



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 30 stp
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM)

***Pseudomonas* isolert fra rå melk: Vekst og proteolytisk aktivitet i UHT-melk ved ulike temperaturer**

Pseudomonas isolated from raw milk:
Growth and proteolytic activity in UHT-milk at
different temperatures

Oda Nilsen Bækkelund
Matvitenskap – Matvaretrygghet, -kvalitet og -hygiene

Forord

Denne oppgaven ble utført som et avsluttende arbeid innen masterstudiet Matvitenskap – retning Matvaretrygghet, -kvalitet og -hygiene - ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Masteroppgaven utgjorde 30 av 120 studiepoeng og ble utført i tidsrommet november 2015 til juni 2016 ved IKBM.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til hovedveileder professor Judith Narvhus og medveileder førsteamanuensis Hilde Marit Østlie. Deres gode veiledning og brennende engasjement har gjort denne oppgaven ekstra spennende å jobbe med. Ikke minst vil jeg takke Ellen Marie Tidemann for et veldig godt samarbeid og hyggelige stunder på laboratoriet.

I tillegg vil jeg benytte anledningen til å takke de gode hjelperne på laboratoriet for deres dyrebare hjelp og engasjement; avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani, overingeniør Kari Olsen, ingeniør May Helene Aalborg, ingeniør Bjørg Holter og øvrige. Deres gode humør gjorde de lange dagene med laboratoriearbeid lystige. En takk til TINE for økonomisk støtte.

Avslutningsvis vil jeg takke alle venner og medstudenter for fem lærerike og flotte år ved NMBU.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, juni 2016

Oda Nilsen Bækkelund

Sammendrag

Rå melk vil, på grunn av sin næringsrike sammensetning, gunstige pH og høye vannaktivitet, forringes raskt om den blir stående ute i romtemperatur, men også ved kjølelagring over tid vil den forringes på grunn av psykrotrofe bakterier. Psykrotrofe bakterier er ikke i seg selv et problem, da de elimineres ved pasteurisering eller UHT-behandling. Deres ekstracellulære proteinaser er derimot varmemestabile og kan opprettholde deler av aktiviteten etter varmebehandling, selv etter UHT-behandling av melk. I langtidsholdbar UHT-behandlet melk kan selv små mengder proteinaser føre til blant annet smaksdefekter og endringer i fysiokjemiske egenskaper over tid, spesielt under lagring ved romtemperatur.

I denne studien ble mangfoldet av proteinaseproduserende *Pseudomonas* stammer med forekomst i rå melk studert ved inokulering i UHT-behandlet melk ved ulike temperaturer. Det ble funnet stor spredning i grad av proteolytisk aktivitet, der stamme og temperatur var av betydning for observerte forskjeller. Inokulert UHT-melk ved 4 °C viste ikke proteolytisk nedbrytning i kapillærelektroferogram før etter 9 dagers lagring, mens det ved 8 °C ble observert noe nedbrytning av β -kasein A2 etter kun 4 dager. Funnene understreker viktigheten av å opprettholde en ubrutt kjølekjede i hele behandlingsleddet av melk, spesielt i den initielle behandlingen av rå melk på gården før prosessering ved meieriet. Ved optimal lagringstemperatur (4 °C) over 4 dager så ikke proteolytisk aktivitet ut til å være et problem ved inokulering i UHT-melk, noe som kan indikere det samme ved overføring til rå melk. Flere faktorer kan likevel føre til fluktuering og heving i temperatur og derved signifikante forskjeller i bakterievekst under suboptimale forhold, noe som kan øke sjansen for produksjon av varmemestabile proteinaser.

En bedre taksonomisk ramme er nødvendig i forbindelse med karakterisering og identifisering av kvalitetsforringere i melk, da fenotypisk karakterisering av mange proteolytiske isolat har ført til en delvis feilidentifikasjon av *Pseudomonas* spp.. Det er i tillegg behov for mer forskning med en eksperimentell tilnærming som etterligner biofilmer funnet i meieriprosesseringsmiljøet, for å bedre relatere funn til meieriindustrien i praksis.

Abstract

Raw milk will, because of its nutritious composition, favorable pH and high water activity, spoil rapidly if left at room temperature, but will also spoil over time when cold stored due to psychrotrophic bacteria. Psychrotrophic bacteria are not in themselves a problem as they are eliminated during pasteurization or UHT-treatment. Their extracellular proteinases are, however, heat stable and can maintain part of their activity after heat treatment, even after UHT-treatment of milk. In shelf-stable UHT-treated milk, even small amounts of proteinases may lead to off-flavors and alter physiochemical properties over time, especially when stored at ambient temperatures.

The main objective of this study was to investigate the diversity amongst proteinase producing *Pseudomonas* strains present in raw milk by inoculation in UHT-treated milk at different temperatures. A widespread ability in proteolytic activity was found, where strain and temperature were of significance for the observed differences. UHT-milk incubated at 4 °C did not show proteolytic degradation in the capillary electropherograms until 9 days of storage, while some degradation of β -casein A2 was seen after only 4 days at 8 °C. These findings underline the importance of maintaining a continuous cold chain throughout the processing of milk, especially in the initial treatment of raw milk at the farm before processing at the dairy. Because there was no indication of proteolytic activity in the UHT-milk when stored optimally at 4 °C over a period of 4 days, the same may be indicated for raw milk. Several factors may still lead to fluctuation in temperature and significant differences in bacterial growth under suboptimal conditions, which may increase the risks of production of heat stable proteinases.

A better taxonomic frame needs to be established in terms of milk spoilage characterisation and identification due to misidentification of many proteolytic isolates of *Pseudomonas* spp. in earlier studies using phenotypic characterisation. Future studies will undoubtedly benefit from an experimental approach that mimic biofilms found in dairy processing environments, to better relate findings to the dairy industry.

Innhold

| | |
|---|-----|
| Forord | I |
| Sammendrag | III |
| Abstract | V |
| Innhold | VII |
| 1 INNLEDNING | 1 |
| 1.1 Melkens sammensetning..... | 1 |
| 1.2 Melk som substrat for mikroorganismer | 2 |
| 1.3 Psykrotrofe bakterier | 3 |
| 1.3.1 Biofilm | 4 |
| 1.4 <i>Pseudomonas</i> | 5 |
| 1.4.1 Identifisering av <i>Pseudomonas</i> | 6 |
| 1.5 Kontamineringskilder | 6 |
| 1.6 Hydrolytiske enzymer..... | 7 |
| 1.6.1 Enzymaktivitet og lavtemperatur-inaktivering (LTI)..... | 8 |
| 1.6.2 Enzymregulering og -produksjon..... | 9 |
| 1.6.3 Fysiske og biokjemiske effekter på melken | 10 |
| 1.6.4 Kvalitetsaspekter | 11 |
| 1.6.5 Analyse av proteolytisk aktivitet i melk..... | 11 |
| 1.7 Hensikt..... | 14 |
| 2 MATERIALER OG METODER | 15 |
| 2.1 Isolering av psykrotrofe bakterier fra rå melk | 15 |
| 2.1.1 Bakterieisolering | 15 |
| 2.1.2 Analyse av proteolytisk aktivitet (diffusjonsanalyse) | 15 |
| 2.1.3 Rendyrking og nedfrysning av renkultur | 16 |
| 2.2 Fenotypisk karakterisering | 16 |
| 2.3 Genotypisk karakterisering: 16S rDNA-sekvensering | 17 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.3.1 | DNA-ekstrahering | 17 |
| 2.3.2 | 16S rDNA-amplifisering | 17 |
| 2.3.3 | Rensing av PCR-produkt og sekvensering | 20 |
| 2.4 | Enzymaktivitet | 21 |
| 2.4.1 | API ZYM | 21 |
| 2.4.2 | Diffusjonsanalyse ved ulike inkuberingstemperaturer | 21 |
| 2.5 | Vekstforsøk | 22 |
| 2.5.1 | Nedfrysning av podemateriale | 22 |
| 2.5.2 | Poding for vekstforsøk | 23 |
| 2.5.3 | Uttak for vekstforsøk | 24 |
| 2.6 | Kjemiske analyser | 25 |
| 2.6.1 | Kvantifisering av frie aminosyrer ved bruk av HPLC | 25 |
| 2.6.2 | Kapillærelektroforese av peptid- og proteinnedbrytning | 27 |
| 3 | RESULTATER | 29 |
| 3.1 | Innledende forsøk | 29 |
| 3.1.1 | Diffusjonsanalyse ved 22 °C | 29 |
| 3.1.2 | Fenotypisk karakterisering | 31 |
| 3.1.3 | Genotypisk karakterisering | 31 |
| 3.1.4 | Enzymaktivitet | 34 |
| 3.2 | Vekstforsøk med <i>Pseudomonas</i> i melk | 39 |
| 3.3 | Kjemiske analyser | 42 |
| 3.3.1 | Kvantifisering av frie aminosyrer ved bruk av HPLC | 42 |
| 3.3.2 | Kapillærelektroforese av peptid- og proteinnedbrytning | 60 |
| 4 | DISKUSJON | 73 |
| 4.1 | Innledende forsøk på isolater fra rå melk | 73 |
| 4.2 | Vekstforsøk med <i>Pseudomonas</i> i melk | 76 |
| 4.3 | Frie aminosyrer og protein- og peptidnedbrytning | 80 |

| | | |
|-----|-----------------------------------|----|
| 4.4 | Sammenfatning av resultater | 84 |
| 4.5 | Avslutning og konklusjon..... | 86 |
| 4.6 | Videre arbeid | 87 |
| 5 | Kilder..... | i |

Vedlegg på USB: totalt 5 stk.

1. Contig-0 sekvenser 16S rDNA-sekvensering
2. Diffusjonsanalyse ved ulike inkuberingstemperaturer
3. Rådata for vekstforsøk
4. HPLC; rådata fra kvantifisering av frie aminosyrer
5. CE; kapillærelektroferogram av peptid- og proteinnedbrytning delforsøk 3

1 INNLEDNING

1.1 Melkens sammensetning

Melk er definert som sekretet fra melkekjertler hos pattedyr og har som funksjon å være næringsgivende for avkommet. Melk er av den grunn meget næringsrik, også for mennesker, på grunn av sin komplekse sammensetning. En oversikt over de viktigste bestanddelene i melk er oppført i **Tabell 1.1** (Walstra et al. 2006e).

Tabell 1.1: Omtrentlig sammensetning av melk (Walstra et al. 2006e).

| Komponent | Gjennomsnittsinhold i melk (% w/w) | Variasjon (% w/w) | Gjennomsnittlig innhold i tørrstoff (% w/w) |
|---------------------|------------------------------------|-------------------|---|
| Vann | 87,1 | 85,3-88,7 | - |
| Fettfritt tørrstoff | 8,9 | 7,9-10,0 | - |
| Fett i tørrstoff | 31 | 22-38 | - |
| Laktose | 4,6 | 3,8-5,3 | 36 |
| Fett | 4,0 | 2,5-5,5 | 31 |
| Protein | 3,3 | 2,3-4,4 | 25 |
| kasein | 2,6 | 1,7-3,5 | 20 |
| Mineralsubstanser | 0,7 | 0,57-0,83 | 5,4 |
| Organiske syrer | 0,17 | 0,12-0,21 | 1,3 |
| Diverse | 0,15 | - | 1,2 |

Proteinene i melk deles inn i kasein- og myseproteiner, der kasein utgjør ~75-80 % av totalprotein i melk. Proteinfraksjonen i kumelk består hovedsakelig (± 90 %, w/w) av seks proteiner, kjent som α -laktalbumin (α -LA), β -laktoglobulin (β -LG) (begge myseproteiner) og α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein. Av disse utgjør kaseinproteinene fire genprodukter; α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein i ratioen 3:1:3:1. Typiske konsentrasjoner av α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein er 12-15, 3-4, 9-11 og 2-4 g/L, respektivt. I tillegg til de fire hovedproteinene av kasein har det blitt identifisert kaseinfraksjoner fra enzymaktivitet, f.eks. γ - og λ -kaseiner, som stammer fra hydrolysering av henholdsvis β - og κ -kasein av den endogene melkeproteinase plasmin. De

fire kaseinproteinene kan i tillegg variere i grad av fosforylering ved posttranslasjonelle modifikasjoner, men for hvert av proteinene er det et referanseprotein (Heck et al. 2008; Sweeney & Fox 2013).

Egenskapene til kasein skiller seg fra de fleste andre proteiner ved å være for det meste hydrofobe og ha høy ladning. Kasein er tilstede i melk i store aggregater kalt kaseinmiceller sammen med kolloidalt kalsiumfosfat. Den høye ladningen er nødvendig for å holde kaseinmicellene i løsning og er delvis forårsaket av fosfatgrupper, men også av glykosylering av κ -kasein. Kjernen av micellene er sammensatt av omtrent lik mengde α - og β -kasein og veldig lite κ -kasein, mens det ytre laget ser ut til å inneholde om lag like mengder κ - og α -kasein, med veldig lite β -kasein (Walstra et al. 2006d).

Kasein er, i motsetning til myseproteinene, ikke globulære, men utstrakte. Mangelen på kaseinets sekundære struktur skyldes blant annet mangel på cystein, da de har svært få svovelbroer som binder strukturen sammen. Aminosyrene serin og prolin gjør at proteinene assosierer med hverandre, ved at serin binder kalsiumfosfat og prolin fungerer som en helixbryter. Disse faktorene gir kasein dets utstrakte natur og fører til at de ikke er denaturerbare. Kasein presipiterer fra melk ved pH 4,6, da isoelektrisk punkt (pI) for de fleste kaseinproteiner ligger på rundt pH 4,6 (McKellar 1989c; Sweeney & Fox 2013; Walstra et al. 2006c; Walstra et al. 2006e).

1.2 Melk som substrat for mikroorganismer

Melk inneholder et bredt spekter av næringsstoffer, inkludert alle vitaminene, som en rekke bakterier trenger for å vokse godt. Av den grunn forringes rå melk raskt om den får stå ute i romtemperatur. Det er likevel flere forhold som kan være ugunstige for vekst av bakterier i melk. Laktose, som hoved-karbohydratkilde i melk, er for mange bakterier ikke egnet som energikilde. Fersk melk inneholder lite frie aminosyrer, som noen bakterier kan være avhengig av som nitrogenkilde. Sistnevnte type bakterier vil typisk begynne å vokse etter at andre bakterier har begynt å hydrolysere proteiner i melken. Melk har i tillegg et høyt O_2 -trykk og redokspotensial, som hindrer strengt anaerobe bakterier fra å vokse. Ionestyrke og vannaktivitet er sjelden begrensende for vekst av bakterier, og pH kun begrensende for et fåtall (Walstra et al. 2006c).

Melk inneholder naturlige inhibitorer, der en viktig klasse blant disse er immunoglobulinene. Immunoglobulinene består av antistoffer mot spesifikke antigener, ofte bakterier, slik at disse som regel er spesifikke for bakterier kuer kan bli utsatt for. En annen viktig, ikke spesifikk inhibitor i melk, er laktoperoksidase-tiocyanat-H₂O₂-systemet (Walstra et al. 2006c).

1.3 Psykrotrofe bakterier

Innføringen av kjølelagring rundt midten av 1900-tallet førte til at sammensetningen i mikrofloraen i rå melk endret seg. Kjølelagring ved 2-6 °C endret den tidligere Gram-positive mesofile bakteriefloraen mot å selektere for Gram-negative og Gram-positive psykrotrofe bakterier. Siden da har uønsket syrning av melk nesten opphørt, noe som tidligere medførte store problemer på grunn av mesofile melkesyrebakterier (Samaržija et al. 2012).

Psykrotrofe bakterier er ikke en spesifikk taksonomisk gruppe av mikroorganismer, men defineres som en gruppe ulike bakterieslekter med evne til å vokse ved 7 °C eller lavere, uavhengig av optimumstemperatur (20-30 °C) for vekst. De er vidt forekommende i naturen, hovedsakelig i vann, jord og vegetasjon, i tillegg til et fåtall tilstede i luft. Psykrotrofe bakterier tilhører pseudomonader og er Gram-negative staver (Samaržija et al. 2012; Walstra et al. 2006c).

Selv om psykrotrofe bakterier vokser lett og trives ved lave temperaturer (≤ 7 °C) ligger optimumstemperaturen ofte mye høyere, mellom 20 og 30 °C. Her skiller de seg fra «ekte» eller obligat psykrofile bakterier, en betegnelse på bakterier med et lavt vekstoptimum (12-15 °C), men som ikke vil vokse over 20 °C. Psykrofile bakterier er avgrenset hovedsakelig til polare regioner og marine miljø, på grunn av sensitiviteten mot relativt moderate temperaturer. Psykrotrofe bakterier (også kalt fakultativt psykrofile) kan altså vokse ned til samme lave temperaturområde som obligat psykrofile, men har høyere optimums- og maksimumstemperaturer for vekst. Toleransen for et bredere temperaturområde betyr at psykrotrofe bakterier finnes i et mangfoldig spekter av habitat og er derav av større betydning for forringelse av kjølelagret mat (Adams & Moss 2008).

Psykrotrofe bakteriers evne til å vokse ved lave temperaturer skyldes en økt andel av flerumettede og kortkjedete fettsyrer i cellemembranens lipider, som opprettholder tilstrekkelig membranfluiditet og funksjonalitet og sikrer transport av metabolitter nødvendig for vekst og reproduksjon ved lave temperaturer. Psykrotrofe bakteriers utbredelse i naturen

indikerer en bemerkelsesverdig tilpasningsdyktighet (Adams & Moss 2008; Chen et al. 2003; Samaržija et al. 2012).

Psykrotrofe bakterier isolert fra kjølelageret melk tilhører både Gram-negative og Gram-positive slekter og klassifiseres taksonomisk i syv ulike klasser. De dominerende klassene, *Gammaprotobacteria*, *Bacilli* og *Actinobacteria*, inneholder mellom 19 og 21 slekter, mens *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteria* og *Sphingobacteria* er de fire mindre viktige klassene. Av Gram-negative psykrotrofe slekter nevnes *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* og *Flavobacterium* som de oftest isolerte dyrkbare slektene fra rå melk, med hovedvekt på *Pseudomonas* (Samaržija et al. 2012).

Flesteparten av psykrotrofe bakterier har evnen til å produsere hydrolytiske termostabile enzymer som bryter ned ulike bestanddeler i melk. Fra et kvalitetsmessig og økonomisk perspektiv er det proteinaser, lipaser og fosfolipaser dannet av slektene *Pseudomonas* spp. og *Bacillus* spp. som er av betydning og som bryter ned henholdsvis proteiner, fett og lecitin. De termostabile ekstracellulære proteinasene av betydning for nedbrytning av protein vil utdypes senere i teoridelen (Samaržija et al. 2012).

