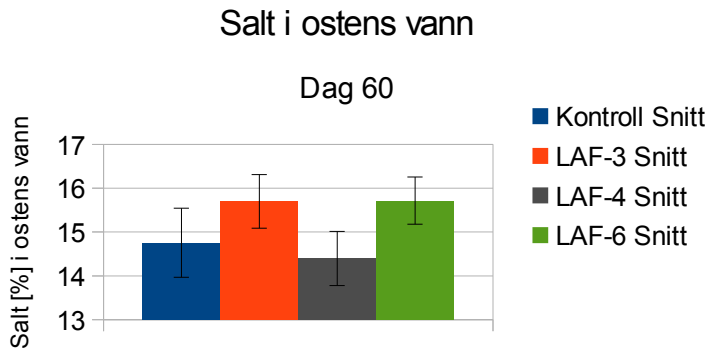


Figur 12: Saltinnhold i osten ved dag 60. Figuren viser gjennomsnittsverdier og standardavvik for ostene med de ulike tilsetningene av gjær.

ulike gjærtypene tilsatt osten.

4.3.5 Salt i ostens vann

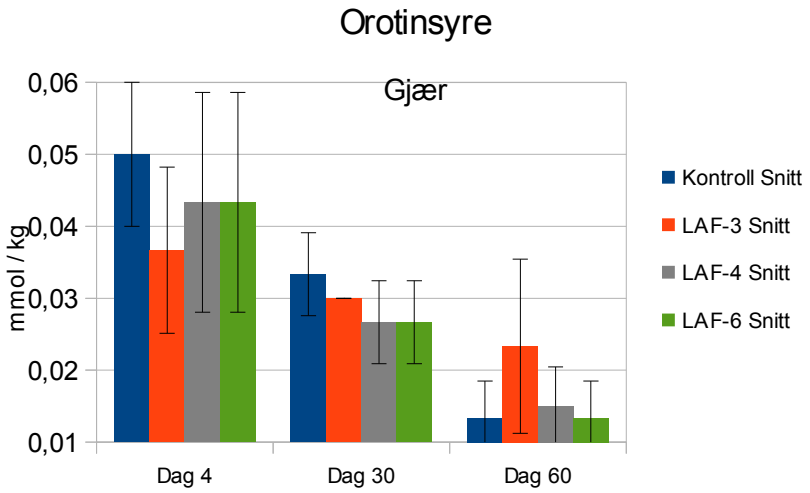
Mengden salt i ostens vann ble signifikant påvirket av gjærtypen tilsatt osten (tabell ??). Ost med *D. hansenii* (LAF-3) og *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde et høyere verdier salt i ostens vann sammenlignet med Kontollosten og ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4). Figur 13 viser mengden salt i prosent av ostens vann ved dag 60. Standardavviket varierte også med gjærtypen tilsatt osten.



Figur 13: % Salt i ostens vann 60 dager etter ysting. Figuren viser gjennomsnittene og standardavvik for de ulike tilsetningene av gjær.

4.3.6 Orotinsyre

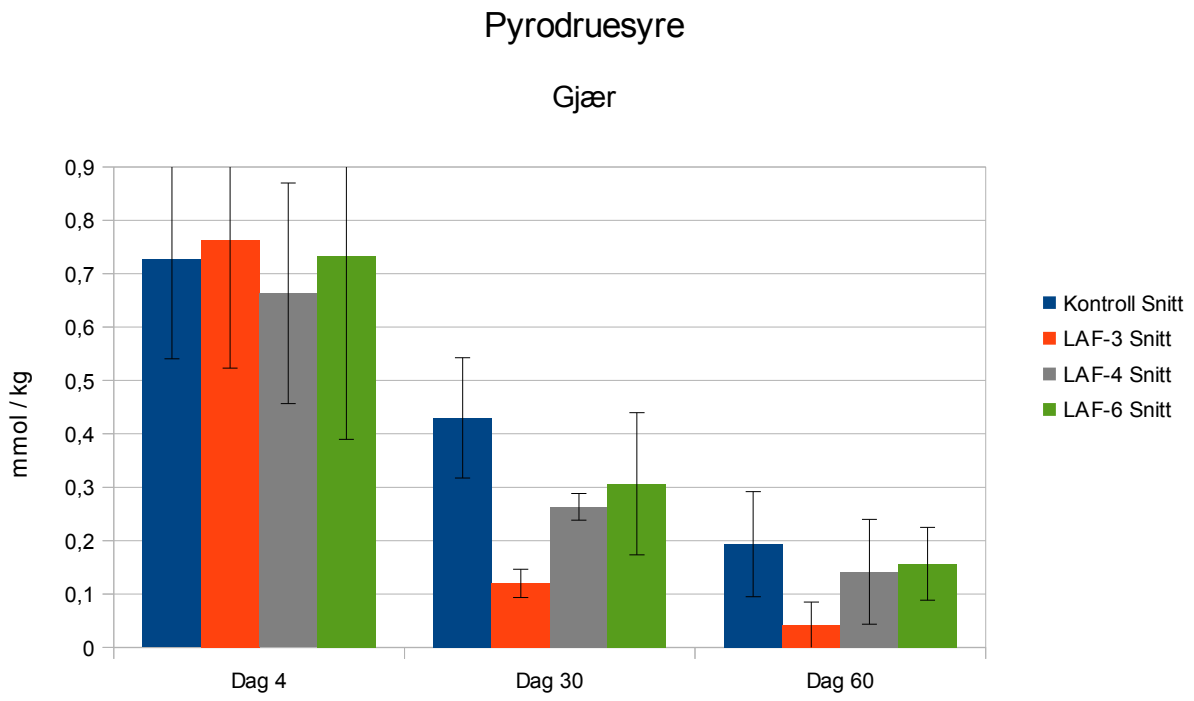
Innholdet av orotinsyre i osten ble funnet til å være signifikant påvirket av forsøksfaktoren *gjær* ved dag 4 og dag 60, og av faktoren ysting ved dag 60. Utviklingen av nivåene av orotinsyre i osten er vist i figur 14. Figuren viser at nivået av orotinsyre ble redusert i alle ostene når ostens alder økte. Etter 60 dager hadde ost tilsatt LAV-3 det høyeste innholdet av orotinsyre med 0,023 mmol pr kg ost. Standardavviket til oster tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) ved dag 60 var svært stort, sammenlignet med de andre ostenes standardavvik. Kontollosten, ost med *K. marxianus* (LAF4) og *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde mindre mengde orotinsyre enn ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3).



Figur 14: Utvikling av orotinsyre mmol / kg ost igjennom lagringstiden . Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik i oster med ulik tilsetning av gjær.

4.3.7 Pyrodruesyre

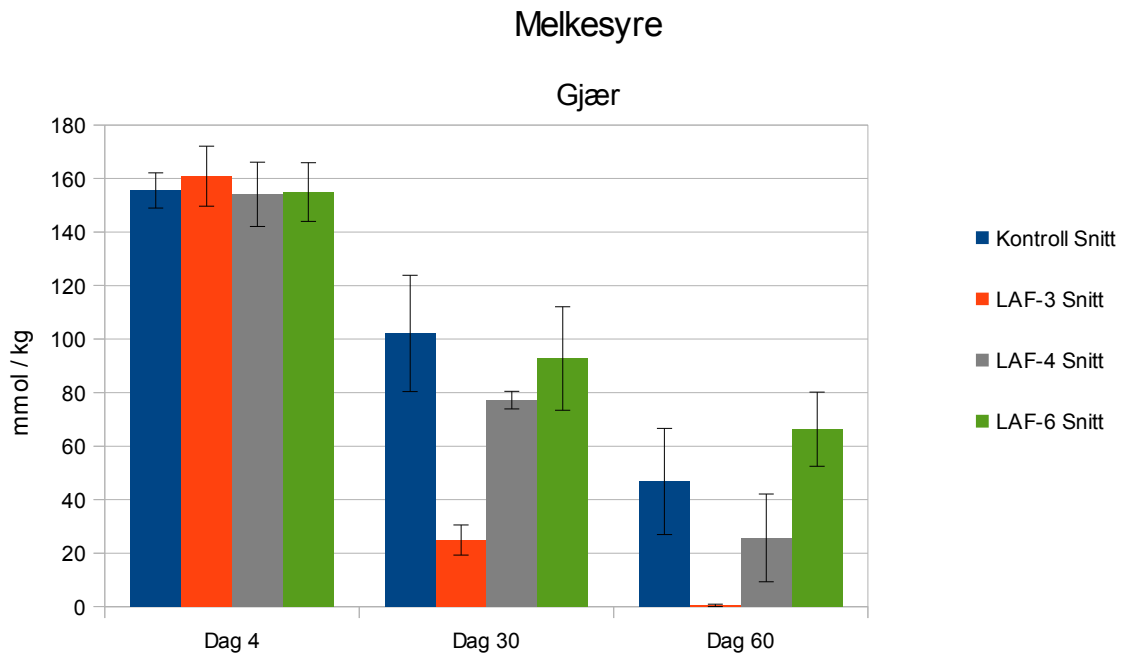
Pyrodruesyreinnholdet i osten var signifikant påvirket av gjærtilsetningen 30 og 60 dager etter ysting. Figur 15 viser utviklinga igjennom lagringsperioden. Konsentrasjonen av pyrodruesyre ble redusert igjennom hele lagringsperioden. Ved dag 30 etter ysting var det konstollosten som hadde størst innhold av pyrodruesyre, mens osten tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde lavest innhold. Osten tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde lavere innhold av pyrodruesyre ved dag 60 sammenlignet med de andre ostene.



Figur 15: Utvikling av pyrodruesyre mmol/kg ost. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for de ulike tilsatsene av gjær.

4.3.8 Melkesyre

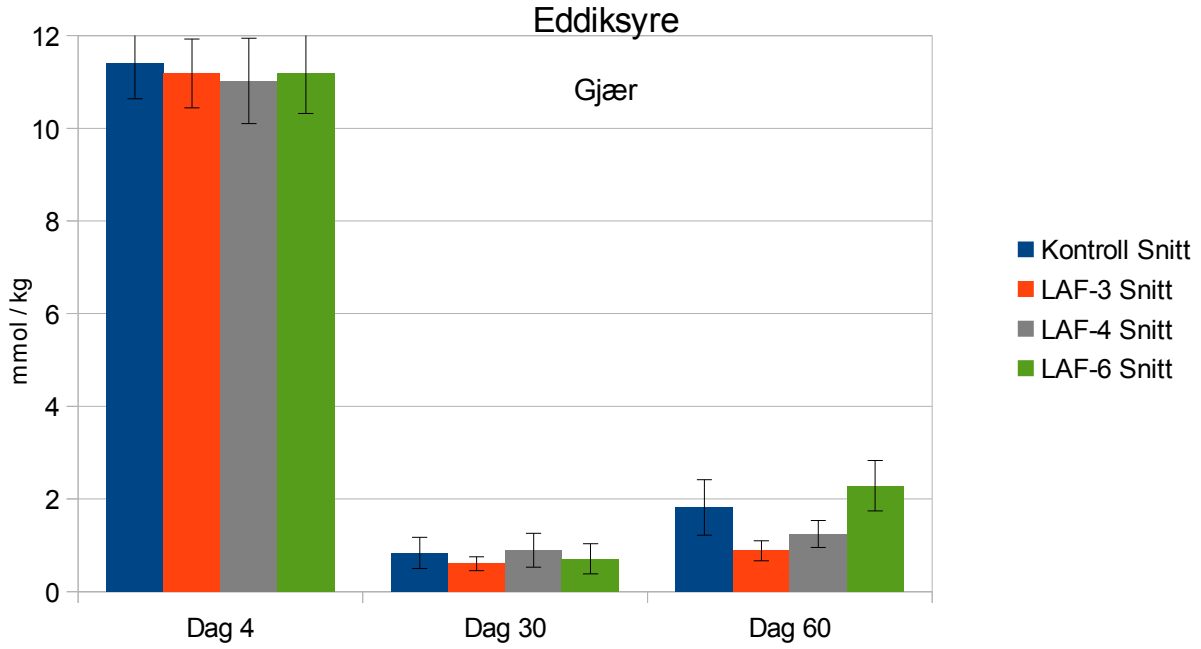
Innholdet av melkesyre i osten ble signifikant påvirket av forsøksfaktoren *Gjær* ved 30 og 60 dager. Innholdet av melkesyre i osten ble ikke påvirket av noen faktor ved dag 4. PCA analysen av organiske syrer viste også at innholdet av melkesyre var den syra som var sterkt korrelert med PC1, jf ?Figur 4. I figur 16 vises utviklinga av innholdet av melkesyre i ostene med de ulike gjærkulturene og kontrollosten. Ved dag 4 hadde alle ostene et gjennomsnittlig innhold av melkesyre som var ikke signifikant forskjellig. Innholdet av melkesyre sank i alle ostene i løpet av hele lagringsperoiden. Ved dag 30 hadde ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) et klart lavere innhold enn resten av ostene. Ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde størst innhold av melkesyre 60 dager etter ysting. Kontrollosten og ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde begge relativt store standardavvik ved dag 60 etter ysting og la seg i området mellom ost med *D. hansenii* (LAF-3) og -6.



Figur 16: Utvikling av melkesyre. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for de ulike gjærtilsetningene i osten.

