



# Proteaser i mjölkkråvara och mejeriprodukter

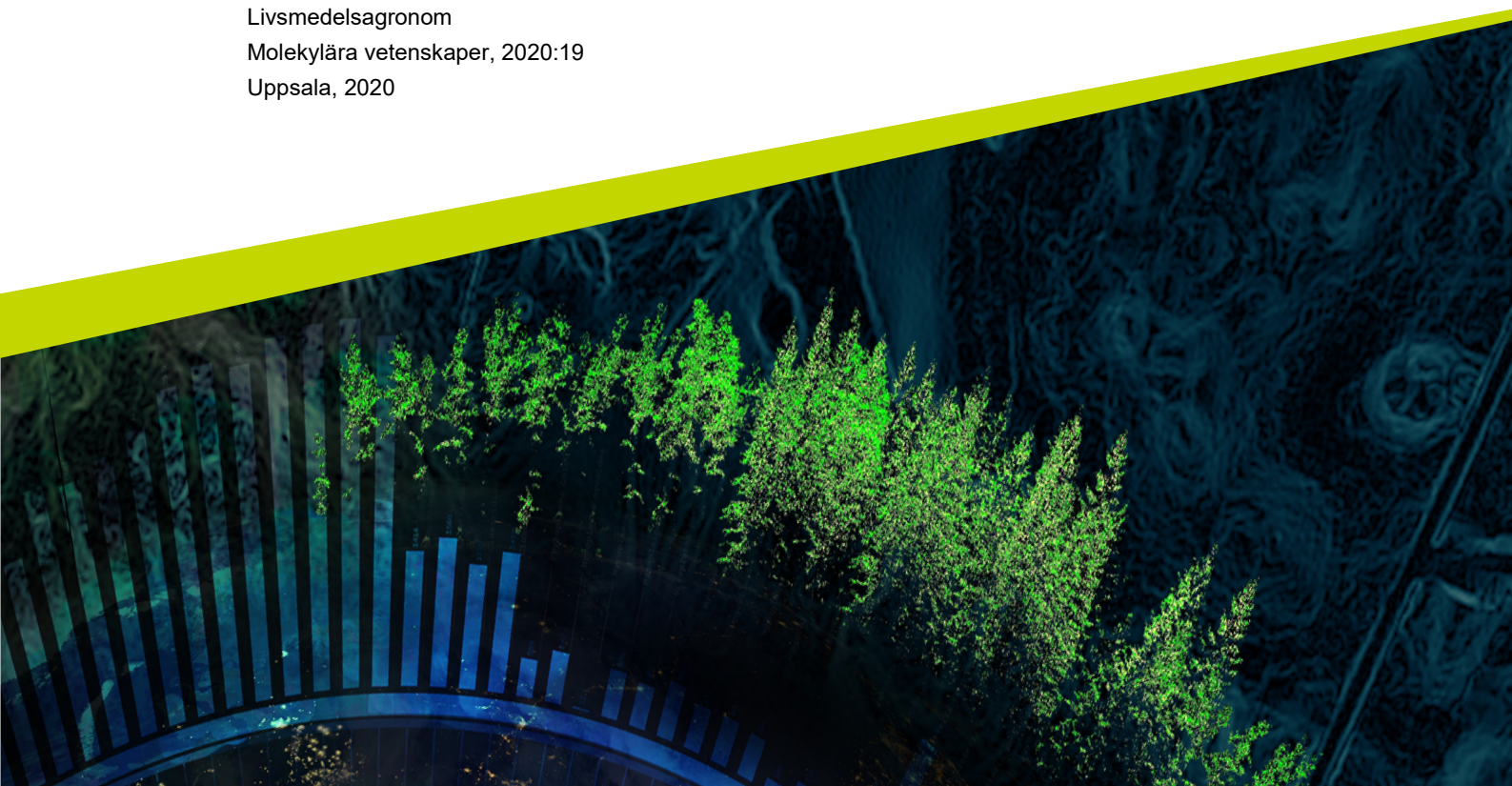
– fördelar och nackdelar

---

*Proteases in raw milk and dairy products – positive and negative effects*

Louise Gustafsson

Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Institutionen för molekylära vetenskaper  
Livsmedelsagronom  
Molekylära vetenskaper, 2020:19  
Uppsala, 2020





# Proteaser i mjölkkråvara och mejeriprodukter – fördelar och nackdelar

*Proteases in raw milk and dairy products – positive and negative effects*

Louise Gustafsson

**Handledare:** Monika Johansson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för molekylära vetenskaper  
**Examinator:** Åse Lundh, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för molekylära vetenskaper

**Omfattning:** 15 hp  
**Nivå och fördjupning:** G2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i livsmedelsvetenskap  
**Kurskod:** EX0876  
**Program/utbildning:** Agronom - livsmedel  
**Kursansvarig inst.:** Institutionen för molekylära vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2020  
**Serietitel:** Molekylära vetenskaper  
**Delnummer i serien:** 2020:19

**Nyckelord:** endogena proteaser, exogena proteaser, mjölkqualität, mjölkproteiner

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institution för molekylära vetenskaper

## Arkivering och publicering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Metadata och fulltext blir då synliga och sökbara på internet. I samband med att dokumentet laddas upp arkiveras det även digitalt.

JA, jag ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>

NEJ, jag ger inte min tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och abstract blir synliga och sökbara.

## Sammanfattning

Enzymer i mejeriindustrin har stor betydelse under tillverkning av mejeriprodukter. Proteaser, en typ av enzym, hydrolyserar mjölkproteiner och kan bidra till positiva såväl som negativa effekter i mjölkråvara och slutprodukt.

Proteaser kan ha olika verkan beroende på om de har ett endogent eller exogent ursprung. Endogena proteaser som plasmin och cathepsin D finns naturligt i mjölk. Dessa proteaser tas upp från blodet till juvret och vidare in i mjölken alternativt via läckage hos somatiska celler. Ett tredje proteas, kymosin, tillsätts däremot aktivt under osttillverkning men förekommer ursprungligen naturligt i magen hos kalvar. Kymosin är alltså inte endogent i mjölken, däremot är det endogent hos en kalv och kommer i denna litteraturstudie därmed anses som ett endogent proteas. Endogena proteaser kan ha negativ verkan i mjölk med minskad avkastning, bismak eller sämre slutprodukt som resultat. De kan även bidra med positiva effekter i form av snabbare ostmognad, bättre textur och mer intensiva smaker.

Exogena proteaser utsöndras av bakterier som kontaminerar mjölk via exempelvis dålig hygienpraxis under mjölkhanteringsrutiner. Psykotrofa bakterier så som *Pseudomonas spp.* samt *Bacillus spp.* kan bilda värmetåligen proteaser respektive sporer som båda överlever värmebehandling. Sporer kan i sin tur orsaka återkontaminering i mejeriprodukter. Enzymer utsöndrade av dessa bakterier kan orsaka bittra och härskna smaker, missfärgningar och gelbildning. Trots detta har proteaser med exogent ursprung även visat sig att ha positiva effekter då restprodukter från proteolysen, i form av aminosyror, kan vara gynnsamma för önskade bakterier som mjölksyrabakterier.

Ökad användning och kunskap om proteaser kan bidra till större produktutbyte för mejeriindustrier. Det kan även leda till ökad kvalitet och längre hållbarhet av slutprodukter. Det möjliggör ett minskat matsvinn vilket vidare resulterar i miljömässiga och ekonomiska vinster.

*Nyckelord: endogena proteaser, exogena proteaser, mjölkqualität, mjölkproteiner*

## Abstract

Enzymes in the dairy industry are of great importance during manufacture of dairy products. Proteases are enzymes that can hydrolyze milk proteins and thereby contribute both to positive and negative effects in a final product.

Proteases can have different effects, depending on if they are of endogenous or exogenous origin. Proteases of endogenous origin, such as plasmin and cathepsin D occur naturally in milk and enter the milk through blood or somatic cells. However, the third protease, chymosin, is added to the milk during cheese manufacture. This protease does not occur naturally in milk, but is originally located in the stomach of calves. Hence, chymosin will in this literature research count as an endogenous protease. Endogenous proteases can have negative effects on milk which results in lower yield, off-flavors or lower quality of the end product. However, they can also contribute with positive effects, resulting in faster cheese ripening, better texture and more intense flavors.

Proteases with exogenous origin are secreted from microorganisms that contaminate milk due to e.g. bad hygiene practice during milk handling. Psychotropic microorganisms such as *Pseudomonas spp.* can produce heat resistant proteases while *Bacillus spp.* can produce heat resistant spores. These proteases and spores can survive heat treatment during dairy manufacture. Furthermore, spores can recontaminate both milk and dairy products. Enzymes secreted from these microorganisms can cause bitter and rancid off-flavors, surface taints and gel formation. However, proteases with exogenous origin have also shown some positive effects since amino acids obtained from proteolysis might favor the growth of wanted lactic acid bacteria.

