

**Studie för utveckling av  
fastställande av  
aminotransferase-  
aktivitet i Enzobact™ med  
isokratisk HPLC metod**



**LUNDS TEKNISKA  
HÖGSKOLA**  
Lunds universitet

Examensarbete:  
Rose-Marie Cederlund



© Copyright Rose-Marie Cederlund

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg  
Lunds universitet  
Box 882  
251 08 Helsingborg

LTH School of Engineering at Campus Helsingborg  
Lund University  
Box 882  
SE-251 08 Helsingborg  
Sweden

Tryckt i Sverige  
Media-Tryck  
Biblioteksdirektionen  
Lunds Universitet  
Lund 2006

## Sammanfattning

### Studie för utveckling av fastställande av aminotransferaseaktivitet i Enzobact™ med isokratisk HPLC metod

Denna examensrapport redogör för en metodutveckling av aminotransferaseaktivitet som är utförd för Medipharm AB i Kågeröd som tillverkar Enzobact™. Enzobact™ är en bakteriekultur som består av värmebehandlad *Lactobacillus helveticus* och används vid tillverkning av lågfetthaltiga ostar, vilket bidrar till att osten får en bättre smak och konsistens.

Behovet av att tillverka ost med låg fetthalt leder till att man behöver utveckla analysmetoder för att ha möjlighet att ge ostarna en bra kvalitet. Man utgår från en befintlig metod för aminopeptidolytisk aktivitet för att kunna utveckla en analysmetod för aminotransferaseaktivitet i Enzobact™.

Metoden börjas med att tvätta cellerna och sedan släppa ut aminotransferaserna från cellerna. Därefter utförs en enzymreaktion där aminotransferaserna genomför en transaminering där en aminosyra reagerar med en  $\alpha$ -ketosyra och bildar en ny  $\alpha$ -ketosyra och en ny aminosyra. Provet tas vid olika tidpunkter för att kunna följa aminotransferaseaktiviteten. För att kunna göra en analys av aktiviteten på aminotransferaser med HPLC, måste aminosyrorna genomgå en derivatisering. Vid analys med HPLC ser man om koncentrationerna av aminosyrorna ökar eller minskar relaterat till provtagningstiden.

Tre metoder användes och de gav olika resultat. En av metoderna var inte så användbar eftersom den gav toppar som var breda och korta, samt dubbla. De andra metoderna gav bättre resultat. Eftersom den ena av metoderna hade en för lång analysid är metoden med en kortare analysid bättre, trots att den ger ett resultat där koncentrationerna av aminosyrorna inte helt stämmer överens med hur det borde vara, relaterat till provtagningstiden. Den metod som gav bäst resultat kan man fortsätta att utveckla och validera för att bekräfta om den är användbar och ger tillförlitliga resultat.

Nyckelord: Aminosyror, aminotransferaser, derivatisering, Enzobact™, enzym kinetik, HPLC, ost.

## Abstract

### Studie for development of determination of aminotransferaseactivity in Enzobact™ with isocratic HPLC method

This thesis accounts for development of a method for aminotransferase-activity. It is based on analysis that are done for Medipharm AB in Kågeröd that produce Enzobact™. Enzobact™ is a bacterial culture that contains heat-treated *Lactobacillus helveticus*. It is used in production of cheese with reduced fat and contributes to better taste and consistency.

Our need to produce cheese with reduced fat, results in a development of a method to give the cheese a good quality. From an available method of aminopeptidolytic activity, experiment is done to develop a method to analyse aminotransferaseactivity in Enzobact™.

The first step is to wash the cells. Then you release the aminotransferases from the cells. After that, an enzymereaction, where the aminotransferases carry out a transamination, is performed. In the reaction an aminoacid react with an  $\alpha$ -ketoacid and produces a new  $\alpha$ -ketoacid and a new aminoacid. At different moments you take samples, to be able to follow the activity of the aminotransferases. To be able to make an analysis of the activity of aminotransferases with HPLC, the reaction must go through a derivatization. When you analyse with HPLC, you find out if the concentrations of the aminoacids increase och decrease related to the time of the samples.

Three methods were used and they gave different results. One of the methods was not useful, because it resulted in wide, low and double peaks. The other methods gave better result. As one of the methods had a time of analysis that was too long, the one with shorter time is a better choice, though you get a result where the concentrations of the aminoacids not correspond to the expectation, related to the time of the samples. The method that gave the best result can continue to be developped and validated to confirm if the method is useful and gives reliable results.

Keywords: Aminoacids, aminotransferases, cheese, derivatization, enzobact™, enzyme kinetics, HPLC.

## **Förord**

Föreliggande examensarbete har kommit till som ett resultat av att Kerstin Holmgren på Medipharm AB hade ett önskemål om att utveckla en metod för aminotransferaseaktivitet i Enzobact™.

Jag vill tacka min examinator Anita Tocaj, min handledare Jonas Kronkvist samt Björn Sivik som har givit mig vägledning och läst igenom mitt arbete och haft synpunkter på det. Vill även tacka de som har ställt upp och stöttat mig under arbetets gång.



## Innehållsförteckning:

1. Inledning	sid	1
2. Teori		2-12
2.1. Osttillverkning		2-3
2.2. Enzobact™		3
2.3. Tillverkning av Enzobact™		4
2.4. Aminosyror		4-5
2.5. Enzym kinetik		5-7
2.6. Aminotransferaser		7-8
2.7. Förbehandling		8
2.8. Frisläppning av enzymer		8
2.9. Enzymreaktion		8-9
2.10. Analysmetoder		9
2.11. HPLC		9-10
2.12. Derivatisering		11
2.13. Blanker		11
2.14. Kalibreringskurvor		12
3. Material		13
3.1. Kemikalier		13
3.2. Utrustning		13
4. Metod		14-18
4.1. Förbehandling		14
4.2. Frisläppning av enzymer		14
4.3. Enzymreaktion		14
4.4. HPLC metoder		15
4.5. Analyser		15
4.5.1. Beredning av OPA-Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> och OPA-2ME		15
4.5.2. Derivatisering med OPA-Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>		15
4.5.3. Derivatisering men OPA-2ME		16
4.6. Blanker		16
4.7. Kalibreringskurvor		16-18
5. Resultat och diskussion		19-31
5.1. Toppidentifiering på kromatogram		19-21
5.2. Förkortning av derivatiseringstiden för tryptophan		22-24
5.3. Ökning av glutamat och minskning av tryptophan		24-31
6. Fortsatt arbete		32
7. Referenser		33-34





## 1. Inledning

Efterfrågan på magra produkter har blivit stor eftersom många människor i vårt samhälle gärna vill äta mat med låg fetthalt men samtidigt ska maten vara välsmakande och njutbar. Därför är det också viktigt att de fettsnåla produkterna som man tillverkar uppfyller de krav som finns samt att de har en hög kvalitet. I detta fall, där man vill tillverka ost med låg fetthalt, så behöver man undersöka och utveckla en fungerande analysmetod för att mäta aminotransferaseaktiviteten i Enzobact™, eftersom denna aktivitet påverkar kvaliteten på lågfetthaltiga ostar.

Enzobact™ är en ostmognadskultur som är avsedd att ge lågfetthaltiga ostar en bättre smak och konsistens. Lågfetthaltiga ostar får en dålig smak därför att fett som man tar bort ersätts med vatten och proteiner och detta ökar mängden bittra peptider i osten. Det som Enzobact™ gör är att reducera bitterheten genom att en ökad nedbrytning av peptider sker. Detta innebär att de fria aminosyrorna blir fler och bidrar till en rikligare och bättre smak på osten.

Man vill utveckla en metod för aminotransferasaktivitetsmätning för att kunna få ett mått på aktiviteten eftersom man vill ha ett visst förhållande mellan peptidaser, proteaser och aminotransferaser för att få rätt egenskaper hos lågfetthaltiga ostar.

En analysmetod för peptidasaktivitet finns sedan innan hos Medipharm och genom att utgå från den kan man fortsätta att utveckla en metod för att analysera aminotransferaseaktiviteten i Enzobact™. Det har gjorts en del analyser på andra bakterier för att mäta aminotransferaseaktiviteten som man kan använda sig av vid utveckling av en metod för Enzobact™. De metoder som man kan använda sig av för att analysera aminotransferaseaktiviteten i Enzobact™ är enzymatiska metoder t.ex. colorimetric metod enligt Boehringer Mannheim GMBH, GDH-aktivitetstest eller en HPLC metod.

Syftet med detta examensarbete var att studera och försöka utveckla en analysmetod som är enkel att använda för att kunna analysera aminotransferaseaktiviteten hos Enzobact™ enzymatiskt eller med hjälp av High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

## 2. Teori

### 2.1. Ostillverkning

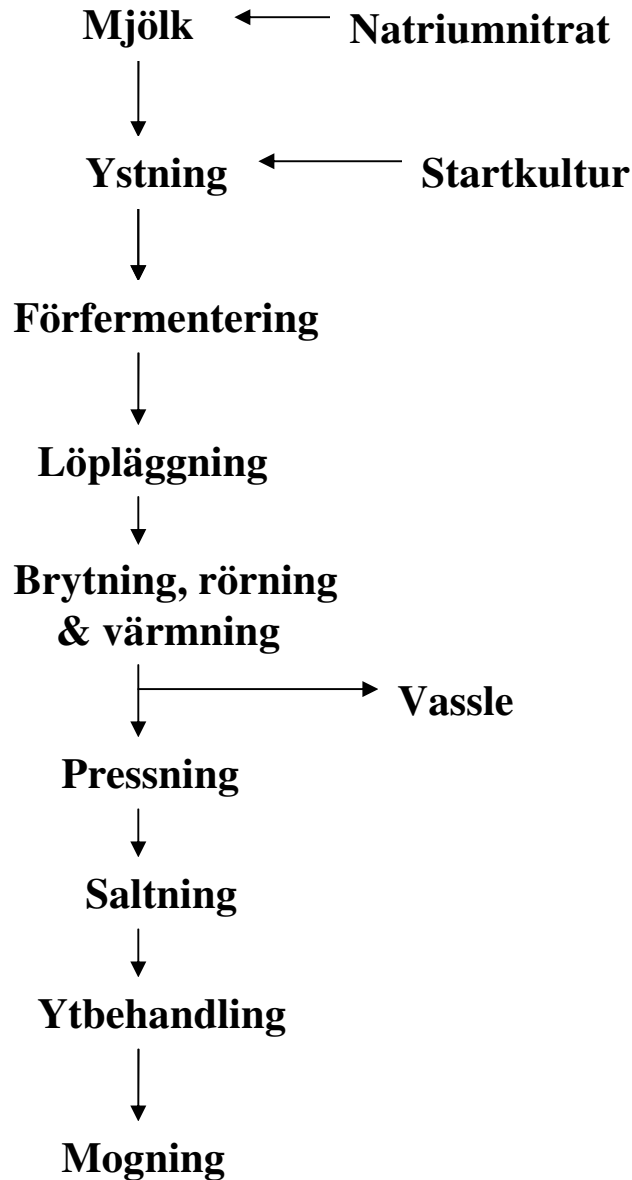


Fig.1. Schematisk beskrivning av ostillverkning

Vid ostillverkning börjar man med att tillsätta natriumnitrat. Nitraten reduceras i olika mängder till nitrit som har en antibakteriell effekt på t.ex. *Enterobacteriaceae* och klostrider. Mjölken standardiseras till den fetthalt som man önskar och därefter tillsätter man under ystningen en s.k. startkultur som består av olika typer av mjölksyrabakterier. Mjölken förfermenteras varvid antalet mjölksyrabakterier ökar och mjölkens pH sjunker. Efter förfermenteringen tillförs löpen och mjölken bringas att koagulera. Den koagulerande massan sönderdelas, bryts och upphettas försiktigt under

omrörning. När man har värmt massan avskiljs vasslen och ostmassan pressas samman. Därefter saltas osten, vanligen läggs den i saltlake, vilket ökar ostens stabilitet mot mikrobiella angrepp. Osten ytbehandlas sedan för att skyddas från alltför kraftig uttorkning och mot mögelangrepp, och till sist lagras osten för att ge den tid att mogna till rätt konsistens och smak. Se Fig.1. [1]

Under osttillverkning sker det autolyser, vilket innebär att enzymerna bryter ner proteinerna till peptider. De enzymer som bryter ner proteinerna kommer från den startkultur som man tillsatte under ystningen och dessa enzymer kommer att läcka ut under självaste ostmognadsprocessen. [2]

Vid tillverkning av lågfetthaltiga ostar blir konsistensen och smaken oftast dålig, vilket beror på att fett som man tar bort ersätts med vatten och proteiner, vilket ger en ökning av bittra peptider i osten. För att förhindra dessa problem har man en lägre temperatur och en kortare omrörningstid efter det att löpen tillsatts. Detta påverkar den primära startkulturen genom att det blir mindre autolyser. Detta innebär att frigöringen av de aminosyrorlytiska enzymerna från den primära startkulturen blir fördröjd. Tillsätter man Enzobact™ blir det möjligt att öka nedbrytningen av peptiderna, vilket ger en förbättrad smak, konsistens och reducerar bitterheten. [2]

## 2.2. Enzobact™

Enzobact™ är en ostmognadskultur vars ursprung är värmebehandlad *Lactobacillus helveticus*, som är homofermentativa termofila mjölksyrabakterier och är bland de mest kräsna och kräver mer exogena aminosyror än vad många andra mjölksyrabakterier gör. Vid tillsats av Enzobact™ under ystning av lågfetthaltiga ostar sker en frisläppning av aminosyror (som är smakföreträdare), minskning av bitterhet genom hydrolys av bittra peptider, ändring av struktur (genom nedbrytning av proteinmatris) samt ökning av pH och vattnets bindningskapacitet genom att amino- och karboxylgrupper bildas när peptidbindningarna klyvs. [4] Detta leder till att ostens smak förbättras, att konsistensen blir mindre elastisk och svampaktig samt att den bittra smaken minskar. [2]

Enzobact™ accelererar nedbrytningen av peptider, vilket gör att antalet fria aminosyror ökar till mer än det dubbla vid tillverkning av lågfetthaltiga ostar. Koncentrationen av aminosyrorna glutamat, histidin, prolin och glycin ökar, medan leucin, phenylalanin, asparagin och serin minskar i ost som innehåller Enzobact™. Sensoriska analyser demonstrerar mindre bitterhet och mer av smakämnen som beskrivs som nötsöta, samt att smaken upplevs som mer mogen. Strukturen hos dessa ostar var mindre elastisk. [3]

### 2.3. Tillverkning av Enzobact™

Enzobact™ produceras av Medipharm AB, man tillsätter ett specifikt medium under fermenteringen och det leder till att Enzobact™ får en hög aminopeptidas- och aminotransferaseaktivitet. Den höga aktiviteten av aminopeptidas bidrar till att det bildas färre bittra peptider genom att en nedbrytning av peptiderna ökar. Den höga aktiviteten av aminotransferaser bidrar till att fler aminosyror bryts ner vilket leder till ostens smak.