4.3.9 Eddiksyre

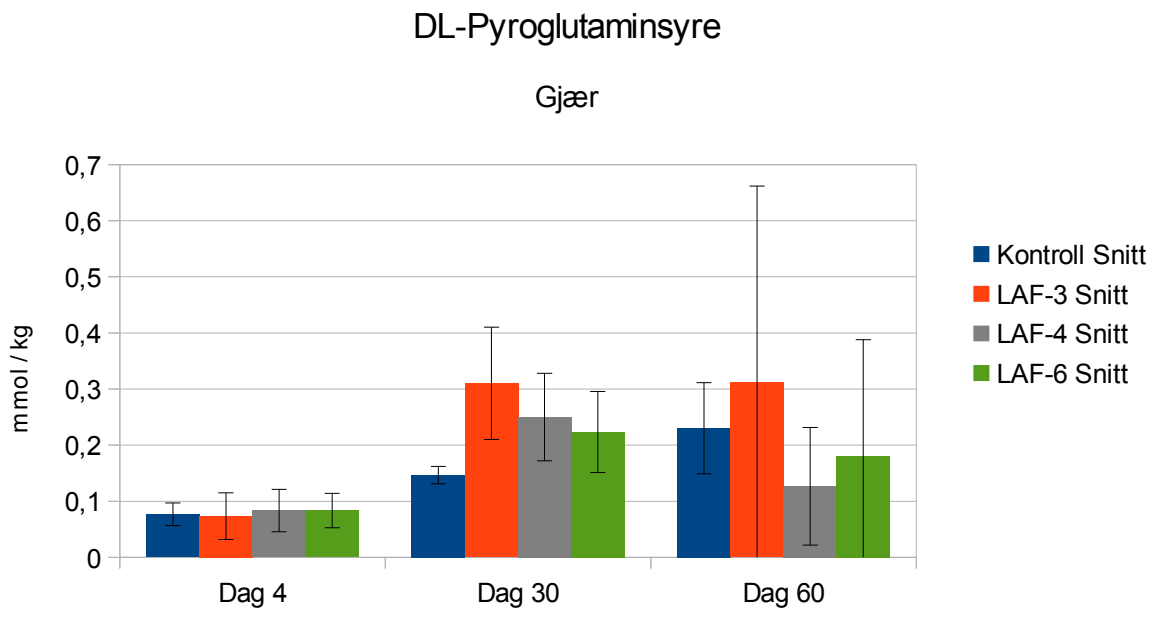
Mengden eddiksyre i osten ble redusert i første del av lagringstiden, som vist i figur 17. Det var ikke signifikante forskjeller ved dag 4 eller dag 30 etter ysting. Fra dag 30 til dag 60 økte mengden eddiksyre. Ved dag 60 ble det funnet signifikante forskjeller på eddikkonsentrasjonen i osten, forsøksfaktoren gjær påvirket innholdet. Ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde høyere innhold av eddiksyre enn kontrollosten, som hadde høyere innhold enn ost med *K. marxianus* (LAF4), osten tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde lavest konsentrasjon ved 60 dager etter ysting.



Figur 17: Utvikling av eddiksyre konsentrasjon i mmol / kg ost, under lagringstiden. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for de ulike tilsetningene av gjær.

4.3.10 DL-Pyroglutaminsyre

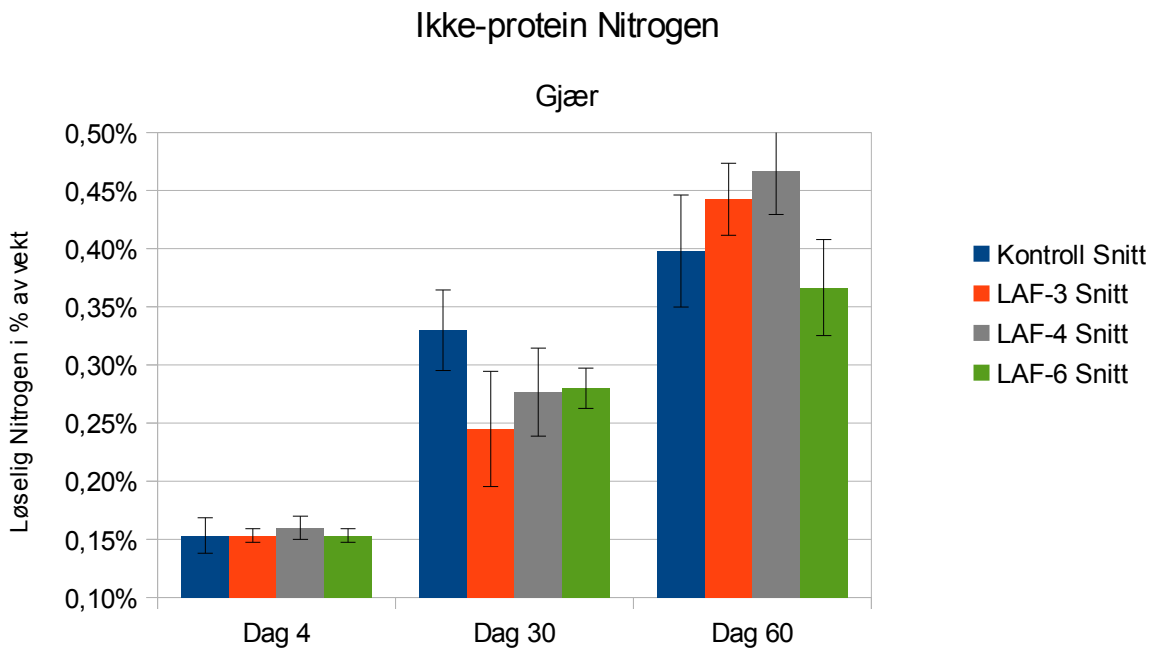
Innholdet av DL-Pyroglutaminsyre ble funnet til å være påvirket signifikant av forsøksfaktoren ysting i ung ost, og forsøksfaktorene gjær og ysting i ost 30 dager etter ysting og moden ost 60 dager etter ysting. Som man kan se av figur 18 viser at mengde DL-pyroglutaminsyre ikke påvirket av gjærtilsetning i osten ved dag 4 etter ysting. Ost med *D. hansenii* (LAF-3) hadde høyest innhold av syra 30 dager etter ysting. Kontollosten hadde på samme tidspunkt det laveste innholdet av DL-pyro-glutaminsyre. Osten tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde lavest konsentrasjon av DL-pyroglutaminsyre ved registreringen 60 etter ysting, standardavviket var lite sammenlignet med de andre syrene. De andre ostene hadde standardavvik som overlappet i større grad, men ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde høyest gjennomsnitt, ved dag 60. Kontollosten økte innholdet av DL-pyro-glutaminsyre mellom dag 30 og dag 60, mens ost med *K. marxianus* (LAF4) og 6 reduserte nivået av syra. *D. hansenii* (LAF-3) hadde uforandret gjennomsnitt mellom dag 30 og dag 60.



Figur 18: Konsentrasjon av DL-Pyrogutaminsyre mmol / kg ost igjennom lagringstiden. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for de ulike gjærtilsetningene.

4.3.11 Ikke-protein Nitrogen

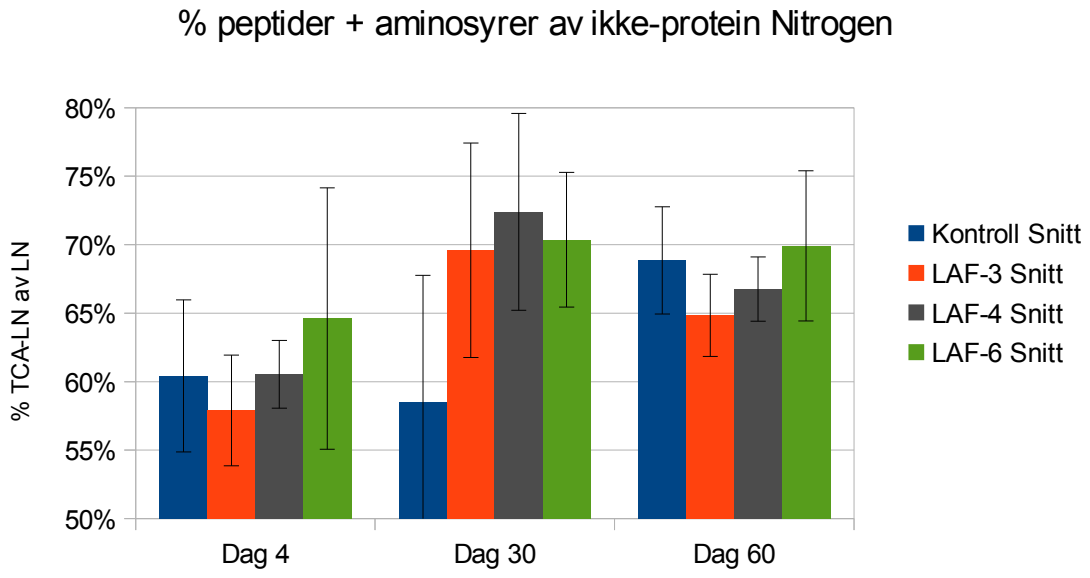
Innholdet ikke-protein Nitrogen, eller pH 4,6 løselig Nitrogen (LN), i osten under lagringsperioden går fram av figur 19. For alle ostene var det en økning av mengden LN i løp av hele lagringstiden. Det ble ikke funnet at forsøksfaktorene påvirket innholdet av ikke-protein Nitrogen signifikant ved 4 eller 30 dager etter ysting. 60 dager etter ysting ble det funnet at forsøksfaktoren gjær hadde signifikant effekt på innholdet av ikke-protein Nitrogen. Osten med *K. marxianus* (LAF4) hadde mest ikke-protein Nitrogen 60 dager etter ysting, ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde også mer LN enn kontollosten. Ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde minst ikke-protein Nitrogen.



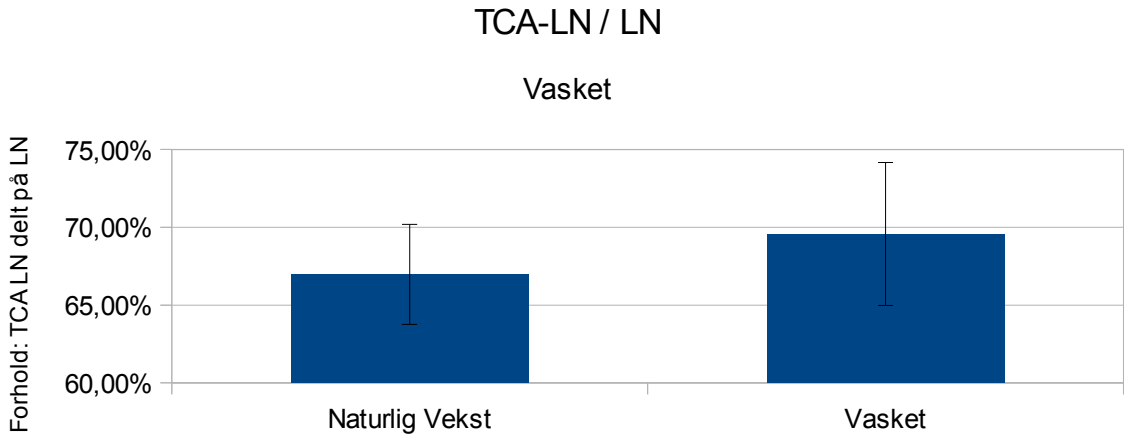
Figur 19: Gjennomsnitt og standardavvik til ikke-protein nitrogen i osten igjennom lagringsperioden for de ulike tilsetningene av gjær.

4.3.12 Forhold mellom peptider + aminosyrer og ikke-protein Nitrogen

Forholdet mellom TCA-løselig Nitrogen og ikke-protein Nitrogen ble signifikant påvirket av forsøksfaktorene; *gjær* ved 30 dager, og *vasket* ved 60 dager. Figur20 viser at kontollosten hadde lavere forhold mellom TCA-LN og LN ved dag 30 sammenlignet med de andre ostene. Figur 21 viser forholdet mellom peptider + aminosyrer ved dag 60, ut fra om osten ble vasket før pakking eller ikke. Det viste seg at vasket ost hadde et relativt høyere TCA innhold.



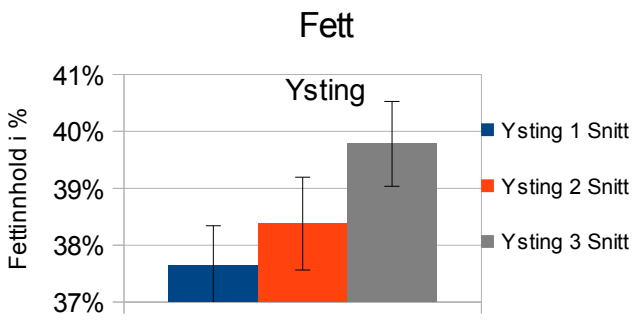
Figur 20: Utvikling av forhold mellom peptider + aminosyrer og ikke-protein Nitrogen under lagring av ostens. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for de ulike tilsetningene av gjær.



Figur 21: Forhold peptider + aminosyrer og ikke-protein Nitrogen ved dag 60. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for vasket ost og og uvasket ost.

4.3.13 Fett

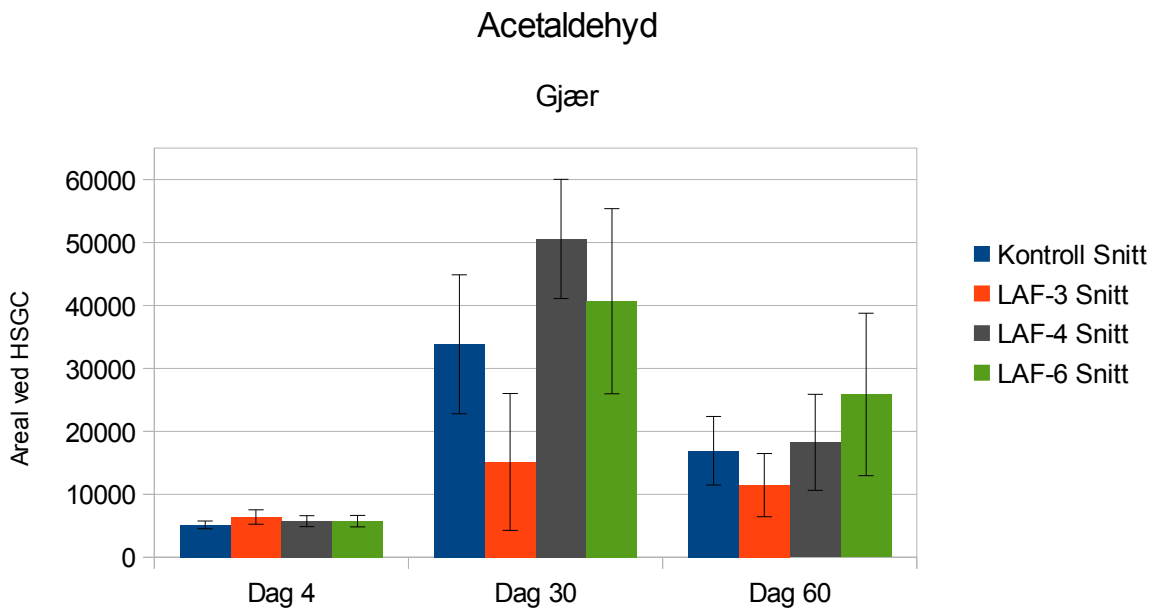
Figur 22 viser mengden fett i osten ved dag 60. Det ble funnet ut at forsøksfaktoren ysting hadde signifikant effekt på fettinnholdet på moden ost. Ost fra ysting1 hadde lavest fettprosent på 37,6 % fett i vekt av osten. Ost fra ysting 2 hadde mer fett i osten enn ysting 1. Mest fett hadde ost fra ysting 3 med 39,8 % fett i osten. I forholdet mellom fett og tørrstoff ble ikke funnet signifikant forskjeller mellom ystingene, alle ostene hadde rundt 60 % fett i tørrstoff. Mengden fett i ystemelken ble målt til 5,3 % for ysting 1, 5,25 % for ysting 2 og 5,3 % for ysting 3.