By increasing the knowledge about the use of proteases, the dairy industry can be more efficient and produce high quality products with prolonged shelf-life. Consequently, this can result in financial profits as well as contribute to a better environment through reduced food waste.

*Keywords: endogenous proteases, exogenous proteases milk quality, milk proteins*

# Innehållsförteckning

<b>1. Inledning</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Proteaser – allmänna fakta</b> .....	<b>12</b>
2.1. Historik .....	12
2.2. Vad är ett proteas? .....	12
<b>3. Mjölakens sammansättning</b> .....	<b>14</b>
3.1. Kolhydrater.....	14
3.2. Fett.....	14
3.3. Proteiner .....	15
3.4. Vitaminer och mineraler.....	17
<b>4. Proteolytisk aktivitet i mjölk</b> .....	<b>18</b>
4.1. Endogena proteaser .....	18
4.1.1. Plasmin.....	18
4.1.2. Kymosin.....	19
4.1.3. Cathepsin D.....	20
4.2. Exogena proteaser.....	21
4.2.1. <i>Pseudomonas spp.</i> .....	21
4.2.2. <i>Bacillus spp.</i> .....	21
<b>5. Positiva och negativa effekter av proteaser i mjölkråvara och mejeriprodukter</b> <b>23</b>	
5.1. Effekter från endogena proteaser i mjölkråvara och mejeriprodukter .....	23
5.1.1. Plasmin.....	23
5.1.2. Kymosin.....	23
5.1.3. Cathepsin D.....	24
5.2. Effekter från exogena proteaser i mjölkråvara och mejeriprodukter.....	24
5.2.1. <i>Pseudomonas spp.</i> .....	25
5.2.2. <i>Bacillus spp.</i> .....	25
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>29</b>
6.1. Slutsats .....	30
<b>Referenser</b> .....	<b>31</b>

# Tabellförteckning

<b>Tabell 1:</b> Egenskaper hos kaseinproteiner respektive vassleproteiner.....	17
<b>Tabell 2:</b> Kvalitépåverkan hos mejeriprodukter vid tillväxt av psykrotrofa mikroorganismer i mjölkråvara innan värmebehandling.....	27
<b>Tabell 3:</b> Kvalitépåverkan hos mejeriprodukter efter värmebehandling vid tillväxt av psykrotrofa bakterier under låg förvaringstemperatur .....	28



## Figurförteckning

<b>Figur 1:</b> Uppbyggnad av en kaseinmicell .....	15
<b>Figur 2:</b> Schematisk beskrivning av PL-systemet.....	19
<b>Figur 3:</b> Kymosin i dess olika former. ....	20

## Förkortningar

GMP	Glykomakropeptider
$\kappa$ -kasein	Kappa-kasein
$\beta$ -kasein	Beta-kasein
$\alpha$ -kasein	Alfa-kasein
UHT	Ultra-high temperature
ER	Endoplasmatiska retikulum
LAB	Mjölksyrabakterier (lactic acid bacteria)
PL	Plasmin
KN	Kasein
LA	Laktalbumin
LG	Laktoglobulin
SA	Serumalbumin
LF	Laktoferrin
PA	Plasminogenaktivator
t-PA	Vävnads plasminogenaktivator
u-PA	Urokinas plasminogenaktivator
Arg	Arginin
Ile	Isoleucin
PAI	Plasminogen aktivator inhibitor
PI	Plasminogen inhibitor
Phe	Fenylalanin
Met	Metionin
MO	Mikroorganismer
Cfu	Kolonibildande enheter
HACCP	Risikanalyt och kritiska stympunkter (Hazard analysis and critical control point)

# 1. Inledning

Mejeriindustrin är till stor del beroende av enzymer med varierad aktivitet och verkan. Enzymer kan vara önskade för förbättrad textur och smak (Hui *et al.* 2012). De kan också bidra till en avsevärt sämre mejeriprodukt gällande både avkastning och sensoriska aspekter. Olika metoder kan därför tillämpas för att ta bort eller inaktivera vissa enzymer (Sørhaug & Stepaniak 1997). Fokus i denna litteraturstudie kommer ligga hos proteaser, en grupp av enzymer som bryter ned mjölkens proteiner.

Mjölk är ett komplext livsmedel bestående av tre faser; fettfas, kolloidal lösning samt vattenfas (Gaucher *et al.* 2008). Mjölkteiner kan generellt delas in i två grupper; kaseinproteiner och vassleproteiner. Dessa två grupper utgör 80% respektive 20% av mjölkens totala proteininnehåll (Jakubowicz 2012). Kaseinproteiner är organiserade som kaseinmiceller i den kolloidala lösningen till skillnad från vassleproteiner, som är lösliga i serum, mjölkens vattenfas, tillsammans med laktos och mineraler (Gaucher *et al.* 2008).

Proteaser i mjölk kan ha endogent samt exogent ursprung och deras påverkan på mjölkens beståndsdelar kan variera (Nielsen 2002). Endogena proteaser finns naturligt i mjölk och kan bilda komplexa system (Ismail & Nielsen 2010). Det finns dessutom naturligt förekommande proteas i magen hos kalvar (Kumar *et al.* 2010). Även den sorters proteas kommer i denna litteraturstudie anses som endogent proteas. Exogena proteaser däremot, utsöndras från mjölkkontaminerande mikroorganismer (Fox 1981).

Denna litteraturstudie är indelad i fyra delar där första delen beskriver historik och allmänna fakta om proteaser. Del två handlar om mjölkens sammansättning för att generera ökad förståelse inför del tre och fyra. De två sistnämnda delarna presenteras fakta om olika proteaser samt dess påverkan på mjölkkråvara och mejeriprodukt. Slutligen diskuteras för- och nackdelar hos denna litteraturstudiens valda proteaser samt åtgärder för att förhindra oönskade effekter på mejeriprodukter.

Syftet med denna litteraturstudie är att med hjälp av kända fakta sammanställa och belysa proteasers betydelse för mejeriindustrin. Kunskap om proteasers påverkan kan bidra till ett minskat matsvinn genom höjd kvalitet och förlängd hållbarhet hos mejeriprodukter.

## 2. Proteaser – allmänna fakta

### 2.1. Historik

Under 1950- och 1960-talet fokuserade forskningen inom proteiner på själva syntesen, vilket innebar vetenskapliga studier om hur proteiner bildas. Intresset för proteiners nedbrytbarhet var inte lika stort då positiva effekter av denna mekanism ännu inte uppmärksammats. Forskare var tillfreds med dåvarande information om proteaser vilken visade att den primära och enda funktion var att fullständigt bryta ned proteiner i slutet av cellcykeln. De få proteaser som då kunnat observerats var små och kompakta och det fastställdes därför att denna form gällde samtliga proteaser (Bond 2019).

Först år 1971, då Dr. Herb Tabor tjänstgjorde som chefredaktör för tidningen *Journal of Biological Chemistry*, accelererade intresset och nya upptäckter inom området proteaser gjordes. Upptäckterna skulle sedan visa sig underlätta förståelsen av livscykeln hos en cell (Bond 2019).

Idag vet vi att ämnet är avsevärt mer komplext vilket beskrivs närmare under nästa rubrik.

### 2.2. Vad är ett proteas?

Ett proteolytiskt enzym, proteas, är ett protein uppbyggt av ett stort antal aminosyror. Aminosyror består av en karboxylsyragrupp, en aminogrupp samt varierande sidokedjor som länkas samman via aminogruppen och karboxylsyragruppen. En peptidbindning bildas och vatten utvecklas som restprodukt. Sammanlänkade aminosyror skapar proteiner som befinner sig i primär struktur. Proteiner i primär form kan sedan utvecklas och bilda sekundära, tertiära och kvartenära strukturer. Dessa strukturer bildas med hjälp av interaktioner som till exempel vätebindningar, Van der Waals interaktioner samt disulfidbryggor (Walstra *et al.* 2005).

Ett proteolytiskt enzym har som syfte att utföra *proteolys* av andra proteiner. Proteolys innebär klyvning av peptidbindningar mellan aminosyror så att peptider eller enskilda aminosyror bildas (Keil 2012). Klyvningen kan ske direkt efter proteinsyntes såväl som efter en tid, då det protein som ska klyvas har hittat sin placering och primära uppgift. Aminosyror som bildas återanvänds av antingen organismen själv eller av en predator.