### 2.4. Aminosyror

Ostarnas smak är den viktigaste egenskapen och dess smak är ett resultat av nedbrytning av mjölkproteiner, fett, laktos och citrat. [5] Aminosyror frigges när peptider formas under proteinaseprocessen på kaseinet, vilket innebär att proteinaserna klyver kaseinet till stora peptider. Därefter klyver peptidas de stora peptiderna till mindre peptider och aminosyror. Denna nedbrytning är en kritisk händelse som leder till aromutveckling under ostmognaden. [6], [7] Aminosyrorna går därefter igenom en enzymatisk och en kemisk omvandling till viktiga smakämnen. Bildandet av smakämnen från mjölksyrabakterier och deras enzymer är i högre grad viktigare än bildandet av smakämnen av ren kemisk reaktion. [5], [7] De fria aminosyrorna kan bidra direkt till arom i ost, men den typiska ostsmaken kommer från omvandlade aminosyror till aromämnen som aldehyder, syror, alkoholer, estrar och tioler. Speciellt aromatiska och grenade aminosyror är företrädare av smakämnen. [7], [8]

Tabellen nedan visar vad de olika aminosyrorna har för smak.

<b>Umami och sur smak</b>	<b>Söt smak</b>	<b>Bitter smak</b>
Glutamat	Glycin	Phenylalanin
Aspartat	Alanin	Tyrosin
	Threonin	Arginin
	Prolin	Leucin
	Serin	Isoleucin
	Glutamin	Valin
		Methionin
		Histidin

Trots att valin kallas för en bitter aminosyra har den även en lätt söt smak. [9] Grenade aminosyror (Val, Ile, Leu), aromatiska aminosyror (Trp, Tyr, Phe) och sulfatinnehållande aminosyror (Cys, Met) är viktiga förelöpare av aromämnen. De grenade aminosyrorna är betydelsefulla av smakämnen som isobutyrate, 3-metylbutanal, 2-metylbutanal och 2- metylpropanal. [10]

## 2.5. Enzymkinetik

Enzymkinetik riktar sig åt den biologiska rollen av enzymatisk katalysering och hur enzymerna åstadkommer sin anmärkningsvärda bedrift. I enzymkinetik söker man efter den maximala reaktionshastigheten som ett enzym kan uppnå samt dess bindningsaffinitet för substrat och inhibitorer. Den kemiska kinetiken är en studie av hastigheten av kemisk reaktion där hastigheten är proportionell mot koncentrationen av reaktanter. [11]

Analys av ändring i reaktionshastighet samtidigt som koncentrationen av reaktanter varierar är en av de primära mätningarna i en kinetisk analys. En kurva av en reaktion som en funktion av koncentrationen av reaktanter ger en rak linje vars lutning är  $k$ . Ju fler reaktanter som är tillgängliga, desto större blir hastigheten,  $v$ . Liknande analyser av enzymkatalyserade reaktioner där endast ett substrat är involverat ger en märkbar skillnad i analysresultat. [11]

I enzymkatalyserade reaktioner ökar inte hastigheten proportionellt när substratkoncentrationen ökar, utan det sker istället när koncentrationen av substratet börjar minska. När koncentrationen av substrat är hög kommer reaktionshastigheten att så gott som bli oberoende av substratkoncentrationen och närma sig en maximal gräns. Värdet på hastigheten vid denna gräns betecknas  $v_{\max}$ . Eftersom reaktionshastigheten inte är beroende av substratkoncentrationen vid höga koncentrationer, är enzymkatalyserade reaktioner av nollte ordningens kinetik, vilket innebär att hastigheten är oberoende av substratkoncentrationen. Detta beteende kallas för mättnadseffekt, dvs. att hastigheten inte ökar även om substratkoncentrationen ökar, systemet är mättat med substrat. En sådan kurva kallas substratmättnadskurva, se Fig.2.. Förklaringen till detta är att enzymmolekylerna i en reaktionsblandning har sin substratbindningsyta ockuperad av substrat. En substratmättnadskurva var begynnelse på att enzymen interagerar direkt med dess substrat genom att binda det. [11]

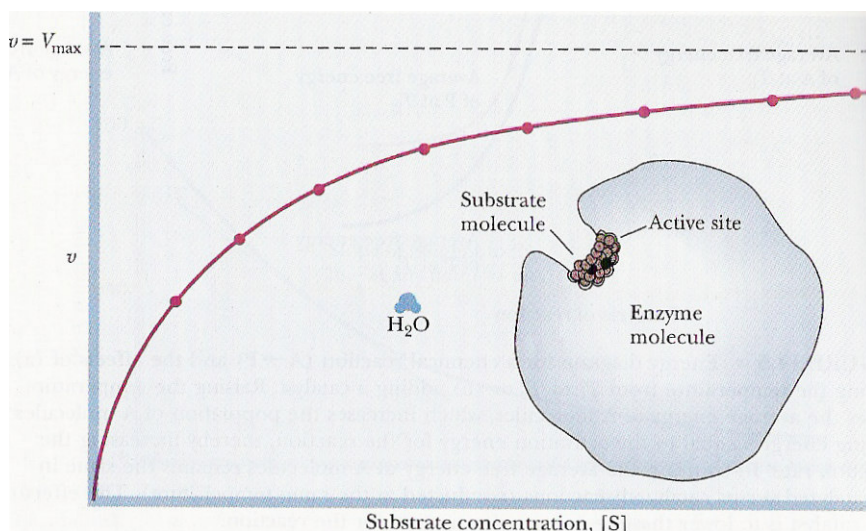
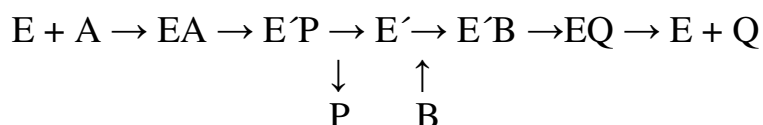


Fig.2. Kurva över enzymkatalyserad reaktion, en s.k. substratmättnadskurva.

Enzymerna bildar komplex med deras substrat under gången av deras katalys och innan det frigörs produkter. Denna reaktion kan illustreras med mekanismen av Michaelis-Menten reaktionen,  $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow P + E$ , där E är enzym, S är substrat, ES är enzymsubstratkomplex och P är produkt. Enzym och dess substrat förbinds reversibelt och bildar ett enzymsubstratkomplex. Denna förbindelse antas vara en snabb jämvikt. Därefter bildas det produkter när enzymsubstratkomplexet bryts ner och enzymet blir fritt och kan interagera med andra substratmolekyler. [11]

Enzymer är endast aktiva över ett begränsat pH område och de flesta har ett speciellt pH värde där deras katalytiska aktivitet är optimal. Hastigheten på enzymkatalyserade reaktioner ökar generellt när temperaturen ökar, vid temperatur mellan + 50 °C och + 60 °C minskar enzymaktivitet. De flesta enzymatiska reaktionshastigheter blir dubbelt så stora för varje ökning av 10 °C så länge enzymet är stabilt och fullt aktivt. [11]

Aminotransferaser är enzymer som följer en s.k. ping-pong mekanism eller dubbelomflyttningsreaktioner. Denna mekanism sker enligt reaktionen:



där E är enzym, A, B är substrat, E' är modifierat enzym och P, Q är produkter. Ett substrat binder till ett enzym och reagerar med det och bildar ett kemiskt modifierat enzym plus en produkt. Ett annat substrat reagerar därefter

med det modifierade enzymet och återbildar enzymet samt bildar andra produkter. Denna reaktion förutsäger att A och Q kämpar om samma enzymer dvs. E, medan B och P kämpar om de modifierade enzymerna. A och Q binder inte till E', och B och P binder inte till E. [11]

## 2.6. Aminotransferaser

Aminotransferaser katalyserar transamineringsreaktioner, se Fig.3., vilket innebär en förflyttning av en aminogrupp från en aminosyra till en  $\alpha$ -ketosyra, enligt reaktionen: L-AMINOSYRA +  $\alpha$ -ketosyra  $\rightarrow$   $\alpha$ -KETOSYRA + L-aminosyra.

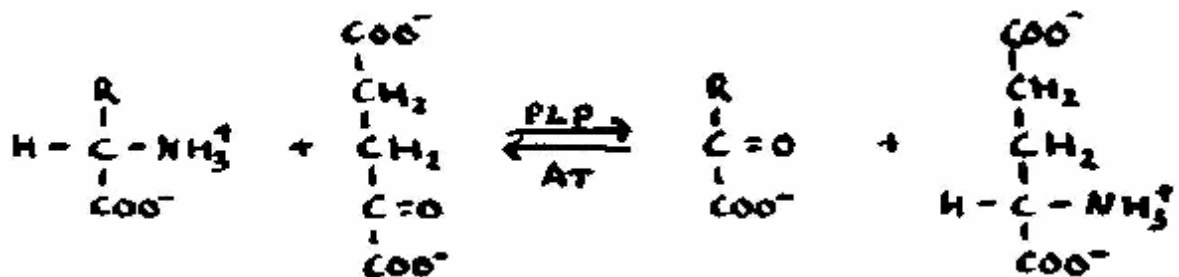


Fig.3. Aminotransferasereaktionen

Produkterna är en ny aminosyra och  $\alpha$ -ketosyra som motsvarar det kolskelett som donerade aminogruppen. Den dominerande aminosyran/ $\alpha$ -ketosyrparet i dessa reaktioner är glutamat/ $\alpha$ -ketoglutarate, där glutamat är den primära aminodonatorm för syntes av aminosyror. [11], [10], [12]

Transamination av aminosyror resulterar i bildning av  $\alpha$ -ketosyror som kan bli omvandlade till aldehyder genom decarboxylering och därefter till alkoholer eller karboxylsyror genom dehydrering. Omvandling av aromatiska aminosyror kan leda till bildning av oönskade smaker som t.ex. p-crecol, phenyletanol, phenylacetaldehyd, indol och skatole, som därefter omvandlas till ruttan eller oklar smak i ost. Väljer man rätt startkultur kan man undvika bildning av de oönskade ämnena. [10]

Aminotransferaser innehåller PLP-beroende enzymer som katalyserar den reversibla transaminationsreaktionen med bred variation av substrat och acceptormolekyler. [10]

PLP (pyridoxal-5'-fosfat) är ett coenzym som är aktivt involverat när aminotransferaserna katalyserar transamineringsreaktioner. PLP serverar som en mellanliggande bärare av den funktionella gruppen som förflyttas i



enzymreaktionen. PLP är hårt bundet till aminotransferaset, med kovalent bindning, och det är svårt att separera dessa från varandra. [11], [10], [12]

Aminotransferaser har en specifik plats på enzymet där substrat binder och katalys sker som kallas aktiv yta och denna yta är en liten del av den totala enzymstrukturen. Ytan har en speciell ficka eller klyfta vars tredimensionella struktur passar ett substrat. Enzym- och substratmolekylerna känner igen varandra genom en strukturell komplettering och ett sådant igenkännande är grunden för specificitet. Substratet binder till enzymet genom svaga krafter och interaktioner som vätebindning, jonbindning (saltbrygga) och van der Waals interaktioner mellan steriska kompletterande hop av atomer. I en enzymkatalyserad reaktion är inga av substraten avledda till sidoreaktioner så inga onödiga biprodukter produceras. [11]

De aromatiska aminotransferaserna kan omvandla de aromatiska aminosyrorerna men även leucin och metionin. De grenade aminotransferaserna kan omvandla de grenade aminosyrorerna, leucin, isoleucin och valin men även metionin, cystein och phenylalanin. [10]

## **2.7. Förbehandling**

Tvättning av cellerna görs för att man ska få bort fettsyror, fosfolipider och andra komponenter från Enzobact™ eftersom de skulle kunna inhibera lysozymreaktionen, samt att de skulle störa vid en analys. [13]

## **2.8. Frisläppning av enzymer**

Inkubering av cellerna görs för att man ska få ut aminotransferaserna ur cellerna eftersom de är intracellulära. Lysozymet klipper upp bindningar i bakteriens cellvägg och denna process tar tid eftersom lysozymet verkar långsamt. Bakterierna spricker eftersom det osmotiska trycket inne i cellen blir högre. När cellerna är uppklippta läcker DNA och RNA ut. Då tillsätter man DNase och RNase för att bryta ner DNA och RNA eftersom det annars ger en grumlig lösning som kan påverka en analys. [13]

## **2.9. Enzymreaktion**

En enzymreaktion utförs för att man ska kunna analysera om det finns någon aminotransferaseaktivitet och hur stor den är. Reaktionen medför att en aminosyra reagerar med en  $\alpha$ -ketosyra vid närvaro av ett coenzym enligt

reaktionen: L-AMINOSYRA +  $\alpha$ -ketosyra  $\rightarrow$   $\alpha$ -KETOSYRA + L-aminosyra. För att kunna få en översikt över aktiviteten tas prov vid olika tidpunkter så man kan se om reaktionen har fungerat. Reaktionen utförs vid +35 °C eftersom den sker fortare då än vid rumstemperatur. För att kunna genomföra själva analysen och veta hur mycket aminosyra som har försvunnit och hur mycket  $\alpha$ -ketosyra som har bildats, behöver reaktionen avstannas efter provtagning i +80 °C så att reaktionen inte fortlöper. [14]

## 2.10. Analysmetoder

De metoder som man kan använda sig av för att analysera aminotransferaseaktiviteten i Enzobact™ är enzymatiska metoder t.ex. colorimetric metod enligt Boehringer Mannheim GMBH, GDH-aktivitetstest, eller en HPLC metod.