Figur 22: Fettinnhold i osten ved 60 dager etter ysting. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for ostene fra de forskjellige ystingene.

4.3.14 Acetaldehyd

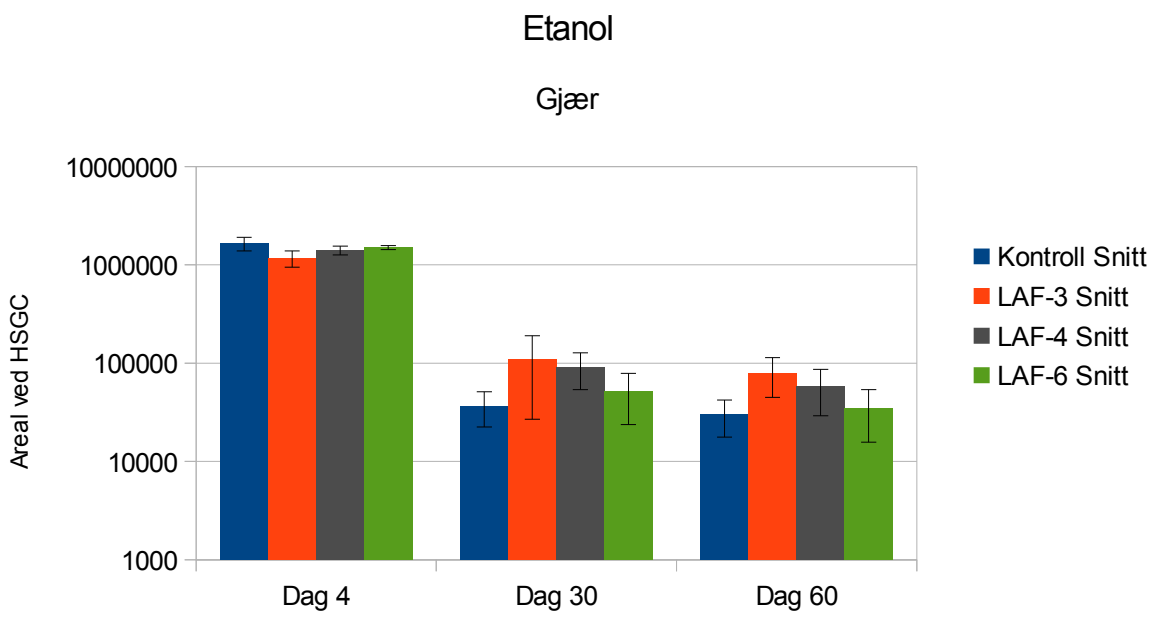
Forsøksfaktoren gjær hadde signifikant effekt på acetaldehyd ved dag 30 og dag 60 etter ysting. I ost 4 dager etter ysting var det ikke signifikante forskjeller mellom ostene tilsatt ulik gjær, ystingen hadde signifikant effekt på innholdet av acetaldehyd. Av figur 23 kan man se at innholdet av acetaldehyd økte fra dag 4 til dag 30. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde et lavere innhold sammenlignet med de andre ostene ved dag 30 etter ysting. Ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde størst innhold av acetaldehyd ved dag 30 etter ysting. Ved dag 60 hadde fortsatt ost med *D. hansenii* (LAF-3) minst acetaldehyd og hadde hatt en lite reduksjon fra dag 30. De andre ostene hadde en relativt større reduksjon av acetaldehyd fra dag 30 til dag 60 etter ysting. Størst innhold hadde ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) 60 dager etter ysting.



Figur 23: Utvikling av acetaldehyd igjennom lagringsperoiden. I figuren vises gjennomsnitt og standardavvik for ostene med de ulike gjærtilsetningene.

4.3.15 Etanol

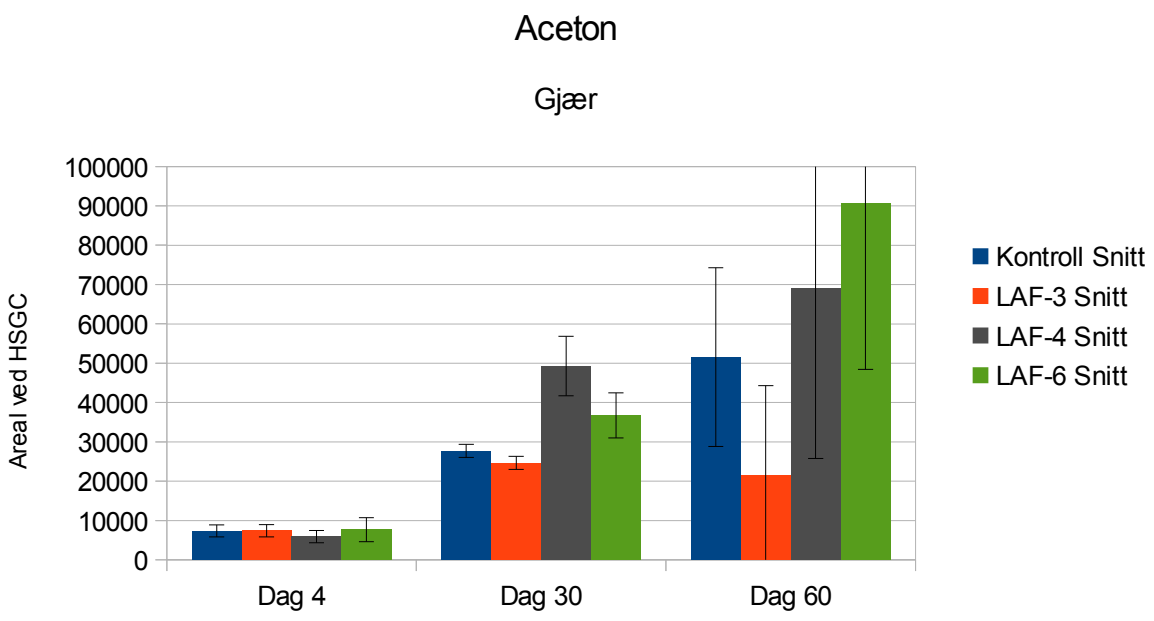
Innholdet av etanol ble funnet til å være signifikant påvirket av forsøksfaktoren gjær 60 dager etter ysting, utviklingen vises i figur 24. Kontollosten hadde lavest konsentrasjon, ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde høyere innhold, mens ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og *K. marxianus* (LAF4) hadde mest etanol ved dag 60. For alle ostene hadde innholdet etanol blitt redusert i løp av lagringsperioden.



Figur 24: Utvikling av etanol igjennom lagringsperoiden. I figuren vises gjennomsnitt og standardavvik for ostene med de ulike gjærtilsetningene. Figuren har logaritmisk skala.

4.3.16 Aceton

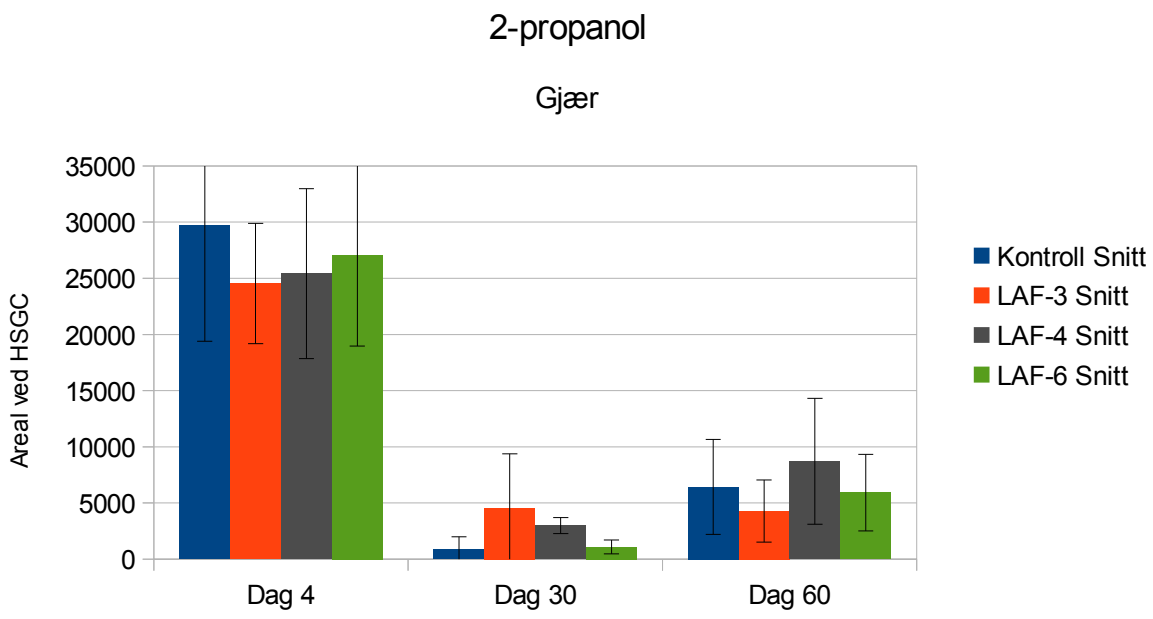
Forsøksfaktoren gjær ble funnet til å påvirket innholdet av aceton signifikant ved 30 og 60 dager etter ysitng. Figur 25 viser innholdet av aceton i løpet av langringstiden. Det gjennomsnittlige innholdet av aceton økte for alle ostene fra dag 4 til dag 30 etter ysting, for alle tilsetningene av gjær fortsatte økningen fram til dag 60, med unntak av ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3). Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) ble funnet til å ha minst innhold både ved 30 og 60 dager etter ysting. Kontollosten hadde tilnærmet samme innhold som ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) ved 30 dager etter ysting, men økte konsentrasjonen til dag 60 etter ysting. Ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde størst konsentrasjon av ostene ved dag 30, men ikke ved dag 60 etter ysting. Ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde den største konsentrasjon av aceton ved dag 60 etter ysting. Standardavvikene for alle ostene er store ved dag 60 sammenlignet med ved dag 30 etter ysting.



Figur 25: Utvikling av aceton igjennom lagringsperoiden. I figuren vises gjennomsnitt og standardavvik for ostene for de ulike gjærtilsetningene.

4.3.17 2-propanol

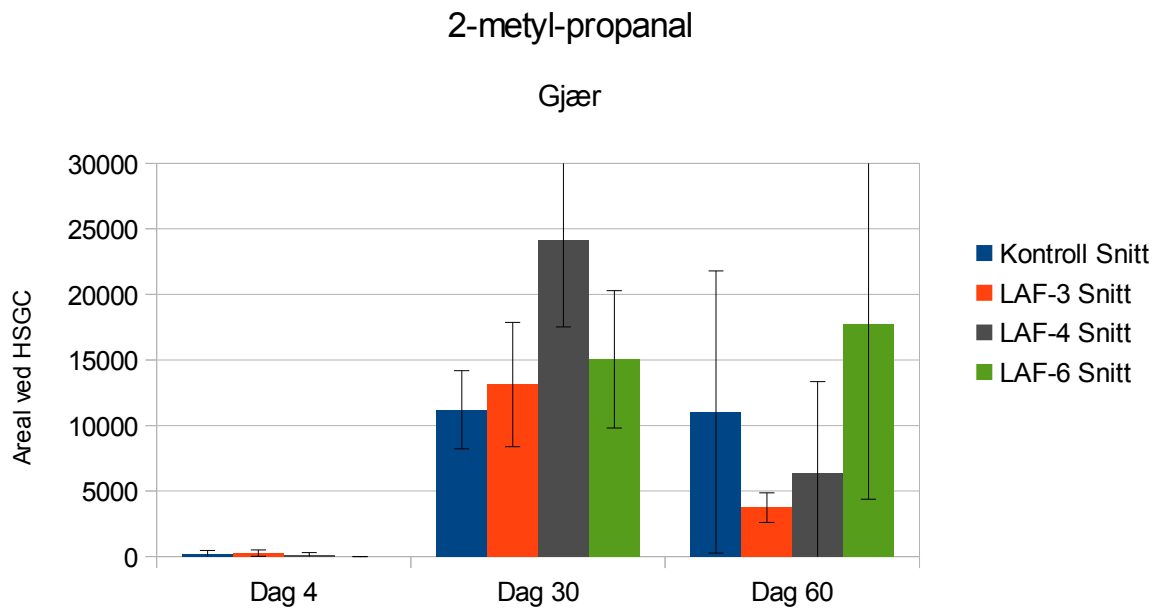
Forsøkfaktoren gjær påvirket innholdet av 2-propanol ved dag 60 etter ysting signifikant. Innholdet av 2-propanol vises i figur 26. Megnden 2-propanol hadde blitt redusert fra ung ost til dag 30 etter ysting og økt fram til 60 dager etter ysting. Ost tilstatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde det laveste innholdet ved dag 60, mens ost med *K. marxianus* (LAF4) hadde det høyeste innholdet av 2-propanol. Standardavvikene ved dag 60 var store sammenlignet med dag 30 etter ysting.



Figur 26: 2-propanol i osten i løpet av tiden på lageret. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for ostene for de ulike gjærtilsetningene.