Det finns ett brett och komplext utbud av vad proteaser kan åstadkomma. Mekanismen de utför kan vara involverad i patogena förhållanden där proteolys leder till allvarliga sjukdomar. Däremot kan proteaser också vara en viktig komponent i farmaceutiska medel. De är även involverade i mekanismer som exempelvis syntes av nya proteiner eller metabolism hos människor och djur (Rawlings 2013). Proteaser är allmänt förekommande i naturen. De finns i celler tillhörande både växter och djur men även i kroppsvätskor så som blod, saliv och mjölk (Rawlings 2013) (Helmerhorst *et al.* 2008) (Shah *et al.* 2014).

## 3. Mjölakens sammansättning

Mjölak är ett komplext system bestående av tre faser; en fettfas innehållande mjölakfett, en kolloidal fas innehållande kaseinmiceller samt en vattenfas innehållande vassleproteiner, laktos och mineraler (Gaucher *et al.* 2008). För att förstå hur proteaser kan påverka mjölakens kvalité krävs en kortfattad förklaring av mjölakens sammansättning. Detta avsnitt kommer dock framför allt att fokusera på mjölakproteiner.

### 3.1. Kolhydrater

Laktos är mjölakens huvudsakliga kolhydrat och är unik hos däggdjur. Laktos är en disackarid bestående av D-glukos och D-galaktos sammankopplade med en  $\beta$ -1,4-glykosidbindning. Den produceras i mjölkkörtlar där proteinet laktalbumin är tillgängligt och stimulerar syntesen (Walstra *et al.* 2005).

För att däggdjur ska kunna tillgodogöra sig denna kolhydrat krävs enzymet laktas. Laktas hydrolyserar laktos så att ovannämnda monosackarider återbildas. Vid brist på detta enzym uppstår laktosintolerans som kan orsaka symptom från mag-tarmkanalen så som illamående, diarré och uppsvullnad (Wang *et al.* 2012).

### 3.2. Fett

Fettet i mjölak kan förekomma i olika former. Den främsta formen är som triglycerider som motsvarar 98% av mjölakens totala fettinnehåll. En triglycerid är en molekyl uppbyggd av tre fettsyror och en glycerolmolekyl och kan förekomma i stor variation. Fettsyror i mjölak varierar i antal kolatomer. De mest förekommande fettsyrororna innehåller mellan fyra till 18 kol. De varierar dessutom i mättnadsgrad och skiljer sig mellan mättade, omättade samt grenade eller ogrenade.

Det finns ungefär elva huvudfettsyror som kan kombineras på tre olika sätt i varje glycerolmolekyl. Detta innebär alltså att endast huvudfettsyrororna bildar  $11^3$  olika triglycerider i mjölak. Med i beräkningen är inte mindre fettsyror som anses ovesätliga, vilket betyder att variationen i fettsyror sträcker sig långt över  $11^3$  (Walstra *et al.* 2005).

Fettsyror kan dessutom förekomma i mjölak som di- och monoglycerider, fria fettsyror, fosfolipider, steroler och karotenoider. Fett i mjölak är till största del samlat i fettkolor med ett omringande membran av fosfolipider som separerar fett från mjölakens vattenfas. Fettkolor är lätta att separera från mjölakens vattenfas med

hjälp av gravitation eller centrifugering. På så sätt kan ett önskat fettinnehåll i en slutgiltig mejeriprodukt uppnås.

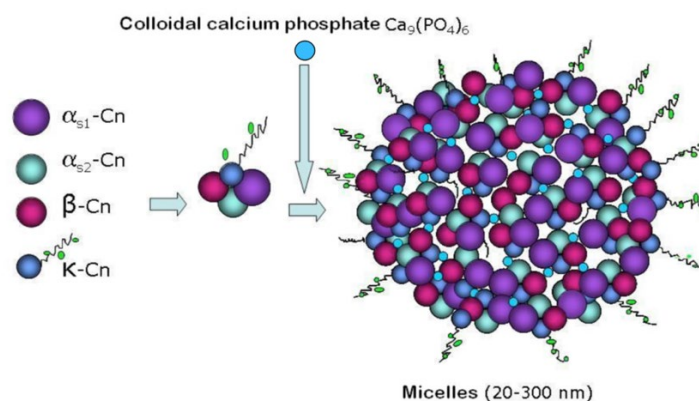
Fettsyror kan i mjölken bli angripna av olika enzymer, där det vanligaste enzymet är lipoprotein lipas. Det sker då en lipolys, enzymatisk hydrolys av triglycerider, vilket leder till att fria fettsyror bildas. Dessa fria fettsyror kan orsaka härsken eller tvålig smak både i mjölkråvara och i slutgiltig produkt (Walstra *et al.* 2005).

### 3.3. Proteiner

Mjölkteiner kan generellt delas in i två grupper; kaseiner (80%) samt vassleproteiner (20%) (Jakubowicz 2012).

Kaseinerna är ett utav de huvudsakliga proteinerna i mjölk och är organiserade i stora aggregat vid namn kaseinmiceller. Kaseinproteiner innehåller aminosyran serin som i sin tur är fosforylerad. De fosforylerade seringrupperna binds samman på ett okänt vis via kolloidalt kalciumfosfat. Forskare har ännu inte kommit fram till hur bindingen mellan fosforylerade seringrupper och kolloidalt kalciumfosfat ser ut och vet därmed inte exakt hur en kaseinmicell är organiserad (Vaclavik & Christian 2014). Det är på grund av detta kalciumfosfat som kaseiner bidrar till en hög halt kalcium och fosfat i mjölk. Kaseiner kan vidare delas in i undergrupper;  $\alpha_s$ -  $\beta$ - och  $\kappa$ - kasein som utgör 55%, 30% respektive 15% av mjölkens totala kaseininnehåll (Morr 1975).  $\alpha_s$ - och  $\beta$ -kaseiner kan delas in ytterligare i;  $\alpha_{s1}$  och  $\alpha_{s2}$  respektive  $\beta$ -kasein A1, A2 eller B (Walstra *et al.* 2005).

Kaseinmicellen är uppbyggd av hydrofoba  $\alpha_s$ - och  $\beta$ - kaseiner på insidan samt  $\kappa$ - kasein på utsidan (Walstra *et al.* 2005). Då  $\kappa$ -kasein är hydrofil och negativt laddad repellerar kaseinmiceller varandra samt förblir lösliga i mjölk fram tills att dess egenskaper ändras (Hui *et al.* 2012). Förändring kan ske om micellerna kommer i kontakt med syra eller löpe (Lucey 2002). Denna reaktion kan vara önskad vid tillverkning av särskilda mejeriprodukter och förklaras närmre framöver i denna studie. En schematisk bild av en kaseinmicell visas i figur 1.



**Figur 1:** Uppbyggnad av en kaseinmicell

Förkortningar: Cn: kasein

*Källa:* (Rebouillat & Ortega-Requena 2015)

Vassleproteiner är till största del globulära proteiner som finns i mjölkens vattenfas. Vassleproteiner är till skillnad från kaseiner värmekänsliga och kan denaturera under uppvärmning. De proteiner som ingår i denna grupp är bland annat  $\alpha$ -lactatbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, serumalbumin och laktoferrin.

$\alpha$ -lactatbumin är ett kompakt protein och litet till storlek. Proteinet har som biologisk funktion att agera som ett coenzym under laktosyntes.

$\beta$ -lactoglobulin är det protein som utgör störst andel av vassleproteiner. Detta protein syntetiseras i mjölk som en dimer där molekylerna är sammanlänkade med hydrofobiska interaktioner. På grund av dess höga hydrofobicitet kan  $\beta$ -lactoglobulin binda till sig det fettlösliga vitaminet retinol (Walstra *et al.* 2005).  $\beta$ -lactoglobulin samt  $\alpha$ -lactatbumin utgör 50% respektive 20% utav den totala mängden serumprotein i mjölk (Bütikofer *et al.* 2006).

Serumalbumin är ett protein som förekommer i mindre kvantitet i mjölk och övergår från blodet hos däggdjur. Däremot är de ett av de större proteinerna i mjölk (Walstra *et al.* 2005). Serumalbumin har som funktion att transportera hydrofoba molekyler i både blod och mjölk.

Laktoferrin tillhör gruppen glykoprotein med metallbindande egenskaper varav järn utgör den huvudsakliga metallen som binds (Takayama 2012). Proteinet finns i sekret med antibiotisk aktivitet som mjölk, saliv och mag-tarmvätskor. På grund av dess järnbindande egenskaper har laktoferrin som biologisk funktion att avlägsna järn från blod men även att förhindra bakterietillväxt. Dessa egenskaper är fördelaktiga i läkningsprocessen vid skorpbildning. Dessutom används laktoferrin som antioxidationsmedel och anti-cancerframkallande medel i kommersiella sammanhang (Sheehy *et al.* 2008). Skillnader mellan vassleproteiner respektive kaseinproteiner visas i tabell 1.