Om man tittar på reaktionen i Fig.3. ser man att det är en reaktion i jämvikt, vilket innebär att om t.ex. aminosyran till vänster i reaktionen ökar i koncentration går reaktionen åt höger för att det ska bli jämvikt.

Eftersom reaktionen är i jämvikt blir det svårt att göra en enzymatisk analys eftersom man då måste dra reaktionen åt ena hållet för att man ska kunna mäta hur mycket glutamat som det har bildats. Annars måste man utföra följdreaktioner på den ursprungliga reaktionen vilket kan leda till fler felkällor.

En HPLC metod valdes eftersom det är en lättare metod, är mer selektiv och ger noggrannare analysresultat.

## 2.11. HPLC

HPLC är en förkortning för High-Performance Liquid Chromatography och är en kromatografiteknik som använder mycket små partiklar i stationärfasen och högt tryck till att pressa lösningsmedel genom en kolonn. Kromatografi används för att separera närbesläktade ämnen från varandra i komplexa provblandningar. Ett HPLC system består av ett system som levererar lösningsmedel (mobilfas), en injektionsventil, en kolonn som tål högt tryck, en detektor och en dator som kontrollerar systemet och resultaten. [15]

Provet injiceras i och rinner in i kolonnen tillsammans med mobilfasen. Mobilfasen med provet rinner genom kolonnen som är packad med stationärfas och analyterna fördelar sig mellan faserna. En del analyter löser sig lättare i stationärfasen och förflyttar sig därmed långsammare än de andra

analyterna som inte löser sig så lätt. De analyter som inte löser sig så lätt i stationärfasen kommer ut först. På detta sätt separeras analyterna och kan därefter identifieras när de har passerat detektorn. [15]

Egenskaper som en nyutvecklad kromatografimetod bör ha är att den ska ha tillräcklig upplösning av önskade analyter, att körtiden är kort samt att metoden ska vara robust, dvs. att inga drastiska effekter av små variationer i parametrarna påverkar analysen. [15]

Kännetecknen för en bra separation mellan topparna är att retentionsfaktorn,  $k'$ , ligger mellan 0,5 och 20, upplösningen  $R_s$ , är större eller lika med 2 och den asymmetriska faktorn ligger mellan 0,9 och 1,5 samt att drifttrycket är lika med eller mer än 15MPa. [15]

Retentionsfaktor:  $k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$   $t_r$  = tid att transportera analyt

$t_m$  = tid att transportera oretarderade ämnen

Upplösning:  $R_s = \frac{2 * (t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$   $t_2, t_1$  = tiden för topparna

$W_2, W_1$  = bredden på toppen vid baslinjen

Asymmetrisk faktor:  $\frac{A}{B}$

A och B är halva bredden var av en topp vid 1/10 ovanför baslinjen. Se fig.4.

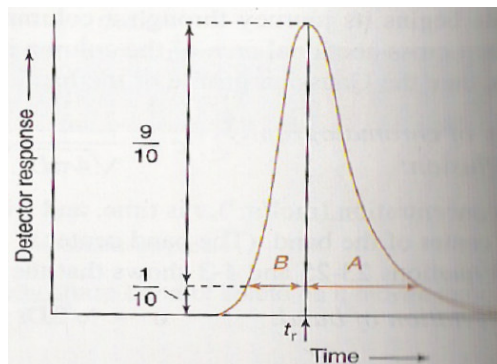


Fig.4. Bild över hur man får ur A och B.

## 2.12. Derivatisering

Derivatisering av aminosyror gör man för att man ska kunna detektera dem när man analyserar dem med en HPLC. En aminosyra har ingen grupp på sig som ger utslag vid en HPLC analys, därför måste man derivatisera dem. När man har derivatiserat aminosyror bildas det en atomgrupp som är detekterbar vid en HPLC analys.

Derivatisering är en kemisk förändring av aminosyror, där instabila aminosyror omvandlas till stabila derivat som man lättare kan detektera och separera. [15]

Aminosyror derivatiseras med O-phthalaldehyd (OPA), beroende på vilken aminosyra som ska derivatiseras används olika OPA-sammansättningar. De sammansättningar som används är O-phthalaldehyd-2-mercaptoetanol (OPA-2-ME) (Fig.5.) och O-phthalaldehyd-natriumsulfit (OPA- $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) (Fig.6.). [9] Derivatiseringen sker enligt följande reaktioner:

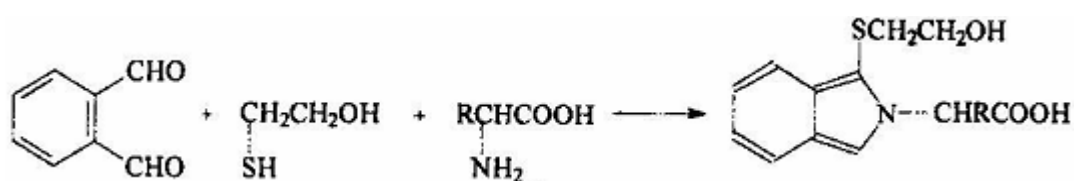


Fig.5. Derivatisering med OPA-2-ME

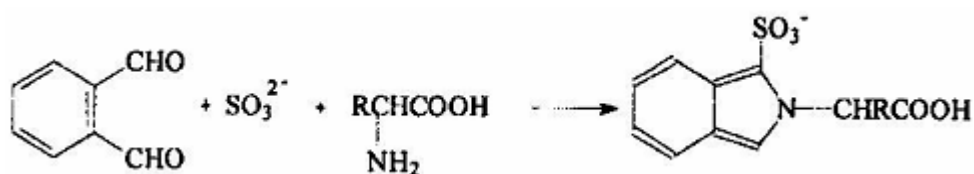


Fig.6. Derivatisering med OPA- $\text{Na}_2\text{SO}_3$

## 2.13. Blanker

Blanker är prov som innehåller alla komponenter utom analyt och tas igenom alla steg av den analytiska proceduren som för ett riktigt prov. Responserna som blankerna ger används till att identifiera alla kemikalier, substanser, orenheter och interfererande ämnen i provet som används under arbetsgången. Alla blankprover har samma koncentration som de har i proven under en riktig analys. Detta görs för att kunna identifiera topparna och få reda på den riktiga tiden som de kommer ut på samt vilken topparea de har. [15]

## 2.14. Kalibreringskurvor

En kalibreringskurva är en graf av detektorrespons som en funktion av känd koncentration av analyt. För att kunna konstruera en kalibreringskurva analyserar man standardlösningar som innehåller kända koncentrationer av ren analyt. En rak linje ritas därefter genom punkterna med hjälp av minsta kvadratmetoden och kan sedan användas till att hitta koncentrationen i okänt prov. Kan även användas till att se inom vilka koncentrationer som man kan ligga, för att kunna utföra analyser av okänd koncentration av analyt. [15]

### **3. Material**

#### **3.1. Kemikalier**

Aminosyrorna L-tryptophan och  $\alpha$ -ketoglutaratsyra ( $\alpha$ -KGA), Na-glutamat, O-phtalaldehyde (OPA), 2-mercaptometanol, pyridoxal-5'-fosfat (PLP), natriumsulfit och magnesiumklorid är inköpta från Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Tyskland). Metanol LiChrosolv, EDTA, natrium borate, natriumhydroxid, saltsyra och tris(hydroxymetyl)aminometan är inköpta från Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland). Enzobact™ 04-101, lysozym, Dnase och Rnase erhålls från Medipharm AB (Kågeröd, Sverige). Alla kemikalier och lösningsmedel är av analytisk och HPLC grad.

#### **3.2. Utrustning**

HPLC apparaturen som används är Dynamax solvent delivery system model SD-200 (Varian Star, walnut creek, USA) och en dynamax absorbance detector model UV-C, 230 nm (Varian). Injektionsventilen är en rheodyne, lämpad med en 20- $\mu$ l prov loop. Toppårean och provkoncentrationerna är beräknade med varian kromatograf datasystem. En rostfri Zorbax SB-C18 kolonn (4.6 mm \*7.5 cm, 3 $\mu$ m) och en SUPELCOSIL LC18-DB (7.5 cm \*4.6 mm, 3  $\mu$ m) är använda. Mobilfaserna består av 0,01 M trisbuffert 15 % metanol LiChrosolv, pH 7 och 0.01 M trisbuffert 10 % metanol LiChrosolv, pH 7, mobilfasernas flödes hastighet är 1.0 ml/min och är rumstempererade.

## 4. Metod

### 4.1. Förbehandling

1,00 gram Enzobact™ 04-101 vägs upp i ett centrifugrör och därefter tillsätts 15 ml trisbuffert 0,01 M (pH7). Cellerna slammas upp under minst 5 minuter och får därefter svälla i + 8 °C under 30 minuter. Därefter centrifugeras cellerna vid 4000 x g, +4 °C i 15 minuter. Supernatanten hålls av, tillsätt 15 ml trisbuffert 0,01 M (pH 7) och slamma upp pelleten under 5 minuter. Centrifugera vid 4000 x g, +4 °C i 15 minuter. Häll av supernatanten, tillsätt 15 ml trisbuffert 0,01 M (pH 7) och slamma upp pelleten i 5 minuter. Centrifugera vid 4000 x g, +4 °C i 15 minuter. Häll av supernatanten och tillsätt trisbuffert med MgCl<sub>2</sub> 0,01 M (pH 7) till en totalvikt av 15 g. Slamma upp cellerna under 5 minuter. Överför därefter 5 g till ett nytt centrifugrör. [16]

### 4.2. Frisläppning av enzymer

Till inkubering av cellerna blandas en lysozymlösning med koncentrationen 15 mg/ml, en DNase-lösning med koncentrationen 5 mg/ml och en RNase-lösning med koncentrationen 5 mg/ml. Tillsätt 200 µl lysozymlösning till 5 g cellmassa och inkubera i värmeskåp +37 °C i 1,5 h. Proverna vänds 2-3 gånger under inkuberingen. Efter 1,5 h tillsätt 25 µl av vardera DNase- och RNase-lösning och inkubera i värmeskåp +37 °C i ytterligare 30 minuter. Centrifugera därefter proverna vid 4000 x g, +4 °C i 30 minuter. Häll över supernatanten i ett nytt rör och spara den till analys eftersom det är i supernatanten som aminotransferase finns. [16]

### 4.3. Enzymreaktion

En reaktionsblandning blandas som innehåller 250 µl trisbuffert 0,01 M (pH 7), 100 µl PLP 0,25 mM, 50 µl EDTA 5mM, 50 µl aminosyra 5 mM, 300 µl α-KGA 30 mM och 750 µl AT-källa.

Sätt ner reaktionsblandningen i ett vattenbad +35 °C och ta ut prov vid vissa tidpunkter. Sätt ner de uttagna proven i vattenbad +80 °C i 15 minuter för att avstanna reaktionen [17] Sätt sedan ner de uttagna proven i isbad och sätt därefter in proven i kylskåp tills analys ska göras.

#### 4.4. HPLC metoder

Metod 1: Kolonnen som används vid denna metod är Zorbax SB-C18, (4.6 mm\*7.5 cm, 3µm). Mobilfasen består av 0.01 M trisbuffert, 15 % metanol LiChrosolv, pH 7.

Metod 2: Kolonnen som används vid denna metod är Supelcosil LC18-DB (7.5 cm\*4.6 mm, 3 µm). Mobilfasen består av 0.01 M trisbuffert, 15 % metanol LiChrosolv, pH 7.

Metod 3: Kolonnen som används vid denna metod är Supelcosil LC18-DB (7.5 cm\*4.6 mm, 3 µm). Mobilfasen består av 0.01 M trisbuffert, 10 % metanol LiChrosolv, pH 7.