4.3.18 2-metyl-propanal

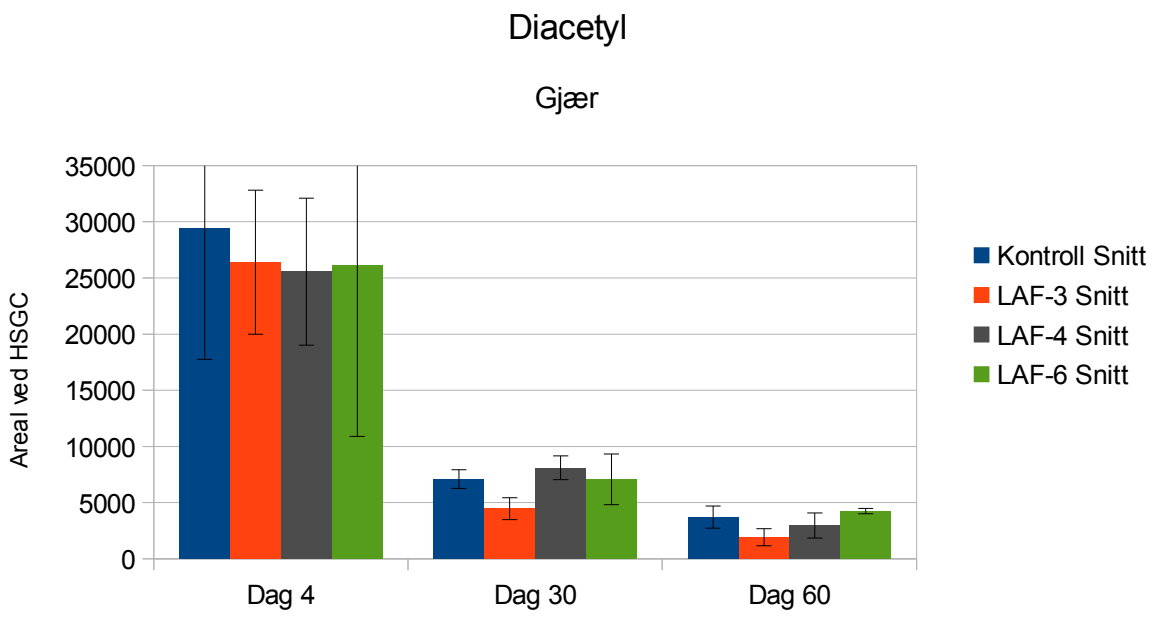
Innholdet av 2-metyl-propanal ble signifikant påvirket av forsøksfaktorene gjær ved 30 og 60 dager etter ysting og faktoren ysting 30 dager etter ysting. Innholdet av denne aromatiske forbindelsen økte fra dag 4 til dag 30 etter ysting, utviklingen er vist i fugur 27. Kontollosten økte minst og hadde lavest innhold av 2-metyl-propanal ved dag 30, mens ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde litt mer. Høyest innhold ved dag 30 etter ysting hadde ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4). Ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde noe høyere innhold av 2-metyl-propanal ved dag 30 sammenlignet med ost med *D. hansenii* (LAF-3). Ved dag 60 etter ysting hadde *D. hansenii* (LAF-3) det laveste nivået av 2-metyl-propanal etter en klar reduksjon fra dag 30. Ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde en klar reduksjon av denne flyktige aromakomponenten mellom dag 30 og dag 60, konsentrasjonen var ved dag 60 litt høyere enn *D. hansenii* (LAF-3), men lavere enn både kontollosten og ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6). Ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde veldig stort standardavvik ved dag 60, gjennomsnittet av målingene av 2-metyl-propanal var det høysete av alle gjærtypene. Kontollosten hadde en liten reduksjon fra dag 30 til dag 60, men standardavviket var stort.



Figur 27: Utvikling av 2-metyl-propanal i osten på lageret. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for ostene for de ulike gjærtilsetningene.

4.3.19 Diacetyl

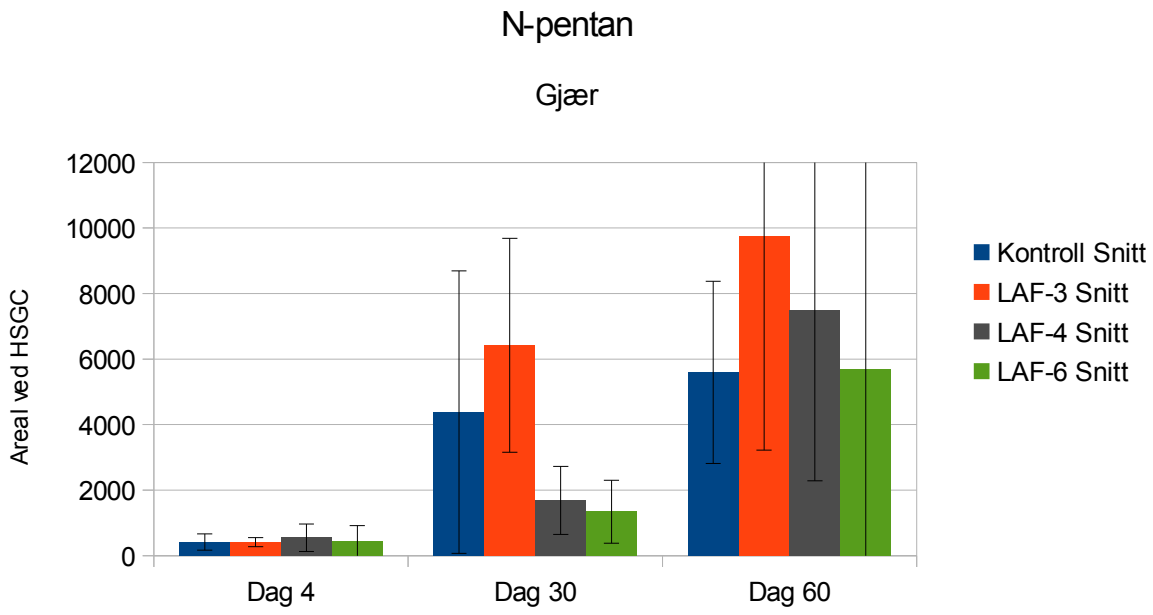
Diacetyl ble funnet til å være signifikant påvirket av forsøksfaktoren gjær ved 30 og 60 dager etter ysting. Innholdet av diacetyl ble redusert igjennom hele lagringsperioden. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde lavest innhold ved både 30 og 60 dager etter ysting, som vist av figur 28. Kontollosten og ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde tilnærmet like verdier både ved 30 og 60 dager. Ost med *K. marxianus* (LAF4) hadde den høyeste konsentrasjonen av diacetyl ved dag 30, men ved dag 60 hadde både kontroll-ost og ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) høyere innhold.



Figur 28: Utvikling av diacetyl i osten på lageret. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for ostene for de ulike gjærtilsetningene.

4.3.20 N-pentan

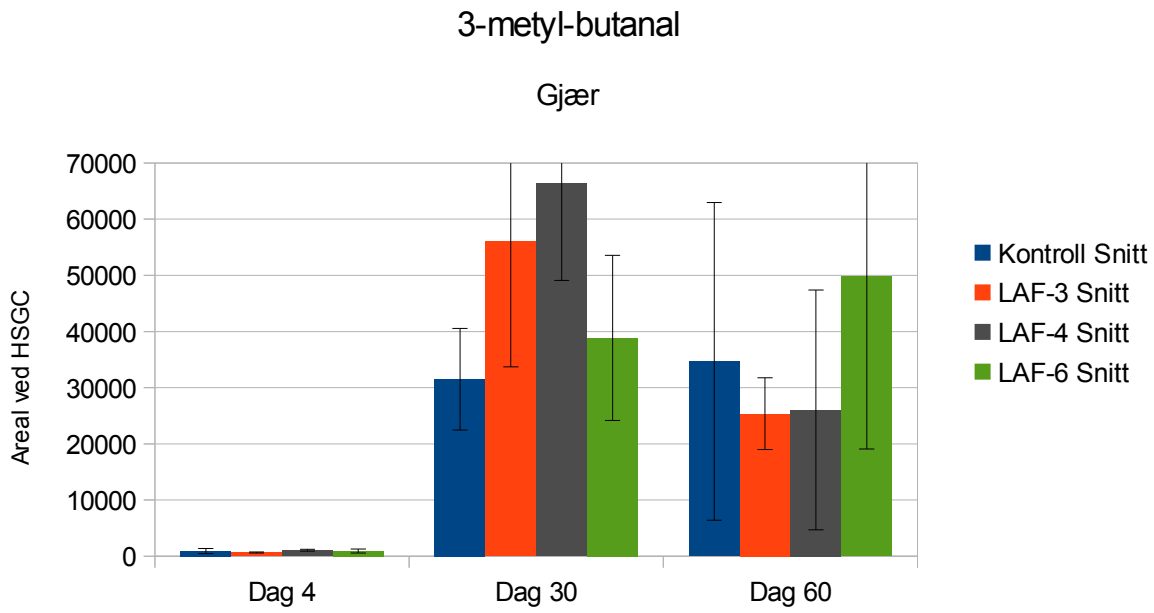
Forsøksfaktorene som påvirket innholdet av n-pentan var gjær ved 30 dager, og ysting ved 30 og 60 dager etter ysting. Som figur 29 viser hadde ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og kontroll-ost et høyere innhold av n-pentan, sammenlignet med ost tilsatt *K. marxianus* (LAF-4) og *S. cerevisiae* (LAF-6) ved 30 dager etter ysting. Innholdet økte igjennom hele lagringsperioden. Det var store forskjeller mellom ostene både ved 30 og 60 dager.



Figur 29: Utvikling av n-pentan i osten på lageret. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for ostene for de ulike gjærtilsetningene.

4.3.21 3-metyl-butanal

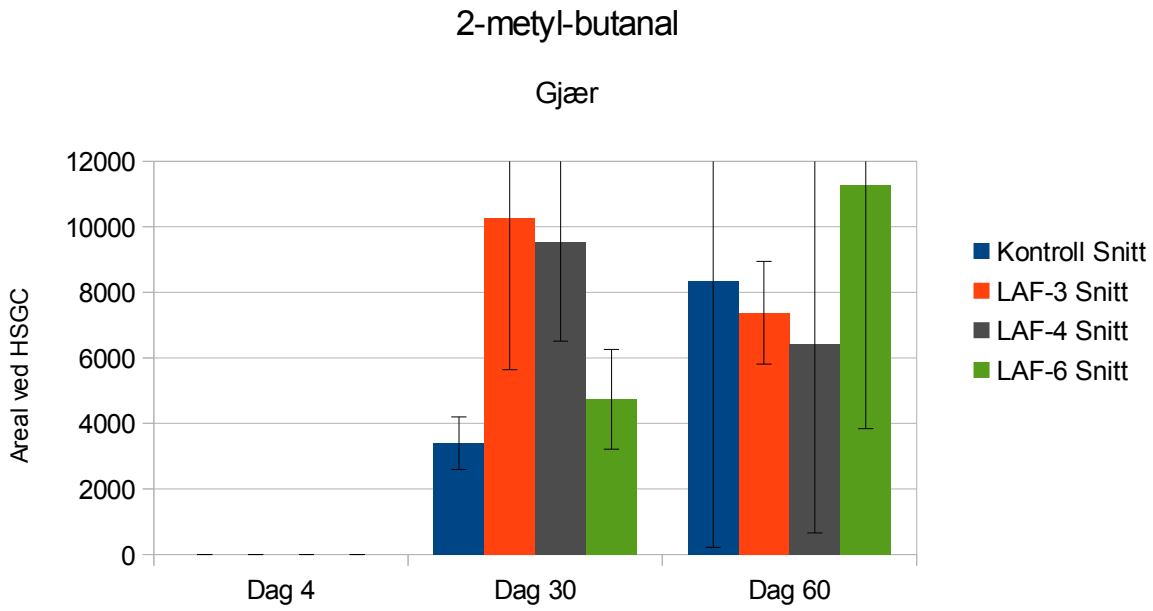
Forsøksfaktoren gjær hadde signifikant effekt på innholdet av 3-metyl-butanal ved dag 30 etter ysting. Utviklingen til denne flyktige aromakomponenten vises i figur 30, kontollosten hadde det laveste innholdet, og ost med *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde litt høyere innhold, 30 dager etter ysting. Det var høyere konsentrasjoner i ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) og *D. hansenii* (LAF-3), sammenlignet med kontollosten og ost tilsat *S. cerevisiae* (LAF-6) ved dag 30 etter ysting.



Figur 30: Utvikling av 3-metyl-butanal i osten på lageret. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for ostene for de ulike gjærtilsetningene.

4.3.22 2-metyl-butanal

Innholdet av 2-metyl-butanal ble signifikant påvirket av forsøksfaktoren gjær 30 dager etter ysting. Som figur 31 viser, hadde ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og *K. marxianus* (LAF4) mye høyere innhold av 2-metyl-butanal ved 30 dager etter ysting, sammenlignet med kontollosten og ost med *S. cerevisiae* (LAF-6).

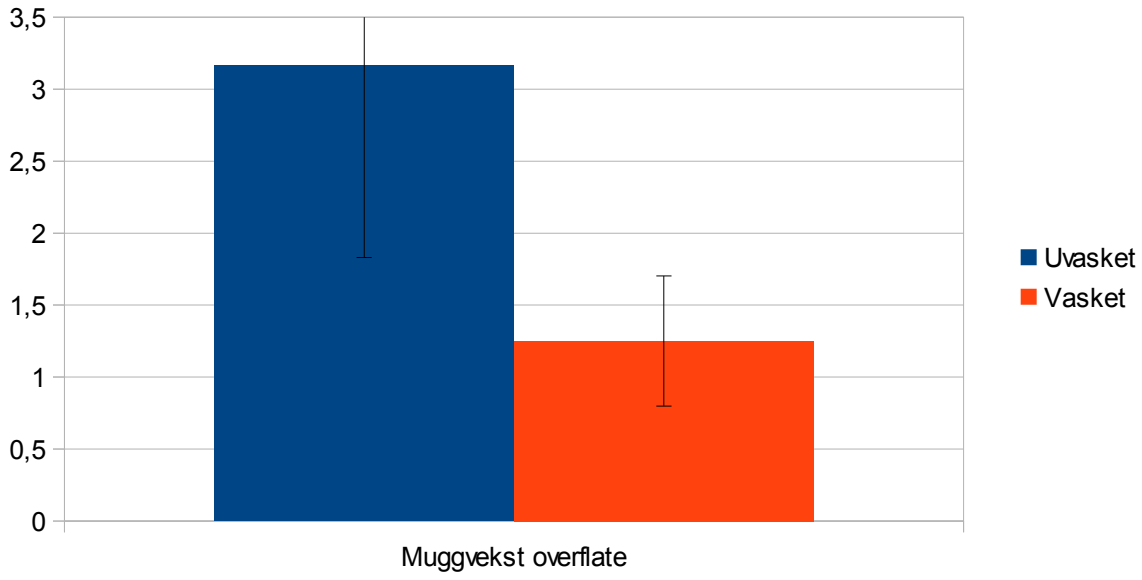


Figur 31: Utvikling av 2-metyl-butanal i løpet av tiden på lageret. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for ostene for de ulike gjærtilsetningene.