Immunoglobuliner är en tredje proteingrupp som kan delas in i många undergrupper varav IgG, IgA samt IgM förekommer i mjölk. Koncentrationen av immunoglobuliner kan vara 30-100 gånger högre i råmjölk i jämförelse med mjölk senare i laktationen. Syntes av immunoglobuliner stimuleras när specifika antigener finns närvarande i mjölk och fungerar därmed som ett försvar mot främmande ämnen som bakterier och virus (Walstra *et al.* 2005).



*Tabell 1: Egenskaper hos kaseiner respektive vassleproteiner*

Proteingrupp	Kaseiner				Vassleproteiner			
	$\alpha_{s1}$ -KN	$\alpha_{s2}$ -KN	$\beta$ -KN	$\kappa$ -KN	$\alpha$ -LA	$\beta$ -LG	SA	LF
Undergrupper								
Molmassa (kDa)	23,6	25,2	24,0	19,0	18,3	14,2	66,3	86,0
Aminosyror <sup>1</sup>	199	207	209	169	162	123	582	689
Fosforserin <sup>1</sup>	8	11	5	1	0	0	0	-
-S-S- <sup>2</sup>	0	1	0	0	2	4	17	-
Hydrofobicitet <sup>3</sup>	25	23	29	22	29	28	24	-
Isoelektrisk pH	4,5	5,0	4,8	5,6	5,2	~ 4,3	4,8	8,7
Prolin <sup>1</sup>	17	10	35	20	2	8	-	-

<sup>1</sup> Sidokedjor/molekyl

<sup>2</sup> Bryggor/molekyl

<sup>3</sup> % hydrofobiska aminosyror (Val, Leu, Ile, Phe, Trp)

#### *Förkortningar*

KN: kasein; LA: laktalbumin LG: laktoglobulin SA: serumalbumin LF: laktoferrin

*Källor:* (Walstra *et al.* 2005) (Takayama 2012) (Pierce *et al.* 1991) (Hui *et al.* 2012)

### 3.4. Vitaminer och mineraler

Mjölk innehåller 14 av kroppens 18 essentiella vitaminer och mineraler (Mjolkfrämjandet 2004) exempelvis; natrium, kalium, kalcium och magnesium. Dessa är fördelade mellan kaseinmiceller och mjölkens vattenfas (Walstra *et al.* 2005). Vitamin B12 och riboflavin är två av de vitaminer som är naturligt förekommande i mjölk. Även vitamin D finns tillgänglig, dock berikas denna vitamin i mjölk eftersom den förekommer i otillräckliga nivåer (Livsmedelsverket 2019).

## 4. Proteolytisk aktivitet i mjölk

Proteolytisk aktivitet kan ge såväl positiv som negativ verkan i mjölkkråvara eller i slutgiltig mejeriprodukt. Effekten kan bero på var proteaset i fråga härstammar från (Nielsen 2002). Naturligt förekommande proteaser, endogena proteaser, bildar i mjölk komplexa system och kan ge upphov till varierad textur i slutgiltig mejeriprodukt (Ismail & Nielsen 2010). Proteaser med exogent ursprung är enzymer som utsöndras från mikroorganismer (Fox 1981). Mikroorganismer kan vara en del av mjölkens naturliga mikroflora (Sørhaug & Stepaniak 1997) men de kan också kontaminera mjölk vid försämrade hygienpraxis i mjölkkningsutrustning och under mjölkhantering (Murugan & Villi 2014).

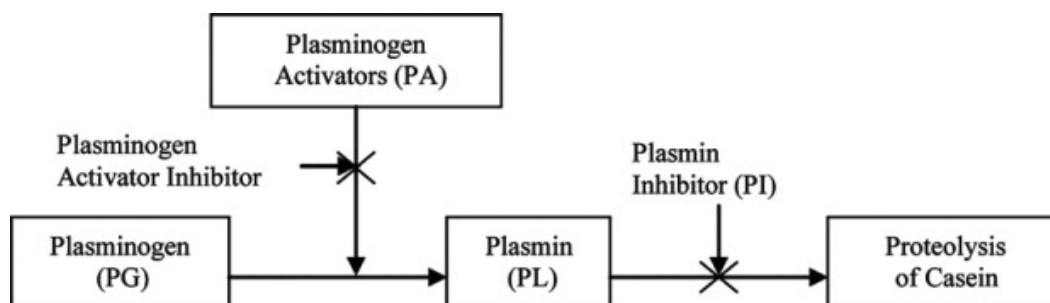
### 4.1. Endogena proteaser

#### 4.1.1. Plasmin

Plasmin är dominerande i antal studier utav proteaser med endogent ursprung i mjölk (Ismail & Nielsen 2010). Jämförelser har gjorts mellan plasmin isolerat från mjölk samt plasmin isolerat från blod hos nötkreatur. Tydliga likheter upptäcktes i pH- och värmestabilitet, specificitet för hydrolys av kasein (Reimerdes 1983) och till viss del identisk aminosyrasekvens (Bastian & Brown 1996). Faktum att plasmin härstammar från blodserum kunde därmed fastställas (Reimerdes 1983).

I mjölken hydrolyserar plasmin  $\beta$ -,  $\alpha_{s1}$ - och  $\alpha_{s2}$ -kasein men klyver primärt  $\beta$ -kasein till  $\gamma$ -1,  $\gamma$ -2, och  $\gamma$ -3 kaseiner samt proteospeptoner (Bastian & Brown 1996). Plasmin hydrolyserar endast proteiner vid peptidbindningar innehållande aminosyran lysin eller arginin (Fox & Kelly 2006).  $\kappa$ -kasein är ett protein med inbundna kolhydratgrupper vilket innebär att proteinet har glykosylerats. Glykosyleringen hindrar plasmin att hydrolysera  $\kappa$ -kasein och gör kaseinet därför resistent (Doi *et al.* 1979).

Plasminer ingår i ett komplext system vid namn plasminsystemet (PL-systemet). I PL-systemet ingår dess inaktiva proenzym, plasminogen, såväl som plasminogenaktivatorer (PA). Plasmin förekommer i mjölk främst som plasminogen och konverteras till plasmin via minst två typer av aktivatorer; vävnad plasminogenaktivator (t-PA) eller urokinas plasminogenaktivator (u-PA). Konvertering sker då plasminogen klyvs vid Arg<sup>557</sup>-Ile<sup>558</sup> (Ismail & Nielsen 2010). I PL-systemet ingår dessutom plasminogen aktivator inhibitor (PAI) samt plasminogen inhibitor (PI). PAI och PI har effekt på PA respektive PL (Ismail & Nielsen 2010). En schematisk beskrivning över PL-systemet visas i figur 2.



**Figur 2:** Schematisk beskrivning av PL-systemet.

*Källa:* (Ismail & Nielsen 2010)

#### 4.1.2. Kymosin

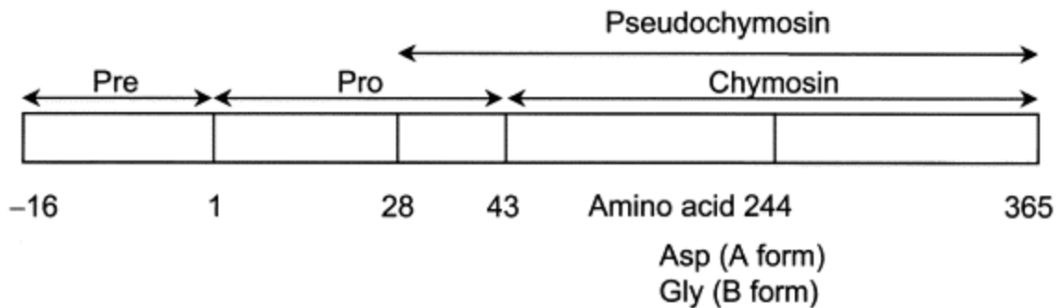
Löpe används i stor omfattning inom mejeriindustrin framförallt under osttillverkning. Omvandlingen från mjölk till ostmassa katalyseras av bland annat två enzymer, kymosin och pepsin, som båda ingår i löpe (Moschopoulou 2011). Hur dessa påverkar ostens kvalitet och struktur diskuteras senare i denna studie.