#### 4.5. Analyser

##### 4.5.1. Beredning av OPA-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> och OPA-2ME

###### 0,2 M OPA lösning

27 mg OPA löses i 1 ml metanol LiChrosolv. [14]

###### 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> lösning

1,2604 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> späds till 10 ml med dest.vatten. [14]

###### 0,1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*10H<sub>2</sub>O (pH 9,65)

3,8 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*10H<sub>2</sub>O späds till 100 ml med dest.vatten och justera pH till 9,65 med NaOH. [14]

###### Beredning av OPA-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

25 µl av 0,2 M OPA lösning i metanol LiChrosolv blandas med 25 µl av 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> och späds till 1 ml med Natriumborat buffert (pH 9,65). [14]

###### Beredning av OPA-2ME

10 µl av 0,2 M OPA lösning i metanol LiChrosolv blandas med 20 µl av 2-ME och späds till 500 µl med 0,1 M Natriumborat buffert (pH 9,65). [14]

##### 4.5.2. Derivatisering med OPA-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

40 µl från reaktionsblandningen blandas med 20 µl OPA-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> och 340 µl Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. Vortexa blandningen och sätt ner den i ett vattenbad + 35 °C i 15 minuter. [14] Injicera 20 µl membranfiltrerat prov för analys vid 230 nm i 20 minuter med metod 1 och 2 och 60 minuter med metod 3.



### 4.5.3. Derivatisering med OPA-2-ME

40 µl från reaktionsblandningen blandas med 60 µl OPA-2-ME och 300 µl Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. Membranfiltrera 20 µl av blandningen och injicera provet efter 3 minuter [14] för analys vid 230 nm i 20 minuter med metod 1 och 2 och 60 minuter med metod 3.

### 4.6. Blanker

Varje kemikalie och substans derivatiseras var för sig med båda OPA blandningarna och analyseras i samma koncentration som de har i den slutliga reaktionsblandningen.

### 4.7. Kalibreringskurvor

Kalibreringskurvor för tryptophan och glutamat görs för 2 av de metoder som används. Kalibreringskurvorna från metod 1 och metod 3 finns i Fig. 7-10.

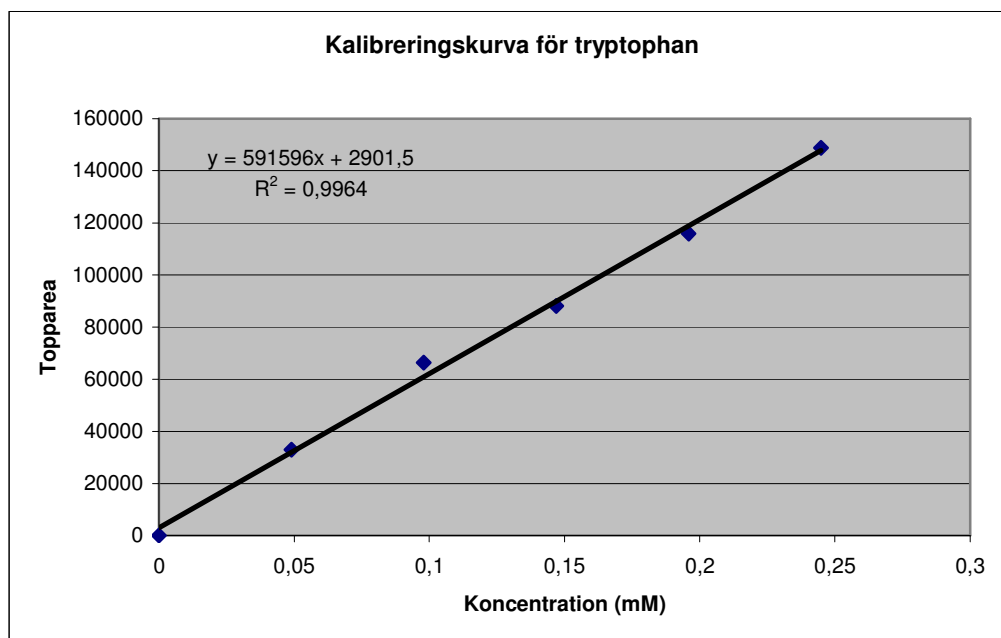


Fig.7. Kalibreringskurva för tryptophan med metod 1

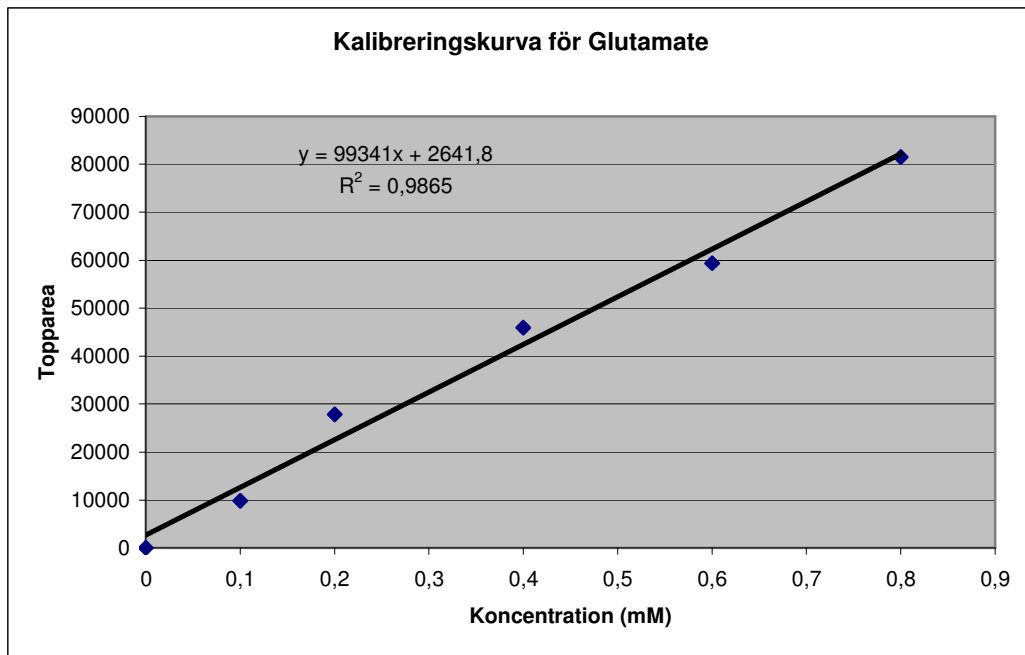


Fig.8. Kalibreringskurva för glutamat med metod 1

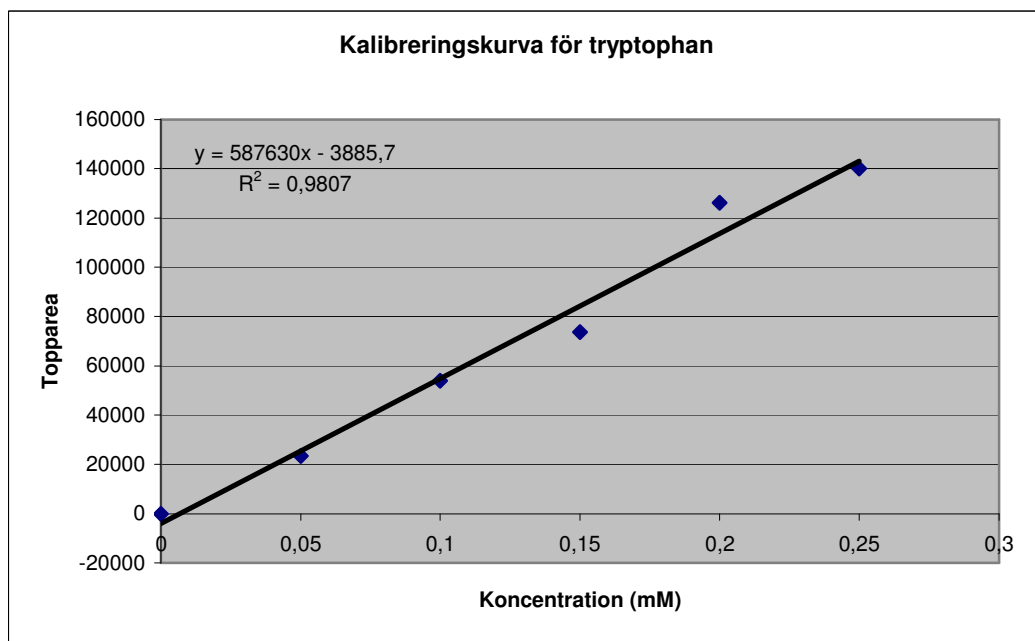


Fig.9. Kalibreringskurva för tryptophan med metod 3

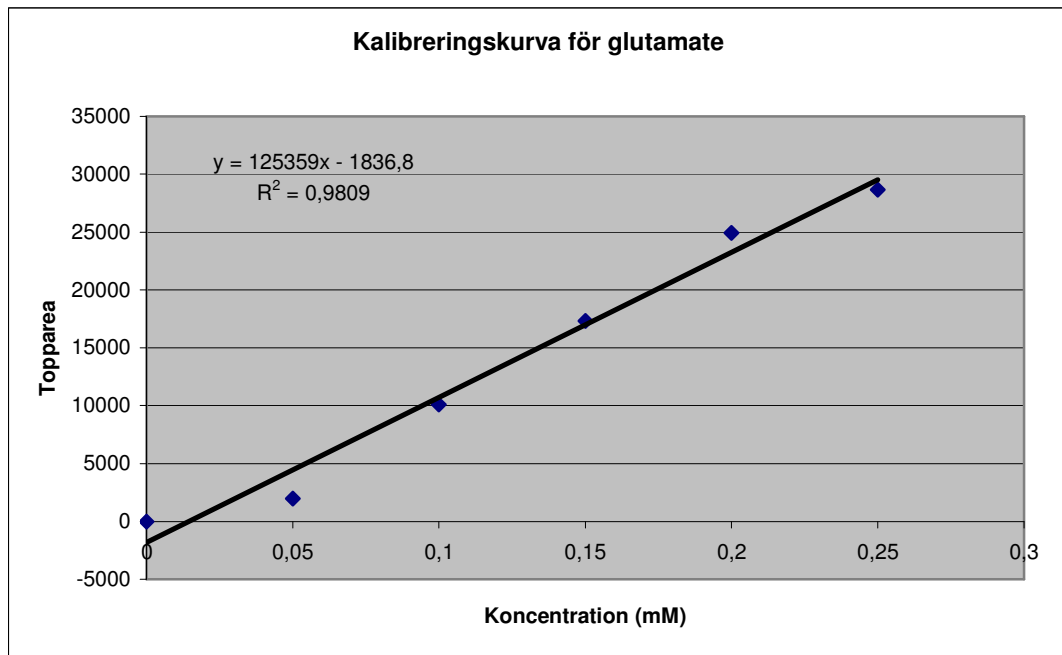


Fig.10. Kalibreringskurva för glutamat med metod 3

## 5. Resultat och diskussion

### 5.1. Toppidentifiering på kromatogram

Till en början identifieras topparna på kromatogrammen med hjälp av alla de blanker som har analyserats var för sig och tillsammans, för att kunna avgöra vilken topp som är vilken. Vid identifieringen på kromatogrammen där tryptophan ger utslag kommer toppen för tryptophan vid ca 15,5 minuter med metod 1, vid ca 16,3 minuter med metod 2 och vid ca 35,4 minuter med metod 3. Se Fig.11.-Fig.13..

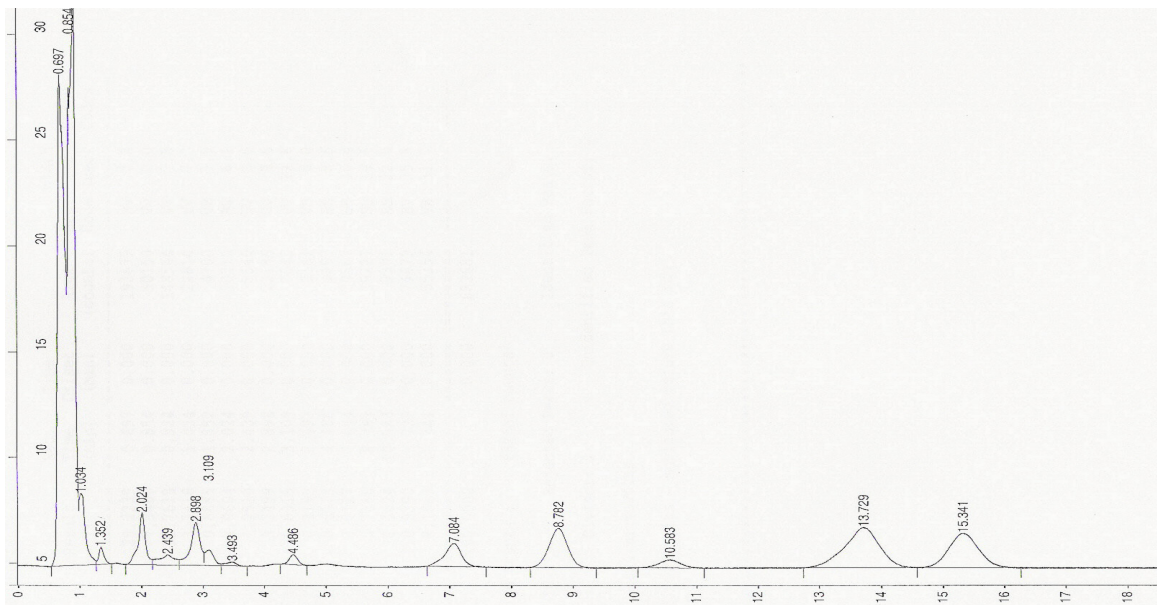


Fig.11. Kromatogram från metod 1 där tryptophan gav utslag vid 15,341 min.