4.4 Sensoriske analyser

4.4.1 Synlig muggvekst

Som det fremgår av tabell 3, ble det ikke funnet sensoriske analyser som var signifikant påvirket av forsøksfatorene, bortsett fra synlig muggvekst. Figur 32 viser at det var mer synlig mugg på ostene som ikke ble vasket før pakking, sammenlignet med ostene som ble vasket. Det ble funnet at standardavviket var mye større på uvasket ost, sammenlignet med vasket ost.



Figur 32: Andel av areal dekket av synlig mugg. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik for vasket og uvasket ost.

4.4.2 Smak sensorisk

Den sensoriske analysen viste at ingen av forsøksfaktorene påvirket smaken til osten. En av dommerne noterte i kommentarfetet at det smake gjær av 3 av 8 oster. Ostene med kommentarer var tilsatt både *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* og *Saccharomyces cerevisiae*, to av disse var uvasket, mens én vasket. To av dommerene kommenterte etter bedømmingen at det var en klar smaksforskjell på ostene, men la til at det kunne ha vært saltinnholdet de hadde rangert. Flere av dommerne kommenterte at det var svært vanskelig med det høye antallet prøver.

I kommentarfeltet ble det skrevet noen smaksfeil på osten. Disse feilene er vist i tabell 6.

Tabell 6: Smaksfeil notert under sensorisk bedømmelse av osten, ut fra gjærtype.

Gjær	Gjærsmak	Annen kommentar
Kontrollost	1	
LAF-3	1	
LAF-4	2	1 (uren smak, ikke god)
LAF-6	2	

5. Diskusjon

5.1 Prinsipalkomponentanalyse

Funnet av melkesyre, som den eneste betydelige responsen i PK analysen av organiske syrer, betyr at de andre organiske syrene påvirket osten i svært liten grad. Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde lite av denne syra, mens ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde mye.

PK analyse av øvrige signifikante responser viste at det var til dels stor forskjeller på ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6). Hovedforskjellen mellom disse ostene viste seg å være gjær i kjernen av osten. Selv om både ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) og tørrstoff lå tildels til vestre i biplottet, skilte PK2 disse fra hverandre ved at *S. cerevisiae* (LAF-6) var spred i hele høyden av biplottet, mens tørrstoff lå svært lavt i biplottet. Kontrollosten og ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde mindre utslag enn ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og *S. cerevisiae* (LAF-6). Dette tyder på at *K. marxianus* (LAF4) hadde liten påvirkning på osten i forhold til kotrollosten. PK2 viste tendens til at ysting var forklarende faktor.

PK analysen av flyktige aromakomponenter viste at ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde lite smakstoffer ved 60 dager etter ysting. Dette kan ha en sammenheng med nivået av melkesyre i osten, siden *P. roqueforti* kan bryte ned og bruke melkesyre som energikilde (Torres et al., 1996). Siden *D. hansenii* forbrukte melkesyre, i ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3), kan det tyde på at *P. roqueforti* har hatt litt senere vekst i denne osten. Tempel & Jakobsen (2000) viste at stammer av *D. hansenii* kan til en viss grad inhibere *P. roqueforti. Penicillium roqueforti* er den viktigeste aromakomponentprodusenten i blåmuggost, og hvis den har vokst med redusert hastighet, kan det forklare mindre produksjon av aromakomponenter i denne osten (McSweeney & Sousa, 2000). Produsenten av gjærene hevder at *K. marxianus* (LAF4) skulle ha sterk proteolytisk effekt og bidra til smaksutvikling, men påvirket ikke smakstoffene påvist PK analysen (Chr Hansen A/S, 2011b). Sammenlignet med de andre ostene, hadde ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) en

større produksjon av aromakomponenter, fordi *Penicillium roqueforti* hadde en større mengde melkesyre tilgjengelig til bruk som energikilde(Torres et al., 1996). Dette tyder på at Saccharomyces cerevisiae gav osten en raskere utvikling.

I alle 3 PK analysene skilte ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) seg klart fra ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6). Dette kan tyde på at disse gjærene hadde invirking på osten, men på svært forskjellig måter. Kontrollosten og ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) plasserte seg stort sett tett ved hverandre i biplottene nær sentrum. Dette kan tyde på at *K. marxianus* (LAF4) har hatt tildels liten innvirkning på osten.

5.2 Mikrobiologiske analyser

Det ble ikke funnet gjær i pasteurisert melk, brukt under ysting av osten, som var forventet, siden gjær drepes av varmebehandling, og dette var en forutsetning for forsøket (Engel et al., 1994). Dette viser også at gjær funnet senere i kontrollosten ikke kom fra melka. Etter inokulering med gjær ble det funnet litt mindre kde i ostemassen enn det som var ønsket ut fra forsøksoppsettet. Variasjonen av kde etter inokulering av ostemassen var liten, ca log 1,5. Denne variasjonen påvirket trolig ikke forsøket. Det ble ikke funnet gjær i kontrollostens ostemasse. Dette viser at kontrollosten trolig ikke var kontaminert under ysting, som forventet.

I kontrollostens kjerne ble det ikke funnet vekst av gjær før dag 30. Da viste én av 3 oster vekst. Veksten skyldes trolig smitte fra en ukjent kilde. Ved dag 60 ble det påvist vekst av gjær i 4 av 6 kjerneprøver fra kontrollostene, kilden til gjæren er ukjent. På overflaten til kontrollosten ble det funnet gjær 6 dager etter ysting, og etter det økte gjærinnholdet fram til dag 60, da det var på høyde med innholdet av gjær i ost hvor gjær var tilsatt. Påvising av gjær var uønsket og en feilkilde for forsøket, men det var dessverre ikke et overraskende funn siden gjær svært ofte blir funnet i blåmuggost også fra kommersielle produsenter (Jakobsen & Narvhus, 1996). Det var relativt lite mugg i kontollostenes kjerne sammenlignet med ostene der gjæren trivdes godt, og gjæren var ikke like lenge i kontrollosten sammenlignet med ost tilsatt gjær, allikevel er det svært vanskelig å si hvilken effekt den har hatt på osten.

Det ble ikke påvist gjær i kjernen til osten tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) 2 dager etter ysting, det kan være 2 grunner til mangelen på funn i ostens kjerne ved 2 dager. Det kan være slik at *Debaryomyces hansenii* døde ut i kjernen, for så å vokse tilbake til kjernen fra overflaten når forholdene ble bedre, eller om et lite antall gjærceller overlevde i kjernen med svært liten aktivitet. Det var god vekst av *D. hansenii* på overflaten på samme tid, det kan trolig skyldes at *D. hansenii* trives godt med oksygen tilstede (Sanchez et al., 2006). I kjernen til osten, fra dag 4 til dag 60, vokste *D. hansenii* fra rundt log 1 til over log 8. Dette viste at forholdene bedret seg i osten i løp av lagringsperioden. På overflaten trivdes og vokste *D. hansenii* godt hele tiden. Melkesyre er en mulig energikilde for *D. hansenii* som var tilgjengelig i hele osten, også i ung ost (Narvhus & Gadaga, 2003). Det var en nedgang i kde målt i prøver fra overflaten til alle ostene tilsatt gjær, mellom dag 2 og dag 4. Dette skyldes trolig at laktosen tok slutt og det ble mindre næring å vokse på.

Ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde stabil kde målt i prøver fra kjernen fram til og med dag 30, mens mellom dag 30 og dag 60 vokste *K. marxianus* kraftig slik som *D. hansenii* også gjorde på samme tid. Også på overflaten hadde *K. marxianus* gode vekstvilkår hele lagringsperioden og veksten skilte seg lite fra *D. hansenii*.

Ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde jevnt over en svakere vekst av gjær. Antallet kde av *Saccharomyces cerevisiae* ble redusert i ostens kjerne fram mot dag 60. På overflaten var det vekst av *S. cerevisiae* under langringsperioden, men veksten var klart svakere sammenlignet med de andre ostene i forsøket, inkludert kontrollosten. Dette peker på at *Saccharomyces cerevisiae* ikke trives godt i ostens kjerne. Funnet av at *Saccharomyces cerevisiae* ikke trivdes i ostens kjerne stemmer ikke med studien av Hansen et al.(2001), som viste at *S. cerevisiae* kunne trives godt i kjernen av en blåmuggost. Grunnen til denne kan kanskje være stammespesifikke forskjeller, eller at forholdene i ostene var forskjellig, dvs høyt tørrstoff i osten i dette forsøket. Siden *S. cerevisiae* ikke vokste godt i kjernen av osten, gjør derfor at det er grunn til å tro at kjemiske forskjeller i osten i hovedsak skyldtes veksten på overflaten til osten, og ikke veksten i kjernen. Osten i forsøket var liten, og hadde derfor stor overflate i forhold til volum. Det er derfor ikke en selvfølge at resultatene fra dette forsøket er overførbare til oster med et større forhold mellom volum og overflate.

5.3 Kjemiske analyser

5.3.1 pH

Det var ingen signifikante forskjeller i pH verdi mellom ostene til og med dag 6, noe som tyder på at ystingen og utviklinga av melkesyrebakterier var lik i alle ostene. pH-verdiene i melka, ved løping og skjæring var innenfor kvalitetskravene oppgitt i TINEs konfidensielle produksjonsanvisning, men ved avtapp, 24 og 48 timer var pH i ostene litt over forventet nivå ut fra kvalitetskravene til TINE. Forskjellen i pH ved dag 30 etter ysting skyldes trolig nedbryting av melkesyre til etanol hos *D. hansenii*, slik at pH økte raskere i denne ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3). Det at det ikke ble funnet forskjell i pH ved dag 60 etter ysting kan forklares enten ved at forskjellene i mengde melkesyre ble redusert fra dag 30 til dag 60, ved at proteolysen hadde kommet lenger for alle ostene, eller en kombinasjon av disse faktorene, med det resultat at de relative forskjellene var blitt mindre.

5.3.2 Tørrstoff

Ved 24 timer etter ysting var tørrstoffprosenten i gjennomsnitt 54,8 % , dette her høyere enn ønsket. Målet var å få tørrstoff ved 24 timer mellom 52 % og 54 % (konfidensiell prosessbeskrivelse fra TINE). Grunnen til denne høye tørrstoffetprosenten ved 24 timer etter ysting, er trolig litt sen skjæring av ostemassen, eller for hard behandling av ostemassen under fylling av formene. Etter 30 dager hadde tørrstoffet økt og endte over 61 %. Ut fra prosessbeskrivelsen var det ønskelig med et tørrstoffinnhold >54 %. Selv om TINE ikke hadde noen offisiell maksimal tørrstoffverdi for sin Norzola ved 30 dager, så er 61 % høyt. Ved dag 60 var ysting 3 signifikant tørrere enn ostene fra ysting 1 og 2 med over 66 % tørrstoff, TINE hadde ikke tall på tørrstoffnivået ved dette tidspunktet, men dette må anses som svært høyt. Denne forskjellen mellom ostene fra ysting 3 og ostene fra de andre ystingene har påvirket enkelte av de andre responsene. Tørrstoffinnholdet ikke var signifikant forskjellig i ysting 3 fra ysting 1 og

2, 24 timer etter ysting. Laget stoppet ved en feil i noen dager, på grunn av en sikring som røk. Temperaturen på lageret var 18 °C, når feilen ble oppdaget, luften virket tørrere, men luftfuktighet ble ikke notert. Grunnen til det høye tørrstoffet i alle ystingene var trolig lageret, og ysting 3 ble spesielt påvirket siden denne osten fikk denne tørre perioden på lageret tidlig i lagringsforløpet. Variasjonene i tørrstoff i mellom ystingene spiller liten rolle for forsøket, fordi effekten av ysting ble beregnet uavhengig av effekten til forsøksfaktorene gjær og vasket ved variansanalysen.

Mengden vann i fettfri ost var lavere for ysting 3 og skyldes trolig tørrstoffets variasjoner.

5.3.3 Salt

Saltinnholdet ble funnet signifikant påvirket av gjærtypene tilsatt osten, men dette kan ikke skyldes gjæren tilsatt osten. Det som trolig er årsak til dette er tørrsaltinga ostene gikk igjennom, der hver enkelt ost ble påført tørt salt manuelt én etter én. Standardavviket varierer svært i mellom de ulike ostene tilsatt ulik gjær, men det var et begrenset antall oster som ble analysert. Det er derfor grunn til å tro at dette resultatet skyldes store variasjoner i saltinnholdet mellom enkelt-oster.

Saltinnholdet ble ikke funnet til å være over 6 % i noen ost, og ingen av gjærtypene som ble undersøkt blir hemmet av denne saltkonsentrasjonen (Breuer & Harms, 2006, Sanchez et al., 2006, Sinigaglia et al., 1998).

5.3.4 Salt i ostens vann

Det ble også for salt i ostens vann funnet at gjærtypene tilsatt osten hadde signifikant utslag. Saltinnholdet er en av to parameter i beregningen av salt i ostens vann, den andre parameteren er tørrstoff. Derfor er det lite trolig at salt i ostens vann påvirkes av gjærtype når hverken saltinnholdet eller tørrstoffet anses å være påvirket av hvilken gjær osten er satt til. Det signifikante utslaget skyldes samme feil som for saltinnholdet.

5.3.5 Orotinsyre

Kilden til orotinsyre er glutamin. Orotinsyre er en mellommetabolitt i produksjon av uridin 5'-monofosfat som omdannes til cytosin monofosfat, et viktig molkekyl i DNA (Champe et al., 2005, s. 300–301). Siden dette er en mellommetabolitt sier dette svært lite om utviklingen i osten.