Kymosin och pepsin ingår i gruppen aspartylproteaser (Moschopoulou 2011). Dessa proteaser syntetiseras intracellulärt i magsäckens funduskörtlar (Kumar *et al.* 2010) som dess proenzym; pepsinogen och prokymosin som utsöndras i löpmagen. Beroende på djurets ålder och diet produceras dessa proenzym i varierande koncentrationer. Ju yngre djuret är och ju större del av dess diet som består av mjölk, desto högre blir koncentrationen av prokymosin och slutligen kymosin (Moschopoulou 2011). Biologisk funktion hos kymosin är dess förmåga att koagulera mjölk i magen hos nyfödda kalvar. Genom att mjölken koaguleras gör det även att hastigheten genom kalvens mage minskar. Vidare ger detta större möjlighet för enzymer att hydrolysera proteiner viktiga för kalvens utveckling (Vaclavik & Christian 2014). Då kymosin ger liknande effekt på mjölk i kalvars mage som under osttillverkning, anses kymosin i denna litteraturstudie som ett endogent proteas.

Kymosin består av totalt 365 aminosyror och syntetiseras som preprokymosin med en hydrofob signalsekvens på 16 aminosyror. Denna sekvens ger möjlighet till passage genom cellmembran (Mohanty *et al.* 1999). Vid hydrolys av denna signalsekvens bildas prokymosin (Kumar *et al.* 2010). Till skillnad från plasminogen genomgår prokymosin en autokatalytisk aktivering via sänkt pH-värde i sin omgivning istället för aktivering via proteolytisk aktivitet (Pedersen *et al.* 1979). Slutprodukten utgörs av kymosin vid pH-värde 5,0 eller pseudokymosin vid pH-värde 2,0 där pseudokymosin är 15 aminosyror längre än kymosin. Vid exponering för pH 5,5 konverteras även pseudokymosin till kymosin.

Det finns två olika naturligt förekommande kymosiner; kymosin A respektive kymosin B. Skillnaden är endast en aminosyra, där asparaginsyra byts ut mot glycin. Trots denna minimala skillnad kommer det resulterande kymosinet att ha olika pH optimum, pH 4,2 hos kymosin A respektive pH 3,7 hos kymosin B

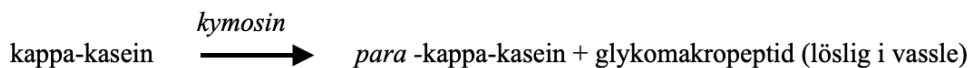
(Mohanty *et al.* 1999). Uppkomsten av ovanstående beskrivna former av kymosin visas i figur 3.



**Figur 3:** Kymosin i dess olika former.

Källa: (Mohanty *et al.* 1999)

Reaktionen för kymosinets destabilisering av en kaseinmicell sker i en primär enzyminducerad fas samt sekundär icke-enzyminducerad fas. I den enzymära fasen hydrolyseras en specifik bindning mellan Phe<sup>105</sup> och Met<sup>106</sup> i  $\kappa$ -kasein, resulterande i *para*- $\kappa$ -kasein och glykomakropeptider (GMP) som restprodukt (Hui *et al.* 2012). Den negativa laddningen hos  $\kappa$ -kasein elimineras och därmed kaseinmicellernas förmåga att repellera varandra (Walstra *et al.* 2005). Kaseinmicellerna mister den repellerande GMP med sin stabiliserande negativa nettoladdning och micellens hydrofoba interiör med kalciumkänsligt  $\alpha_s$ - och  $\beta$ -kasein exponeras. Då kaseinmicellens hydrofila exteriör inte längre är intakt, aggregerar  $\alpha_s$ - och  $\beta$ -kasein på grund av deras hydrofoba karaktär. Destabiliseringsprocessen går därmed in i sekundär fas och en ostmassa bildas som resultat. *Para*- $\kappa$ -kasein är fortsatt bundet till kaseinmicellen och förläggs i ostmassan och GMP förloras till vassle (Hui *et al.* 2012). En schematisk bild på hur kymosin påverkar  $\kappa$ -kasein visas i figur 4.



**Figur 4.** Påverkan på  $\kappa$ -kasein av kymosin.

Källa: (Hui *et al.* 2012)

### 4.1.3. Cathepsin D

Cathepsin D är, likt kymosin, ett aspartylproteas som finns i lysosomer hos somatiska celler (Hurley *et al.* 2000b) och som träder in i mjölken från dessa via läckage (Li *et al.* 2014). Cathepsin D syntetiseras som propepcathepsin av mRNA i

det korniga endoplasmatiska retikulum (rough endoplasmatic reticulum). Procathepsin hydrolyseras och träder vidare in i endoplasmatiska retikulum (ER) som dess inaktiva form, procathepsin D. Slutligen transporteras proteinet till lysosomen där det omvandlas till dess aktiva form, cathepsin D (Minarowska *et al.* 2008). Cathepsin D är uppbyggd av två proteinkedjor, en lätt kedja med aminoterminal samt en tung kedja med karboxyterminal. Dessa kedjor hålls samman via hydrofobisk interaktion (Zaidi *et al.* 2008).

Fysiologiskt syfte hos cathepsin D i mjölk har ännu inte identifierats. Dock har cathepsin D visat sig ha effekt på mejeriprodukter genom hydrolys av kaseinproteiner. Dess proteolytiska aktivitet riktas huvudsakligen mot  $\alpha_{s1}$ -kasein, men angriper även  $\beta$ -kasein,  $\kappa$ -kasein,  $\alpha_{s2}$ -kasein samt  $\alpha$ -lactalbumin. Hydrolysen av  $\kappa$ -kasein sker på samma klyvningsplats som den för kymosin; peptidbindningen mellan Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> (McSweeney *et al.* 1995). Cathepsin D klyver  $\alpha_{s1}$ -kasein mellan Phe<sup>23</sup>-Phe<sup>24</sup> resulterande i polypeptiden  $\alpha_{s1}$ -I-kasein. Denna polypeptid kan ha påverkan i osttillverkning framför allt under mognadsprocessen (Hayes *et al.* 2001).  $\alpha_{s1}$ -kasein och  $\alpha_{s1}$ -I-kasein är till stora delar lika, där den enda skillnad som identifierats är att  $\alpha_{s1}$ -I-kasein är mindre känsligt mot kalciumjoner i förhållande till  $\alpha_{s1}$ -kasein (Kaminogawa *et al.* 1980).

## 4.2. Exogena proteaser

I länder med väl utvecklad mjölkindustri finns bra strategier för att förvara mjölk nedkyld under 7°C från mjölkning till processning. En låg förvaringstemperatur minskar risken för kontaminering av mesofila mikroorganismer, men gynnar istället mikroorganismer med psykotrofa egenskaper (Adams 2016).

### 4.2.1. *Pseudomonas spp.*

*Pseudomonas spp.* utgör ungefär 10% av den totala mikrofloran i mjölkkråvara (Sørhaug & Stepaniak 1997). Trots dess låga kvantitet kan bakterien ge stora problem då den kan föröka sig vid låga temperaturer. Vidare kan mikroorganismen utsöndra proteaser som i sin tur hydrolyserar kaseiner till lösliga peptider (Sørhaug & Stepaniak 1997). Proteaserna som utsöndras är värmestabila och påverkas inte av värmebehandlingar. *Pseudomonas spp.* utsöndrar proteaser i dess sena exponentiella eller tidigt stationära fas under tillväxt i kylskåpstemperatur (Stoeckel *et al.* 2016). Främst hydrolyserar *Pseudomonas spp.*  $\kappa$ -kasein följt av  $\beta$ -kasein. Vassleproteiner är mer tåliga mot hydrolys. Lösliga peptider orsakade av extracellulära proteaser har varierande påverkan på mjölk kvalitét, där den främsta defekten resulterar i bitter smak (Techer *et al.* 2014).

### 4.2.2. *Bacillus spp.*

Ytterligare en mikroorganism med psykotrofa egenskaper är *Bacillus spp.* *Bacillus spp.* har förmågan att bilda sporer, som kan överleva pastörisering (72°C 15s). Sporer bildas som en försvarsmekanism och bakterien kan därför återkontaminera mjölk efter pastörisering (Sørhaug & Stepaniak 1997). *Bacillus cereus* är vanligt förekommande i mjölkningstrustning, ströbäddsmaterial samt i

torra produkter så som hö och halm. Genom en dålig hygienpraxis kan organismen följa med från ladugården via mjölkuppsamling, transporter och lagerhantering. Organismen kan via dessa hanteringsprocesser kontaminera mjölkråvaran och slutligen i avsedd mejeriprodukt. (Murugan & Villi 2014). Produktion av extracellulära proteaser har varierande påverkan på mjölkqualität, där den främsta defekten resulterar i sötkoagulering som förklaras längre fram i denna litteraturstudie.