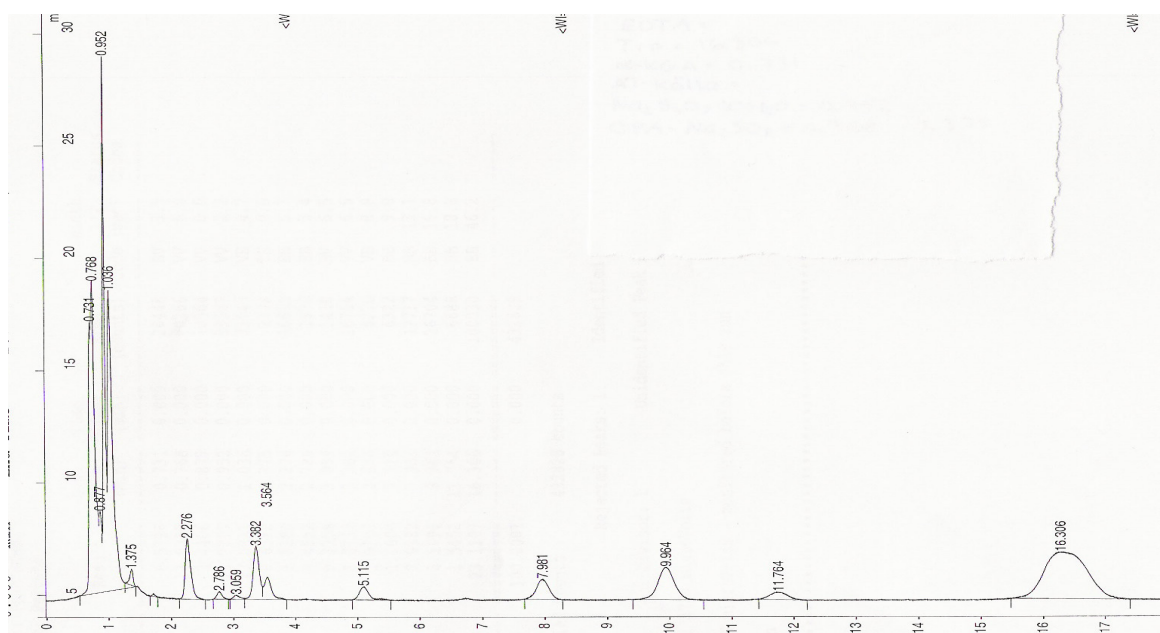


Fig.12. Kromatogram från metod 2 där tryptophan gav utslag vid 16,306 min.

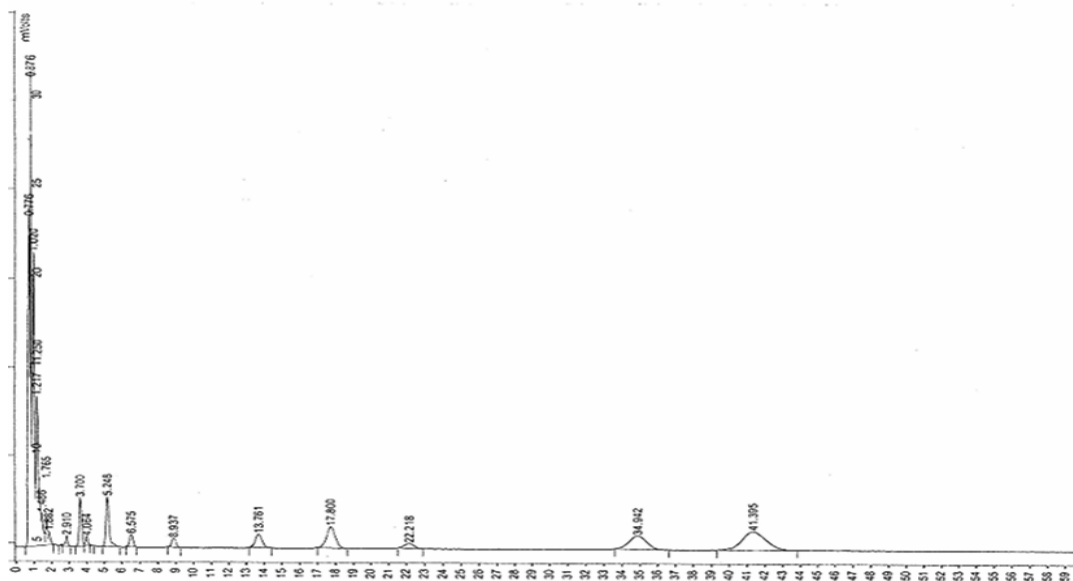


Fig.13. Kromatogram från metod 3 där tryptophan gav utslag vid 34,942 min.

Vid identifieringen på kromatogrammen där glutamat ger utslag kommer toppen för glutamat vid ca 2,5 minuter med metod 1, vid ca 8,6 minuter med metod 2 och vid ca 4,7 minuter med metod 3. Se Fig.14.-Fig.16..

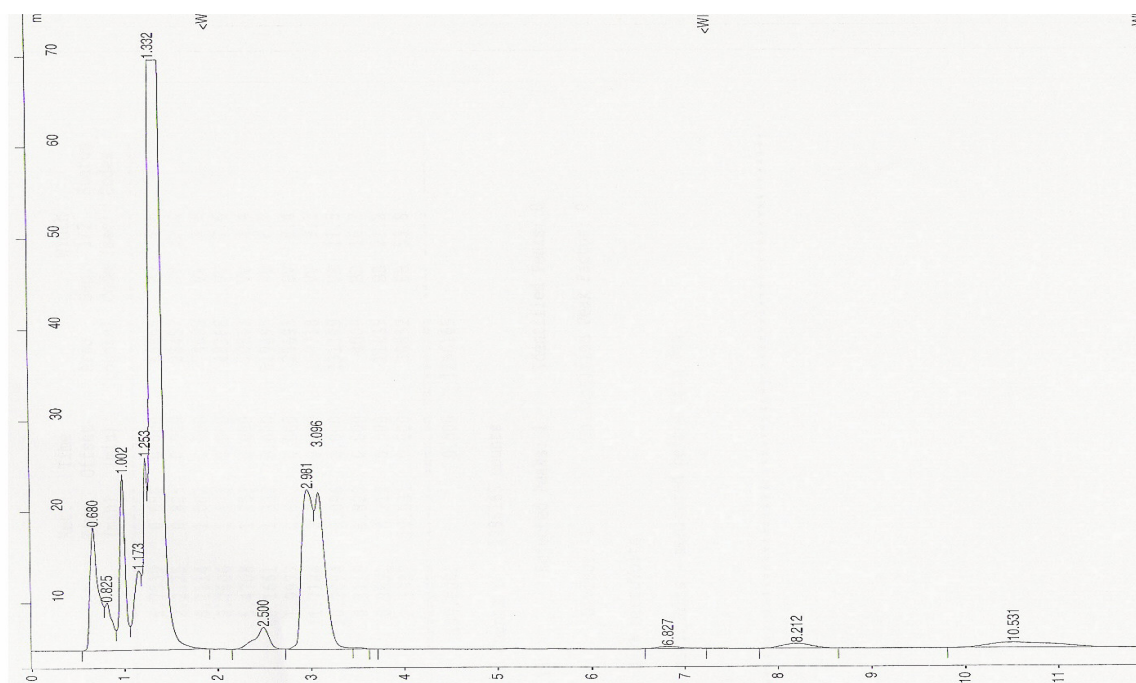


Fig.14. Kromatogram från metod 1 där glutamat gav utslag vid 2,500 min.

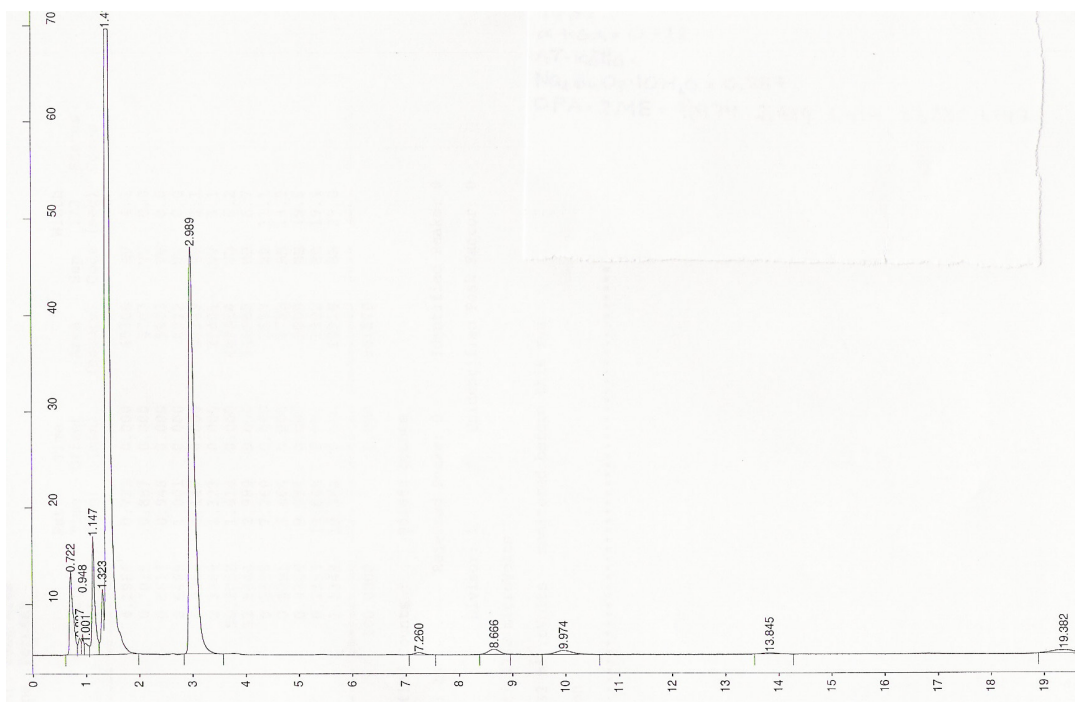


Fig.15. Kromatogram från metod 2 där glutamat gav utslag vid 8,666 min.

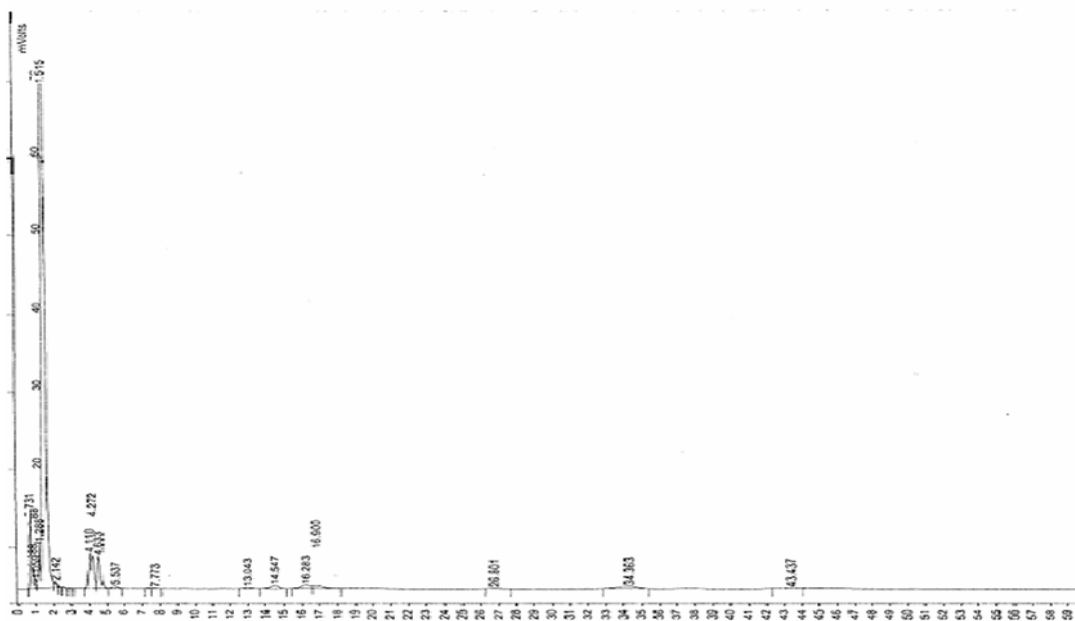


Fig.16. Kromatogram från metod 3 där glutamat gav utslag vid 4,633 min.

## 5.2. Förkortning av derivatiseringstiden för tryptophan

Derivatiseringstiden för tryptophan är från början 25 minuter. För att minska den tiden görs ett antal försök. Förkortning av derivatiseringstiden görs för att minska tiden innan en analys utförs, eftersom tiden för utvinning av aminotransferase från Enzobact™ tar lång tid och inte går att korta ner.

Det som varierar mellan alla försök är tiden för derivatiseringen och temperaturen i vattenbadet, enligt följande tabell:

Försök	Temperatur (°C)	Tid (min)
1	Rumstemperatur	25
2	30 °C	15
3	35 °C	15
4	35 °C	5

Fem olika koncentrationer derivatiseras och analyseras för varje försök för att kunna få fram kalibreringskurvor. I det första försöket blir den linjära regressionen 0,989 (Fig.17.), i det andra försöket blir den linjära regressionen 0,9956 (Fig.18.), i det tredje försöket blir den linjära regressionen 0,9964 (Fig.19.) och i det fjärde försöket blir den linjära regressionen 0,9766 (Fig.20.). Kalibreringskurvorna visar vilket försök som ger bäst resultat dvs. bäst linjäritet och det är försök 3 (Fig.19.).