5.3.6 Pyrodruesyre

Pyrodruesyre er en viktig komponent tidlig i melkesyrebakteriers karbohydratmetabolisme (Izco et al., 2002). Pyrodruesyre kan brytes ned til en lang rekke stoff som acetaldehyd, acetoin, melkesyre, diacetyl mf. (McSweeney & Sousa, 2000) Siden dette er en vanlig mellommetabolitt har jeg ikke funnet noen klar tolking av resultatene angående denne syren.

5.3.7 Melkesyre

Det ble ikke funnet forskjeller i innhold av melkesyre 4 dager etter ysting, som også var forventet siden det var svært tidlig i lagringsperioden og gjærveksten var så vidt kommet i gang. Det var forventet at ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde et lavere innhold av melkesyre sammenlignet med resten av ostene ved dag 30 og dag 60 etter ysting, siden nedbryting av melkesyre er en egenskap til gjæren ut fra produktinformasjonen, en egenskap til *D. hansenii* som også påvises i en studie av Percorino Romano ost. (Chr Hansen A/S, 2011a, Deiana et al., 1984) Forventingen stemte med resultatene. Ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde høyt innhold av melkesyre ved dag 60 etter ysting, denne osten hadde også lavere pH, og svært få gjær i kjernen på dette tidspunktet, som tyder på at *S. cerevisiae* verken har likt seg i kjernen eller brutt ned melkesyre.

5.3.8 Eddiksyre

Økningen i mengde eddiksyre i kontrollosten fra dag 30 til dag 60 kommer trolig av nedbryting av acetaldehyd, av *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Liu et al., 1997). Det var kun ved 60 dager etter ysting eddikkonsentrasjonen ble funnet til å være signifikant påvirket av forsøksfaktoren gjær. Ost tilsatt *D. hansenii* hadde minst eddiksyre, de kommer trolig av evnen til respirasjon (Sánchez et al., 2008). Respirasjonen til *D. hansenii* hindret trolig produksjon av actetaldehyd fra melkesyre siden mengden melkesyre i osten tilsatt *D. hansenii* var mindre (Urbach, 1995). Siden det var mindre acetaldehyd i ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) sammenlinget med kontrollosten, kunne ikke *L. cremoris* produsere like mye eddiksyre i denne osten. Ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) hadde omtrent samme innhold av eddiksre som i kontrollosten. Det antas derfor at *K. marxianus* ikke påvirket innholdet av eddiksyre i noen vesentlig grad. Ost tilsatt *Saccharomyces cerevisiae* som har egenskapen til å produsere eddiksyre fra acetaldehyd (Cha et al., 2011). Det har trolig skjedd siden mengde eddiksyre i osten var høy samtidig som mengde acetaldehyd i osten var lav.

5.3.9 DL-Pyroglutaminsyre

DL-pyroglutaminsyre er et resultat av proteolyse generelt og nedbryting av glutamin spesielt (Orekhova et al., 2005). Det økte innholdet av DL-pyroglutaminsyre i alle ostene med tilsatt gjær og spesielt de som var tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) sammenlignet med kontrollosten ved dag 30 etter ysting, tyder på at gjær dreier proteolysen mot produksjon av DL-pyroglutaminsyre eller gjør omdanningen raskere. Ved dag 60 etter ysting hadde kontrollosten økt innholdet av DL-pyroglutaminsyre, mens ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde samme nivå, og dette tyder på at kontroll-ost laget syren senere sammenlignet med ostene tilsatt gjær, mens *D. hansenii* ikke bryter ned syren. Det var svært stort standardavvik i ost tilsatt *D. hansenii*, så effekten av *D. hansenii* er noe usikker. Derimot viser reduksjonen av DL-pyroglutaminsyre i ost tilsatt *K. marxianus* (LAF-4) og *S. cerevisiae* (LAF-6) at *K. marxianus* og *S. cerevisiae* bryter DL-pyroglutaminsyren ytterligere ned.

5.3.10 Ikke-protein Nitrogen

Funnet av et signifikant forskjell i løselig nitrogen alene sier trolig svært lite om osten alene.

5.3.11 Forhold mellom peptider + aminosyrer og ikke-protein Nitrogen

I følge Lacroix et al. (Lacroix et al., 2010) betyr forholdstallet mellom mengde TCA-LN (peptider + aminosyrer) og LN (ikke-protein Nitrogen) hvor mye av ostens proteiner som har gjennomgått en sekunder proteolyse i forhold til hvor mye proteiner som er nedbrutt. Det vil si hvor stor andel av aminosyrene som er butt ned videre til aldehyder, ammoniakk og indoler. Dette inkluderer smakstoffer som; 2-metyl-propanal og 3-metyl-butanal. (McSweeney & Sousa, 2000). Kontrollosten hadde et lavere innhold av (TCA-LN /LN) sammenlignet med alle ostene tilsatt gjær, 30 dager etter ysting. Ost tilsatt gjær har derfor trolig hatt en raskere proteolyse sammenlignet med kontrollosten. Dette stemmer overens med funnene av smakstoffene 2-metyl propanal, 2-metyl butanal og 3-metyl butanal. Gjær produserte mer av alle disse aromakomponentene enn kontrollosten, på dette tidspunktet 30 dager etter ysting. Detter 60 dager ble det ikke funnet noen signifikant forskjell i forholdet mellom TCA delt på LN. Kontrollosten hadde "tatt igjen" ostene tilsatt gjær. Innholdet av flere smakstoffer viste samme utvikling. Kontrollost hadde samme eller høyere innhold av 2-metyl propanal, 2-metyl-butanal og 3-metyl-butanal. Det betyr ikke nødvendigvis at kontrollosten tok igjen proteolysen til ost tilsatt gjær. Det er heller trolig at aromakomponentene ble brutt ned videre, til alkoholer og syrer (McSweeney & Sousa, 2000).

Vasket ost hadde høyere forhold mellom TCA-LN og LN, ved 60 dager etter ysting, sammenlignet med ost som ikke ble vasket før pakking, noe som kan tyde på at proteolysen var sterkere i vasket ost. Dette funnet var uventet, siden fjerning av mikroorganismene som bryter ned osten, ikke skulle tilsi at osten ble rakere nedbrutt.

5.3.12 Fett

Det ble funnet mer fett i ysting 3 sammenlignet med ysting 1 og 2. Dette var forventet ut fra at det var et høyere tørrstoffinnhold i ytsitng 3, noe som ble bekreftet ved at det ikke ble funnet signifikante forskjeller i mengden fett i tørrstoff mellom ostene. Fettinnholdet i ystemelken ble litt fetere enn målet på 5,2 % fett. Mengden fett i ystemelk ble målt til mellom 5,25 % og 5,30 %. Fettinnholdet i ystemelk er dokumentert ut fra målet om å beskrive osten og produksjonen av den.

5.3.13 Acetaldehyd

Det var som forventet ikke signifikante forskjeller i acetaldehyd innhold i osten 4 dager etter ysting. Økningen av acetaldehyd fra 4 til 30 var forventet, siden enzymene til *L. cremoris* produserer acetaldehyd i modnet ost. Fra melkesyrebakterer, kan acetaldehyd komme både igjennom sitratfermentering og fra nedbryting av melkesyre. Acetaldehyd kan også gjennom nedbrytning av threonin, gjennom enzymet theronin adlolase. Saccharomyces cerevisiae har theronin adlolase. (Liu et al., 1997, Molimard & Spinnler, 1996, Monschau et al., 1998, Urbach, 1995) Ved dag 30 etter ysting hadde ost tilsatt *K. marxianus*(LAF-4) mest acetaldehyd. *Kluyveromyces marxianus* kan omdanne pyrodruesyre til acetaldehyd ved hjelp av dekarboksylering (Medeiros et al., 2000). *Saccharomyces cerevisiae* kan utvikle acetaldehyd fra ethanol og pyrodruesyre. Siden det ble funnet en del av disse stoffene ved 4 dager etter ysting, var det forventet at mer av dette ble omgjort til acetaldehyd av *Saccharomyces cerevisiae*, sammenlignet med kontrollosten. (Pronk et al., 1996).

Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) hadde et lavere innhold av acetaldehyd ved 30 dager etter ysting sammenlignet med alle andre oster, trolig fordi *D. hansenii* omdannet en del melksyre til energi gjennom respirasjon, slik at det ble mindre råstoff for acetaldehydproduksjon (Chr Hansen A/S, 2011a, Deiana et al., 1984, Liu et al., 1997).

I all ost 60 dager etter ysting, hadde mengden acetaldehyd blitt redusert fra dag 30 etter ysting. Årsaken til dette var trolig omdanning av acetaldehyd til eddikksyre eller etanol som *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *cremoris* og *Leuconostoc (Leu.) mesenteroides* subsp. *cremoris* fra melkesyrekulturen kan stå bak (Liu et al., 1997). Siden det ble funnet forskjeller mellom gjærtypene, har også gjæren bidratt til omdanningen til acetaldehyd. *Saccharomyces cerevisiae* har acetaldehyddehydrogenase og kan omdanne acetaldehyd til eddiksyre direkte. Siden *Leu*. C*remoris* produserte etanol fra acetaldehyd, kunne *K. marxianus* og *D. hansenii* omdanne etanol til eddisyre, fordi *K. marxianus* og *D. hansenii* har alkoholdehyrogenase (Calahorra et al., 2009, Cha et al., 2011, Perrone et al., 2007). Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3), hadde minst reduksjon av acetaldehyd, og minst økning av eddiksyre, samtidig som osten hadde mest etanol. Det viste at *D. hansenii* ikke omdannet etanol like effektivt som de andre gjærtypene, i ost mellom dag 30 og dag 60. Ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6) hadde en stor reduksjon av acetaldehyd og en stor økning av mengden eddiksyre, fra dag 30 til dag 60, etter ysting, det viser at *S. cerevisiae* har effektiv omdanning av acetaldehyd. i ostene mellom dag 30 og dag 60, slik som teorien skulle tilsi. Omdanningen alene forklarer ikke all forskjellen i acetaldehyd- og eddiksyrenivåene, fordi ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4) ,hadde størst reduksjon i acetaldehyd innholdet, men bare en liten økning i eddikksyre konsentrasjonen, uten økning i etanol innholdet, fra dag 30 til dag 60 etter ysting.

5.3.14 Etanol

Mengden etanol i osten 60 dager etter ysting var liten for alle ostene, så det har trolig ikke bidratt i vesentlig grad til smak i osten. Det var en liten reduksjon av etanol i alle ostene fra dag 30 til dag 60. Etanol ble brutt ned til eddiksyre i gjennom lagringstiden, som forventet, trolig til estere og eddiksyre. Alle gjærene har alkoholdehydrogenase, som er enzymet som bryter ned alkoholer. Etanol har også trolig blitt produsert, fra nedbryting av acetaldehyd av *Leu. Cremoris*. (Calahorra et al., 2009, Cha et al., 2011, Liu et al., 1997, Molimard & Spinnler, 1996, Perrone et al., 2007, Pronk et al., 1996). Forskjellene i etanolinnhold ved dag 60 var signifikante, kontrollost hadde minst etanol av alle. Dette kan tyde på sen sekundærproteolyse, omdanning av acetaldehyd. Ost

tilsatt *D. hansenii* hadde mest etanol, minst acetaldehyd og lite eddiksyre. Det tyder på sen omdanning av alkohol i denne osten til eddiksyre. Ost tilsatt *K. marxianus* hadde en noe raskere omdanning av etanol til eddiksyre i denne osten. Ost tilsatt *S. cerevisiae* hadde minst innhold av etanol av ostene tilsatt gjær. Det kommer trolig av en direkte nedbryting av acetaldehyd til eddiksyre. Økningen av eddiksyre forklarer ikke hele reduksjonen i etanol fra dag 30 til dag 60. Produksjonen av estere antas å utgjøre denne forskjellen.

5.3.15 Aceton

Aceton, en type keton, dannes fra nedbryting av fettsyrer. (Engels et al., 1997, Molimard & Spinnler, 1996) Det var derfor forventet at innholdet av acetoin skulle stige i løpet av lagringsperioden, slik som resultatene viser. Kontollosten og ost tilsatt *D. hansenii* hadde mindre økning i mengde aceton fra dag 4 til dag 30, og dette betyr at lipolysen gikk senere i disse ostene sammenlignet med ostene tilsatt *S. cerevisiae* og *K. marxianus*. Mengden aceton forble lav i ost tilsatt *D. hansenii* i hele lagringsperioden. Standardavviket var svært stort for ost tilsatt denne gjærtypen ved dag 60, men selv høyest målte verdi som var på nivå med kontrollosten, hadde klart lavere enn de andre gjærene. *Debaromyces hansenii* er i studien av van den Tempel & Jakobsen (2000) beskrevet som ikke lipolytisk, og resultatet stemmer derfor med den studien, mens Cosentino et al. (2001) finner *D. hansenii* til å være lipolystisk. Hvis forskjellene i disse studiene skyldes stammespesifikke forskjeller, kan det antas at stammen brukt i dette forsøket er ikke-lipolystisk. Hansen & Jakobsen (2001) fant at *S. Cerevisiae* hadde lipolytiske egenskaper for kortkjedede fettsyrer, og derfor var det forventet at acetoninnholdet i ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6) var høyt, noe som det var ved både dag 30 og dag 60 etter ysting. *Kluyveromyces marxianus* er beskrevet som svakt lipolytisk i studien av Cosentino et al. (2001), noe som stemte med mengden aceton funnet i osten 60 dager etter ysting. Ved dag 30 viste resultatene uventet at ost tilsatt *K. marxianus* hadde høyest aceton innhold. I kontrollosten øke aceton innholdet fra dag 30 til dag 60 etter ysting, i motsetning til ost tilsatt *D. hansenii* som hadde et stabilt innhold av aceton. Kontrollost antas å ha korrekte verdier, fordi en stopp i lipolysen og dermed aceton produksjonen er urealistisk. Noe som også det store standardavviket for ost tilsatt *D. hansenii* bygger opp om.