1.3.1 Biofilm

Omtrent alle slekter av psykrotrofe bakterier har evnen til å adhere til faste overflater slik at de kan danne biofilm på innsiden av meieriutstyr. Biofilm er bakterielle samfunn som kan forankres til alle overflater i industrien, som rustfritt stål, gulv, belter eller gummipakninger. Bakteriesamfunnene i biofilmer omgis av en matriks av selvprodusert polymer substans kalt EPS (Ekstracellulær Polymer Substans) bestående av en blanding av nukleinsyrer, polysakkarider, lipider og proteiner dannet under bakterievekst. I naturen kan biofilmer bestå av én enkelt art, men vanligvis består de av en blanding av ulike arter. Dannelsen av biofilm øker motstandsdyktigheten mot temperatursvingninger, som pasteurisering, og vaske- og desinfeksjonsmidler brukt i industrien. Bakteriell forankring på overflater ser ut til å foregå i ulike steg, som bakteriell adhesjon, bakteriell vekst og biofilm ekspansjon. Når en biofilm blir stor nok vil enkeltceller kunne lekke ut og føre til en vedvarende kilde til kontaminering av psykrotrofe bakterier i melk (Marchand et al. 2012; Oliveira et al. 2015; Samaržija et al. 2012).

Hoveddelen av studier basert på psykrotrofe bakterier i melk har fokusert på individuelle isolater voksende som frittflytende kulturer. Det er likevel en økende erkjennelse at en slik tilnærming overser potensielle interaksjoner og kommunikasjon mellom ulike arter av psykrotrofe bakterier (også av ikke-kultiverbare bakterier) i biofilmer som utvikler seg under melkelagring og i produksjonsmiljøet. Dette kan påvirke kvaliteten og tryggheten til melken (Oliveira et al. 2015).

1.4 *Pseudomonas*

Slekten *Pseudomonas* omfatter en heterogen gruppe av mikroorganismer innen familien Pseudomonadaceae. Gruppen består av Gram negative, aerobe, ikke-fermentative, katalase og oksidase positive, mesofile og psykrotolerante, ikke sporedannende, bevegelige staver med én eller flere flageller. Bevegeligheten, på grunn av flageller, gjør at slekten har en svært «spredende» vekst ved dyrking. Som psykrotrofe bakterier er *Pseudomonas* allestedsnærværende og har på grunn av sin tilpasningsdyktighet tilpasset seg til en lang rekke nisjer, som jord, vann, planter, animalsk vev og mat, mye takket være komplekse enzymatiske systemer (Caldera et al. 2016).

Ved påvisning i fersk tappet rå melk utgjør vanligvis ikke *Pseudomonas* mer enn 10 % av mikrofloraen. *Pseudomonas*, med hovedvekt av *Pseudomonas fluorescens*, er likevel den viktigste av de psykrotrofe bakteriene som dominerer mikrofloraen i rå og pasteurisert melk i det kvalitetsforringelsen skjer, ifølge Sørhaug og Stepaniak (1997). Lafarge et al. (2004) fant ut at den psykrotrofe floraen blir den dominerende i melk innen 24 timer ved 4 °C, uavhengig av initielt kontamineringsnivå. Viktigheten av *Pseudomonas* i rå melk har blitt eksemplifisert i to studier av Adams et al. (1975) og Craven og Macauley (1992), som viste at henholdsvis 70-90 % og 87 % av psykrotrofe bakterier isolert fra rå melk ved 4 °C etter lagring utgjorde *Pseudomonas*. Sammenlignet med andre psykrotrofe bakterier, karakteriseres *Pseudomonas* av en kort generasjonstid (< 4 timer) ved kjølelagring. Dette betyr i praksis at kontaminering av én enkelt celle kan føre til mengder på 10^6 CFU ml⁻¹ *Pseudomonas* i melk etter åtte dagers lagring ved 4 °C (der CFU = «Colony Forming Units»/kolonidannende enheter). En slik rask generasjonstid setter rekontaminering av varmebehandlet melk i et viktig lys (Samaržija et al. 2012).

1.4.1 Identifisering av *Pseudomonas*

For identifisering av *Pseudomonas*, og andre bakterier, brukes ofte 16S rRNA-gensekvensering som taksonomisk metode. Metoden er sammen med DNA-DNA hybridisering standard praksis for bakteriell taksonomi. På grunn av den høyt konserverte naturen hos ribosomale gener er derimot ikke 16S rDNA-sekvensering egnet for differensiering mellom arter innen slekten *Pseudomonas*. Flere studier har vist at bakteriearter av slekten *Pseudomonas* har nær identisk 16S rRNA-gensekvens, slik at metoden mangler oppløsningsevne ved og under artsnivå for denne slekten. Fullstendig sekvensering av bakteriegenomer har gjort det mulig å identifisere polymorfe områder i DNA-sekvensen og dette kan utnyttes til differensiering av ulike bakteriestammer. «Multiple Locus Sequence Analysis» (MLVA) er en slik metode, som analyserer såkalte «housekeeping» gener, som er konstitutive gener som trengs for vedlikehold av grunnleggende celledfunksjoner (Caldera et al. 2016; Martens et al. 2008).

1.5 Kontamineringskilder

Kontaktsmitte utgjør den største kontamineringstrusselen hos alle typer mat, inkludert melk. Dårlig vasket og desinfisert melkeutstyr kan inneholde store mengder bakterier. Ved lave temperaturer har psykrotrofe bakterier en kort lag-periode og en veldig lang stasjonærfase, slik at overlevelsen i for eksempel restmelk kan være svært lang. Restmelk inneholder ofte opp mot 10^9 CFU ml⁻¹ av psykrotrofe bakterier, og ved rekontaminering av kun 1 ml restmelk i 100 l fersk melk vil bakterietallet øke til 10^4 CFU ml⁻¹. Kontaminering av 10^2 - 10^3 CFU ml⁻¹ av psykrotrofe bakterier under melking er derimot vanskelig å unngå. Mengder under 10^5 CFU ml⁻¹ av psykrotrofe bakterier er derimot ikke farlig, men mengder høyere enn $5 \cdot 10^5$ CFU ml⁻¹ opprinnelig i melk kan være uheldig. Dette fordi det kan innebære en risiko for produksjon av varmemestabile enzymer av psykrotrofe bakterier, som kan påvirke kvaliteten til det endelige produktet.

Ifølge «TINEs regelverk om bedømmelse og betaling av leverandørmelk etter kvalitet» (TINE SA 2014b) blir bakterietallet i rå melk analysert som Bactocount-enheter (antall enkeltbakterier/BC per ml). Leveringsstopp av rå melk ved TINEs meierier skjer ved bakterietall $\geq 4 \cdot 10^5$ BC ml⁻¹. I Norge opereres det med en omregningsfaktor på 5 fra bakterietall (BC ml⁻¹) til CFU ml⁻¹, som undersøkt av Amundsen (2015). Det vil si at rå melk

ikke mottas ved meieriet om bakterietallet når eller overskrider $8 \cdot 10^4$ CFU ml⁻¹. Det mikrobielle kriteriet for forringelse ligger derimot ganske mye høyere, ved $3 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹ (Sørhaug & Stepaniak 1997; Walstra et al. 2006c).

Interessant nok inneholder ofte fersk tappet rå melk ikke påvisbare populasjoner av kultiverbare psykrotrofe bakterier. Rett etter melking inneholder hygienisk tappet rå melk under $5 \cdot 10^3$ CFU ml⁻¹. Mikrofloraen domineres på dette tidspunktet hovedsakelig av slektene *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus* og *Corynebacterium*. Psykrotrofe bakterier er ikke en del av den naturlige mikrobielle populasjonen i eller på juret. Tilstedeværelsen av psykrotrofe bakterier i rå melk er derfor utelukkende et resultat av kontaminering etter melking. De vanligste oppgitte kildene for kontaminering av Gram-negative psykrotrofe bakterier er restvann i melkemasiner, melkerørverk eller kjølere, skitne jur og spener, utilstrekkelig rensed melkeutstyr for mottak av melk, transport og lagring av melk og dannelse av biofilm. Om kyrene ikke har mastitt (da kan nivåer komme opp i flere millioner bakterier ml⁻¹ i rå melk) vil melkeanlegget bidra med størst kontamineringsgrad (Oliveira et al. 2015; Samaržija et al. 2012; Walstra et al. 2006c).

Sørhaug og Stepaniak (1997) beskriver at den mest ødeleggende faktoren for holdbarhet av melk pasteurisert ved 72 °C i 15 sekunder, lagret ved 4 - 7 °C, er vekst og metabolsk aktivitet av *Pseudomonas* som stammer fra rekontaminering etter varmebehandling. Dette fenomenet kalles på engelsk «Post Pasteurization Contamination» (PPC). Selv om pasteurisering dreper nesten alle termolabile psykrotrofe bakterier, vil PPC av *Pseudomonas* med 0,001-1 CFU ml⁻¹ alltid skje i praksis, selv om alle hygienekrav følges. Rekontaminering av *Pseudomonas* er i tillegg mer ødeleggende for holdbarheten til pasteurisert melk ved 4-8 °C enn den termodure mikrofloraen som overlever pasteurisering (med nivåer rundt ~1000 CFU ml⁻¹). Derfor korrelerer nivået av rekontaminering etter pasteurisering mye bedre med holdbarheten enn totalt antall bakterier i nylig pasteurisert melk (Chen et al. 2003; Sørhaug & Stepaniak 1997).

1.6 Hydrolytiske enzymer

Kvaliteten til melkeprodukter kan påvirkes av varmeresistente ekstracellulære enzymer utskilt av psykrotrofe bakterier i rå melk før varmebehandling, eller av enzymer og andre metabolitter produsert av psykrotrofe bakterier som vokser i kjølelageret melk etter varmebehandling. Vekst av psykrotrofe bakterier i melk er ikke i seg selv et stort problem for

kvalitet, da de fleste er varmesensitive Gram-negative staver som drepes under pasteurisering. Enzymene de produserer kan derimot være varmeresistente og i stand til å degradere viktige melkekomponenter som proteiner (Sørhaug & Stepaniak 1997).

Proteinaser produsert av *Pseudomonas* er hovedsakelig metalloenzymer med en molekylær masse på 40-50 kDa, som inneholder minst ett Zn-atom og opptil 16 Ca-atomer i den molekylære strukturen. Noen stammer av *Pseudomonas* kan produsere opptil to eller tre immunologisk ulike proteinaser, men bare én lipase. Noen stammer har også evnen til å produsere alle tre typer av hydrolytiske enzymer samtidig (proteinase, lipase og fosfolipase), mens andre produserer kun lipaser og proteinaser (Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997).

1.6.1 Enzymaktivitet og lavtemperatur-inaktivering (LTI)

I varmebehandlet melk klarer hydrolytiske enzymer å beholde store deler av aktiviteten, da flesteparten av proteinasene er ekstremt varmestabile og delvis renaturerer etter varmebehandling. Noen er til og med stabile etter varmebehandling av melk ved 100 °C i 30 minutter. Etter pasteurisering (72 °C i 15 sekunder) ligger den opprinnelige enzymaktiviteten på rundt 60-70 %, mens den i sterilisert melk (f.eks. 145 °C i 1-2 sekunder) ligger på rundt 30-40 %. Temperaturoptimum for termostabile proteinaser er 30-45 °C, og de har en lav aktiveringsenergi, slik at de er mer aktive ved 4-7 °C enn enzymer fra f.eks. mesofile mikroorganismer (Samaržija et al. 2012).

Til tross for den eksepsjonelle varmestabiliteten enzymene viser, er det et interessant faktum at de fleste proteinaser er mer ustabile ved temperaturer omkring 55-60 °C enn varmebehandling over 100 °C. Dette fenomenet kalles lavtemperaturinstabilitet. Tap av aktivitet ved 55-60 °C ser ut til å være et resultat av dannelsen av enzym-kasein aggregater og ikke av autoproteolyse, som lett skjer i fravær av melkeproteiner. Tilstedeværelsen av store mengder melkeproteiner ser altså ut til å forhindre autolyse av proteinasene. Ca-ioner kan også stabilisere proteinaser mot både termisk denaturering og autolyse. Mange studier har forsøkt å belyse mekanismene ved LTI på proteinaser ved å utnytte dette fenomenet for å redusere enzymaktiviteten. En kombinert UHT- og lavtemperaturbehandling av melk har blitt foreslått av Bucky et al. (1988). I nevnt studie ble melken først UHT-behandlet ved 140 °C i 5 sekunder, for deretter å bli kjølt ned og holdt ved 60 °C i 5 minutter. Denne kombinerte

varmebehandlingen begrenset effektivt både lipase- og proteinaseaktiviteten i rå melk med opptil 10 ganger bedre effekt sammenlignet med UHT-behandling alene.

Dobbeltbehandlingen økte holdbarheten av UHT-behandlet melk produsert fra lav-kvalitetsmelk med bakterietall på 10^6 CFU ml⁻¹ fra 3 til 8 uker, med proteolyse som mål på kvalitet. Andre studier igjen har ikke funnet samme økning i holdbarhet ved bruk av LTI, slik at mer forskning trengs for å belyse dette fenomenet (Bucky et al. 1988; Chen et al. 2003; Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997).

1.6.2 Enzymregulering og -produksjon

Mange faktorer med innflytelse på produksjonen av ekstracellulære enzymer av psykrotrofe bakterier har blitt studert. Det ser ut til at proteinaseproduksjon hos *P. fluorescens* reguleres av nærings-, luft-, og temperaturmessige faktorer, som ser ut til å variere ved typen stamme studert. Mange av faktorene ser i tillegg ut til å interagere, slik at faktorene hver for seg har en uklar rolle i kontrollen av syntese. Tilgjengelige bevis peker trolig i retning av en reduksjon i energinivåer som viktigste faktor for syntese. I det energinivåer synker som følge av begrensning i næringstilgang, økt celletetthet, eller jern- eller oksygenreduksjon, øker syntesen av ekstracellulære enzymer. Det er enda ikke helt klart hvilke mekanismer som er involvert i denne reguleringen (McKellar 1989d).

Ekstracellulær enzymproduksjon kan variere over et stort temperaturområde. De fleste studier er enige om at betydelig enzymsyntese foregår ved temperaturer noe lavere (20-25 °C) enn optimumstemperatur for vekst av bakteriene (20-30 °C). I en studie beskrevet av McKellar (1989d) var produksjonen av proteinase av *P. fluorescens* ved 5 °C 55 % av aktiviteten funnet ved 20 °C. En annen studie beskrevet av samme forfatter rapporterte lik proteinaseaktivitet per vekstenhet ved 5 °C og 20 °C (McKellar 1989d).

Det hersker uenighet omkring hvilken del av vekstfasen det forekommer størst enzymproduksjon hos *Pseudomonas*. Ekstracellulær proteinaseaktivitet ser ut til å forekomme i kulturer som har nådd 10^8 CFU ml⁻¹, beskriver McKellar (1989d). Rowe & Gilmour fant i 1982 (ifølge Dunstall et al. (2005)) at proteinaseproduksjon fant sted i kulturer som hadde nådd $>10^6$ CFU ml⁻¹. For øvrig ser det ut til at produksjonen av proteinaser har sammenheng med høy celletetthet som typisk oppstår sent i log- og tidlig stasjonær fase (Dunstall et al. 2005; McKellar 1989d).

1.6.3 Fysiske og biokjemiske effekter på melken

Degradering av melkeproteiner av psykrotrofe proteinaser kan føre til koagulering av melk, utvikling av vond smak, dårlig osteutbytte og kortere holdbarhet på meieriprodukter. Ved koagulering av melk grunnet enzymaktivitet er det hovedsakelig tre ting som skjer: proteolyse av enzymer, aggregering av kolloidale partikler og gelering. Det proteinaser fra psykrotrofe bakterier gjør, helt enkelt, er å destabilisere kaseinmicellene gjennom hydrolyse, og resultatet er dannelse av en gelstruktur eller koagulering av varmebehandlet melk under lagring.

Geldannelsen som foregår i UHT-behandlet melk starter med en interaksjon mellom myseproteiner (spesielt β -laktoglobulin) og kasein (hovedsakelig κ -kasein) under varmebehandlingen. β -laktoglobulin- κ -kasein-komplekset ($\beta\kappa$ -kompleks) hydrolyseres så av bakterielle proteinaser og danner et nettverk, sammen med andre proteiner, til en gel. Melken får en vond smak, beskrevet som bitter, fremmed, uren, fruktig, gjæraktig eller metallisk. Kasein er veldig utsatt for proteolyse av enten endogene proteinaser i melk eller mikrobielle proteinaser, da de mangler sekundær og tertiær struktur. Det er generelt akseptert at myseproteiner ikke degraderes i særlig grad av proteinaser (Samaržija et al. 2012).

κ -kasein dekker overflaten av micellen, da den er mest hydrofil av kaseinene. κ -kasein er også mer tilgjengelig for proteolyse i micellen enn både den løselige og dissosierte formen. α_{S1} - og β -kasein er derimot ikke degraderbar inne i micellen, men kan være det dersom kolloidalt kalsiumfosfat fjernes. Når β -kasein dissosierer fra micellen er den mottagelig for proteolyse. Mange studier tyder på at det er fortrinnsvis κ -kasein som hydrolyseres av psykrotrofe proteinaser, i og med at proteinet finnes for det meste på overflaten av micellen, og at nedbrytning av β -kasein følger, etterfulgt av α_S -kaseinene. Andre studier, av blant annet Gebre-Egziabher et al. (1980), har funnet at β - og κ -kasein er mer utsatt for proteolyse enn α_S -kaseinene (Chen et al. 2003; McKellar 1989c).

Det er tilstrekkelig kasein tilstede i løselig form for degradering av proteinaser. Melk som holdes ved 35 °C har omtrent 15 % av kaseinproteinene i løselig form. Ved kjøling til 4 °C dissosierer kaseinmicellen og mengden løselig kasein øker til 30 %. β -kasein dissosierer i stor grad ved lave temperaturer. På den måten vil kjølelagring av melk kunne gjøre ulike kaseinfraksjoner i melken, spesielt β -kasein, mer utsatt for proteolyse, så sant enzymene er aktive i dette temperaturområdet (McKellar 1989c).