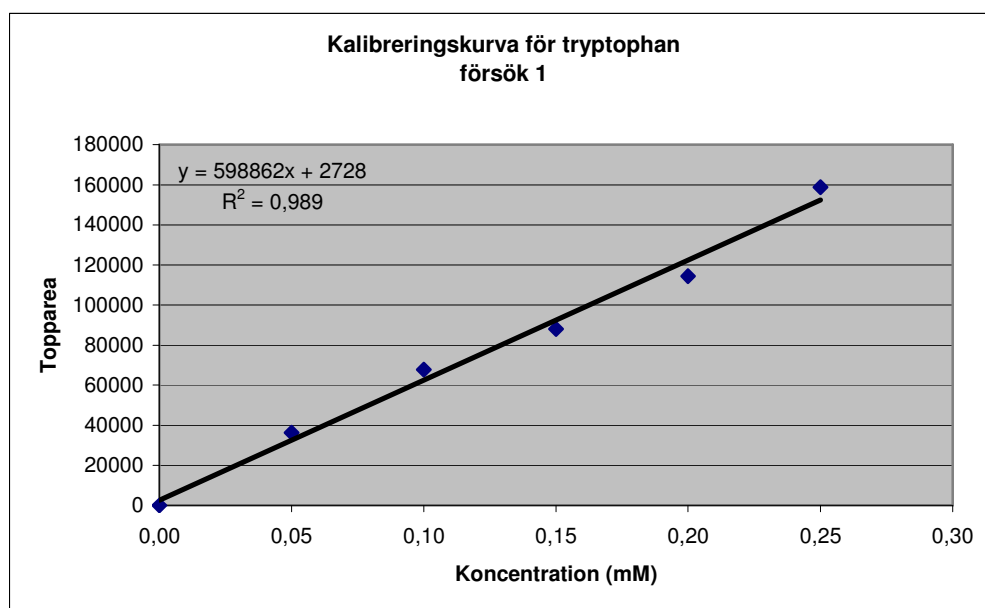


Fig.17. Kalibreringskurva för försök 1.

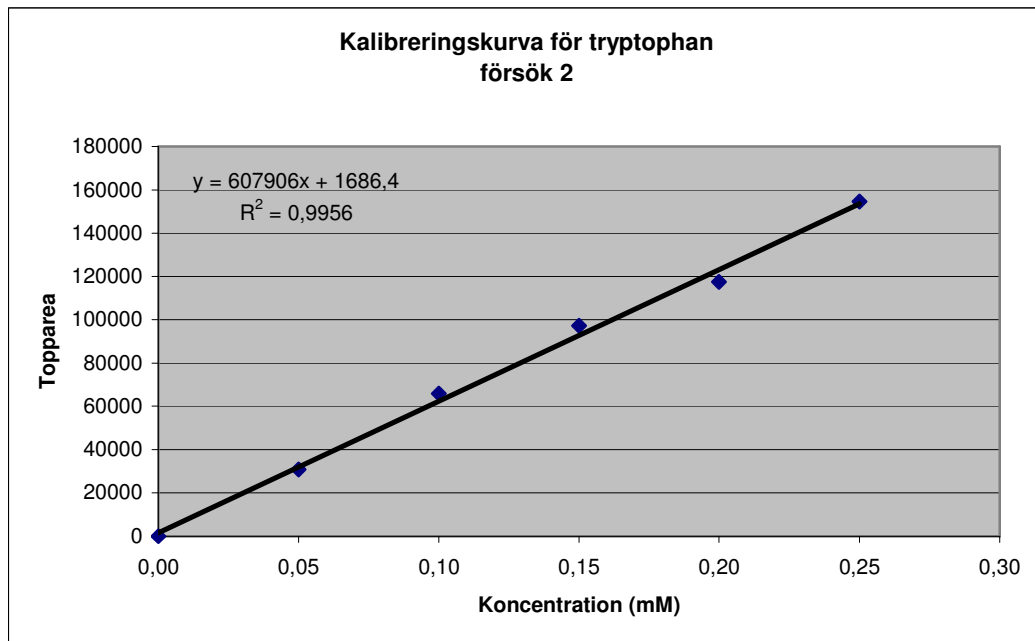


Fig.18. Kalibreringskurva för försök 2.

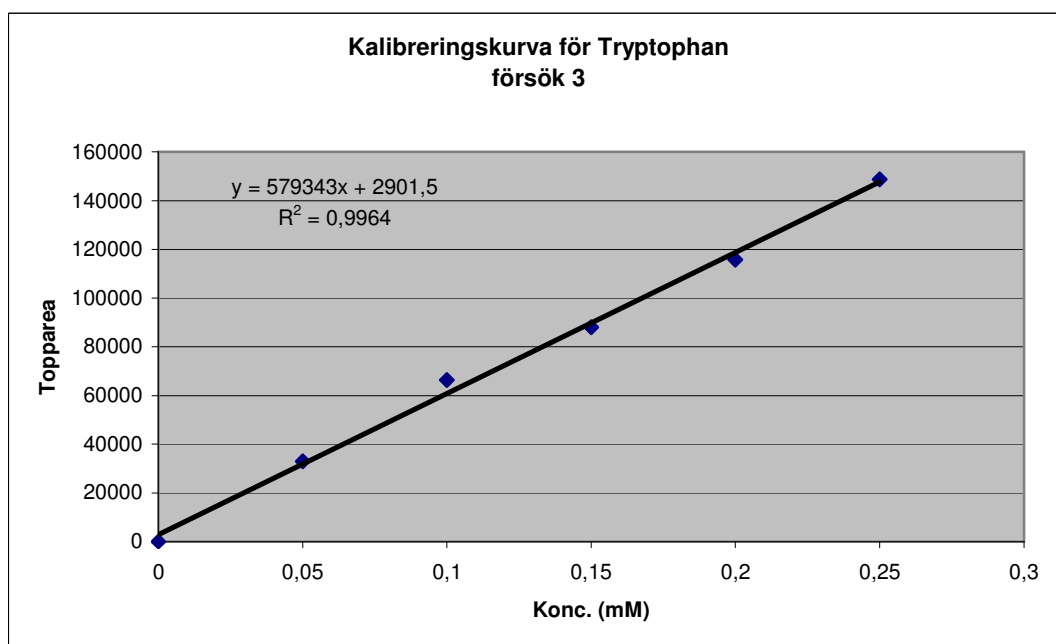


Fig.19. Kalibreringskurva för försök 3.



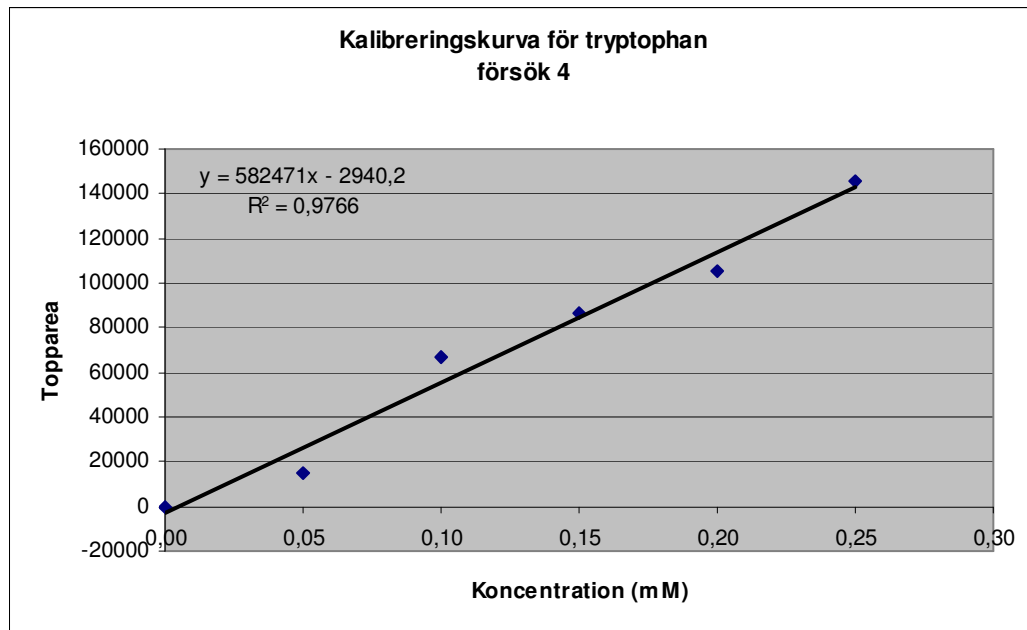


Fig.20. Kalibreringskurva för försök 4.

### 5.3. Ökning av glutamat och minskning av tryptophan

Ett antal analyser görs över ökning av glutamatkoncentrationen och minskning av tryptophankoncentrationen med metod 1, metod 2 och metod 3. Metoderna ger olika resultat vilket visas nedan.

Med metod 1 görs trippelprov för ökning av glutamatkoncentrationen för att se om det är någon stor skillnad mellan samma koncentrationer. För resultaten av trippelproven se tabell nedan.

	5 min	10 min	15 min	20 min
<b>Koncentration (mM)</b>	0,0142	0,0194	0,0164	0,0264
<b>Koncentration (mM)</b>	0,0233	0,0219	0,0185	0,0229
<b>Koncentration (mM)</b>	0,0194	0,0338	0,0267	0,0199
<b>Medelvärde</b>	0,0190	0,0250	0,0205	0,0231
<b>Std. Avvikelse</b>	0,0037	0,0063	0,0044	0,0027
<b>Relativ Std. Avvikelse</b>	0,1966	0,2500	0,2153	0,1158

I Fig.21. är varje försök över ökning av glutamatkoncentrationen uppritade var för sig där man ser att glutamat koncentrationerna skiljer sig åt olika mycket vid varje tidpunkt. Vid trippelprovet blir den relativa standardavvikelsen bra eftersom den ligger under 0,3 %. Detta innebär att skillnaden mellan varje analys för samma tidpunkt som prov tas ut inte skiljer sig åt så mycket. I Fig.22. är kurvan av ökning av glutamatkoncentrationen ett medelvärde av de tre försöken.

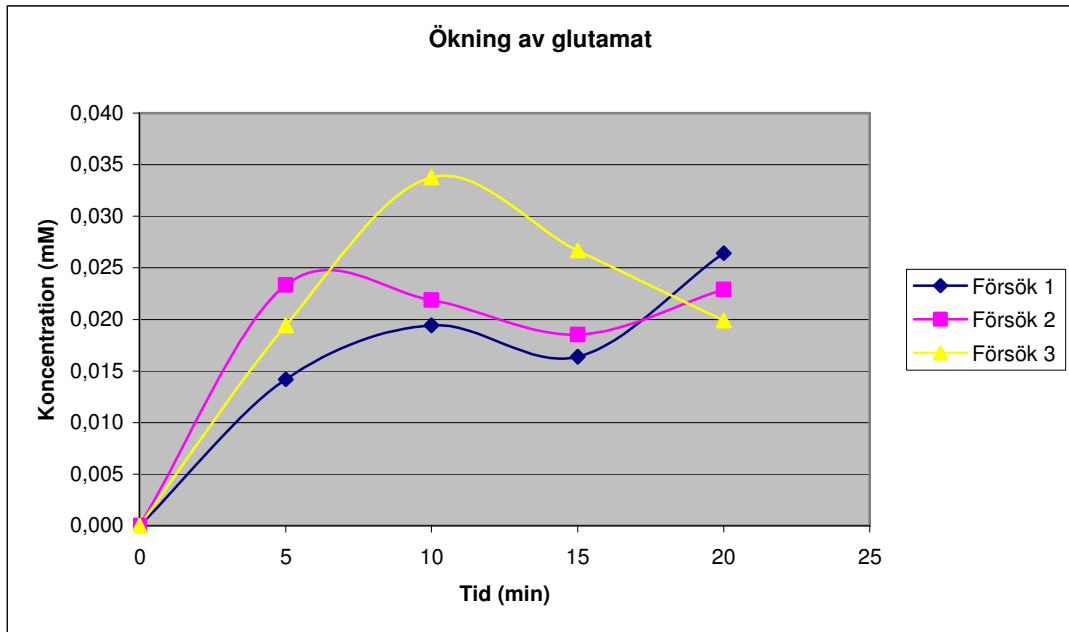


Fig.21. Kurvor över ökning av glutamat vid tre olika försök

Med metod 1 ökar koncentrationen på glutamat de första 10 minuterna från 0 mM till 0,025 mM innan koncentrationen minskar till 0,020 mM för att sedan öka igen till 0,023 mM (Fig.22.). Koncentrationen av tryptophan minskar inte under 20 minuter utan koncentrationen går upp och ner (Fig.23.).