5.3.16 2-propanol

Fra dag 30 til dag 60 steg innholdet av 2-pronanol i all ost, grunnet nedbryting av aceton, ut fra Collins et al. (2003). Det var lite 2-propanol i all ost 60 dager etter ysting, sammenlignet med ung ost. Ved 60 dager etter ysting hadde ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) minst 2-propanol, og det kommer trolig av liten mengde aceton. I ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6), hadde *S. cerevisiae* ikke omdannet aceton til 2-propanol, i større grad enn kontrollosten, til tross for stor større produksjon av aceton. Ost tilsatt *K. marxianus* (LAF-4) hadde mest 2-propanol ved 60 dager, og acetoninnholdet var også høyt. Dette tyder på en rask lipolyse.

5.3.17 2-metyl-propanal

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller 4 dager etter ysting, av 2-metyl-propanal. Dette var forventet siden aldehyder er et produkt av sekundær proteolyse, som trolig ikke har kommet i gang etter 4 dager. Innholdet av 2-metyl-propanal økte i all ost fra dag 4 til dag 30, grunnet dekaroksylering av frie aminosyrer til aldehyder, som 2-metyl-propanal, via Strecker reaksjonen. Aldehyder vil ikke konsentreres opp i ost, men brytes ned til alkoholer og syrer. Derfor er ikke et høyt innhold av disse ketonene det samme som sterk proteolyse, siden innholdet av disse stoffene kan ha vært høyere på et tidligere tidspunkt, ut fra McSweeney & Sousa (2000). Kontollosten hadde minst innhold av dette aldehydet ved dag 30, sannsynligvis på grunn av senere og svakere proteolyse sammenlignet med de andre ostene. Størst innhold av 2-metyl-propanal hadde ost tilsatt *K. marxianus* (LAF-4), og det kan betyr rask proteolyse sammenlignet med andre oster. *Kluyveromyces marxianus* er beskrevet i produktinformasjonen som en gjær med høy aminopeptidaseaktivitet (Chr Hansen A/S, 2011b). Ved 30 dager etter ysting hadde også ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6) et relativt høyt innhold av 2-metyl-propanal, som trolig skyldes interaksjonen mellom *S. cerevisiae* og *P roqueforti* som gir økt proteolyse , beskrevet i Hansen & Jakobsen (2001). Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3), og kontrollost hadde omtrent samme innhold av 2-metyl-propanal, *Debaromyces hansenii* har trolig derfor ikke påvirket produksjonen

av dette smakstoffet. Reduksjonen av 2-metyl-propanal, fra dag 30 til dag 60, var forventet siden aldehyder raskt blir brutt ned til alkoholer og syrer. (McSweeney & Sousa, 2000) Kontollosten og ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6), hadde høyt innhold av 2-metyl-propanal ved dag 60, noe som viser at tilførselen av dette aldehydet varte lengre i disse ostene, og det indikerer en senere proteolyse i disse ostene.

5.3.18 Diacetyl

Innholdet av diacetyl ble funnet til å være signifikant påvirket av forsøkfaksfaktoren gjær ved dag 30 og dag 60 etter ysting. Nivået av diacetyl var lavt i alle ostene sammenlignet med innholdet i ung ost. Effekten av diacetyl på smaken i osten er ikke klarlagt.

5.3.19 n-Pentan

Mengden n-pentan økte i osten under hele lagringsperioden. Mengden var signifikant større i ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og *K. marxianus* (LAF4), ved dag 30 etter ysting, sammenlignet med kontrollosten og ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6). Ved dag 60 var forskjellene i mengde n-pentan mindre, men også ved 60 dager etter ysting hadde ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3), og *K. marxianus* (LAF4), mer n-pentan, sammenlignet med kontrollosten og ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6). N-pentan er et smakstoff i ost. Det ble ikke funnet litteratur som omhandlet n-pentan. Ut fra navnet er det en lang rett karbonkjede, som sannsynligvis kommer fra fett.

5.3.20 3-metyl butanal

Innhold av 3-metyl butanal indikerer proteolyse og er et nedbrytings produkt av aminosyrer.

Aldehyder som 3-metyl butanal brytes raskt ned til alkoholer og syerer. Det er derfor mer interesant å undersøke når under lagringen innholdet av dette stoffet er høyest, siden det forteller om når produktene av den sekundære proteolysen finnes i osten, ut fra McSweeney & Sousa (2000). Innholdet av 3-metyl butanal var signifikant påvirket av gjærtypen tilsatt osten ved dag 30 etter ysting. Kontollosten hadde minst innhold av dette stoffet etter 30 dager, men holdt innholdet av dette aldehydet stabilt til dag 60, og det var ikke signifikante forskjeller etter 60 dager. Dette tyder på en senere proteolyse i kontrollosten. Det var ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og *K. marxianus* (LAF4) som hadde størst innhold av 3-metyl butanal, ved 30 dager, og nivået ble redusert til dag 60. Dette tyder på at *D. hansenii* og *K. marxianus* skulle ha sterkere proteolyse på dette tidspunktet. Ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) hadde et nivå som lå mellom kontrollosten og ost tilsatt *D. hansenii* og *K. marxianus*. Nivået økte fra dag 30 til dag 60 etter ysting i ost tilsatt *S. cerevisiae*.

5.3.21 2-metyl butanal

Ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3) og *K. marxianus* (LAF4) hadde større innhold av 2-metyl-butanal ved dag 30 etter ysting, sammenlignet med kontrollost, og ost med *S. cerevisiae* (LAF-6), dette indikerer en raskere proteolyse forårsaket av disse gjærkulturene. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller ved dag 60 (McSweeney & Sousa, 2000).

5.4 Sensoriske analyser

5.4.1 Synlig muggvekst

Det var forventet at det ble funnet mindre muggvekst på vasket ost sammenlignet med ost som

ikke var vasket, av den grunn at under vaskingen ble mye av muggen fysisk fjernet. Undersøkelsen av synlig muggvekst ble satt i gang ut fra at det så ut som det var forskjeller på overflaten til ostene tilsatt ulik gjær. Det ble brukt bilder som var tatt ut fra et ønske om å dokumentere prosessen, derfor var ikke bildene standardiserte. Forskjellene på overflate til osten dreide seg om fargenyanser, og om andel av overflaten dekt av mugg. Med dette som utgangspunkt var det forventet at forsøksfaktoren gjær hadde signifikant påvirkning på den synlige muggveksten, men dette viste seg ikke å være tilfellet. Det hadde vært ønskelig med bilder av osten med standardisert vinkel, lys, kamera o.l., slik at bildene kunne analyseres med datamaskin for å finne sammensettingen av farger, det hadde trolig blitt funnet forskjeller med et slik forsøksoppsett.

5.4.2 Smak

Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller i ostens smak 60 dager etter ysting, og det kan være flere årsaker til dette: Det var ingen eller små forskjeller i ostens aromastoffer, forskjellene i smak skyldtes saltinnhold i osten, metoden brukt for å undersøke dette var ikke god nok, eller en kombinasjon av disse faktorene.

Av de flyktige aromakomponentene ble, 6 av 25 signifikant påvirket av forsøksfaktoren gjær 60 dager etter ysting. Dette inkluderer 2-metyl-propanal som er viktig for smak i ost generelt (Smit et al., 2008). Ut fra forskjellene i aromakomponentene alene, hadde det trolig vært mulig å finne smaksforskjeller, ved å gjøre de endringene i forsøksoppsettet.

Saltinnholdet var forventet å være likt i alle ostene, mens resultatene viser store forskjeller og store standardavvik, trolig på grunn av tørrsaltinga. På grunn av ostens størrelse var det ikke samme ost som ble brukt til sensorisk test og til kjemisk test slik at det er ikke mulig å slå fast hvorvidt sensorisk score er korrelert med saltinnholdet i osten. Det er ikke grunn til å utelukke at saltinnholdet i osten kan ha påvirket smaksopplevelsen under det sensoriske forsøket.

Rangerinsmetoden ble valgt fordi det var forventet store forskjeller mellom ostene, som dommerne lett skulle merke forskjellen på. Dette viste seg at ikke var tilfelle.

Rangeringsmetoden som ble brukt var derfor ikke den beste metoden. Forskjellen var så små at det ville vært best å undersøke hvorvidt det var påvisbare forskjeller mellom prøvene. Da ville triangeltest eller partest fungert mye bedre. Partest kunne avslørt om en ost var sterkere sammenlignet med en annen, mens triangeltest kunne brukes for å undersøke om det var forskjell mellom ostene. Rangeringstestens styrke er heller å sortere antatte, eller tidligere påviste, forskjeller. Denne testen fungerer godt der veldefinerte skalaer ikke finnes, i tillegg er metoden enkel og hurtig. Hver dommer fikk utdelt 8 prøver for hver prøveomgang, noe som er over det som er anbefalt. Partest og triangeltest ble ikke valgt som metode fordi testene bare kunne inneholde 2 prøver, og det var 8 oster som skulle sammenlignes. Skulle alle ostene i hver ysting sammenlignes med hverandre, ved hjelp av partest /triangeltest hadde dette krevd et urealistisk antall tester. Det kunne ha blitt brukt partest/triangeltest for å undersøke om ostene skilte seg fra en referanseost, for eksempel vasket kontroll-ost. En forskjell i partest / trigangeltest, der referanseosten var kontrollosten, ville ikke si noe om eventuelle forskjeller mellom gjærtypene som ble brukt. Derfor ble denne metoden ikke valgt. Poengbedømmelse, en type kassifiseringstest der ost blir gitt poeng for ulike egenskaper, som for eksempel smaksintensitet, ble vurdert. Denne testen ble valgt bort på grunn av krav om spesialiserte dommere og klare standarder (Berg et al., 2005, s. 73–86). Rangeringstesten var den eneste testen hvor alle prøvene kunne være med og samtidig ha potensiale til å peke ut innbyrdes rangering av styrken på smaken. Det var for mange med 8 prøver pr sett. Det hadde vært bedre å bare undersøke for forskjeller i gjær og sett på kun vasket eller uvasket ost samtidig. På den måten hadde hver dommer fått 4 prøver pr sett. Det ble antatt at prøvene skulle ha store smaksforskjeller som dommerne lett skulle finne. Dette viste seg å ikke være tilfelle. Sett i lys av alle resultater hadde det bedre å bruke triangeltest mot standardosten vasket kontroll-ost, for å påvise hvorvidt det var forskjell mellom ostene.

Noen av dommerne hadde skrevet kommentarer i skjemaet brukt under sensorisk testing av osten. Det var få dommere som benyttet seg av denne muligheten. Mest trolig skyldes det at det ikke ble lagt vekt på denne muligheten under kalibrering av dommerene. Hadde dommerne blitt spurt om å lete etter smaksfeil, hadde trolig flere rapportert om gjærsmak. Av ostene, ble 6 bemerket med smak av gjær, mens 1 hadde kommentaren "uren, ikke god". Dette viser at disse gjærene kan lage feilsmak. Funnet av gjærsmak var ikke forventet i ost med *D. hansenii* (LAF-3), siden dette er en gjær som regelmessig finnes i startkulturer brukt i rødkittoster, som ikke

bærer preg av gjærsmak (Bockelmann, 2002). Skal disse gjærartene tilsettes blåmuggost, tyder dette på at utviklinga må kontrolleres slik at gjæren ikke tar overhånd i osten. Det er ikke mulig å utelukke at samme gjær som sprede seg til kontrollosten, også spredte seg til oster tilsatt annen gjær og at kun en gjærart skapte gjærsmak, men samtidig er det ikke urimelig å anta at alle gjærtypene kan danne gjærsmak. Med utgangspunkt i rapporteringene om gjærsmak er det klart at ostene burde ha vært undersøkt systematisk for uønskede smaker, for å finne omfanget av disse smaksfeilene.

5.5 Samlet vurdering av resultatene

Funnet av gjærsmak i noen av ostene, må sees på som en alvorlig smaksfeil. Dette viser at disse gjærkulturene ikke bør tilsettes ukritisk til blåmuggost. Det ble funnet en rekke kjemiske forskjeller i ost tilsatt ulik gjær. Det kan ikke utelukkes at disse forskjellene er tilknyttet gjærsmaken, men det er heller ikke mulig å utelukke at disse endringene kan ha bidratt positivt til smaken i osten. Antallet kde av gjær på overflaten på dette tidspunktet var høyt, over log 7 i alle ostene. I kjernen var antallet kde av gjær på samme tid spredt fra *ikke påvist* i noen oster til *log 8*. Ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6) hadde et gjennomsnitt av kde gjær i kjernen på cirka log 1, høyeste målte enkeltverdi i denne osten var log 4. I denne gruppen med oster ble det rapportert 2 oster med gjærsmak. Dette tyder på at *S. cerevisiae* hadde gjærsmak selv i relativt lave mengder. For de andre gjærtypene kan det tenkes at en mindre mengde gjær i moden ost, kunne gi endrede egenskaper i osten uten gjærsmak. Ostene burde også vært undersøk for hvilke gjærarter som var tilstede i osten ved dag 60. Det kunne kanskje gitt et sikkert svar på hvilke av gjærene som laget gjærsmaken.

Ut fra de PK analyse av de kjemiske egenskapene til osten, samt vekst av gjær, var det klart at ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6) og *D. hansenii* (LAF-3) hadde ulike effekter på osten. Det som var karakteristisk ved ost tilsatt *D. hansenii* (LAF-3), var lite melkesyre, lite av mange aromakomponenter, et høyt innhold av gjær, samtidig som at pH steg raskt. Sammenlignet med de andre ostene, hadde ost tilsatt S. cerevisiae (LAF-6) en tendens til at å ha et høyere innhold av melkesyre, mange aromakomponenter og mindre vekst av gjær, spesielt i ostens kjerne. Antallet

gjær i osten tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6) var lite, men allikevel var påvirkingen av gjæren klart større en *Kluyveromyces marxianus,* som hadde store mengder gjær uten at det skilte den klart fra konrtollosten i PK analysene. Proteolysen og lipolysen ser ut til å ha gått raskere i ost tilsatt *S. cerevisiae* (LAF-6), sammenlignet med alle andre oster, og spesielt *D. hansenii* (LAF-3). Dette kan trolig forklares med interaksjoner mellom disse gjærene og *Penicillium roqueforti*, Tempel & Jakobsen (2000) viste at enkelte stammer av *D. hansenii* kunne redusre veskt hastigheten ved å inhibere *P. roqueforti*. Mens i studien av Hansen & Jakobsen (2001) ble det vist økt vekst i enkelte stammer av *P. roqueforti* i sameksistens med stammer av *Saccharomyces cerevisiae*, samt påvist økt proteolyse. Funnene i denne oppgave stemmer derfor bra overens med forventningene. Til sammen tyder dette på at disse forskjellene skulle gi ostene tilsatt *D. hansenii* (LAF-3), og *S. cerevisiae* (LAF-6) en forskjell i smak. Smaksforskjellene burde også være store nok slik at de burde skille seg fra kotrollost og ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4). Disse antatte forskjellene i smak ble ikke påvist på grunn av dårlig valg av sensorisk analysemetode.