1.6.4 Kvalitetsaspekter

I de fleste land produseres det meste av meieriprodukter fra kjølelagret rå melk som varmebehandles etter kjølelagring, og det er derfor få referanser til kommersielle produkter produsert direkte fra fersk melk uten kjølelagring. Dette er en konsekvens av stadig sjeldnere henting av melk hos bøndene og lengre lagringsperioder for melk både hos bonden og på meieriet. På gården kan melken lagres i tanker i både 2 og 3 dager før henting, og en lagringstemperatur mellom 4 og 6 °C er ikke uvanlig. Temperaturen kan fluktuere, spesielt ved melking når varm melk slipper inn i tanken, og ved transport til meieriet i store isolerte tankbiler uten kjøling. I Norge og mange andre land har sentraliseringen og færre meierier ført til større kjøreavstander ved frakt av melk fra gård til meieri. Lengre transportavstander kan føre til at melken blir utsatt for forhøyet temperatur over lengre tid, da melken kun mottas ved meieriet om den er under 10 °C ved levering. Lagring av rå melk i 24 timer eller lenger ved meieriet etter mottak før varmebehandling er heller ikke uvanlig, spesielt i forbindelse med helg (McKellar 1989b; Sørhaug & Stepaniak 1997; Walstra et al. 2006a).

Holdbarheten til varmebehandlet melk er hovedsakelig begrenset av proteolytisk eller lipolytisk enzymaktivitet eller av begge, selv om endogene melkeproteinaser, som lipase, og fysiokjemiske forandringer også kan påvirke den i mindre grad over tid. Optimumsparametere for enzymaktivitet er kjent og rapportert i litteraturen, men siden små mengder enzymer kan virke i lang tid under suboptimale forhold, vil minimumsparametere for aktivitet være minst like viktig for kvalitet, om ikke viktigere. Dette gjelder spesielt for langtidsholdbare produkter som UHT-behandlet melk, som lagres over lang tid og kan oppbevares i romtemperatur frem til åpning, ifølge produktbeskrivelsen (McKellar 1989b; Sørhaug & Stepaniak 1997; TINE SA 2014a).

1.6.5 Analyse av proteolytisk aktivitet i melk

Det eksisterer utallige metoder for deteksjon av ikke-spesifikk proteolytisk aktivitet hos psykrotrofe bakterier som *Pseudomonas*, og for alle er det både fordeler og ulemper, slik at det i hvert tilfelle må vurderes hvilke som passer best. Tidligere metoder for deteksjon av proteinaseaktivitet i melk baserte seg på å måle økning i nivåer av peptider inneholdende tyrosin og tryptofan ved bruk av Folin-Ciocalteu reagens. Senere ble det brukt reagenser som fluoresamin, trinitrobensen sulfonsyre (TNBS) og *o*-ftaldialdehyd (OPA) for å detektere forandring i nivåer av α -aminosyrer. I de siste par tiårene har mer sensitive analyser blitt

utviklet, som enzytbundet bioluminescens og fluorimetriske, immunologiske og radiometriske metoder (Chen et al. 2003).

Spektrofotometriske metoder er enkle og raske, men kan ikke påvise de relativt lave nivåene av proteinaser som finnes i melk. Radiometriske og fluorimetriske metoder har begge lignende sensitivitet, men trenger spesialistinstrumentering i tillegg til at radiometriske metoder bruker radioaktive materialer der grundige håndteringsprotokoller må følges. Blant alle metodene har måling av hydrolyse av fluoriserende kasein vist seg å være den mest sensitive metoden for måling av proteinaseaktivitet. Enzytbundet immunosorbent assay (ELISA) er en metode som bruker antistoff og fargeforandring til å detektere stoffer og kan brukes for å detektere forekomst av enzymer som proteinaser. Metoden kan derimot ikke differensiere mellom aktive og inaktive enzymer og vil dermed kunne overestimere det faktiske enzymnivået. Kromatografiske metoder, som «High Performance Liquid Chromatography» (HPLC) og den noe beslektede separasjons- og analysemetoden kapillærelektroforese (CE), benytter begge separasjonsteknikker for å skille stoffer fra hverandre i en kolonne på bakgrunn av forskjeller i stoffenes kjemiske og fysiske egenskaper. Ved HPLC kan det detekteres proteolytiske produkt fra kasein nedbrutt av proteinaser i TCA (trikloreddiksyre). Kun små peptider og aminosyrer er løselige i 12 % TCA, og løseligheten til proteinhydrolysatene avtar med minkende TCA-konsentrasjon. Store løselige proteinsubstrater presipiterer i TCA, slik at presipitatet kan separeres bort ved sentrifugering eller filtrering. I løsningen gjenstår da kun små peptider og aminosyrer som kan analyseres med HPLC (Chen et al. 2003; Datta & Deeth 2003; McKellar 1989a; Sørhaug & Stepianiak 1997; Wibetoe 2009).

Diffusjonsanalyse og API ZYM er noen av de enklere metodene for å studere enzymaktivitet. Diffusjonsanalyse er en kvalitativ metode for måling av enzymaktivitet der bakterier inokuleres på f.eks. skummetmelkagar og det måles klaringssoner rundt bakteriekoloniene som mål på grad av proteolytisk aktivitet. Rask initiell hydrolyse av κ -kasein gir uløselig para- κ -kasein, som produserer en hvit sone av presipitat. Videre hydrolyse resulterer i en indre transparent sone på grunn av proteinløselighet. Fordelen med metoden er at lite utstyr trengs, samt at den er enkel og gir god reproducerbarhet. API ZYM er en semi-kvantitativ mikrometode som brukes for å undersøke enzymaktivitet. Den baserer seg på reaksjoner mellom substrat i brønner og enzymer i prøven og gir svar i form av fargeforandring. Metoden, produsert av bl.a. Biomérieux, baserer seg på deteksjon av 20 enzymer med tilsvarende substrater. Av totalt 20 enzymer detekterer metoden for 5 proteolytiske enzymer

(leucin, valin og cystin arylamidase, trypsin og α -chymotrypsin) i tillegg til sur fosfatase og naftol-AS-BI-fosfohydrolase med korresponderende substrater, som listet opp i **Tabell 1.2** (Biomérieux 2014; McKellar 1989a).

Tabell 1.2: Enzymer med substrat detektert med API ZYM (Biomérieux 2014).

| Enzym analysert for | Substrat |
|---|-------------------------------------|
| Leucin arylamidase | L-leucyl-2-naftylamid |
| Valin arylamidase | L-valyl-2-naftylamid |
| Cystin arylamidase | L-cystyl-2-naftylamid |
| Trypsin | N-benzoyl-DL-arginin-2-naftylamid |
| α-chymotrypsin | N-glutaryl-fenylalanin-2-naftylamid |
| Sur fosfatase | 2-naftylfosfat |
| Naftol-AS-BI-fosfohydrolase | Naftol-AS-BI-fosfat |

1.7 Hensikt

Hensikten med oppgaven var å undersøke proteolytisk aktivitet blant ulike isolater av slekten *Pseudomonas* isolert fra rå kjølelagret melk fra TINE SA og mangfoldet en kan finne blant disse. Det er kjent at *Pseudomonas* stammer kan produsere ekstracellulære enzymer ved kjøleromstemperatur, og det var ønskelig å undersøke om enzymene i tillegg var aktive ved lave temperaturer. Det var derfor av interesse å studere denne slektens ekstracellulære varmestabile enzymer ved ulike lagringstemperaturer. Denne masteroppgaven er en videreføring av en tidligere masteroppgave om proteolytisk aktivitet hos to *Pseudomonas* stammer skrevet ved IKBM, NMBU (Amundsen 2015). Oppgavens nye vikling inkluderte studering av et større utvalg bakteriestammer, over lenger tid, og ved bruk av færre, men mer målrettede, kjemiske analyser enn den foregående masteroppgaven. Det var ønskelig å isolere bakteriestammer fra kommersiell rå melk for å kunne relatere funnene til faktiske forhold i meieriindustrien.

2 MATERIALER OG METODER

Det ble i forsøket benyttet rå melk (ubehandlet) fra TINE meieriet Kalbakken for å dyrke frem ulike psykrotrofe stammer av slekten *Pseudomonas* og undersøke deres proteolytiske aktivitet. Parallelt med forsøk på proteolytisk aktivitet ble det i forbindelse med en annen masteroppgave undersøkt lipolytisk aktivitet av isolater i de samme rå melksprøvene, slik at deler av det praktiske arbeidet foregikk parallelt. Begge masteroppgavene har hatt samme fremgangsmåte og skiltes først etter vekstforsøk ved bruk av ulike kjemiske analyser. Videre i denne masteroppgaven har det blitt fokusert kun på proteolytisk aktivitet. Det skal likevel nevnes at lipolytisk aktivitet har hatt innvirkning på valg av bakteriestammer brukt i forsøket. For videre lesning om lipolytisk aktivitet henvises det til Tidemann (2016).

Denne masteroppgaven var en videreføring av en tidligere masteroppgave om proteolytisk aktivitet ved NMBU av Amundsen (2015). Sammen med stammer isolert fra rå melk i denne oppgaven ble det benyttet en kjent stamme (*P. fluorescens* ATCC 17400) fra den tidligere masteren (stamme B), for å kunne trekke linjer mellom de to oppgavene.

2.1 Isolering av psykrotrofe bakterier fra rå melk

2.1.1 Bakterieisolering

Rå melk ble tatt fra 4 ulike silotanker med steril sprøyte til sterile 50 ml Ola LT-beger (Skala, Oslo, Norge) og lagret ved 4 °C frem til forsøksstart. Fra hver av de fire begrene/silotankene ble det strøket ut uforynnnet prøve med steril podeøse av 7 dager gammel rå melk på *Pseudomonas* CFC-agar («Cephalothin-Sodium Fusidate-Cetrimide Agar», Merck, Darmstadt, Tyskland) tilsatt cetrinide-fucidin-cephalodine supplement (Merck). CFC-agarskålene ble inkubert aerobt ved 22 °C i 3 dager.

2.1.2 Analyse av proteolytisk aktivitet (diffusjonsanalyse)

For å undersøke proteolytisk aktivitet hos bakteriestammer ble det benyttet diffusjonsanalyse med bruk av skummetmelkagar. Skummetmelkagar ble tillaget ved tilsats av 2 % rekonstituert skummetmelk (TINE, Brumunddal, Norge) i «Plate Count Agar» (PCA, Merck) etter metode beskrevet av (DiLiello 1982). Skummetmelkagar-skåler ble tørket i avtrekksskap før bruk, for å unngå spredning av bakterievekst på skålene. Fra de fire CFC-skålene ble 8 enkeltkolonier

plukket fra hver skål med sterile tannpirkere og prikket på skummetmelkeagar-skåler, totalt 32 kolonier, før inkubering ved 22 °C i 24 timer. Etter 24 timers inkubering ble eventuelle klaringssoner målt, som indikasjon på proteolytisk aktivitet. Videre ble de 32 koloniene podet til næringsbuljong («Nutrient broth» (NB), Merck) og inkubert ved 22 °C i 2 døgn. Bakteriene ble nedfrosset ved -80 °C i NB tilsatt 30 % glycerol fortynnet fra konsentrat (85 %, Merck) i sterile kryo-rør (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland).

2.1.3 Rendyrking og nedfrysning av renkultur

Nedfrosset bakterieisolat i kryo-rør ble overført til NB (Merck) før inkubering ved 22 °C i 24 timer. Rendyrkning ble utført ved utstrykning på Brain Heart Infusion agar (BHI, Oxoid, Hampshire, England) og inkubering ved 22 °C i 24 timer. Enkeltkolonier ble deretter plukket fra BHI-skåler og podet over i NB (Merck) før inkubering ved 22 °C i 24 timer og nedfrysning av renkulturer i NB tilsatt 15 % glycerol (Merck). De 32 renkulturene ble oppbevart i kryo-rør (Sarstedt) ved -80 °C.

2.2 Fenotypisk karakterisering

Mikroskopering og konfirmerende tester med hensyn til tilstedeværelse av *Pseudomonas* i de 32 prøvene ble gjort. Samtlige isolat ble testet med 3 % kaliumhydroksid (KOH, Merck) for undersøkelse av Gram-reaksjon og 3 % hydrogenperoksid (H₂O₂) fortynnet fra konsentrat (30 %, Merck) for testing av katalaseaktivitet. Begge testene ga positivt utslag på alle isolater med hensyn til Gram negative bakterier med dannelse av en viskøs blanding med KOH og katalase-positive isolat med dannelse av gass (O₂) med H₂O₂-tilsats. I tillegg ble alle prøver mikroskopert som våtpreparat for å undersøke bakterienes morfologi og et utvalg som Gram-preparater (Gramfarget etter Grams metode) i et Leica DM750 mikroskop for bestemmelse av morfologi og Gram-reaksjon.

2.3 Genotypisk karakterisering: 16S rDNA-sekvensering

For å videre skille og identifisere potensielle *Pseudomonas*-isolat, ble det utført 16S rDNA-sekvensering av alle 32 isolater.

2.3.1 DNA-ekstrahering

Fra NB med renkultur (tatt før nedfrysning) ble det for hvert isolat sentrifugert ned 1 ml i et eppendorfrør ved 13 000 x g i 3 minutter i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Pelleten ble resuspendert i 500 µl sterilt destillert vann og mikset på en minishaker (Gene 2, Scientific Industries, New York, NY), før prøvene ble varmebehandlet på en varmeblokk ved 95 °C i 15 minutter. Til slutt ble rørene sentrifugert ved maksimum hastighet (16 000 x g) i 5 minutter (Eppendorf). Rørene, med både pellet og supernatant, ble lagret ved -20 °C etter uttak av templat-DNA for kjøring av PCR («Polymerase Chain Reaction»).

2.3.2 16S rDNA-amplifisering

For å amplifisere 16S rDNA ble det kjørt PCR. Det ble tillaget en PCR-blanding ved å tilsette templat-DNA fra eppendorfrør med ekstrahert DNA til en mastermiks. DNA-polymerase ble holdt på is og tilsatt sist ved blanding av mastermiksen, da DNA-polymerase lett degraderes ved romtemperatur. To primere, som bandt til 16S rRNA-genet fra hver sin ende, ble benyttet; 1F («1Forward», 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') og 5R («5Reverse», 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Templat-DNA fra DNA-ekstraheringen ble til slutt tilsatt den ferdige mastermiksen. Reagensene med mengder og konsentrasjoner brukt i PCR-blandingen kan ses i **Tabell 2.1**.

Tabell 2.1: Konsentrasjon og mengder reagenser benyttet i PCR-blandingen.

| Reagens | Initiell konsentrasjon | Endelig konsentrasjon | Volum, μl (1 reaksjon) |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--|
| Iproof HF buffer | 5x | 1x | 8 |
| dNTPs | 10 mM | 200 μ M | 0,8 |
| Forward1 (primer) | 5 μ M | 0,2 μ M | 2 |
| 5Reverse (primer) | 5 μ M | 0,2 μ M | 2 |
| dH₂O | | Total 40 μ l | 23,8/25,3* |
| Iproof DNA polymerase | 2 U/ μ l | 0,02 U/ μ l | 0,4 |
| Templat-DNA | 5-100 ng/ μ l | 7,5-150 ng | 3/1,5** |
| | | Totalt: | 40 |

* *Kompensering for redusert mengde templat-DNA*

** *Redusert mengde templat-DNA ved forhøyet DNA-konsentrasjon*

Det ble tilsatt lavere mengde templat-DNA enn vanlig (3 μ l) i noen av prøvene, da de ikke ga bånd på gel under første runde med PCR og agarosegelelektroforese. Ved kjøring av genomisk DNA på NanoDrop 2000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) ble det fra DNA-ekstraheringen målt høyere DNA-konsentrasjon i prøver som ikke ga bånd på agarosegelelektroforese. Grunnet høy DNA-konsentrasjon ble det for prøvene det gjaldt brukt 1,5 μ l templat-DNA til PCR-blandingen og kompensert med destillert vann til totalt 40 μ l. PCR-blandingen ble kjørt i en C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA) etter PCR-program illustrert i **Tabell 2.2**.

Tabell 2.2: Betingelser benyttet i PCR-program.

| Steg | Temperatur (°C) | Tid (min) | Antall sykluser |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|
| Initiell denaturering | 98 | 1/2 | 1 |
| Denaturering | 98 | 1/6 | 35 |
| Hybridisering | 55 | 1/2 | |
| Polymerisering | 72 | 3/4 | |
| Endelig polymerisering | 72 | 10 | 1 |

Velykket 16S rDNA-amplifisering ble bekreftet ved å kjøre PCR-produktet på agarosegel. Agarosegel (1 %) ble tillaget i forhold til støpeformens volum (15 x 20 cm) ved å blande ut 2,1 g SeaKem LE Agarose-pulver (Lonza, Rockland, USA) med 210 ml 1xTAE i en 0,5-l-blåtoppflaske. Løsningen ble varmet opp i mikrobølgeovn til alt pulveret var løst. Etter avkjøling av løsningen (ca. 60 °C) ble det tilsatt 10,5 µl GelRed Nucleic Acid Stain fra Biotium (Hayward, CA, USA) (0,5 µl per 10 ml 1xTAE), før løsningen ble helt over i en støpeform sammen med to brønn-kammer. I en mikroplatebrønn ble det blandet sammen PCR-produkt og reagenser etter mengder anvist i **Tabell 2.3**. Fra mikroplatebrønn ble 7-8 µl fra hver prøve applisert på gel. For å kontrollere at riktig båndlengde på gelen ble oppnådd, ble 3 µl Quick-Load 1 kb DNA ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA) fortynnet i 7 µl milliQ-vann før applisering på gel. Gelelektroforesen ble kjørt ved 80 V i 40 minutter (PowerPac 300, BioRad, Hercules, CA, USA) i et elektroforesekar (BioRad) med 1xTAE buffer.

Tabell 2.3: Reagenser brukt til preparering av PCR-produkt for kjøring av gelelektroforese.

| Løsning | Mengde (μl) |
|--|-----------------------------------|
| PCR-produkt | 3 |
| GelPilot DNA Loading Dye, 5x (Qiagen) | 1,5 |
| milliQ-vann | 6 |

2.3.3 Rensing av PCR-produkt og sekvensering

Videre ble PCR-produktet rensert etter protokoll fra Omega Bio-Tek «E.Z.N.A. Cycle Pure Kit Centrifugation Protocol» (Omega Bio-Tek, Georgia, USA). Ferdig rensert PCR-produkt ble sendt i eppendorfrør med forsterket lokk etter instruksjoner fra GATC Biotech med hensyn til Sanger sekvensering. Det ble sendt et rør for hver av de to primerne benyttet, «Forward1» og «5Reverse», to rør per stamme. Sekvenseringen ble utført etter gjeldende prosedyrer ved GATC Biotech AG i Köln, Tyskland.