## 5. Positiva och negativa effekter av proteaser i mjölkråvara och mejeriprodukter

### 5.1. Effekter från endogena proteaser i mjölkråvara och mejeriprodukter

#### 5.1.1. Plasmin

Beroende på när plasmin är aktivt kan det ge olika konsekvenser för mjölkråvara såväl som mejeriprodukt. Vid en hög plasminaktivitet innan separation och pressning av ostmassa kan leda till minskat ostutbyte. Plasmin hydrolyserar, som beskrivet ovan,  $\beta$ -kasein och bildar  $\gamma$ -kaseiner samt proteospeptoner som restprodukt. Detta orsakar en minskning på 1-4% i ostutbyte, då nedbrytningsprodukter av kaseinet istället går förlorade med vasslen. Denna minskning beror på plasminaktivitet, men även hur lång tid mjölkråvaran förvaras under låga temperaturer vid osttillverkning (Walstra *et al.* 2005).

Plasminer kan dock också bidra med positiva effekter i mejeriprodukter. I en studie från (Bastian *et al.* 1997) tillverkades tre olika schweizerostar, varvid det tillsattes olika koncentrationer urokinas i två av ostmassorna. I den tredje ostmassan, som användes som referens, tillsattes inget urokinas. Syftet var att öka plasminaktiviteten och därmed proteolysen för att se skillnader i kemiska såväl som sensoriska parametrar. Kontrollmätningar gjordes på samtliga ostar efter 6, 12 och 24 veckor. Det visade sig att ostar med högre koncentration urokinas resulterade i högre koncentration av plasmin som initierade hydrolys av  $\beta$ -kasein. Som effekt gav det en högre andel propansyra, nötigare smak och en generellt mer intensiv smakbild. Skillnader i ostarna sågs endast vid granskning efter 12 veckor och efter 24 veckor märktes inte längre någon skillnad. Slutsats är att plasmin ökar mognadshastigheten hos ostar, men bidrar inte med någon skillnad i sensoriska egenskaper efter en viss tid.

#### 5.1.2. Kymosin

Som tidigare beskrivet utför kymosin en koagulerings-effekt på mjölk i magen hos kalvar. Kymosin kan extraheras och sedan tillsättas aktivt vid osttillverkning i syfte att åstadkomma liknande effekt vid osttillverkning som i magen hos kalvar

(Vaclavik & Christian 2014). Trots att detta proteas tillsätts aktivt under osttillverkning finns det naturligt hos nyfödda idisslare och beskrivs därför i denna litteraturstudie som ett endogent proteas.

Kymosin har påverkan både i mjölk samt under mognadsfasen vid osttillverkning. Med dess hydrolyserande egenskaper på  $\kappa$ -kasein ansvarar enzymet för koagulering av mjölk. I osttillverkning har kymosin betydelse för textur samt ger ökad smakintensitet (Kumar *et al.* 2010).

Koaguleringsprocessen av mjölk är beroende av olika faktorer så som kymosinkoncentration, temperatur, pH, kalciumkoncentration samt specifika interaktioner mellan kymosin och kasein. Som resultat bildas en gel vilket utgör en bas till ost under osttillverkning. Risker för negativa effekter av kymosin under koaguleringsprocessen är låg, till skillnad från pepsin som också koagulerar mjölkproteiner (Hui *et al.* 2012) men som kan ge en betydligt lägre ostutbyte på grund av dess mer generella proteolytiska aktivitet (Kumar *et al.* 2010).

Under ostens mognadsfas hydrolyserar resterande kymosin parakasein till peptider. Peptider bidrar i sin tur till ökade samt förstärkta smaker i ost. En förbättrad smakbild i ost av kymosin är dock beroende av ostens saltkoncentration. Vid minskad salthalt kan kymosin istället utföra en extrem proteolys vilket resulterar i peptider med bitter smak (Ardö *et al.* 2017).

### 5.1.3. Cathepsin D

Cathepsin D klyver som tidigare beskrivet  $\kappa$ -kasein på samma sätt som kymosin; peptidbindningen mellan Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup>. Denna hydrolys går dock avsevärt långsammare än hydrolys med hjälp av kymosin (McSweeney *et al.* 1995). Cathepsin D fungerar som naturligt förekommande proteolytiskt enzym. Koncentrationen är dock inte tillräckligt hög vilket innebär att risken för att en ostmassa ska bildas är låg. Det är dock svårt att bestämma i vilken grad cathepsin D gör verkan, då dess aktivitet maskeras av kymosin (Hurley *et al.* 2000b).

Cathepsin D är däremot mer resistent mot höga temperaturer så som vid pastörisering (72°C) samt har ett bredare pH-spektrum (3,5–7,0) (Li *et al.* 2014). gentemot kymosin (4,6–6,4) (Kumar *et al.* 2010). Effekt från cathepsin D kunde påvisas i mejeriprodukter så som fetaost (Wium *et al.* 1998), kvarg (Hurley *et al.* 2000a) och schweizerostar (Cooney *et al.* 2000). I experimentella studier framställdes dessa produkter utan tillsats av löpe, alternativt producerades under höga temperaturer där kymosin inaktiverats. Trots inaktivering av kymosin hydrolyserades  $\kappa$ -kasein och  $\alpha_{s1}$ -kasein i dessa produkter. Slutsatsen var att hydrolysen orsakats av cathepsin D och att enzymet således kan bidra under mognadsfasen vid osttillverkning. Ytterligare påverkan av cathepsin D på ostkvalitet kräver vidare forskning (Hurley *et al.* 2000b).

## 5.2. Effekter från exogena proteaser i mjölkkråvara och mejeriprodukter

Mikroorganismer med psykrotrofa egenskaper innefattar Gram-negativa bakterier så som *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*,



*Chromobacterium*, *Flavobacterium spp.* samt gram positiva *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium spp.* Största påverkan i mjölkkråvara eller mejeriprodukt har visats vara resultat främst från *Pseudomonas spp.* samt *Bacillus spp.* Dessa kan kontaminera en mjölkkråvara innan värmebehandling som sedan ger sämre kvalitet i den färdiga mejeriprodukten. Mikroorganismerna kan dessutom kontaminera en färdig mejeriprodukt. Även i detta fall påverkas mejeriproduktskvaliteten negativt, dock inte i lika stor utsträckning. Effekter från psykotrofa mikroorganismer på mejeriproduktskvalitet då mjölkkråvara kontamineras före värmebehandling visas i tabell 2. Effekter från psykotrofa mikroorganismer då färdig mejeriprodukt kontamineras visas i tabell 3. Då produkter idag görs på mjölk som förvarats en tid innan behandling finns få rapporter tillgängliga på en produkt gjord på dagsfärs mjölkkråvara (Sørhaug & Stepaniak 1997).

### 5.2.1. *Pseudomonas spp.*

Mjölk förvaras aerobt och i en temperatur på 4°C. Därmed kan många stammar av *Pseudomonas spp.* förökas och producera proteaser. Dessa proteaser kan hydrolysera alla kaseinproteiner till lösliga peptider. *Pseudomonas spp.* kan dessutom utföra lipolys där mjölkfett bryts ned till fria fettsyror.

En positiv konsekvens av enzymutsöndring är en ökad tillväxt hos mjölksyrabakterier (LAB). Detta beror på att LAB kan tillgodogöra sig peptider och aminosyror som bildas vid proteolys. Dock kan även LAB inhiberas på grund av den höga halt fettsyror som bildas (Sørhaug & Stepaniak 1997).

Efterfrågan på mejeriprodukter med en lång hållbarhetstid är en uppåtstigande trend (Stoeckel *et al.* 2016). En produkt som kan uppfylla dessa önskemål är UHT-mjölk (ultra-high temperature). Hög värmebehandling (140°C, 4-6 s) ska eliminera alla mikroorganismer i mjölkkråvaran och på så sätt förlänga produktens hållbarhetstid (Rauh *et al.* 2014). På grund av mikroorganismens förmåga att utsöndra värmeståliga proteaser kan produktens hållbarhetstid dock minska avsevärt.

En studie från 2016 gjord i Tyskland har visat påverkan på UHT-mjölk gjord på mjölkkråvara inkuberad med tre olika stammar av *Pseudomonas*. Resultatet visade att defekter i mjölk kunde uppstå från endast några dagar upp till flera månader efter mjölkkråvaran UHT behandlats. Detta var beroende på förvaringstemperatur samt enzymaktivitet. Dessa defekter visade sig att komma i följande ordning; bitterhet – partikelformation – gräddansättning – utfällning – gelbildning. Dessa uppkom i samtliga prover som visade innehåll av peptidaser vilka utsöndrats av *Pseudomonas spp.* (Stoeckel *et al.* 2016).