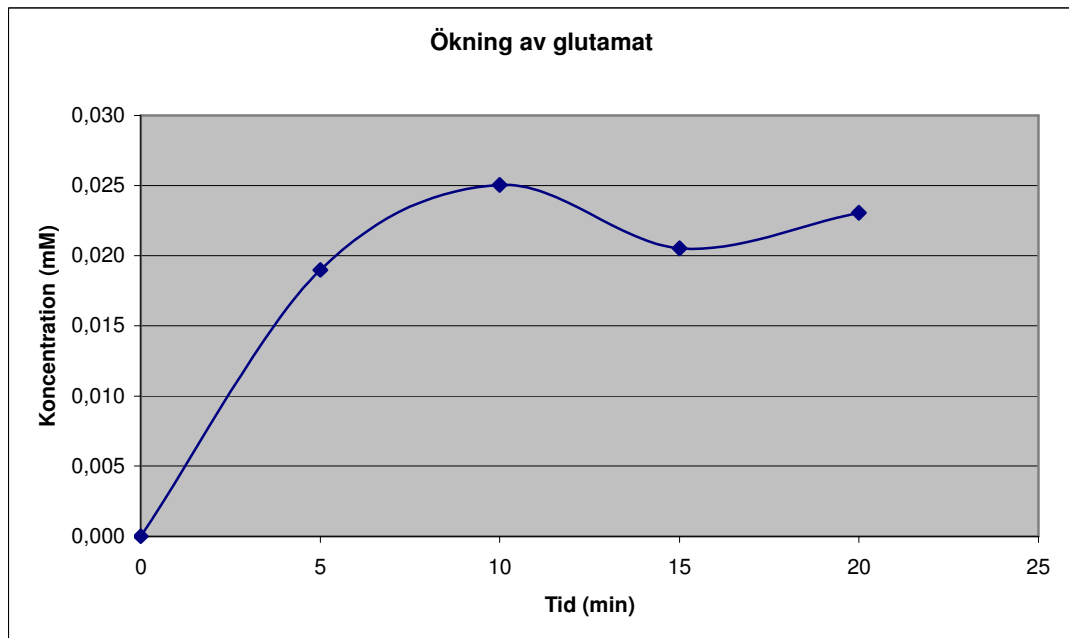


Fig.22. Kurva över ökning av glutamat

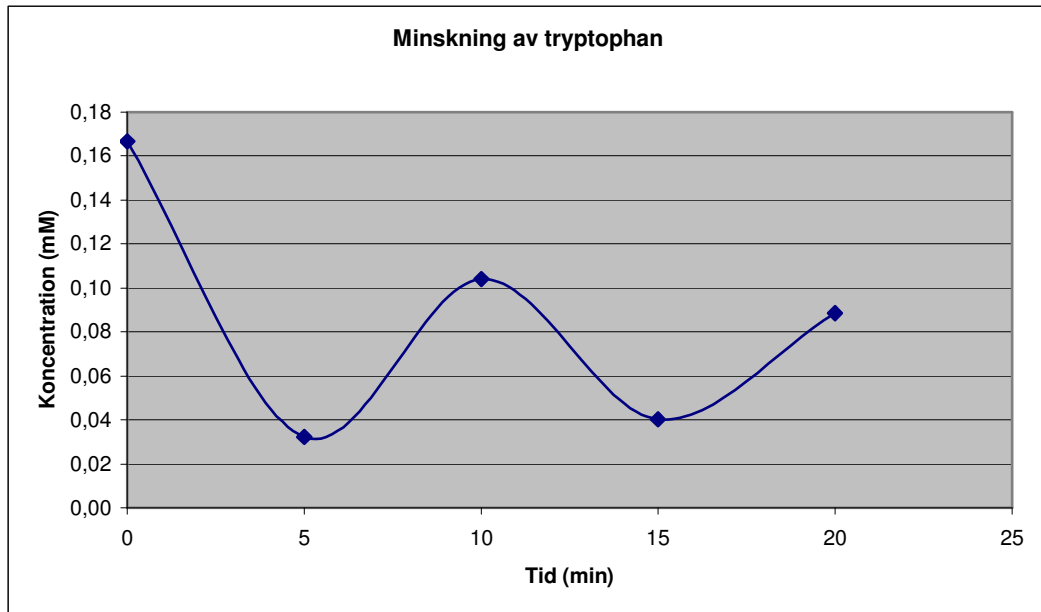


Fig.23. Kurva över minskning av tryptophan

För glutamat är retentionsfaktorn beräknad till 2,6, den asymmetriska faktorn till 0,9 och upplösningen till 4,1. För tryptophan beräknas retentionsfaktorn till 21,7, den asymmetriska faktorn till 1,1 och upplösningen till 1,5. Retentionsfaktorn för glutamat ligger inom gränsen, men för tryptophan är den lite för hög. De asymmetriska faktorerna och upplösningarna för både glutamat och tryptophan ligger inom gränserna. Denna metod ger generellt bra analysresultat, men eftersom topparna är breda och korta samt att vissa toppar är dubbla är den inte bra. Anledningen till att topparna är dubbla, breda och korta kan vara att kolonnen som används är dålig. Orsaken till att ökningen av glutamat och minskningen av tryptophan går upp och ner kan vara att prov tas ut för tätt och under en för kort tid. Fel kan också göras vid provtagning, t.ex. för liten provvolym kan tas upp från reaktionsblandningen, provet kanske inte är homogent eller att allt kanske inte är derivatiserat eftersom det är en för liten volym av OPA-2-ME eller OPA- $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

Med metod 2 ökar topparean av glutamat de första 10 minuterna från 0 till 1576 innan topparean minskar till 1021 (Fig.24.). Topparean av tryptophan minskar inte under 20 minuter utan går först ner från 100030 till 76864 och ökar sedan till 80687 (Fig.25.).

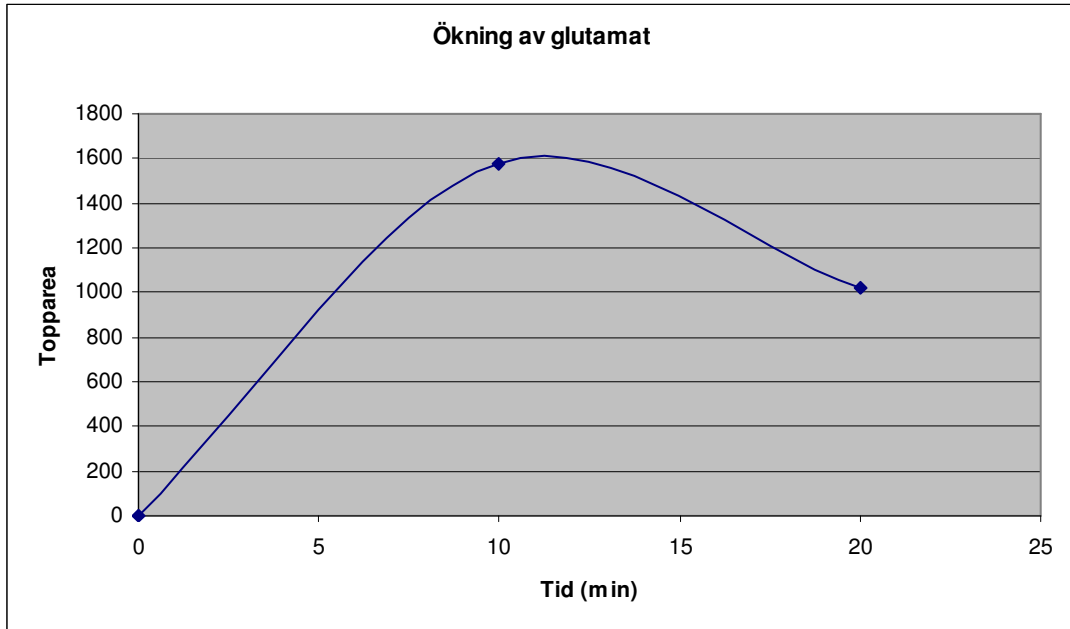


Fig.24. Kurva över ökning av glutamat.

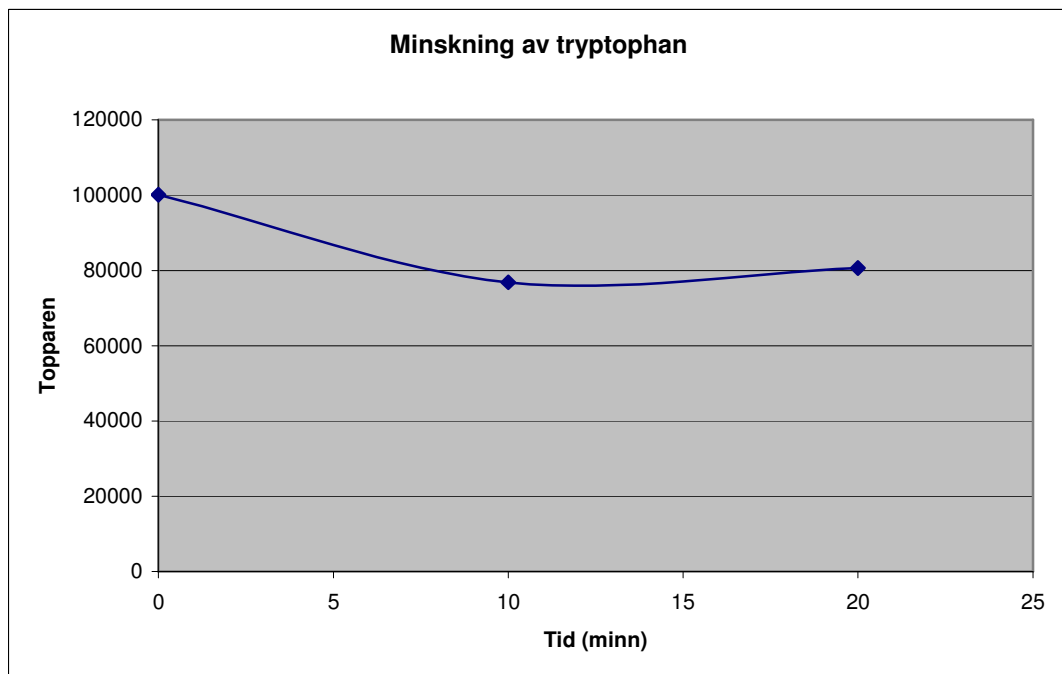


Fig.25. Kurva över minskning av tryptophan.

Med metod 2 ritas inte kurvorna mot koncentrationerna eftersom inga kalibreringskurvor görs med metod 2, eftersom mobilfasen gjordes om efter ett försök med denna metod. Topparean är proportionell mot koncentrationen så man kan ändå se och veta att glutamat och tryptophan ökar och minskar med tiden.

För glutamat är retentionsfaktorn beräknad till 11, den asymmetriska faktorn till 1,1 och upplösningen till 3,4. För tryptophan beräknas retentionsfaktorn till 20,6, den asymmetriska faktorn till 1,2 och upplösningen till 4,2. För glutamat ligger retentionsfaktorn, upplösningen och den asymmetriska faktorn inom gränserna. För tryptophan ligger retentionsfaktorn lite över gränsen men upplösningen och den asymmetriska faktorn ligger inom gränserna. Denna metod ger bättre analysresultat än vad metod 1 gör, så bytet av kolonn ger resultat. Orsaken till att ökningen av glutamat och minskningen av tryptophan går upp och ner kan vara av samma anledning som för metod 1.

Med metod 3 görs det två försök. Vid det första försöket ökar koncentrationen på glutamat bara under två timmar från 0 mM till 0,39 mM och minskar under den tredje timmen till 0,24 mM (Fig.26.). Koncentrationen på tryptophan minskar från 0,13 mM till 0,04 mM under tre timmar, (Fig.27.) precis som det ska.