Prøveresultatet fra ferdig sekvenserte prøver ble behandlet i dataprogrammet BioEdit versjon 7.2.5 (Hall 1999). Før sekvenssammenstilling ble sekvensene (to for hver stamme) «trimmet» i begge ender ved å fjerne dårlige sekvenser. Sekvenssammenstilling ble utført med «CAP contig assembly program» i BioEdit for å gi en Contig-0-sekvens, som utgjorde summen av de to originale sekvensene fra de to primerne benyttet. Contig-0-sekvensen ble deretter kopiert i FASTA-format og limt inn i databasen BLAST «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST 2016). Sekvensene ble sammenlignet opp imot andre publiserte sekvenser i en nukleotiddatabase, og ga et resultat i form av prosentvis sekvenslikhet mot databasens innlagte sekvenser.

2.4 Enzymaktivitet

Enzymaktivitet ved hjelp av API ZYM-kit (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, Frankrike) og en ny diffusjonsanalyse på skummetmelkagar ved ulike inkuberingstemperaturer ble utført.

2.4.1 API ZYM

API ZYM-testen ble utført på samtlige 32 stammer ved å pøde NB (Merck) med renkultur fra -80 °C-fryser før 24 timers inkubering ved 22 °C og utstrykning på BHI-agar (Oxoid) med påfølgende 24 timers inkubering ved 22 °C. API ZYM-analysen ble utført i henhold til produsentens veiledning fra Biomérieux, med et par modifikasjoner. Bakteriemengden overført fra BHI-agarskåler til API Suspension Medium ble tilpasset slik at turbiditeten var lik en McFarland Standard 5 (Biomérieux). API ZYM-strippene ble inkubert ved 30 °C. Tilstedeværelse av de 5 proteolytiske enzymene leucin arylamidase, valin arylamidase, cystine arylamidase, trypsin og α -chymotrypsin, i tillegg til sur fosfatase og naftol-AS-BI-fosfohydrolase ble undersøkt.

2.4.2 Diffusjonsanalyse ved ulike inkuberingstemperaturer

På grunnlag av resultater fra diffusjonsanalyse ved 22 °C og API ZYM-test ble det opprinnelige utvalget på 32 stammer redusert til 13 stammer. Det var av interesse å utføre en ny diffusjonsanalyse for de 14 stammene, denne gang ved ulike inkuberingstemperaturer for å indikere hvilke temperaturer enzymene var mest aktive ved. Dette ble gjort for å ytterligere skille stammene og snevre inn utvalget som skulle tas med videre til vekstforsøk. Fire inkuberingsstemperaturer ble brukt; 4, 7, 22 og 30 °C.

Bakterier fra BHI-skåler brukt for testing av API ZYM ble overført ved hjelp av sterile tannpirkere og prikket på skummetmelkagar-skåler. Det ble over en tre dagers inkuberingsperiode daglig målt klaringssoner for de 14 stammene, før skålene ble satt fra sine respektive temperaturer til 4 °C. Det ble videre studert klaringssoner ved 4 °C.

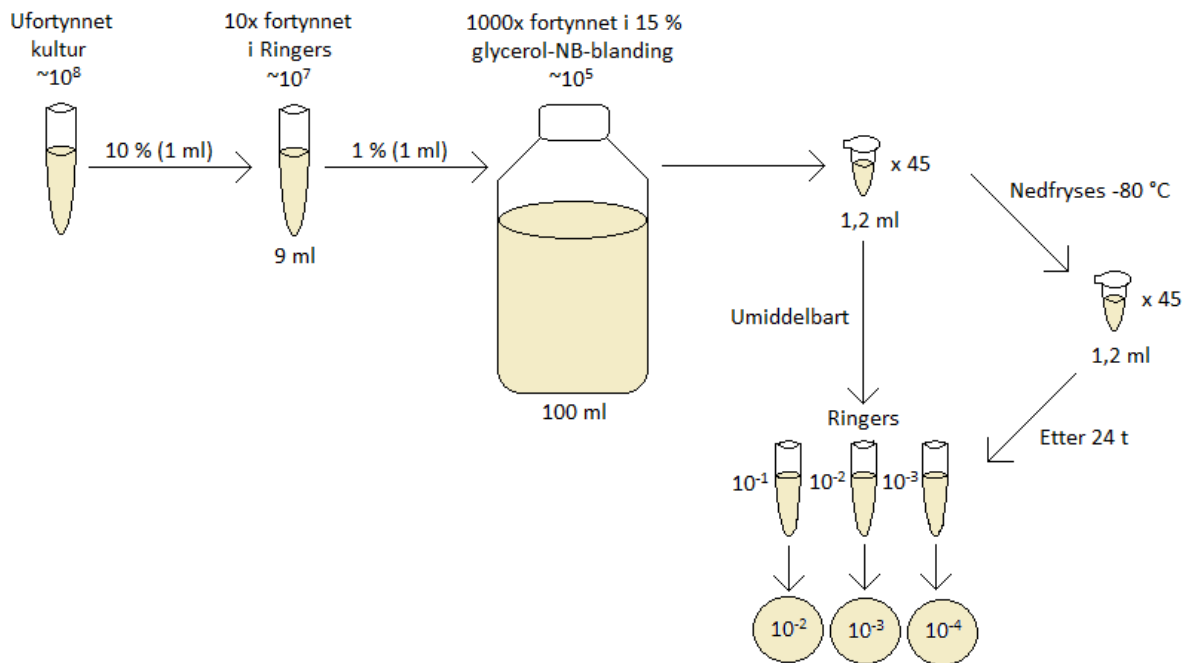
2.5 Vekstforsøk

Det ble bestemt et endelig utvalg på 8 stammer, basert på resultater fra enzymaktivitetsforsøk. Bakgrunnen for valget av stammer til vekstforsøk var et ønske om mest mulig diversitet i prøveutvalget.

Som substrat til vekstforsøket ble det benyttet Langtidsholdbar UHT-behandlet H-melk (3,5 % fett) produsert av TINE Meierier Østlandet levert direkte fra leverandør i Elopak Pure Pak-kartonger merket best før 20.05.16.

2.5.1 Nedfrysning av podemateriale

For å sørge for et mest mulig likt utgangspunkt for podingen i vekstforsøket ble det for hver av de 8 stammene utført nedfrysning av podemateriale til melken i eppendorfrør med kjent bakteriekonsentrasjon (10^5 CFU ml⁻¹). Opparbeiding av podemateriale ble utført ved inokulering av fryst renkultur i NB og inkubering ved 22 °C i 24-33 timer, til kulturen nådde visuelt sammenlignbar blakhet i NB som stamme B etter 24 timers inkubering (tilnærmet 10^8 CFU ml⁻¹) (Amundsen 2015). Kulturene ($\sim 10^8$ CFU ml⁻¹) ble først fortynnet 10 ganger i Ringers-løsning (VWR, Kalbakken, Oslo, Norge) til $\sim 10^7$ CFU ml⁻¹ og videre fortynnet 100 ganger i 15 % glycerol-NB-blanding (50 ml:50 ml 30 % glycerol). Det ble umiddelbart før og etter nedfrysning (etter 24 t) tatt ut mikrobielle prøver og platespredt på PCA-agar, der fortynningene 10^{-2} , 10^{-3} og 10^{-4} ble benyttet. Dette for å bekrefte velykket fortynning til $\sim 10^3$ CFU ml⁻¹. Fra inokulerte glycerol-NB-blandinger ble det nedfrost 45 eppendorfrør á 1,2 ml ved -20 °C for hver av de 8 stammene. Fortynning av kulturer og nedfrysning av eppendorfrør er illustrert i **Figur 2.1**.



Figur 2.1: Prosess for nedfrysning av podemateriale illustrert for én av 8 stammer.

2.5.2 Poding for vekstforsøk

Selve vekstforsøket ble utført i triplikat, der hvert delforsøk innebar poding av hver av de 8 stammene i langtidsholdbar H-melk og aerob inkubasjon ved tre gitte temperaturer; 4, 8 og 22 °C. Beskrivelsen videre i avsnittet gjelder for ett av totalt tre delforsøk.

Melken ble inokulert ved å tilsette totalt 9,9 ml tint podemateriale fra 9 eppendorfrør oppbevart ved -20 °C for hver stamme til en 1-L-Langtidsholdbar H-melk. Melken ble etter poding blandet ved vending 10 ganger. Totalt ble åtte melkekartonger á 1 l inokulert per delforsøk. Umiddelbart før fordeling til 1-L-blåtoppflasker, ble mikrobielle nullprøver tatt ut fra hver melkekartong (1 ml), fortynnet i Ringers og platespredt på PCA-agar med fortynningene 10^{-2} , 10^{-3} og 10^{-4} . Hver podet melkekartong ble så fordelt videre i volum på ca. 330 ml til 3 1-L-blåtoppflasker, som deretter ble plassert ved hver sin temperatur; 4, 8 eller 22 °C. 24 1-L-blåtoppflasker, med åtte stammer fordelt ved tre temperaturer, ble benyttet per delforsøk, totalt 72 flasker for alle tre delforsøk.

2.5.3 Uttak for vekstforsøk

Videre ble det gjort uttak til både kjemiske og mikrobielle analyser etter plan vist i **Tabell 2.4**.

Tabell 2.4: Uttaksplan for mikrobielle og kjemiske analyser under hovedforsøk.

| TEMPERATUR | DAG* | | | | | | | | |
|------------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 4 °C | | X | | X | | | | | X |
| 8 °C | | X | | X | | | | | X |
| 22 °C | X | X | X | | | X | | | X |

* 1 dag = 24 t ± 10 min

Én gang daglig og ved uttak ble flaskene ristet grundig ved å vende de 10 ganger, i tillegg til at korken ble holdt delvis åpen under inkuberingen. Dette for å sikre et aerobt miljø.

Inkuberingstiden ble forsøkt holdt lik for de ulike stammene. Underveis i vekstforsøket ble melken vurdert ved å se og lukte på den.

Mikrobielle prøver ble tatt ut (1 ml) og umiddelbart etter uttak fortynnet i Ringers og platespredd på skåler med PCA-agar. Det ble benyttet parallelle skåler av hver fortynning. Etter 24 timers inkubering ved 22 °C ble bakteriekonsentrasjonen bestemt ved telle parallelle skåler med mellom 30 og 300 kolonier og beregne gjennomsnittet av disse.

Det ble videre tatt ut prøver til kjemiske analyser ved å overføre 15 ml melk til sterile 15 ml Falcon-rør (Greiner Bio-One) ved hjelp av 5 ml sterile automatpipetter. Rett etter uttak ble Falcon-rørene nedfrosset ved -20 °C inntil videre bruk til kjemiske analyser. Blindprøve (0-prøve, 0 t) til kjemiske analyser ble tatt fra en nyåpnet, ikke inokulert melkekartong.

2.6 Kjemiske analyser

Det ble utført kjemiske analyser på et utvalg av prøvene fra vekstforsøket. Fra delforsøk 2 og 3 ble det foretatt analyser på samtlige stammer fra tre uttak ved hver inkuberingstemperatur, som illustrert i **Tabell 2.5**. Totalt utgjorde dette 145 prøver per kjemiske analysemetode, regnet med blindprøve fra upodet melk.

Tabell 2.5: Uttak det ble foretatt kjemiske analyser på illustrert for ett delforsøk.

| | DAG | | | | | | | | |
|------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TEMPERATUR | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 4 °C | | X | | X | | | | | X |
| 8 °C | | X | | X | | | | | X |
| 22 °C | | X | | | | X | | | X |

2.6.1 Kvantifisering av frie aminosyrer ved bruk av HPLC

Kvantifisering av frie aminosyrer ble gjennomført ved hjelp av «High Performance Liquid Chromatography» (HPLC), en metode beskrevet av Bütikofer og Ardö (1999) og Moe et al. (2013) med et par modifikasjoner.

Prøveopparbeidelsen ble utført ved å veie inn 5,00 g tint prøvemateriale fra vekstforsøk i sterile 15 ml Falcon-rør. Innveid rør ble tilsatt 5,00 ml indre standardløsning (0,4 µmol/ml L-norvalin (Sigma-Aldrich, Kina) i 0,1 M HCl (Merck, Tyskland)). Prøvene ble mikset på en MS1 Minishaker (Ika, Staufen, Tyskland) i ca. 1 minutt og satt i en MultiRS-50 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 15 minutter. Deretter ble prøvene plassert i et ultralydvannbad (Branson 2510, Soest, Nederland) i 30 minutter, etterfulgt av sentrifugering (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) i 40 minutter ved 2500 x g (3400 rpm) ved 4 °C. I et eppendorfrør ble 0,6 ml av supernatanten tilsatt 0,6 ml 4 % trikloreddiksyre (Merck) før blandingen ble mikset på en minishaker (Gene 2) og satt på is i 30 minutter. Prøvene ble sentrifugert ved 15600 x g i 5 minutter i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf) ved 4 °C. Videre ble prøvene overført til en 10 ml steril sprøyte

(Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40 mm fra samme produsent og deretter filtrert med 0,2 µm cellulose acetat-filter (VWR, USA) over i nye eppendorfrør. Fra de filtrerte prøvene ble 50 µl overført videre til HPLC-rør og nedfrosset ved -20 °C frem til analysering sammen med resten av prøven i eppendorfrørene.

Før separering og påsetting på HPLC ble prøvene tilsatt 350 µl boratbuffer (0,4 M med pH 10,2, Agilent Technologies, Tyskland). Separeringen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument bestående av utstyret Agilent 1200 serie pumpe (Agilent Technologies, Singapore), Agilent 1200 serie autoinjektor (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie kolonneovn (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie termostat (Agilent Technologies) og en Agilent 1200 serie fluorescensdetektor. Programvaren som ble benyttet var Open LAB EZChrom (Agilent Technologies). Prøvene ble derivatisert før injisering ved å blande 5 µl prøve med 5 µl OPA-løsning (Agilent). Reaksjonstiden var 0,15 min før injisering. Det ble injisert 10 µl av hver prøve i instrumentet og analysert med en XTera RP 18 kolonne (150 x 4,6 mm; Waters, Milford, MA) ved hjelp av to mobile faser; A (30 mmol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck), 0,1 mmol/l titriplex III (Merck), pH 7,2 og 0,25 % tetrahydrofuran (Merck)) og B (100 mol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck) og 0,53 mol/l titriplex III (Merck), pH 7,2, tilsatt 80 % acetonitril (Merck)). Kolonnen holdt en temperatur på 42 °C og hastigheten på mobilfasen var 0,7 ml/min. Gradienten på mobilfasen var: Fra 3,3-20,7 % B i 13 minutter, 20,7-30 % B i 12 minutter og 30-100 % B i 4 minutter.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på lik måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. De kjente aminosyrene var: L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-asparagin, L-serin, L-glutamin, L-histidin, glycin, L-treonin, L-citrullin, L-arginin, L-alanin, GABA, L-tyrosin, L-valin, L-metionin, L-norvalin, L-isoleucin, L-fenylalanin, L-tryptofan, L-leucin, L-ornitin og L-lysin løst i 0,1 M HCl (Merck).

2.6.2 Kapillærelektroforese av peptid- og proteinnedbrytning

Analyse av peptid- og proteinnedbrytning ble gjennomført ved hjelp av kapillærelektroforese (CE, «capillary electrophoresis»), en metode beskrevet av Heck et al. (2008) og Mestawet et al. (2014) med et par modifikasjoner.

Prøvebuffer og kjørebuffer ble preparert som beskrevet av Heck et al. (2008). Det ble tilsatt 39,3 mg dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 5 ml prøvebuffer. Prøveopparbeidelsen ble utført ved å blande 270 µl tint prøvemateriale fra vekstforsøk med 1230 µl prøvebuffer i eppendorfrør. Eppendorfrørene ble ristet raskt på en minishaker (Gene 2), før de ble satt til inkubering på en roterende PSU-20i orbital shaker (Biosan) i romtemperatur i 1 time. Prøvene ble deretter sentrifugert i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf) ved 5000 x g i 5 minutter for å separere fett. Ved hjelp av en 2,5 ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40 mm fra samme produsent ble prøven, med unntak av utfelling i toppen eller bunnen av røret, sugd opp og deretter filtrert med 0,45 µm PES-filter (VWR) over i nye eppendorfrør. Det ble overført 50 µl prøvemateriale til CE-prøverør fra eppendorfrørene for kjøring av kapillærelektroforese. Eppendorfrørene ble frosset ned som «back up» ved -20 °C.

Kapillær elektroforesen ble kjørt med programvaren Agilent ChemStation og kapillæren «HPCE stndrd cap 50µm id 56cm lgth» (Agilent Technologies, Tyskland) på Agilent kapillærelektroforese-system. Kaseinseparasjon ble utført i henhold til Heck et al. (2008). Prøver ble kjørt i sekvenser på 30 prøver, der hver kjøring tok 72 minutter. Ved starten og etter hver fjerde kjøring ble kapillæren skylt med 0,1 M NaOH i 5 minutter, etterfulgt av skylling med «run buffer» i 20 minutter. Før hver kjøring ble kapillæren skylt med «run buffer» i 5 minutter. Fersk «sample buffer» ble brukt etter hver eneste kjøring. Prøvemateriale ble injisert ved anoden ved et trykk på 34,5 mbar i 20 sekunder, og UV-deteksjon av peptider og proteiner ble utført ved 214 nm (Mestawet et al. 2014).

3 RESULTATER

Oppgaven ble delt inn i innledende forsøk og hovedforsøk, etterfulgt av kjemiske analyser. Innledende forsøk på de 32 opprinnelige isolatene (1-32) innebar måling av proteolytisk (og lipolytisk) aktivitet ved diffusjonsanalyse ved 22 °C og fenotypisk og genotypisk karakterisering, samt videre måling av enzymaktivitet ved hjelp av API ZYM og diffusjonsanalyse ved 4 ulike inkuberingstemperaturer. Før diffusjonsanalyse ved ulike inkuberingstemperaturer (siste innledende forsøk) ble utvalget redusert til 13 stammer basert på resultater fra diffusjonsanalyse ved 22 °C, 16S rDNA-sekvensering og API ZYM. I tillegg ble det i dette studiet inkludert en stamme (stamme B) fra studier av Amundsen (2015), slik at 14 stammer totalt ble undersøkt ved siste diffusjonsanalyse. Under hovedforsøket ble det utført vekstforsøk med et endelig utvalg på 8 stammer, som genererte prøvemateriell til mikrobielle uttak og kjemiske analyser. Undersøkelse av proteolytisk aktivitet i prøver fra vekstforsøk ble utført ved kvantifisering av frie aminosyrer ved hjelp av HPLC og analyse av peptid- og proteinnedbrytning med kapillærelektroforese (CE). Det endelige utvalget på 8 stammer inkluderte stammene 1, 9, 12, 15, 16, 22, 26 og B. Da denne oppgaven retter seg mot proteolytisk aktivitet vil det kun presenteres resultater fra denne delen, selv om lipolytisk aktivitet ble undersøkt parallelt under innledende forsøk og ved hovedforsøk. Da lipolytisk aktivitet har hatt innvirkning på valg av stammer innledningsvis vil det tas med resultater for lipolyse fra diffusjonsanalysen ved 22 °C for å belyse mangfoldet blant isolatene.