### 5.2.2. *Bacillus spp.*

Fermenterade mejeriprodukter och ostar påverkas inte av *Bacillus spp.* Bakterien inhiberas på grund av minskat pH efter att starterkulturer tillsätts. Dock kan *Bacillus spp.* överleva i pastöriserade produkter då den kan bilda sporer (Christiansson 2011).

*Bacillus spp.* har förmågan att bilda enterotoxiner som kan orsaka symptom i mag-tarmkanalen så som diarré och kräkningar. Bildning av enterotoxiner är dock inte vanligt förekommande i mjölkkråvara eller andra mejeriprodukter. Dagens ladugårdar och mejerier genomgår noga hygienrutiner vilket minskar risken för spridning av *Bacillus spp.* Därför kommer cellantalet ofta inte upp i det antal som krävs för toxinpåverkan (Christiansson 2011). En mer vanligt förekommande defekt skapad av *Bacillus cereus* är sötkoagulering. Sötkoagulering innebär en söt massa som sjunker ner till botten av exempelvis ett mjölkpaket. På så sätt blir defekten dessutom svår att upptäcka av en konsument. Defekten orsakas av löpeliknande enzymer som utsöndras av den sporbildande bakterien (Overcast & Atmaram 1974).

**Tabell 2:** Kvalitépåverkan hos mejeriprodukter vid tillväxt av psykrotrofa mikroorganismer i mjölkkråvara innan värmebehandling.

Produkt	Antal psykrotrofa MO (log cfu/ml)	Kvalitépåverkan
UHT-mjölk	5,9	Gelformation efter 20 veckor
	6,9–7,2	Gelformation efter 2–10 veckor, minskad färskhet. Något unken, oren och bitter smak
Mjölkpulver, frystorkad mjölk	6,3–7	Minskad värmestabilitet; ökad kapacitet att bilda skum vid rekonstituering av mjölkpulver
Pastöriserad mjölk	5,5	Sämre smak i jämförelse med pastöriserad mjölk gjord på icke kontaminerad mjölkkråvara
Hårdost	6,5–7,5	Härsken smak
	7,5–8,3	Härsken och tvålig smak; reducerat ostutbyte.
Keso	5–7,8	Tydligt samband mellan antal psykrotrofa MO i mjölkkråvara och bitter smak
Smör	<i>Ej bestämd</i>	Härsknar fortare hos smör gjord på mjölk förvarad i låga temperaturer än från färsk mjölk
Yoghurt	7,6–7,8	Bitter, oren eller fruktig smak beroende på den specifika mikrofloran

*Källa:* (Sørhaug & Stepaniak 1997)

*Förkortningar*

MO: mikroorganismer, cfu: kolonibildande enheter.

**Tabell 3:** Kvalitépåverkan vid tillväxt av psykotrofa mikroorganismer i färdiga mejeriprodukter under låg förvaringstemperatur.

Produkt	Antal psykotrofa MO vid tidpunkten för förstörelse (cfu/ml)	Kvalitépåverkan
Pastöriserad mjölk och grädde	6–7,5	Bittra och orena bismaker
Keso	8	Bittra, orena och fruktiga smaker
Kärnmjök	<i>Ej bestämd</i>	Härsken och rутten smak
Smör	<i>Ej bestämd</i>	Färgbildning på ytan

*Källa:* (Sørhaug & Stepaniak 1997)

*Förkortningar*

MO: mikroorganismer, cfu: kolonibildande enheter.

## 6. Diskussion

I produktionen av olika mejeriprodukter är proteaser en viktig komponent under olika produktionssteg. Framför allt har positiva egenskaper kopplats till kymosin, där en stor andel av artiklarna belyser dess verkan under koagulering samt ostmognadsfasen. Det verkar dock vara en subtil gräns, positiva egenskaper kan lätt omvandlas till negativa beroende på ostens saltkoncentration.

Plasmin associeras istället oftare med negativa konsekvenser i artiklar, där forskarna hänvisar till stora förluster av peptider till vasslen (Walstra *et al.* 2005). Med dess förmåga att snabbt hydrolysera  $\beta$ -kasein har plasmin även visat sig ha positiva effekter då den under ostens mognadsfas kan påskynda peptidbildningen med förbättrade sensoriska egenskaper hos osten (Bastian *et al.* 1997). En påskyndad ostmognad kan vidare vara positiv utifrån ekonomiska perspektiv då tillverkare kan få ut sina ostar snabbare på marknaden.

Cathepsin D visar sig ha liknande påverkan på mejeriprodukter som kymosin, men verkar på mjölkproteiner med lägre aktivitet (McSweeney *et al.* 1995). Med tanke på att detta är ett naturligt förekommande enzym i mjölkråvara, kanske det skulle kunna i koncentrerad form, vara ett komplement till kymosin. Detta för att tillsatsen av löpe från en kalv inte alltid uppskattas av specifika konsumentgrupper.

Angående exogena proteaser, utsöndrade av mikroorganismer, har positiva effekter inte framhävts i samma utsträckning som för endogena proteaser. Här har negativ påverkan varit i fokus främst avseende kvalitet på mejeriprodukter. Även symptom hos människor i mag-tarmkanalen från mikrobiell toxinproduktion har belysts men som i mejeriindustrin inte längre är ett stort problem på grund av dagens goda hygienpraxiser. En positiv effekt som däremot uppmärksammats vid utsöndring av exogena proteaser är bildningen av en gynnsam miljö för LAB vid proteolys av mjölkproteiner. Dock kan mikrobiella lipaser motverka denna positiva påverkan då LAB mister sin aktivitet med ökade halter fettsyror (Sørhaug & Stepaniak 1997).

Metoder som förebygger att mjölken kontamineras av mikrobiella proteaser inkluderar god hygienpraxis vid mjölkhanteringsprocesser, noga kontroller över förvaringstemperaturer, kort förvaringstid för mjölkråvara, värmebehandlingar och väl utförda HACCP-planer. Detta är självklara hanteringsåtgärder i mejeriindustrin (Sørhaug & Stepaniak 1997) som framför allt eliminerar det endogena proteaset plasmin, vilket inaktiveras vid 80°C (Walstra *et al.* 2005). För att försäkra minimal kontaminering av mikroorganismer och därmed exogena proteaser kan ytterligare åtgärder krävas. En effektiv metod för minskad risk av återkontaminering av sporer från *Bacillus spp.* är kombinationen mellan värmebehandling men också förvaring av produkten i anaerob miljö. På så sätt kan de värmestabila sporererna inte återkontaminera produkten då syre inte finns tillgängligt. Gällande *Pseudomonas*

*spp.* har en effektiv metod visats vara en kombination mellan värmebehandling (140°C, 5 s) följt av nedkylning (60°C, 5 min). Detta har visats sig inhibera både proteaser samt lipaser utsöndrande från *Pseudomonas spp.* Ytterligare behandlingsmetoder i form av koldioxid och kväve har även förmåga att inhibera tillväxt av mikroorganismer med psykotrofa egenskaper men även deras proteaser (Sørhaug & Stepaniak 1997).

## 6.1. Slutsats

Proteaser har stor betydelse för mejeriindustrin, detta innefattar både proteaser med endogent såväl som exogent ursprung. Förståelsen för hur de påverkar en mejeriprodukt, avseende ökad smakbild och textur men även risk för missfärgningar, bismaker, och andra defekter som visas i tabell 2 och 3, kan vara avgörande vid framställningen.

Ökad kunskap kring detta ämne kan bidra till ekonomiska fördelar för mejeriföretagen, genom ökad produktion vid snabbare ostmognad, men också via minskad risk för förluster i form produktdefekter och lägre utbyten. Vidare kan kunskap om proteaser vara gynnsamt utifrån ett miljöperspektiv, då den kan bidra till nya anpassade processteg i mejeriindustrin som i sin tur kan leda till förlängd produkthållbarhet, minskat matsvinn och på så sätt minskad miljöförstörelse.