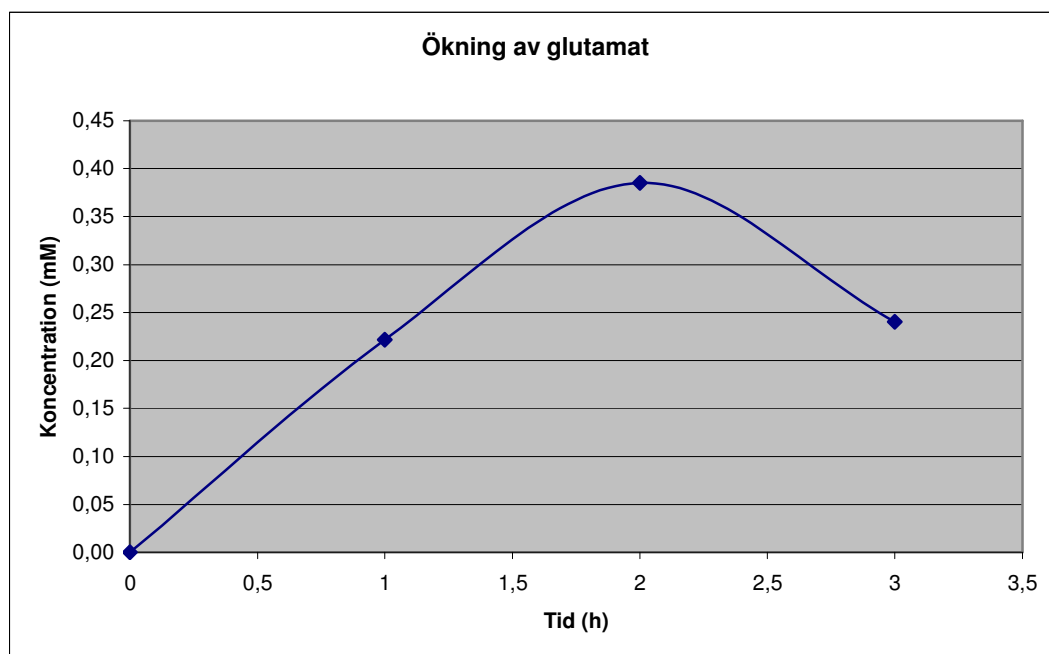


Fig.26. Kurva över ökning av glutamat försök 1

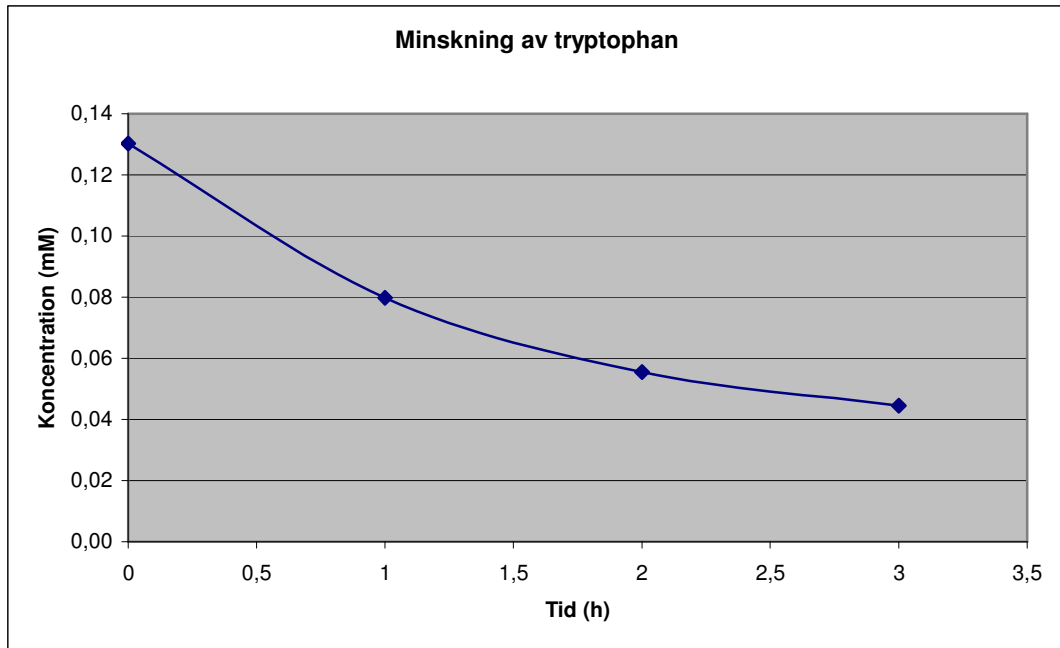


Fig.27. Kurva över minskning av tryptophan försök 1

För glutamat är retentionsfaktorn beräknad till 5,4, den asymmetriska faktorn till 1,3 och upplösningen till 3,7. För tryptophan beräknas retentionsfaktorn till 45,2, den asymmetriska faktorn till 1,3 och upplösningen till 6,6. För glutamat ligger retentionsfaktorn, upplösningen och den asymmetriska faktorn inom gränserna. För tryptophan ligger retentionsfaktorn mycket över gränsen men upplösningen och den asymmetriska faktorn ligger inom gränserna.

Anledningen till att koncentrationen på glutamat minskar efter två timmar kan vara att fel görs vid provtagningen, t.ex. för liten provvolym kan tas upp från reaktionsblandningen, provet kanske inte är homogent vid den tredje timmen, all glutamat har kanske inte blivit derivatiserad, eftersom det kan ha varit för liten volym av OPA-2-ME.

Vid andra försöket ökar koncentrationen på glutamat under tre timmar från 0 mM till 0,29 mM (Fig.28.). Koncentrationen på tryptophan minskar under tre timmar från 0,13 mM till 0,05 mM (Fig.29.)

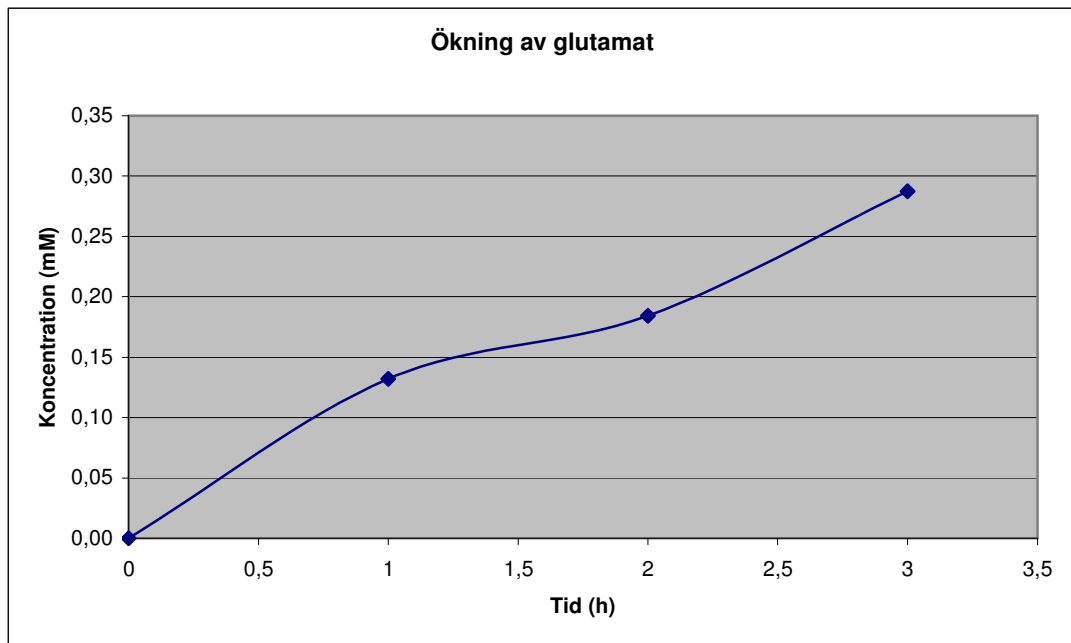


Fig.28. Kurva över ökning av glutamat försök 2

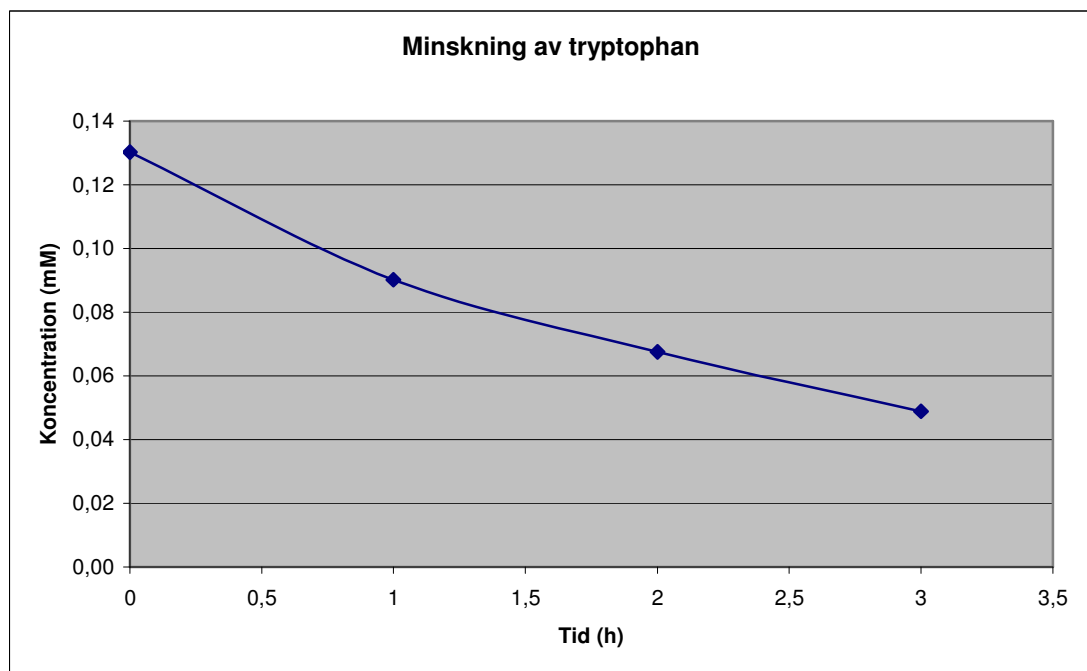


Fig.29. Kurva över minskning av tryptophan försök 2

För glutamat är retentionsfaktorn beräknad till 5,4, den asymmetriska faktorn till 1,3 och upplösningen till 3,7. För tryptophan beräknas retentionsfaktorn till 44,4, den asymmetriska faktorn till 1,3 och upplösningen till 6,6. För glutamat ligger retentionsfaktorn, upplösningen och den asymmetriska faktorn inom gränserna. För tryptophan ligger retentionsfaktorn mycket över gränsen men upplösningen och den asymmetriska faktorn ligger inom gränserna.

Utifrån resultaten från dessa 3 metoder kan man dra slutsatsen att metod 1 ger relativt bra resultat förutom att den har dubbla toppar, toppar som är breda och korta. Därför är denna metod inte så lämplig att använda vid analys. Metod 2 och metod 3 ger bra resultat förutom retentionsfaktorn på tryptophan med metod 3. Men metod 2 är att föredra eftersom den har en kortare analystid fastän koncentrationerna på glutamat och tryptophan går upp och ner. Resultaten från de tre metoderna kan tolkas som att analysmetoden skulle kunna fungera som en metod för att analysera aminotransferase-aktiviteten i Enzobact™, men fler försök bör göras innan man kan dra en slutsats om det.



## 6. Fortsatt arbete

Från analysresultaten som man har fått från de analysmetoder som används kan man fortsätta att arbeta på och utveckla metoden för att kunna analysera aminotransferaseaktiviteten i Enzobact™. Det som man bör koncentrera sig på i första hand är att göra ett antal analyser på glutamat och tryptofan med metod 2, eftersom den ger bra resultat och har kortast analystid. Man bör börja med att göra en kalibreringskurva för metod 2 eftersom inte det har gjorts. Det som man sedan kan göra är att ta ut prover över en längre tid och ett förslag är att man börjar med att ta ut prover med 30 minuters mellanrum under minst 3 timmar och max 5 timmar. Om det behövs så kan man ändra sammansättningen på mobilfasen så att metanolhalten ligger mellan 10 % och 15 %, eller mer än 15 %, för att se vad som händer med upplösningen, retentionsfaktorn och den asymmetriska faktorn. Om det tar för lång tid att göra analyserna kan man fundera på om man kan använda sig av gradient istället för att få en kortare analystid. Man kan även byta till en kolonn som är kortare eller längre, där den längre kolonnen ger ökad upplösning men  $t_r$  ökar. Man kan även ändra flödet på mobilfasen där minskat flöde oftast leder till bättre upplösning men  $t_r$  ökar. Man kan även ändra på partikelstorleken i kolonnen, och minskar man på den så ökar upplösningen men  $t_r$  ökar. Det är viktigt att komma ihåg att man bara ska ändra på en parameter i taget.

När metoden fungerar bra behöver man göra en utvärdering på analysmetoden för att se om den ger tillförlitliga provresultat och det gör man genom att göra en validering av metoden. Det som man bör kontrollera då är precision, noggrannhet, Limit of detection (LOD), Limit of quantitation (LOQ), selektivitet, linjaritet och robusthet. En validering måste göras för att kunna säga om en metod går att använda till analys av aminotransferaseaktivitet i Enzobact™. När metoden är validerad och visar att den är användbar kan man testa om analysmetoden går att använda på andra aminosyror och validera den för dem.

## 7. Referenser

- [1] Molin, G. (1998) Livsmedelsmikrobiologi - Hållbarhet, Mjölksyrabakterier & kontroll, 166-169. ISBN 91-7970-588-X.
- [2] Medipharm AB. Technical data of Enzobact™, 1-7. [www.medipharm.se](http://www.medipharm.se)
- [3] Ardö, Y., Spinner Madsen, J., och Tähtinen, H. (2003). Improvement of texture in low fat cheese by accelerated degradation of peptides to free amino acids. *Mælkeritidene*, 19, 444-448.
- [4] Kenny, O., FitzGerald, R.J., O’Cuinn, G., Beresford, T., och Jordan, K. (2003). Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 13, 509-516.
- [5] Engels, W. (1997). Volatile and non-volatile compounds in riped cheese: their formation and their contribute to flavour, 1-5.  
<http://libary.wur.nl/wda/abstract/ab2363.html>
- [6] Williams, A.G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., Banks, J.M. (2002). Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Internationa Dairy Journal*, 12, 841-852.
- [7] Amarita, F., Requena, T., Taborda, G., Amigo, L., Pelaez, C. (2001). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. *Journal of applied microbiology*, 971-978.
- [8] Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C. (1996). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and environmental microbiology*, 414-419.
- [9] <http://www.ajinomoto.com/amino/index.html>
- [10] Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Van Hylckma Vlieg, J., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., Siezen, R.J. (2001). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International dairy journal*, 111-121.

- [11] Garrett, R.H., Grisham, C.M. (1995) *Biochemistry*. Second edition. ISBN 0-03-022318-0., 428, 430-432, 434-435, 442-443, 449, 452-453, 594, 866-887.
- [12] Hansen, B.V., Houlberg, U., Ardö, Y. (2001) Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International dairy journal*, 225-233.
- [13] Kronkvist, J. (2001). Lysozymbehandling av Enzobact<sup>®</sup> för bestämning av aminopeptidolytisk aktivitet, 1-2.
- [14] Tcherkas, Y.V., Kartsova, L.A., Krasnova, I.N. (2001). Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 303-308.
- [15] Harris, D. C. (2003). *Quantitative Chemical Analysis*. Sixth edition. ISBN 0-7167-4464-3., 5, 85, 553-555, 557, 566, 608, 626-627, 732, 716.
- [16] Tykesson, E., Medipharm. Analys av LNA/PNA aktivitet i Enzobact.
- [17] Vedel Thage, B., Rattray, F.P., Woon Laustsen, M., Ardö, Y., Barkholt, V., och Houlberg, U. (2003). Purification and characterization of a branched-Chain amino acid aminotransferase from *Lactobacillus paracasi* subsp. *Paracasei* CHCC 2115.