3.1 Innledende forsøk

3.1.1 Diffusjonsanalyse ved 22 °C

Det ble innledningsvis målt proteolytisk og lipolytisk aktivitet hos 32 tilfeldige enkeltkolonier med diffusjonsanalyse og inkubering ved 22 °C på skummetmelkagar og tributyrinagar, som vist i **Tabell 3.1**. Alle 32 stammer ble tatt med videre i forundersøkelsene, inkludert stammene som ikke viste tegn til proteolytisk eller lipolytisk aktivitet. Videre i resultatdelen vil det kun presenteres resultater for proteolyse.

Tabell 3.1: Klaringssoner (diameter, mm) for proteolytisk aktivitet (PRT) på skummetmelkagar og lipolytisk aktivitet (LIP) på tributyrinagar målt etter 24 timers inkubering ved 22 °C av isolat 1-32. Proteolytisk aktivitet er angitt i grønt, lipolytisk aktivitet i gult og blått for både proteolytisk og lipolytisk aktivitet.

| Agar | TANK | | | | | | | |
|------|------|------|-----|--------|-----|------|-----|--------|
| | Nr. | 1 | Nr. | 2 | Nr. | 3 | Nr. | 4 |
| PRT | 1 | S** | 9 | 2,5 mm | 17 | - * | 25 | - |
| LIP | | 1 mm | | 2 mm | | - | | 0,5 mm |
| PRT | 2 | 2 mm | 10 | 3 mm | 18 | 3 mm | 26 | - * |
| LIP | | - * | | 2 mm | | 1 mm | | - * |
| PRT | 3 | 1 mm | 11 | SS*** | 19 | - | 27 | - |
| LIP | | - * | | - | | 1 mm | | 1 mm |
| PRT | 4 | S** | 12 | - | 20 | - | 28 | - * |
| LIP | | - * | | - | | - * | | - |
| PRT | 5 | - | 13 | 2,5 | 21 | 3 mm | 29 | - |
| LIP | | 1 mm | | 3 mm | | 1 mm | | - * |
| PRT | 6 | - | 14 | - * | 22 | - * | 30 | - |
| LIP | | 1 mm | | 1,5 mm | | 1 mm | | 0,5 mm |
| PRT | 7 | - | 15 | 2-4 mm | 23 | - | 31 | 2 mm |
| LIP | | - | | - | | - | | - |
| PRT | 8 | 2 mm | 16 | - * | 24 | - | 32 | - |
| LIP | | - * | | 1 mm | | 1 mm | | 0,5 mm |

* Indikerer dannelse av klaringssone etter ytterligere 5 dagers lagring ved 4 °C (etterfulgt 24 timers inkubering ved 22 °C)

** S=Spredning av stammen på skål

*** SS=Spredning av stammen på skål med dannelse av klaringssone

Diffusjonsanalysen ved 22 °C viste stor variasjon i proteolytisk og lipolytisk aktivitet blant isolatene. Det ble målt proteinase- og/eller lipaseaktivitet hos omtrent to tredjedeler av isolatene, der flest viste proteinaseaktivitet. Størst klaringssoner ble målt på skåler med både proteinase- og lipaseaktivitet.

3.1.2 Fenotypisk karakterisering

Alle 32 isolat fra *Pseudomonas* CFC-agar fikk positivt utslag med hensyn til Gram negative bakterier, med dannelse av en viskøs blanding med KOH og katalase-positive isolat med dannelse av gass (O₂) med tilsats av H₂O₂. Bakterienes morfologi ble undersøkt ved mikroskopering, som bekreftet at alle isolat var stavbakterier. Et utvalg ble mikroskopert som Gram-preparater, med rosa stavbakterier som Gram-reaksjon. Den fenotypiske karakteriseringen styrket antagelsen om at alle isolatene var Gram-negative, katalase-positive staver.

3.1.3 Genotypisk karakterisering

Det ble utført Sanger sekvensering av 16S rRNA-genet for å identifisere isolatene til slekt og art og muligens differensiere de 32 isolatene isolert fra rå melk. De 7 isolatene tatt med videre i hovedforsøk er fremhevet i rød skrift i resultatfremstilling i **Tabell 3.2**.

Tabell 3.2: Slekt og potensielle arter for 32 isolater etter 16S rDNA-sekvensering, med endelig utvalg på 7 stammer fremhevet i rød skrift.

| Kultur | Tank | Slekter og potensielle arter |
|-----------|------|--|
| 1 | 1 | <i>Pseudomonas fluorescens (cs*) / baetica / helmanticensis / moraviensis</i> eller <i>Bacillus</i> |
| 2 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / lundensis / psychrophila / deceptionensis / taetrolens</i> |
| 3 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / lundensis / psychrophila / deceptionensis / taetrolens</i> |
| 4 | | <i>Pseudomonas fluorescens (cs) / baetica / jessenii / helmanticensis / koreensis</i> eller <i>Bacillus</i> |
| 5 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> eller <i>Bacillus</i> |
| 6 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> eller <i>Bacillus</i> |
| 7 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> eller <i>Bacillus</i> |
| 8 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida / psychrophila / syringae / deceptionensis / taetrolens</i> |
| 9 | 2 | <i>Pseudomonas fluorescens(cs) / trivialis / mandelii / poae(cs) / salomonii / simiae / putida</i> |
| 10 | | <i>Pseudomonas fluorescens(cs) / trivialis / mandelii / poae(cs) / salomonii / simiae / putida</i> |
| 11 | | <i>Pseudomonas fluorescens(cs) / trivialis / mandelii / poae / salomonii / simiae / putida / extremaustralis / veronii</i> |
| 12 | | <i>Pseudomonas psychrophila / fragi</i> |
| 13 | | <i>Pseudomonas fluorescens(cs) / trivialis / mandelii / poae(cs) / salomonii / simiae / putida</i> |
| 14 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / syringae(cs) / trivialis / putida</i> |
| 15 | | <i>Pseudomonas fluorescens / cedrina / marginalis / azotoformans / synxantha / gessardii</i> |
| 16 | | <i>Pseudomonas fluorescens / psychrophila / fragi(cs) / putida</i> |
| 17 | 3 | <i>Pseudomonas psychrophila / fragi</i> |
| 18 | | <i>Pseudomonas psychrophila(cs) / fragi / putida</i> |
| 19 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> |
| 20 | | <i>Pseudomonas fluorescens / jessenii / baetica / helmanticensis / moorei /</i> |

| | | |
|----|---|---|
| 21 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> |
| 22 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> eller <i>Bacillus</i> |
| 23 | | <i>Pseudomonas fluorescens(cs) / antarctica / salomonii / meridiana / veronii / auricularis / constantinii / marginalis</i> |
| 24 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> eller <i>Bacillus</i> |
| 25 | 4 | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> |
| 26 | | <i>Pseudomonas fluorescens / psychrophila / fragi / lundensis / deceptionensis / taetrolens / syringae</i> |
| 27 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> |
| 28 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / psychrophila / deceptionensis / lundensis / syringae</i> |
| 29 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / psychrophila / lundensis / deceptionensis / syringae / taetrolens</i> |
| 30 | | <i>Pseudomonas fluorescens fragi / psychrophila(cs) / putida</i> |
| 31 | | <i>Pseudomonas fragi / psychrophila</i> |
| 32 | | <i>Pseudomonas fluorescens / fragi / putida</i> |

* *cs* = «complete sequence»/fullstendig sekvens (resten er basert på «partial sequence»/delvis sekvens)

Sekvenseringen bekreftet at de 32 isolatene tilhørte slekten *Pseudomonas*. Basert på at 16S rDNA-sekvensering foreslo såpass mange potensielle arter etter søk i databasen BLAST, var det vanskelig å dra noen slutning om hvilken art de ulike isolatene tilhørte. Det ble observert at artene *fluorescens*, *fragi*, *putida* og *psychrophila* ble foreslått som potensiell arter for mange av isolatene. Rå melk fra tank 2 skilte seg ut fra de andre tankene ved at artene *mandelii* og *salomonii* gikk igjen. Det samme kunne sies om tank 1, der *Bacillus* gikk igjen som potensiell slekt hos et flertall av isolatene, noe som var oppsiktsvekkende, da dette er en Gram positiv stavbakterie. Disse resultatene kan imidlertid utelukkes, da isolatene ble bekreftet Gram negative ved fenotypisk karakterisering.

Av resultatene for det endelige utvalget på 7 stammer (fremhevet i rødt), ble arten *fluorescens* foreslått for alle isolater med unntak av stamme 12, slik at samtlige andre stammer potensielt kan ha tilhørt denne ene arten. På bakgrunn av at de andre foreslåtte artene likevel var relativt

forskjellige, kan resultatene likeledes ha tydet på at de 7 ukjente isolatene var artsmessig ulike.

3.1.4 Enzymaktivitet

Enzymaktivitet ble vurdert ved hjelp av API ZYM og en diffusjonsanalyse på skummetmelkagar ved ulike inkuberingstemperaturer. API ZYM ble utført på de opprinnelige 32 stammene og ga grunnlag, sammen med første diffusjonsanalyse ved 22 °C og 16S rDNA-sekvensering, til å redusere utvalget til 13 stammer. Stamme B ble inkludert på dette tidspunktet, slik at diffusjonsanalyse ved 4 ulike temperaturer ble utført på totalt 14 stammer.

API ZYM

Analyse av enzymaktivitet ved hjelp av API ZYM ble foretatt på de 32 opprinnelige stammene. Av de 5 proteolytiske enzymene, samt sur fosfatase og naftol-AS-BI-fosfohydrolase, metoden detekterte for ble det kun målt tilstedeværelse av 4 enzymer, leucin arylamidase, valin arylamidase, sur forfatase og naftol-AS-BI-fosfohydrolase. Det fremstilles derfor kun resultater for disse 4 enzymene i **Tabell 3.3**. Enzymene cystin arylamidase, trypsin og α -chymotrypsin ble ikke detektert med API-ZYM. De 7 stammene tatt med videre til hovedforsøk er fremhevet i rød skrift.

Tabell 3.3: API ZYM enzymaktivitetstest av leucin arylamidase, valin arylamidase, sur fosfatase og naftol-AS-BI-fosfohydrolase utført på 32 stammer, med endelig utvalg på 8 stammer fremhevet i rød skrift. Enzymene cystin arylamidase, trypsin og α -chymotrypsin ble ikke detektert med metoden.

| Kultur | Tank | Leucin arylamidase | Valin arylamidase | Sur fosfatase | Naftol-AS-BI-fosfohydrolase |
|----------|------|--------------------|-------------------|---------------|-----------------------------|
| 1 | 1 | x | | x | x |
| 2 | | x | x | x | x |
| 3 | | x | | x | x |
| 4 | | x | | x | x |

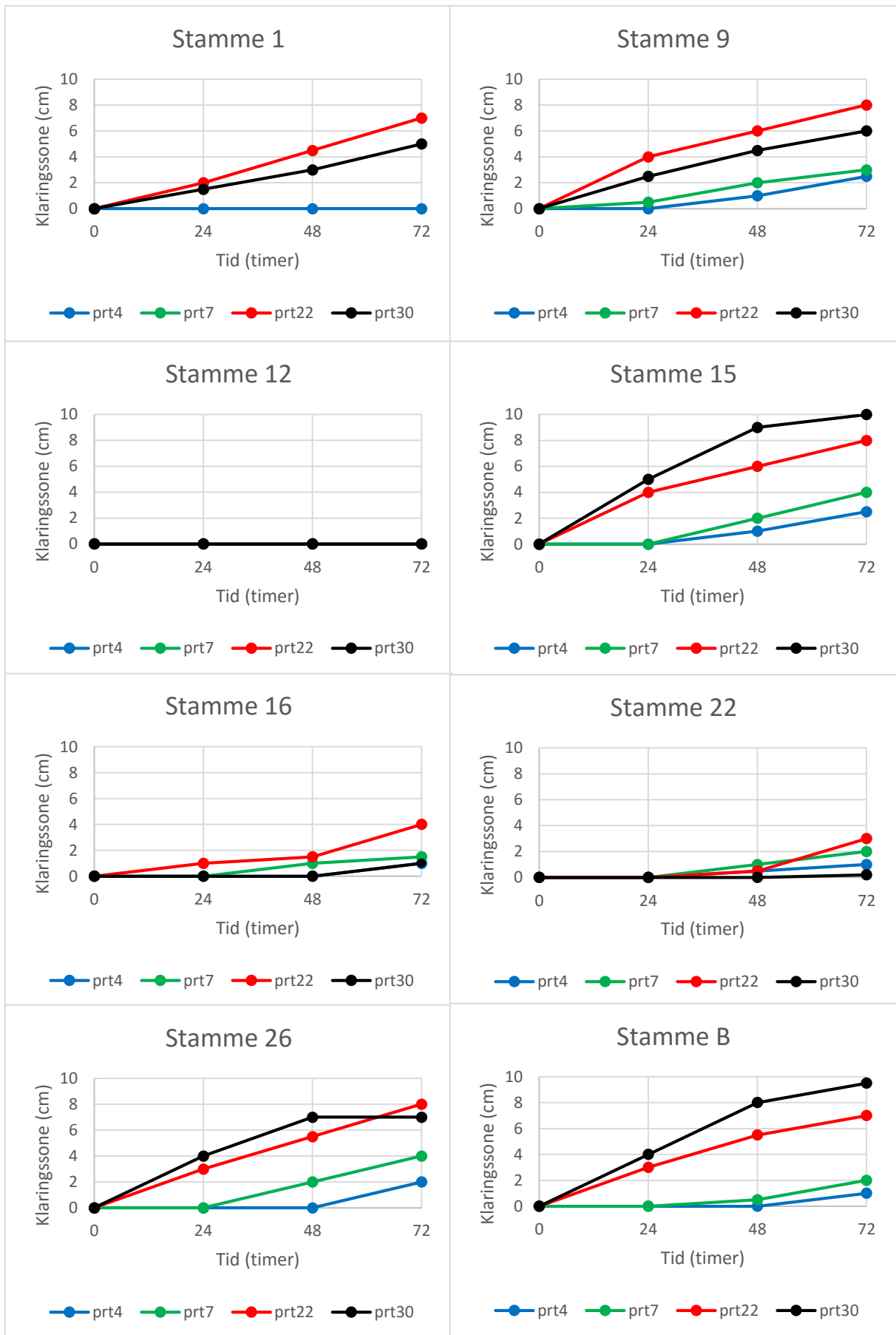
| | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|
| 5 | | x | | x | x |
| 6 | | x | | x | x |
| 7 | | x | x | x | x |
| 8 | | x | x | x | x |
| 9 | 2 | x | | x | x |
| 10 | | x | | | x |
| 11 | | x | | | x |
| 12 | | x | | x | x |
| 13 | | x | | x | x |
| 14 | | x | x | x | x |
| 15 | | x | | x | x |
| 16 | | x | | x | x |
| 17 | 3 | x | x | x | x |
| 18 | | x | x | x | x |
| 19 | | x | x | x | x |
| 20 | | x | x | x | x |
| 21 | | x | | x | x |
| 22 | | x | x | x | x |
| 23 | | x | | x | x |
| 24 | | x | x | x | x |
| 25 | 4 | x | x | x | x |
| 26 | | x | x | x | x |
| 27 | | x | x | x | x |
| 28 | | x | x | x | x |
| 29 | | x | x | x | x |
| 30 | | x | x | x | x |
| 31 | | x | x | x | x |
| 32 | | x | x | x | x |

Samtlige stammer isolert fra tank 4, i tillegg til de fleste fra tank 3, så ut til å produsere de fire enzymene det ble detektert for i denne metoden. Fra tank 1 og 2 var det betraktelig færre stammer med evne til å produsere valin arylamidase. Stamme 10 og 11 er de eneste som ikke produserer sur fosfatase. Alle stammer så ut til å produsere naftol-AS-BI-fosfohydrolase.

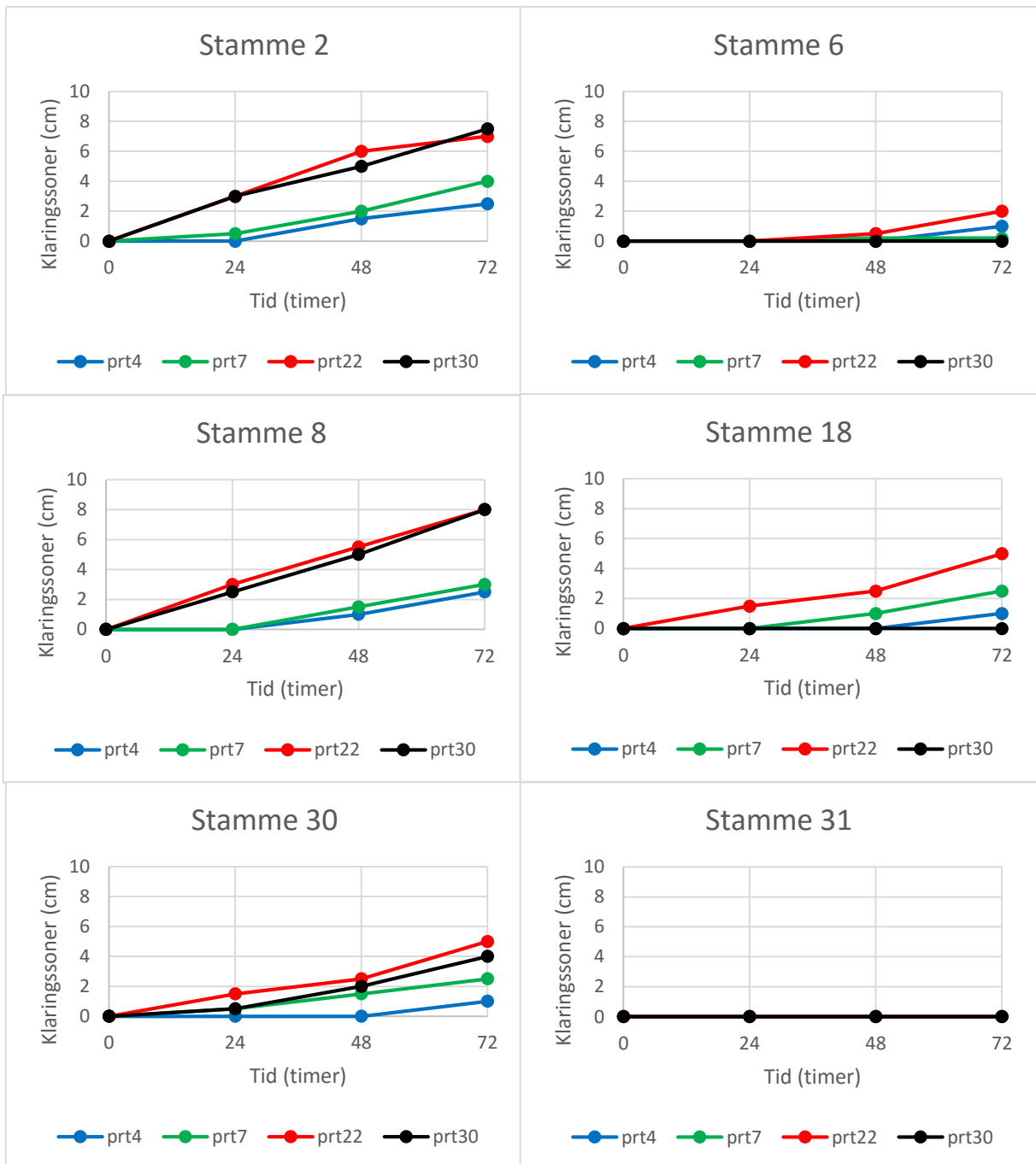
De 7 stammene det ble gått videre med i vekstforsøk produserte alle enzymene leucin arylamidase, sur fosfatase og naftol-AS-BI-fosfohydrolase. Kun stamme 22 og 26 produserte valin arylamidase, og er dermed de eneste stammene som produserte alle fire enzymer det ble detektert for i metoden blant de 7 utvalgte stammene.