De 3 PK-analysene viste at ost tilsatt *Kluyveromyces marxianus* (LAF-4) overlappet i stor grad med kontrollosten. pH utvikling i osten tilsatt *K. marxianus* (LAF4), var også relativ lik utvikling i kontrollosten. Antall gjær funnet på overflaten til disse ostene ved dag 60, skilte seg lite fra hverandre. Disse ostene skilte seg fra hverandre i produksjon av enkelte aromakomponenter som 2-metyl-propanal, 3-metyl-butanal og 2-metyl-butanal. Når kontrollost og ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4), ble sammenlignet, var det ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4), som hadde det signifikant største innholdet av disse flyktige aromakomponentene. Det var spesielt produksjon av 2-metyl-aldehyder som *K. marxianus* (LAF4) påvirket positivt. Dette tyder på en litt rakere proteolyse i ost tilsatt *K. marxianus* (LAF4). En raskere proteolyse var forventet ut fra produktspesifikasjonen som oppgav at *K. marxianus* (LAF4) hadde høy aminopeptidaseaktivitet (Chr Hansen A/S, 2011b). Men forskjellen mellom *K. marxianus* (LAF4) og kontrollosten var mye mindre enn forskjellene mellom kontrollost og de respektive gjærene *D. hansenii* (LAF-3) og *S. cerevisiae* (LAF-6). Det hadde trolig vært mulig å skille alle ostene fra hverandre på smak hvis det ble brukt triangeltest.

Forsøksfaktoren vasking hadde ingen vesentlig effekt på osten, selv om osten var realativ liten og hadde stor overflate.

5.6 Videre undersøkelser

Selv om det ble oppdaget gjærsmak på flere av ostene, kan det finnes gjærarter og gjærstammer som ikke gir den karakteristiske gjærsmaken. Hadde en slik gjærart eller gjærstamme blitt funnet, kunne den kanskje bli tilsatt ost, for å kontrollere annen gjær, samt bidra til smaken positivt. En mulig kandidat til dette kan være pultostgjær: *Candida rugosa*. Denne er spesielt interessant siden denne gjæren lager mye smak, i pultost, uten å gi gjærsmak.

En naturlig forlengelse av denne oppgaven er å prøve å finne ut om alle gjærene som ble brukt i dette forsøket faktisk gav smak av gjær. Eller om det var krysssmitte som var årsaken til funnet av gjærsmak i all ost.

De proteolytiske evnene til gjæren hadde en effekt på flere smaksstoffer i ost. Fra dette har jeg utformet denne hypotesen: Hvis en kunne dyrke en gjærkultur og drepe gjæren uten denaturering av enzymer. Kunne den døde kulturen tilsettes ystemelken, og på den måten nyte godt av gjærens proteolytiske enzymer, uten fare for vekst av gjærceller.

6. Konklusjon

Dette arbeidet viste at gjær påvirker aromakomponentdannelsen i blåmuggost. Det ble funnet at resultatene kan forklares på 3 tidligere kjente måter: *i) Debaromyces hansenii* (LAF-3) reduserte trolig vekst av *Penicillium roqueforti*, slik at aromakomponentproduksjonen indirekte ble påvirket negativt, *ii) Saccharomyces cerevisiae* økte trolig veksten av *Penicillium roqueforti*, slik at dannelsen av flyktige aromakomponenter økte, *iii) Kluyveromyces marxianus* (LAF-4) økte proteolysen i ost, slik at det ble dannet aromakomponenter direkte. Effekten av *Kluyveromyces marxianus* på ostens proteolyse var mindre enn den indirekte effekten igjennom *Penicillium roqueforti.* Effekten av disse kjemiske endingene ble ikke funnet igjen under sensorisk analyse, da osten ble rangert etter egenskapen smaksintensitet. Det ble funnet ost med gjærsmak. Effekten

av vasking på osten var svært liten.

Referanser

Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J. & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Effects of salts on Debaryomyces hansenii and Saccharomyces cerevisiae under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2–3), 191–197.

Álvarez-Martín, P., Flórez, A. B., López-Díaz, T. M. & Mayo, B. (2007). Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 17(8), 961–967.

Berg, E. W., Solheim, R., Døving, K. B., Skorbakk, O. I., Hauge, B., Kjeilen, T. F., Rødbotten, M., et al. (2005). *Sensorisk analyse* (4. utg.). Oslo: Gyldendal Undervisning.

Besancon, X., Smet, C., Chabalier, C., Rivemale, M., Reverbel, J. P., Ratomahenina, R. & Galzy, P. (1992). Study of surface yeast flora of roquefort cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 9–18.

Bockelmann, W. (2002). Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 123–131.

Breuer, U. & Harms, H. (2006). Debaryomyces hansenii — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437.

Calahorra, M., Sánchez, N. S. & Peña, A. (2009). Activation of fermentation by salts in Debaryomyces hansenii. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1293–1301.

Cha, J.-Y., Jeong, J.-J., Yang, H.-J., Lee, B.-J. & Cho, Y.-S. (2011). Effect of Fermented Sea Tangle on the Alcohol Dehydrogenase and Acetaldehyde Dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 791–795.

Champe, P. C., Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2005). *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.

Chr Hansen A/S. (2011a, 23). SWING YEAST LAF-3 Product information. CHR Hansen.

Chr Hansen A/S. (2011b, 23). SWING YEAST LAF-4 Product information. CHR Hansen.

Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. & Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841–866.

Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F. & Palmas, F. (2001). Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1–2), 53–58.

Deiana, P., Fatichenti, F., Farris, G. A., Mocquot, G., Lodi, R., Todesco, R. & Cecchi, L. (1984). Metabolization of lactic and acetic acids in Pecorino Romano cheese made with a combined starter of lactic acid bacteria and yeast. *Le Lait*, 64(640-642), 380–394.

Engel, G., Rosch, N. & Heller, K. J. (1994). Heat tolerance of yeasts. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 46(1), 81–90.

Engels, W. J. M., Dekker, R., de Jong, C., Neeter, R. & Visser, S. (1997). A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7(4), 255–263.

Fleet, G. H. & Mian, M. A. (1987). The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 4(2), 145–155.

Fonseca, G., Heinzle, E., Wittmann, C. & Gombert, A. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 339–354.

Hampsey, M. (1997). A review of phenotypes in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 13(12), 1099–1133.

Hansen, T. K. & Jakobsen, M. (2001). Taxonomical and technological characteristics of Saccharomyces spp. associated with blue veined cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 59–68.

Hansen, T. K., Tempel, T. V. D., Cantor, M. D. & Jakobsen, M. (2001). Saccharomyces cerevisiae as a starter culture in Mycella. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1–2), 101–111.

IDF. (1982). *Cheese and processed cheese: Determination of the total solids content.* IDF Standard 4A. Brussels: International Dairy Federation.

IDF. (1986). *Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests*. IDF Standard 20A. Brussels: International Dairy Federation.

IDF. (2008a). *Milk and milk products - Guidance on sampling*. IDF Standard 050. Brussels: International Dairy Federation.

IDF. (2008b). *Milk - Deternination of fat content*. IDF Standard 226. Brussels: International Dairy Federation.

IDF. (2008c). *Cheese - Deternination of fat content - Van Gulik method*. IDF Standard 222. Brussels: International Dairy Federation.

Imperfekte sopper. (2012).*Store norske leksikon*. Lastet ned: 6. mars 2012, tilgjengelig fra: http://snl.no/imperfekte_sopper

Izco, J. M., Tormo, M. & Jiménez-Flores, R. (2002). Rapid Simultaneous Determination of Organic Acids, Free Amino Acids, and Lactose in Cheese by Capillary Electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2122–2129.

Jakobsen, M. & Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6(8-9), 755–768.

Kalil, S., Suzan, R., Maugeri, F. & Rodrigues, M. (2001). Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94(3), 257–264.

Lacroix, N., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fortin, J. & Vuillemard, J.-C. (2010). Characterization of aromatic properties of old-style cheese starters. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3427–3441.

Lawlor, J. B., Delahunty, C. M., Sheehan, J. & Wilkinson, M. G. (2003). Relationships between sensory attributes and the volatile compounds, non-volatile and gross compositional constituents of six blue-type cheeses. *International Dairy Journal*, 13(6), 481–494.

Legras, J., Merdinoglu, D., Cornuet, J. & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: Saccharomyces

cerevisiae diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16(10), 2091–2102.

Liu, S.-Q., Asmundson, R. V., Holland, R. & Crow, V. L. (1997). Acetaldehyde Metabolism by Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris under stress conditions. *International Dairy Journal*, 7(2-3), 175–183.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Brock, T. D. (2006). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.

McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80(3), 293–324.

Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Freitas, R. J. S., Christen, P. & Soccol, C. R. (2000). Optimization of the production of aroma compounds by Kluyveromyces marxianus in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 6(1), 33–39.

Molimard, P. & Spinnler, H. E. (1996). Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 169–184.

Monschau, N., Sahm, H. & Stahmann, K. P. (1998). Threonine Aldolase Overexpression plus Threonine Supplementation Enhanced Riboflavin Production in Ashbya gossypii. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4283–4290.

Narvhus, J. A. & Gadaga, T. H. (2003). The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 51–60.

Nishikawa, A., Tomomatsu, H., Sugita, T., Ikeda, R. & Shinoda, T. (1996). Taxonomic position of clinical isolates of Candida famata. *Medical Mycology*, 34(6), 411–419.

Norkrans, B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archives of Microbiology*, 54(4), 374–392.

Orekhova, Z., Sambira, Y., Manzurola, E. & Apelblat, A. (2005). Electrical Conductance and Volumetric Studies in Aqueous Solutions of DL-Pyroglutamic Acid. *Journal of Solution Chemistry*, 34(7), 853–867.

Perrone, M. G., Santandrea, E., Scilimati, A. & Syldatk, C. (2007). Stereoselective prostereogenic 3-oxo ester reduction mediated by a novel yeast alcohol dehydrogenase derived from Kluyveromyces marxianus CBS 6556. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(7), 1111–1118.

Pessione, E., Pergola, L., Cavaletto, M., Giunta, C., Trotta, A. & Vanni, A. (1990). Extraction, purification and characterization of ADH1 from the budding yeast Kluyveromyces marxianus. *The Italian Journal of Biochemistry*, 39(2), 71–82.

Pronk, J., Steensma, H. & vanDijken, J. (1996). Pyruvate metabolism in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 12(16), 1607–1633.

Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 28(3), 393–404.

Sánchez, N. S., Arreguín, R., Calahorra, M. & Peña, A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of Debaryomyces hansenii. *FEMS Yeast Research*, 8(8), 1303–1312.

Sanchez, N. S., Calahorra, M., Gonzalez-Hernandez, J. C. & Pena, A. (2006). Glycolytic sequence and respiration of Debaryomyces hansenii as compared to Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 23(5), 361–374.

Seiler, H. & Busse, M. (1990). The yeasts of cheese brines. *International Journal of Food Microbiology*, 11(3–4), 289–303.

Settanni, L. & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691–697.

Sinigaglia, M., Rosaria Corbo, M. & Ciccarone, C. (1998). Influence of temperature, pH and water activity on “in vitro” inhibition of Penicillium glabrum (Wehmer) Westling by yeasts. *Microbiological Research*, 153(2), 137–143.

Skeie, S., Kieronczyk, A., Næss, R. M. & Østlie, H. (2008). Lactobacillus adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese. *International Dairy Journal*, 18(2), 158–168.

Smit, B. A., Engels, W. J. M. & Smit, G. (2008). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 81(6), 987–999.

Taherzadeh, M. J., Niklasson, C. & Lidén, G. (1997). Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by Saccharomyces cerevisiae? *Chemical Engineering Science*, 52(15), 2653–2659.

Tempel, T. van den & Jakobsen, M. (1998). Yeasts associated with Danablu. *International Dairy Journal*, 8(1), 25–31.

Tempel, T. van den & Jakobsen, M. (2000). The technological characteristics of Debaryomyces hansenii and Yarrowia lipolytica and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal*, 10(4), 263–270.

Tempel, T. van den & Nielsen, M. S. (2000). Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology*, 57(3), 193–199.

Torres, A., Li, S. M., Roussos, S. & Vert, M. (1996). Screening of Microorganisms for Biodegradation of Poly(lactic-Acid) and Lactic Acid-Containing Polymers. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2393–2397.

Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5(8), 877–903.

Viljoen, B. C., Knox, A., Beuchat, L. R., Deak, T., Malfeito-Ferreira, M., Hansen, T. K., Hugo, A., et al. (2004). An inter-laboratory evaluation of selective media for the detection and enumeration of yeasts from blue-veined cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 9–14.

Vedleggsliste

Vedlegg 1: Formler for beregning av TN, LN og TCA-LN.

Vedlegg 2: Liste over pverdier etter ANOVA (på CD)

Vedlegg 1: Formler for beregning av TN, LN og TCA-LN.

%N i prøven:

$$\%N = \frac{M\ \ HCl^{A}\ \text{x}\ korrigert\ titreringsvolum^{B}\ \text{x}\ 14{,}007^{C}}{vekt\ \ av\ \ prøve\ \text{x}\ 1000^{D}}\ 100\%^{E}\ \text{x}\ fortynningsfaktor^{F}$$

A: molaritet til titreringsyren - HCl [mol x l^{-1}] = 0,05 mol H-Cl pr liter

B: korrigert titreringsvolum = titrert volum prøve (ml) – titrert volum blank (ml)

C: 14,007 = molekylvekt til Nitrogen [gram x mol^{-1}]

D: 1000: omregningfaktor liter til ml

E: omregningfaktor til prosent

F: Prøvens fortynningsfaktor

TN: 40 g ost pr gram prøve

LN: 25 g ost pr gram prøve

TCA-LN: 50 g ost pr prøve

Omregningfaktor % TN til % protein .

% protein = % TN x 6,38.