## Referenser

- Adams, M.R. (2016). *Food microbiology*. 4th edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Upadhyay, V.K. & Fox, P.F. (2017). Chapter 18 - Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. I: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., & Everett, D.W. (red.) *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, s. 445–482.
- Bastian, E.D. & Brown, R.J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*, vol. 6 (5), s. 435–457
- Bastian, E.D., Lo, C.G. & David, K.M.M. (1997). Plasminogen Activation in Cheese Milk: Influence on Swiss Cheese Ripening I. *Journal of Dairy Science*, vol. 80 (2), s. 245–251
- Bond, J.S. (2019). Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 294 (5), s. 1643–1651
- Bütikofer, U., Meyer, J. & Rehberger, B. (2006). Determination of the percentage of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin of total milk protein in raw and heat treated skim milk. *Milchwissenschaft*, vol. 61 (3), s. 263–266
- Christiansson, A. (2011). Pathogens in milk, *Bacillus cereus*. I: Fuquay, J.W. (red.) *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, s. 24–30.
- Cooney, S., Tiernan, D., Joyce, P. & Kelly, A.L. (2000). Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese. *Journal of Dairy Research*, vol. 67 (2), s. 301–307
- Doi, H., Kawaguchi, N., Ibuki, F. & Kanamori, M. (1979). Susceptibility of  $\kappa$ -casein components to various proteases. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 25 (1), s. 33–41
- Foltmann, B., Pedersen, V.B., Jacobsen, H., Kauffman, D. & Wybrandt, G. (1977). The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74 (6), s. 2321–2324
- Fox, P.F. (1981). Exogenous proteinases in dairy technology. I: Turk, V. & Vitale, L.J. (red.) *Proteinases and their Inhibitors*. Pergamon, s. 245–267.
- Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. *International Dairy Journal*, vol. 16 (6), s. 500–516
- Gaucher, I., Boubellouta, T., Beaucher, E., Piot, M., Gaucheron, F. & Dufour, E. (2008). Investigation of the effects of season, milking region, sterilisation process and storage conditions on milk and UHT milk physico-chemical characteristics: a multidimensional statistical approach. *Dairy Science & Technology*, vol. 88 (3), s. 291–312
- Hayes, M.G., Hurley, M.J., Larsen, L.B., Heegaard, C.W., Magboul, A., Oliveira, J.C., McSweeney, P.L.H. & Kelly, A.L. (2001). Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *Journal of Dairy Research*, vol. 68 (2), s. 267–276

- Helmerhorst, E.J., Sun, X., Salih, E. & Oppenheim, F.G. (2008). Identification of Lys-Pro-Gln as a Novel Cleavage Site Specificity of Saliva-associated Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283 (29), s. 19957–19966
- Hui, Y.H., Toldr?, F., Nollet, L.M.L., Simpson, B.K., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., Simpson, B.K., Hui, Y.H. & Nollet, L.M.L. (2012). *Food Biochemistry and Food Processing*. Hoboken, UNITED STATES: John Wiley & Sons, Incorporated. Tillgänglig: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=843662> [2020-04-17]
- Hurley, M.J., Larsen, L.B., Kelly, A.L. & McSweeney, P.L.H. (2000a). Cathepsin D activity in quarg. *International Dairy Journal*, vol. 10 (7), s. 453–458
- Hurley, M.J., Larsen, L.B., Kelly, A.L. & McSweeney, P.L.H. (2000b). The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal*, vol. 10 (10), s. 673–681
- Ismail, B. & Nielsen, S.S. (2010). Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, vol. 93 (11), s. 4999–5009
- Jakubowicz, D. (2012). Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes | Elsevier Enhanced Reader. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.07.008>
- Kaminogawa, S., Yamauchi, K. & Yoon, C. (1980). Calcium Insensitivity and Other Properties of  $\alpha$ 1 -I Casein. *Journal of Dairy Science*, vol. 63 (2), s. 223–227
- Keil, B. (2012). *Specificity of Proteolysis*. Springer Science & Business Media.
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J. & Batish, V.K. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 30 (4), s. 243–258
- Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P. & Gagnaire, V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Science & Technology*, vol. 94 (6), s. 517–538
- Livsmedelsverket (2019). *Mj?lk och mejeriprodukter*. Livsmedelsverket. Tillgänglig: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/mat-och-dryck/mjolk-och-mejeriprodukter> [2020-03-30]
- Lucey, J.A. (2002). Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*, vol. 85 (2), s. 281–294
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. & Olson, N.F. (1995). Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: Preliminary observations and comparison with chymosin. *International Dairy Journal*, vol. 5 (4), s. 321–336
- Minarowska, A., Gacko, M., Karwowska, A. & Minarowski, Ł. (2008). Human cathepsin D. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, vol. 46 (1), s. 23–38
- Mj?lkfr?mjandet (2004). *Professor i n?ringsl?ra: Mj?lk ?r naturens egen functional food*. Tillgänglig: <https://mb.cision.com/wpyfs/00/00/00/00/00/04/46/8A/wkr0006.pdf> [2020-05-22]
- Mohanty, A.K., Mukhopadhyay, U.K., Grover, S. & Batish, V.K. (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, vol. 17 (2), s. 205–217
- Morr, C.V. (1975). Chemistry of Milk Proteins in Food Processing. *Journal of Dairy Science*, vol. 58 (7), s. 977–984
- Moschopoulou, E. (2011). Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research*, vol. 101 (1), s. 188–195
- Murugan, B. & Villi, R.A. (2014). Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* in milk and dairy products through polymerase chain reaction. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, vol. 33 (4), s. 246–250



- Nielsen, S.S. (2002). Plasmin System and Microbial Proteases in Milk: Characteristics, Roles, and Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50 (22), s. 6628–6634
- Overcast, W.W. & Atmaram, K. (1974). The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk. *Journal of Milk and Food Technology*, vol. 37 (5), s. 233–236
- Pedersen, V.B., Christensen, K.A. & Foltmann, B. (1979). Investigations on the Activation of Bovine Prochymosin. *European Journal of Biochemistry*, vol. 94 (2), s. 573–580
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. & Spik, G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *European Journal of Biochemistry*, vol. 196 (1), s. 177–184
- Rauh, V.M., Sundgren, A., Bakman, M., Ipsen, R., Paulsson, M., Larsen, L.B. & Hammershøj, M. (2014). Plasmin activity as a possible cause for age gelation in UHT milk produced by direct steam infusion. *International Dairy Journal*, vol. 38 (2), s. 199–207
- Rawlings, N.D. (2013). Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. I: Brix, K. & Stöcker, W. (red.) *Proteases: Structure and Function*. Vienna: Springer Vienna, s. 1–36.
- Rebouillat, S. & Ortega-Requena, S. (2015). Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, vol. 06 (03), s. 176
- Reimerdes, E.H. (1983). New Aspects of Naturally Occurring Proteases in Bovine Milk1. *Journal of Dairy Science*, vol. 66 (8), s. 1591–1600
- Shah, M.A., Mir, S.A. & Paray, M.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, vol. 94 (1), s. 5–16
- Sheehy, P.A., Williamson, P., Sharp, J.A., Menzies, K., Lefevre, C., Digby, M., Nicholas, K.R. & Wynn, P.C. (2008). Chapter 3 - Significance, origin and function of bovine milk proteins: the biological implications of manipulation or modification. I: Thompson, A., Boland, M., & Singh, H. (red.) *Milk Proteins*. San Diego: Academic Press, s. 81–106.
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Fischer, L. & Hinrichs, J. (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*, vol. 59, s. 20–28
- Sørhaug, T. & Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 8 (2), s. 35–41
- Takayama, Y. (2012). Lactoferrin Structure Function and Genetics. *Lactoferrin and its Role in Wound Healing*. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 43–66.
- Techer, C., Baron, F. & Jan, S. (2014). Spoilage of animal products | Microbial Milk Spoilage. I: Batt, C.A. & Tortorello, M.L. (red.) *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, s. 446–452.
- Vaclavik, V. & Christian, E.W. (2014). *Essentials of Food Science*. New York: Springer. Tillgänglig: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=672243&site=ehost-live> [2020-04-15]

- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. & Geurts, T.J. (2005). *Dairy Science and Technology*. Baton Rouge, United states: CRC Press LLC.  
Tillgänglig: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=263085> [2020-03-27]
- Wang, D., Lin, H., Kan, J., Liu, L., Zeng, X. & Shen, grong (2012). *Food Chemistry*. Hauppauge, United states: Nova Science Publishers, Incorporated. Tillgänglig: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=3017667> [2020-04-02]
- Wium, H., Kristiansen, K.R. & Qvist, K.B. (1998). Proteolysis and its role in relation to texture of Feta cheese made from ultrafiltered milk with different amounts of rennet. *Journal of Dairy Research*, vol. 65 (4), s. 665–674
- Zaidi, N., Maurer, A., Nieke, S. & Kalbacher, H. (2008). Cathepsin D: A cellular roadmap. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 376 (1), s. 5–9

# Tack

Författaren vill rikta ett särskilt tack till Monika Johansson för bra handledning. Monika har under detta arbete visat god samarbetsvilja genom att snabbt svara på frågor och funderingar via mail samt videolänk. Hon har dessutom givit bra kritik under arbetets gång för att göra litteraturstudien så bra som möjligt.