Diffusjonsanalyse ved ulike inkuberingstemperaturer

Enzymaktivitet ved fire ulike inkuberingstemperaturer ble studert ved hjelp av diffusjonsanalyse på skummetmelkagar inkubert ved 4, 7, 22 og 30 °C. På bakgrunn av resultater fra diffusjonsanalyse ved 22 °C, 16S rDNA-sekvensering og API ZYM ble utvalget på 32 stammer redusert til 13, samt inkludering av stamme B fra tidligere hovedoppgave. «Stamme B» ble inkludert da det er en stamme mye benyttet i proteolyseforsøk fra ATCC (u.å.). Klaringssoner for de 14 stammene ble målt daglig over 3 dagers inkubering. Resultatene for de 8 utvalgte stammene til hovedforsøk er illustrert i **Figur 3.1**, mens de resterende 6 stammene av de 14 er vist i **Figur 3.2**.



Figur 3.1: Enzymaktivitet målt som klaringssoner (diameter, mm) ved hjelp av diffusjonsanalyse på skummetmelkagar ved 4, 7, 22 og 30 °C for endelig utvalg på 8 stammer, der «prt4» = proteolyse ved 4 °C, «prt7» = proteolyse ved 7 °C, «prt22» = proteolyse ved 22 °C og «prt30» = proteolyse ved 30 °C.



Figur 3.2: Enzymaktivitet målt som klaringssoner (diameter, mm) ved hjelp av diffusjonsanalyse på skummetmelkagar ved 4, 7, 22 og 30 °C for resterende 6 stammer ikke tatt med videre til hovedforsøk, der «prt4» = proteolyse ved 4 °C, «prt7» = proteolyse ved 7 °C, «prt22» = proteolyse ved 22 °C og «prt30» = proteolyse ved 30 °C.

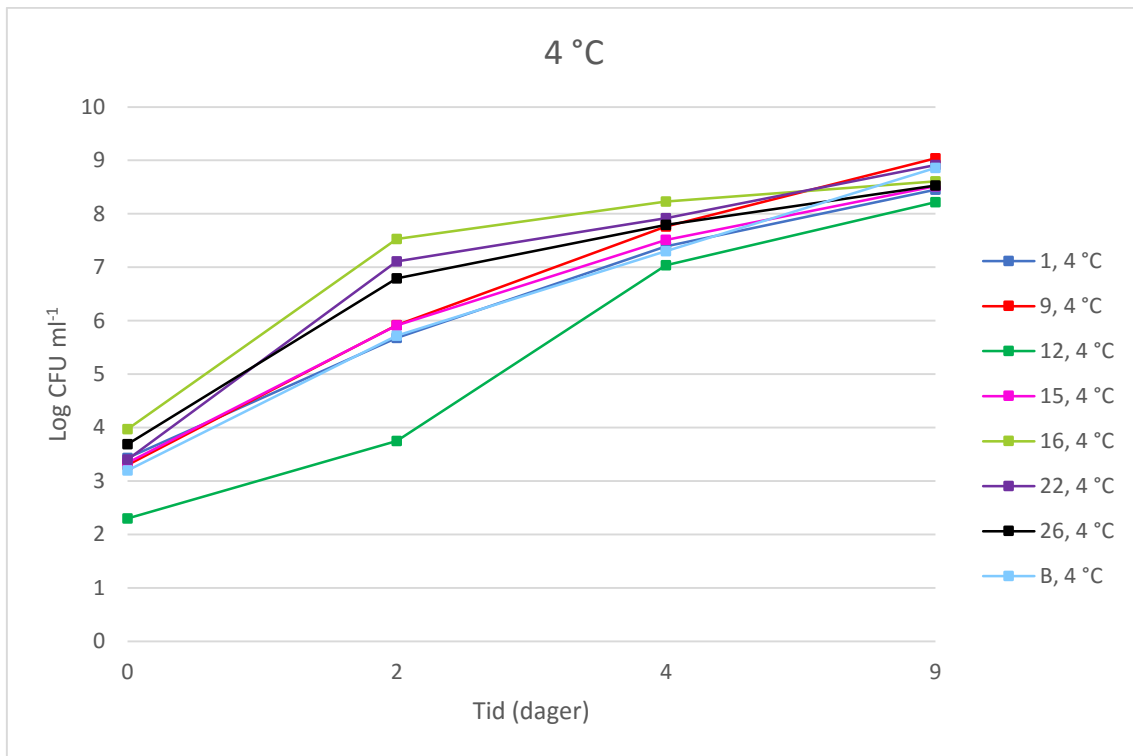
I **Figur 3.1** viste stamme 12 ingen klaringssoner og så derfor ikke ut til å være proteolytisk ved noen av de anvendte temperaturene. Av de resterende stammene i figuren skilte stamme 15, 26 og B seg ut med høyest proteolysegrad ved 30 °C og lavere grad av proteolyse ved lavere temperatur. Stamme 15 dannet klaringssoner tidligere ved 4 °C enn stamme 26 og B, mellom 24 og 48 timer. Sammen med stamme 9 hadde stamme 15 størst klaringszone ved 4 °C etter 72 timer. De mest psykrotrofe stammene så ut til å være stamme 1 og 9, da de hadde høyere proteolysegrad ved 22 °C enn ved 30 °C. Det samme kunne sies om stamme 16 og 22, selv om graden av proteolyse var svakere her. I tillegg var klaringssonene for stamme 16 og 22 større eller lik ved 4 og 7 °C sammenlignet med 30 °C. Stamme 9 og 15 så ut til å være mest proteolytiske over et større temperaturområde, der stamme 9 var mest psykrotrof av de to.

Av de resterende 6 stammene i **Figur 3.2** blant de 14 utvalgte viste stamme 31, som stamme 12, ingen tegn til proteolyse. Stamme 6 og 18 virket til, i likhet med stamme 16 og 22, å ha mer proteolytisk nedbrytning ved 4, 7 og 22 °C, enn ved 30 °C. Som for stamme 1 og 9, hadde stamme 2, 8 og 30 noe høyere grad av proteolyse ved 22 enn ved 30 °C, men lavere proteolytisk aktivitet ved 4 og 8 °C. Av de seks stammene, utenom stamme 31, så alle ut til å være ganske proteolytiske, og høyest proteolytisk aktivitet ved de 4 anvendte inkuberingstemperaturer ble målt for stamme 2 og 8.

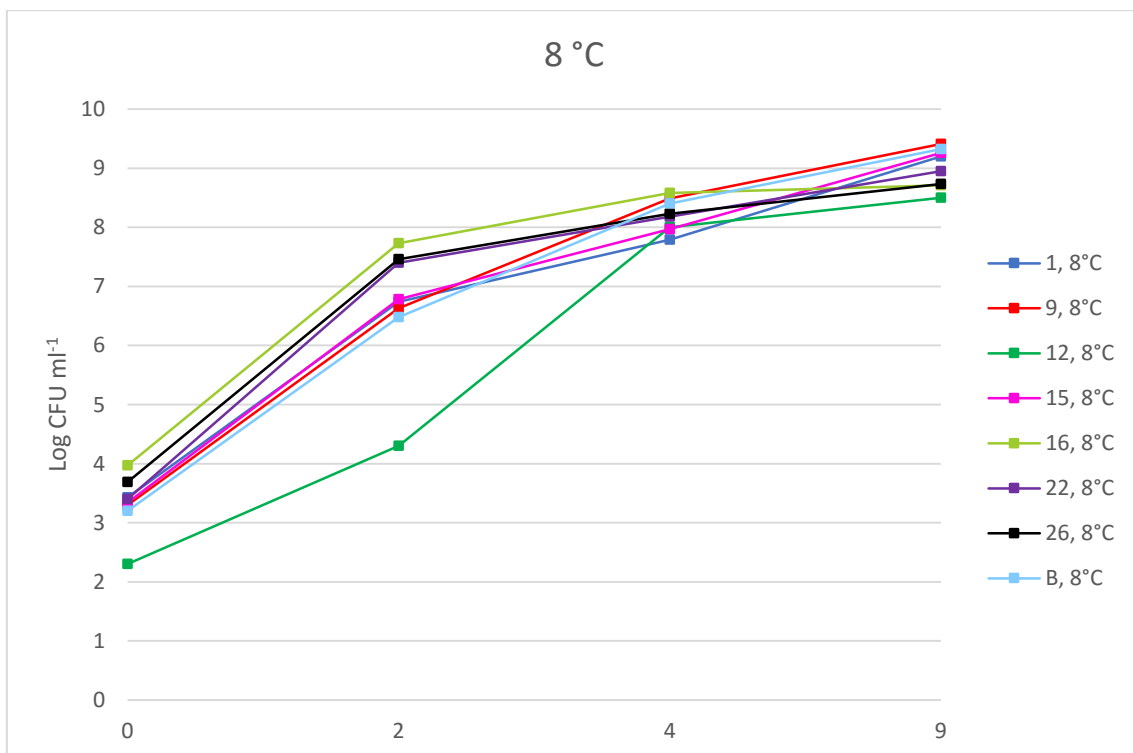
3.2 Vekstforsøk med *Pseudomonas* i melk

Blant de 14 stammene benyttet til diffusjonsanalysene ved ulike temperaturer ble det gått videre med 8 stammer til vekstforsøk, basert på et ønske om størst mulig diversitet i det endelig utvalget. Som hovedforsøk ble det utført vekstforsøk i triplikate ved å inokulere de 8 stammene i langtidsholdbar UHT-behandlet melk før inkubering ved 4, 8 og 22 °C.

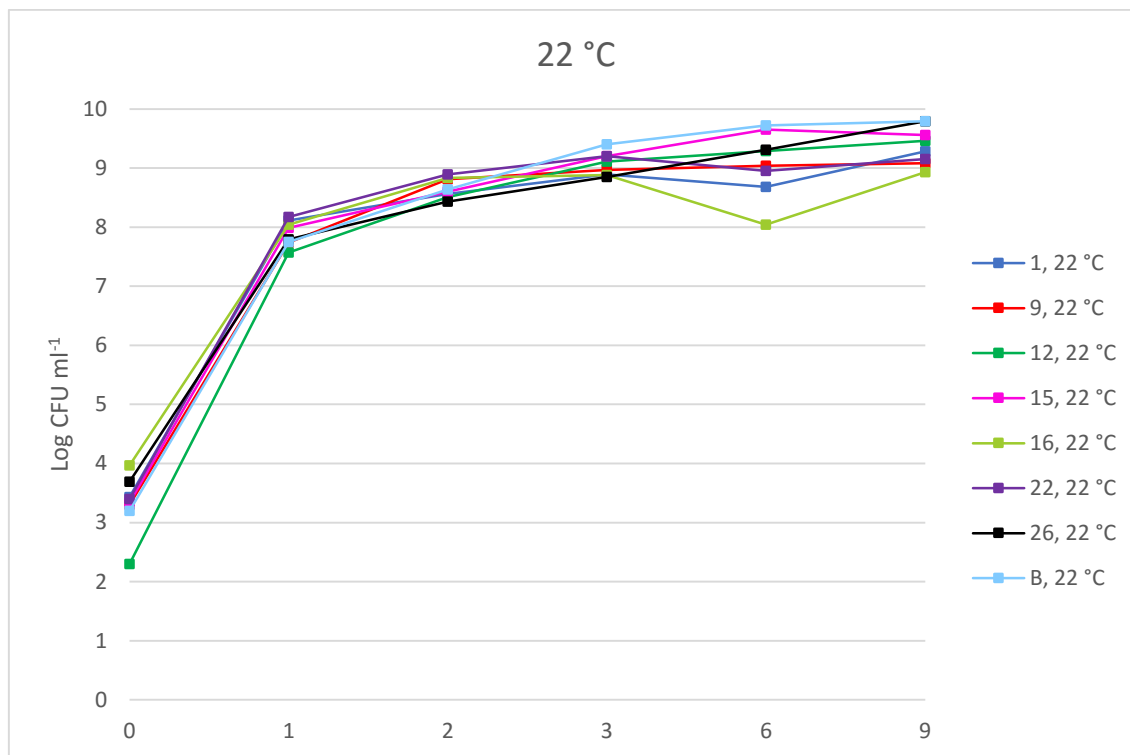
Mikrobielle prøver ble tatt ut, fortynnet og platespredd med paralleller ved gitte tidsintervaller for de ulike inkuberingstemperaturene. Bakteriekonsentrasjonen ble beregnet ut fra de 3 forsøkene og gjennomsnittet av bakterietallene er presentert som vekstkurver i **Figur 3.3-Figur 3.5**. Melken ble også vurdert ved å se og lukte på den i løpet av vekstforsøket.



Figur 3.3: Vekst av stammene 1, 9, 12, 15, 16, 22, 26 og B i UHT-melk inkubert ved 4 °C. Vekstkurvene er basert på gjennomsnitt av 3 gjentak.



Figur 3.4: Vekst av stammene 1, 9, 12, 15, 16, 22, 26 og B i UHT-melk inkubert ved 8 °C. Vekstkurvene er basert på gjennomsnitt av 3 gjentak.



Figur 3.5: Vekst av stammene 1, 9, 12, 15, 16, 22, 26 og B i UHT-melk inkubert ved 22 °C. Vekstkurvene er basert på gjennomsnitt av 3 gjentak.

Vekstkurvene bekreftet at melk var et ypperlig vekstmedium for de isolerte bakteriene, da bakteriekonsentrasjonen økte kraftig fra 2,5-4 log CFU ml⁻¹ til 8,5-10 log CFU ml⁻¹ for alle stammer ved samtlige temperaturer innen 9 dager. Stamme 12 så ut til å være noe mindre psykrotrof, da veksten kom raskere i gang, og tok igjen de andre bakteriene ved 22 °C kontra 4 og 8 °C, til tross for lav startkonsentrasjon. Ved 4 og 8 °C kom stamme 1, 9, 15 og B tregere i gang enn stamme 16, 22 og 26. Sistnevnte stammer var antakelig noe mer psykrotrofe, da de så ut til å trives bedre ved lave temperaturer. Rent visuelt kan denne forskjellen i vekst ha sett ut til og skyldes høyere bakteriekonsentrasjon ved start for stamme 16 og 26, men stamme 22 hadde lik bakteriekonsentrasjon fra start som stamme 1, 9, 15 og B og kom likevel raskere i gang ved de laveste temperaturene. Stamme 16 så i tillegg ut til å havne i stasjonær fase tidligst av alle stammene, så tidlig som etter dag 4 ved 4 og 8 °C. Ved 22 °C så alle stammer ut til å være i stasjonær fase etter dag 2 og stabiliserte seg da rundt 9-10 log CFU ml⁻¹. Etter 9 dager var bakteriekonsentrasjonene oppe på tilnærmet likt nivå for melk inkubert ved både 4, 8 og 22 °C.

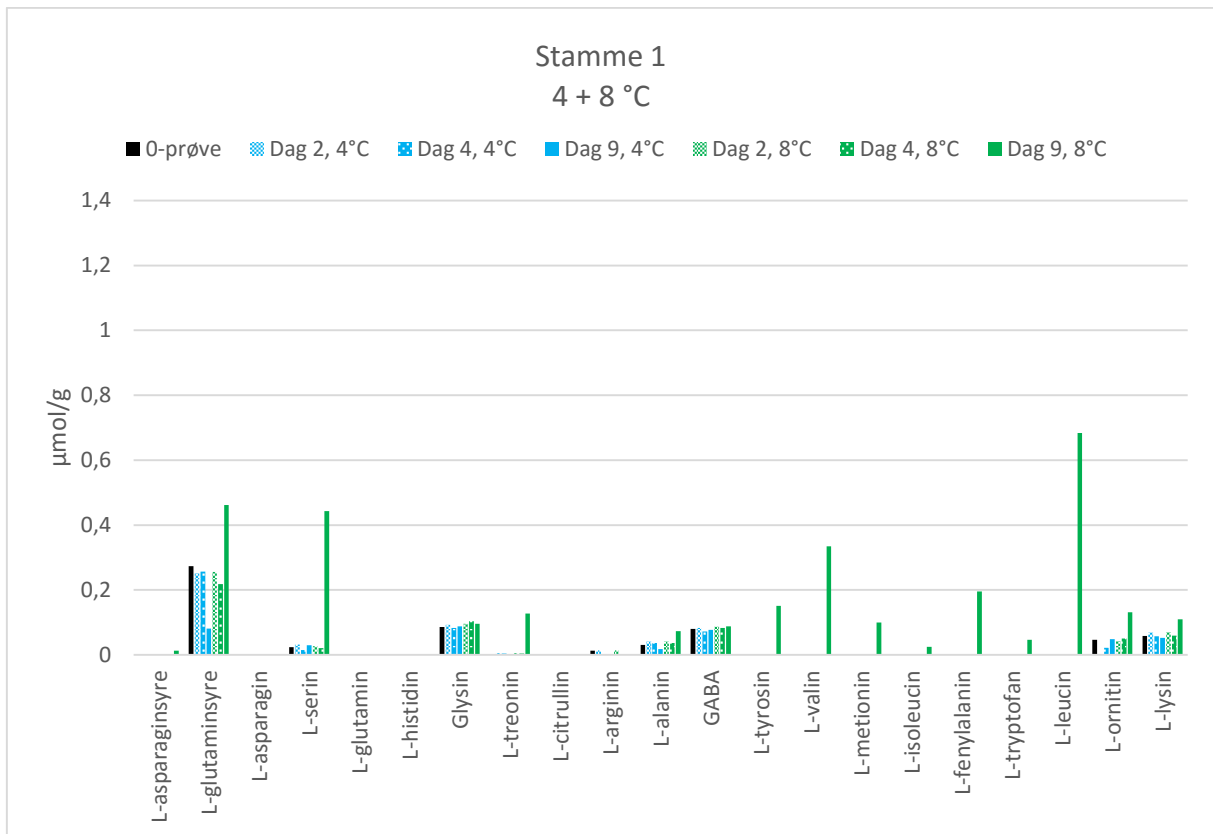
For alle stammer, med unntak av stamme 12, ble det registrert klumpdannelse og melken hadde skilt seg ved 22 °C etter 9 dagers lagring, der dannelse av en fast gel ble observert i melken for et par av stammene. Ved 4 og 8 °C ble det ikke observert dannelse av gel som ved 22 °C etter 9 dager. Ved 8 °C ble klumpdannelse og/eller økt viskositet observert for alle stammene etter 9 dager, unntatt stamme 12. Lukten av UHT-melk lagret ved 22 °C ble beskrevet som uren, fruktig og harsk, med spesielt vond lukt av stamme 26 og B etter 9 dager. De samme vonde luktene ble ikke registrert i UHT-melk lagret ved 4 og 8 °C over 9 dagers lagring.

3.3 Kjemiske analyser

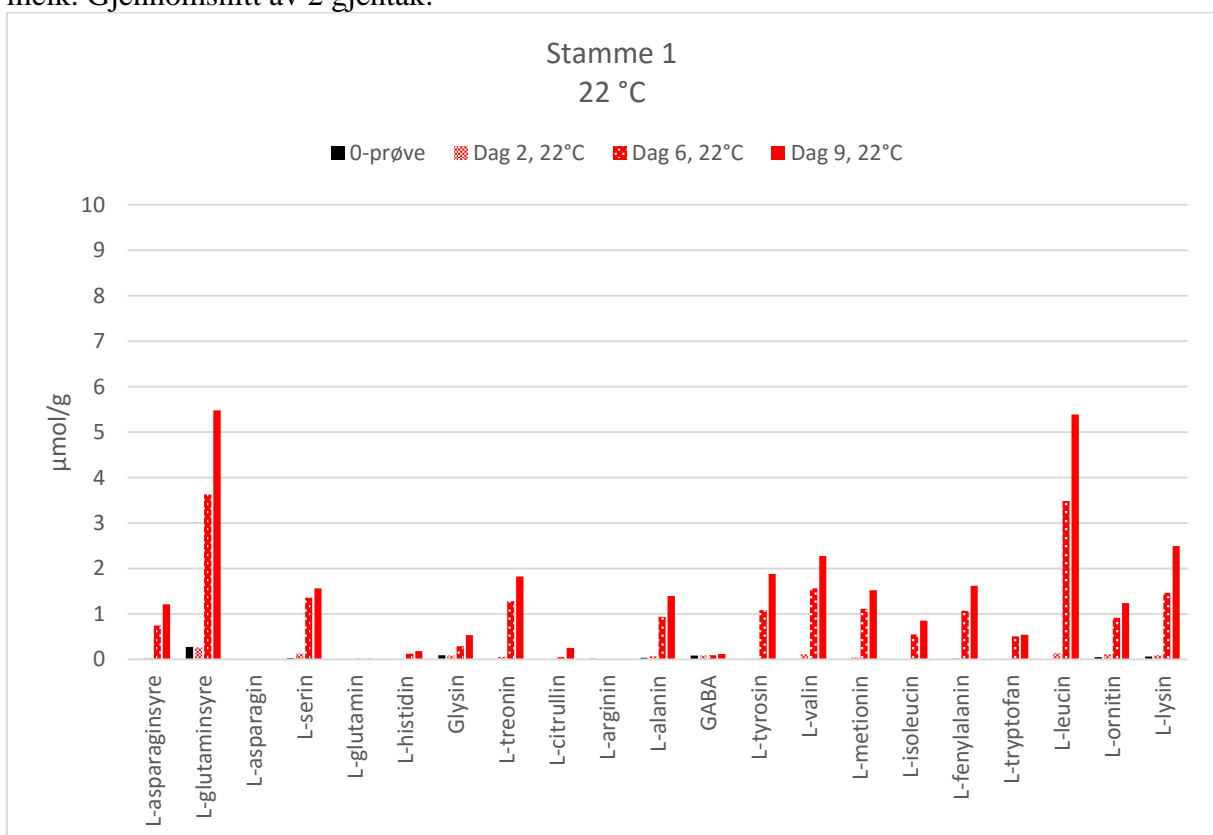
De kjemiske analysene HPLC, til kvantifisering av aminosyrer, og CE, til peptid- og proteinnedbrytning, ble kjørt på utvalgte prøver fra vekstforsøk 2 og 3 av de 8 stammene dyrket i UHT-melk ved 4, 8 og 22 °C. Det ble valgt å kun bruke prøver fra vekstforsøk 2 og 3, da vekstforsøk 1 ga fravikende resultater i vekstforsøket på noen områder. Ved å bruke prøver kun fra 2 av 3 delforsøk ble det i tillegg mulig å analysere flere uttak per delforsøk, enn om prøver fra alle 3 delforsøk hadde blitt benyttet. Totalt 145 prøver ble kjørt per kjemiske analysemetode, regnet med blindprøve fra upodet melk.

3.3.1 Kvantifisering av frie aminosyrer ved bruk av HPLC

Det ble på HPLC kjørt kvantifisering av frie aminosyrer på de 8 utvalgte stammene. Resultater fra aminosyreanalyser for 21 aminosyrer er fremstilt i to stolpediagrammer per stamme, et for 4 og 8 °C og et for 22 °C, vist i **Figur 3.6-Figur 3.21**. Resultatene presenteres som gjennomsnitt av to gjentak. Det gjøres oppmerksom på at mengden frie aminosyrer ble funnet å være svært forskjellige mellom melk inkubert ved 4 og 8 °C og melk inkubert ved 22 °C. Y-aksene for de to stolpediagrammene ved ulike temperaturer er dermed forskjellige. For å kompensere for lave mengder frie aminosyre hos noen stammer er det også brukt ulike y-akseskalaer mellom stolpediagrammer ved samme temperatur.



Figur 3.6: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 1 ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.



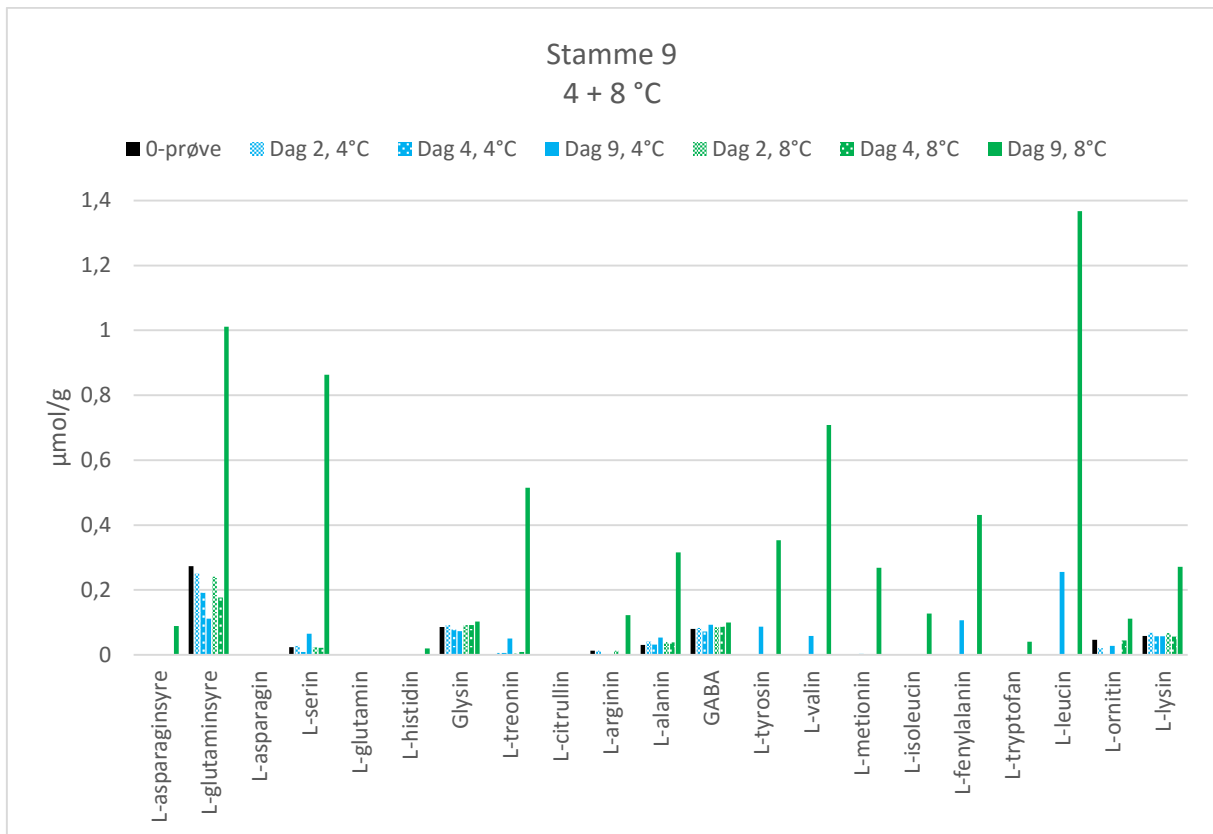
Figur 3.7: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 1 ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

Stamme 1

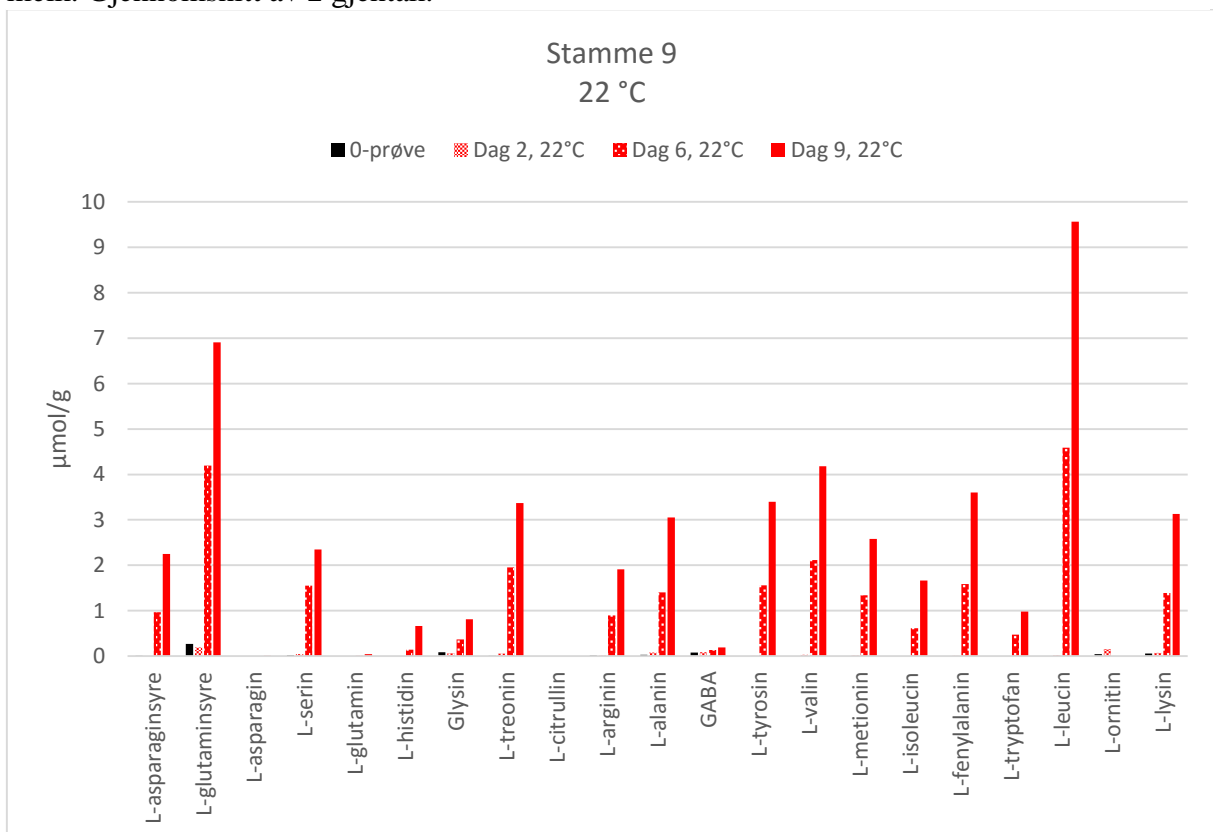
Svært få av aminosyrene analysert for ble detektert i den opprinnelige UHT-melken. Av de 21 aminosyrene analysert for, ble det observert verdier for L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-serin, glysin, L-treonin, L-arginin, L-alanin, GABA, L-ornitin og L-lysin.

Ingen økning i frie aminosyrer ble registrert ved 4 °C. Først etter 9 dager ved 8 °C ble det observert en økning i 13 av de 21 frie aminosyrene, deriblant L-glutaminsyre, L-serin, L-treonin, L-alanin, L-tyrosin, L-valin, L-metionin, L-isoleucin, L-fenylalanin, L-tryptofan, L-leucin, L-ornitin og L-lysin. Den største økningen skjedde hos L-leucin (0,684 µmol/g) > L-serin (0,420 µmol/g) > L-valin (0,335 µmol/g) > L-fenylalanin (0,195 µmol/g) > L-glutaminsyre (0,189 µmol/g). For L-glutaminsyre og L-alanin skjedde det derimot en reduksjon av aminosyrekonsentrasjonen ved 4 °C etter 9 dager.

Økningen av frie aminosyrer ved 22 °C fulgte en noe lignende trend som ved 8 °C etter 9 dager, bare med høyere verdier og tidligere økning ved 22 °C. Ingen spesiell økning ble observert etter 2 dagers lagring sammenlignet med 0-prøve, med unntak av en svak økning for L-valin og L-leucin. Ved dag 6 og 9 hadde de fleste aminosyrene økt i konsentrasjon, med størst økning etter 9 dager hos L-leucin (5,389 µmol/g) > L-glutaminsyre (5,210 µmol/g) > L-lysin (2,549 µmol/g) > L-valin (2,271 µmol/g) > L-tyrosin (1,881 µmol/g).



Figur 3.8: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 9 ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.



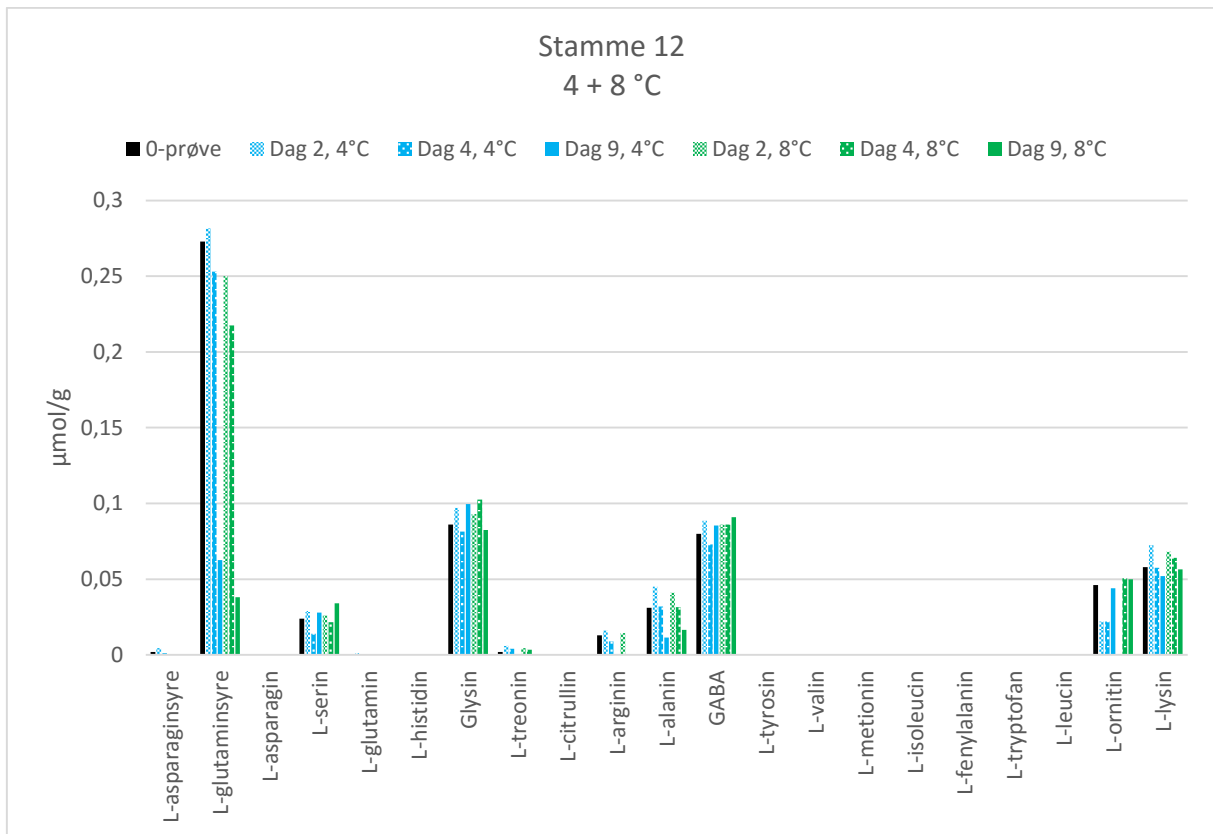
Figur 3.9: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 9 ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

Stamme 9

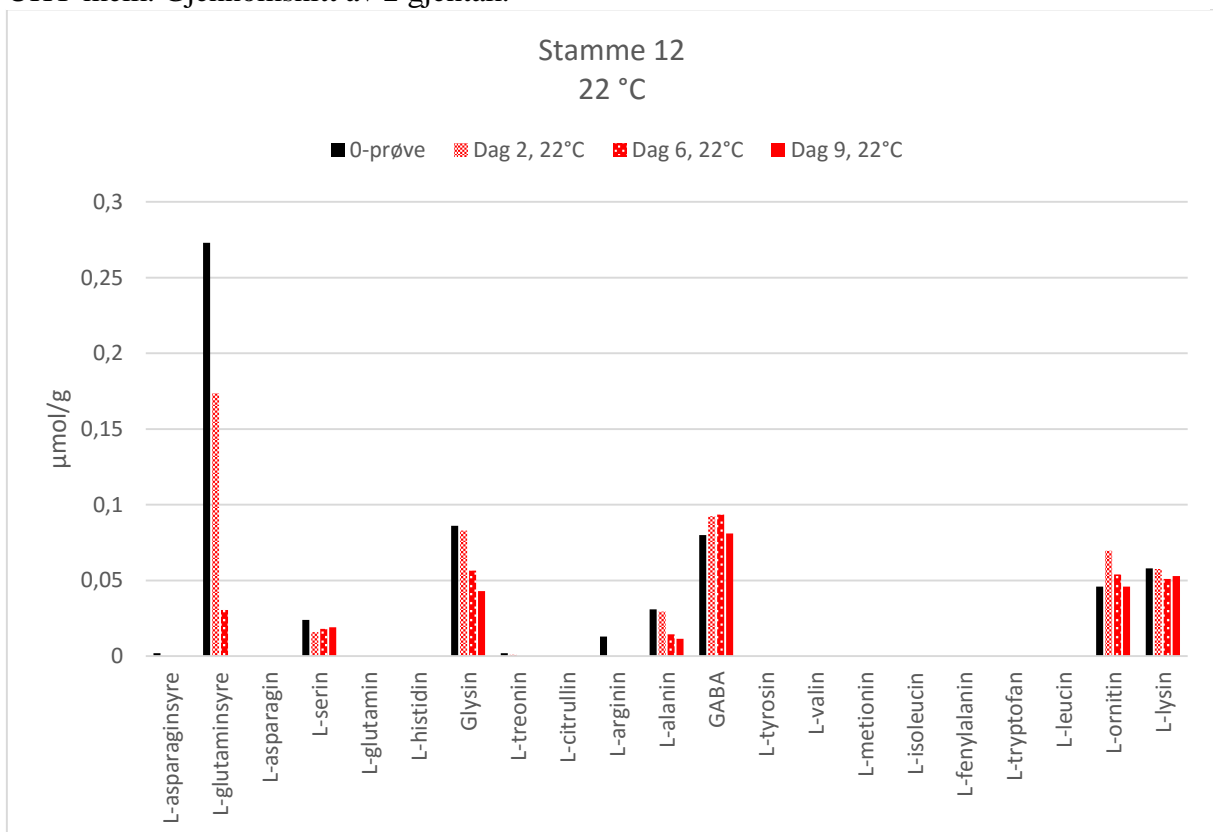
Ingen økning i mengde frie aminosyrer ble observert frem til dag 4 ved 4 og 8 °C. Ved dag 9 kunne det observeres en økning ved både 4 og 8 °C, men i ulik grad. Ved 4 °C, dag 9, skjedde en økning hos 8 av 21 aminosyrer, med størst økning hos L-leucin (2,556 µmol/g) > L-fenylalanin (0,107 µmol/g) > L-tyrosin (0,087 µmol/g) > L-valin (0,059 µmol/g) > L-treonin (0,050 µmol/g). Noe økning i frie aminosyrer ved 4 °C, dag 9, så også ut til å forekomme for L-serin, L-alanin og L-ornitin. Ved 8 °C skjedde en økning hos langt flere aminosyrer, 16 av 21, med størst økning hos L-leucin (1,368 µmol/g) > L-glutaminsyre (0,738 µmol/g) > L-serin (0,840 µmol/g) > L-valin (0,780 µmol/g) > L-treonin (0,515 µmol/g).

Ved dag 2, 22 °C, skjedde det lite endringer i mengde frie aminosyrer i forhold til 0-prøve. Først ved dag 6 og 9 økte nivået hos de aller fleste frie aminosyrene betraktelig, med unntak av L-asparagin, L-glutamin, L-citrullin og L-ornitin. L-glutamin og GABA økte så vidt ved dag 9. Størst økning ved dag 9 ble sett hos L-leucin (9,564 µmol/g) > L-glutaminsyre (6,634 µmol/g) > L-valin (4,181 µmol/g) > L-fenylalanin (3,603 µmol/g) > L-tyrosin (3,396 µmol/g).

En sammenligning av forholdet mellom aminosyreprofilen for dag 9 ved 8 og 22 °C indikerte en ganske lik profil. Det skjedde en økning i frie aminosyrer hos nesten like mange aminosyrer ved 8 og 22 °C, dag 9, og økningen var høyest for mange av de samme typen aminosyrer. Forskjeller lå i at blant annet L-ornitin økte ved 8 °C og ikke ved 22 °C.



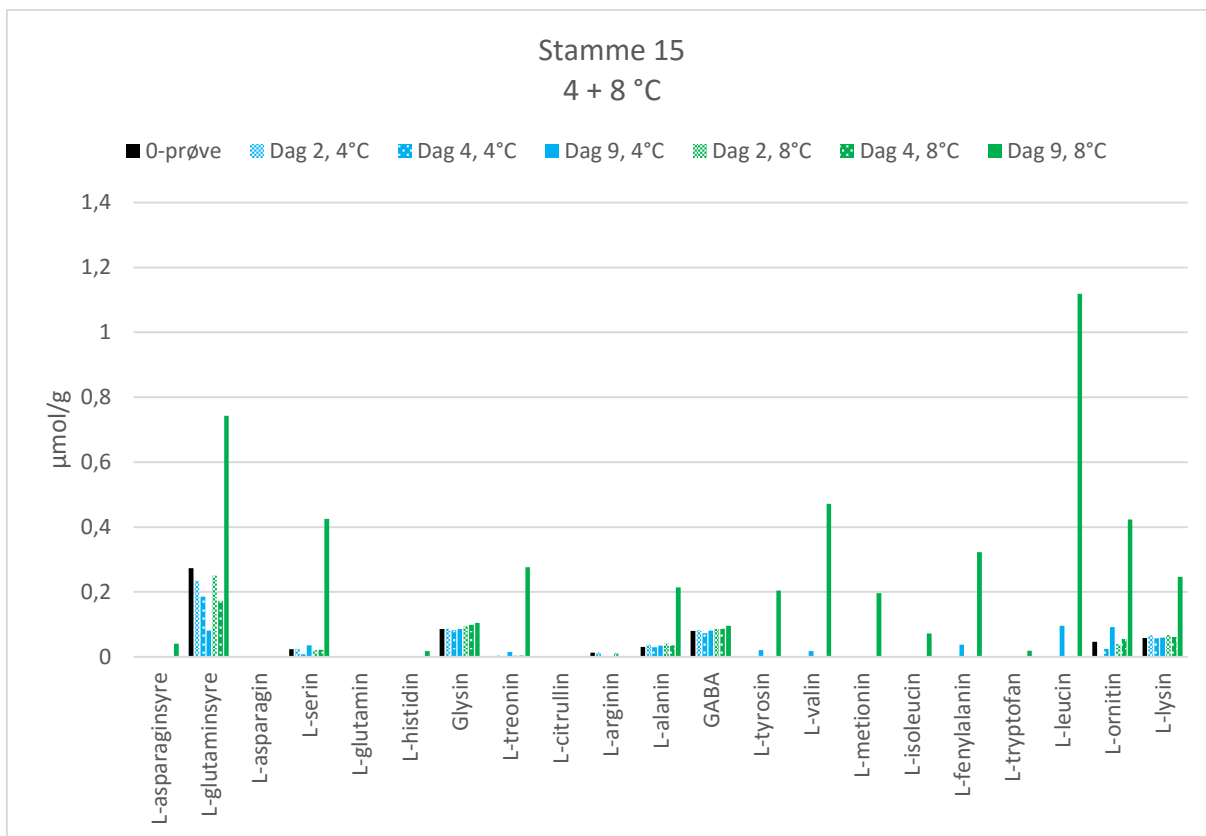
Figur 3.10: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 12 ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.



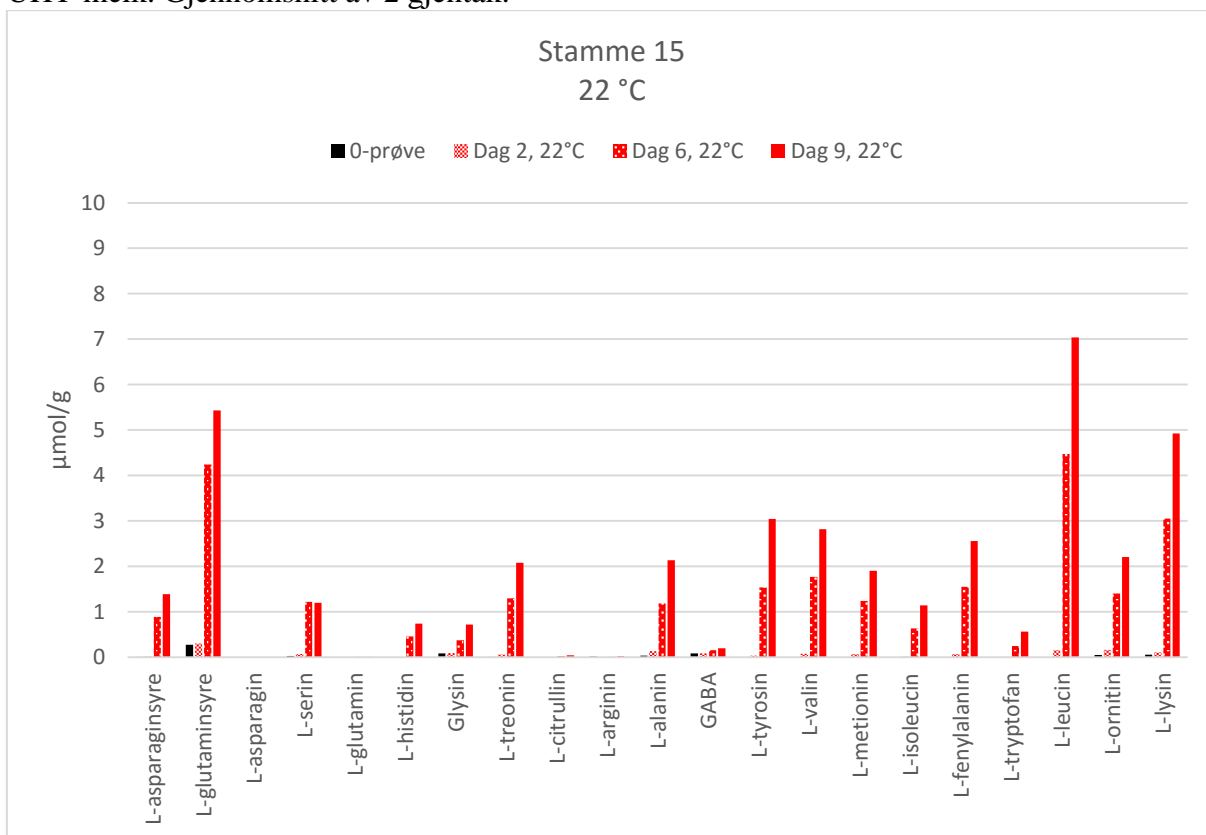
Figur 3.11: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 12 ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

Stamme 12

Stamme 12 viste tilnærmet ingen økning i frie aminosyrer ved verken 4, 8 eller 22 °C. En reduksjon i mengden L-glutaminsyre og L-alanin ble derimot registrert ved alle tre temperaturer, i tillegg til en reduksjon av glysin ved 22 °C. Ved 4 og 8 °C lå nivået for L-ornitin lavere enn 0-prøve ved dag 2 og 4, for deretter å øke til nivå rundt 0-prøve igjen etter 9 dager. Sett bort fra disse endringene forholdt nivåene av frie aminosyrer seg relativt konstant sammenlignet med mengder målt i 0-prøve.



Figur 3.12: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 15 ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.



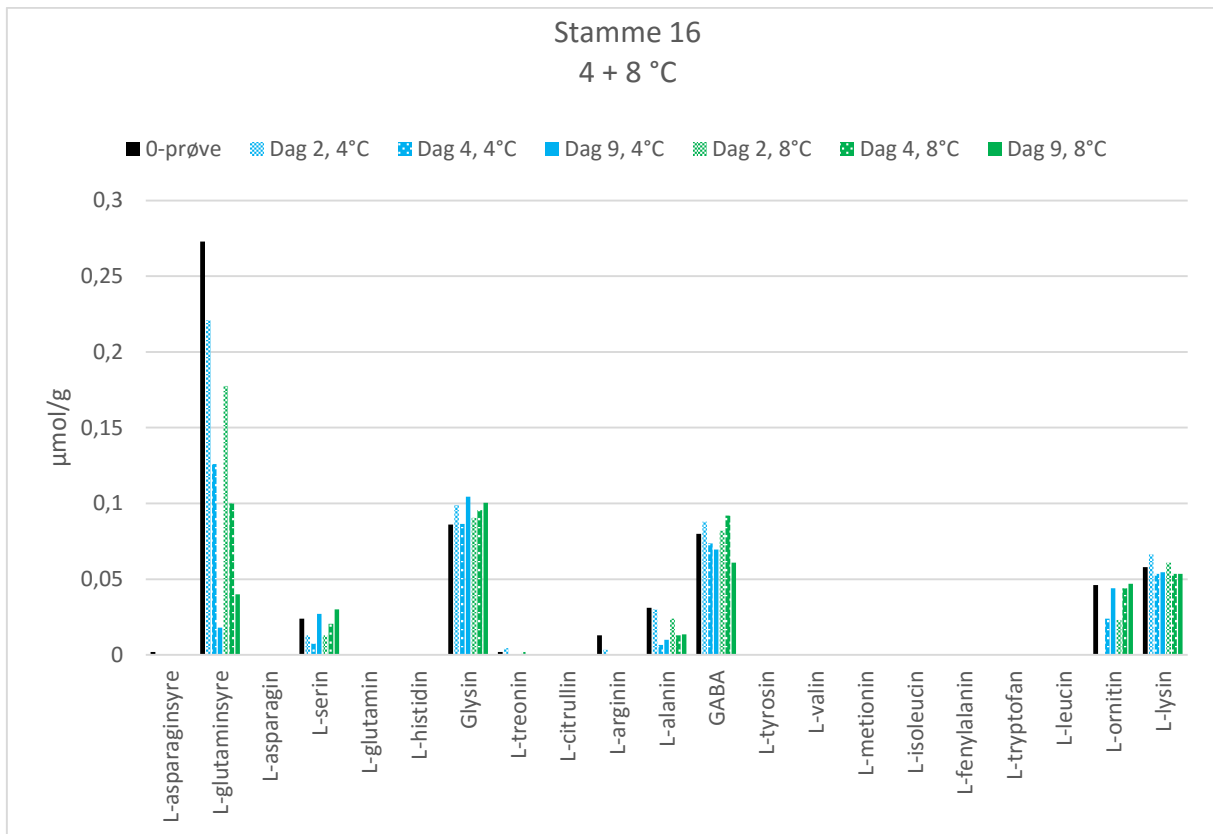
Figur 3.13: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 15 ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

Stamme 15

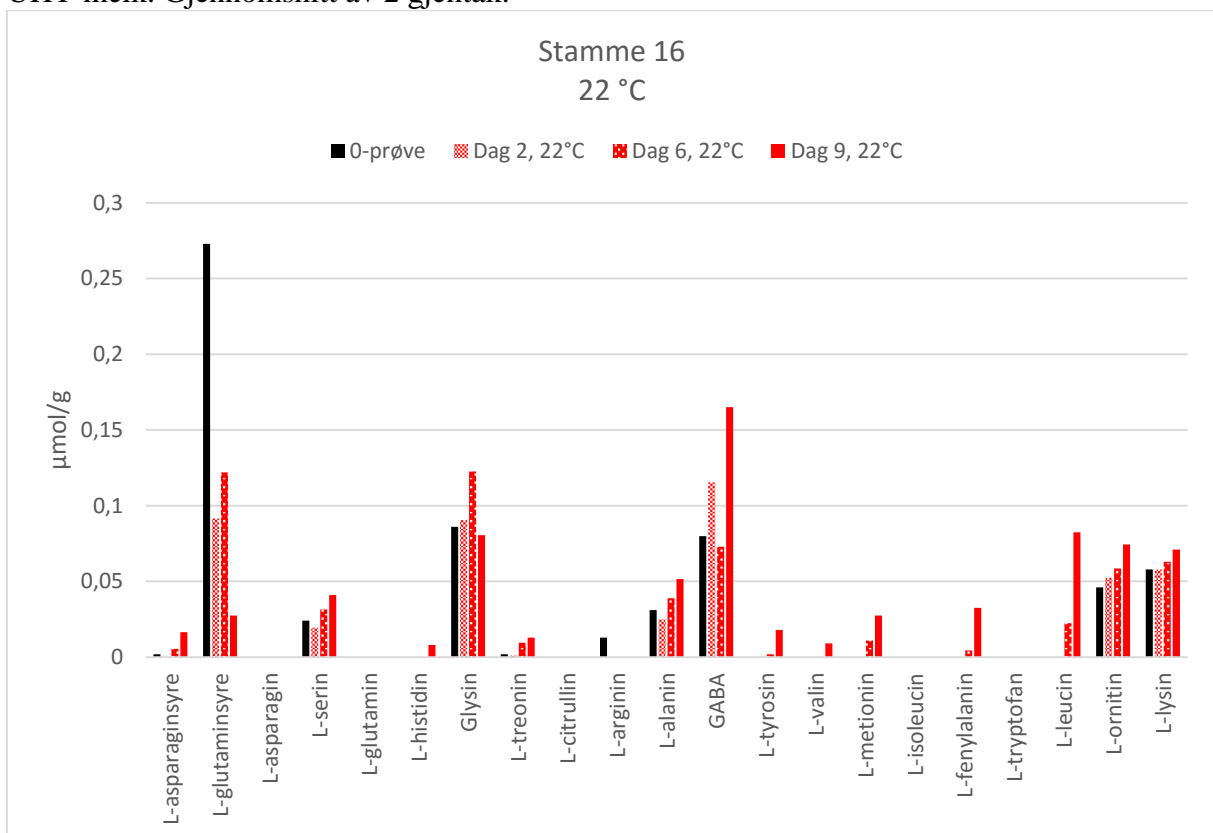
Ved 4 og 8 °C ble ingen økning observert i frie aminosyrer hos stamme 15 ved dag 2 og 4, med unntak av L-ornitin ved 4 °C, som viste en liten økning ved dag 4. Først ved dag 9 økte mengden frie aminosyrer ved både 4 og 8 °C, med størst økning ved 8 °C. Ved 4 °C, dag 9, ble det observert økning i frie aminosyrer hos 6 av 21 aminosyrer, med størst økning hos L-leucin (0,096 µmol/g) > L-ornitin (0,046 µmol/g) > L-fenylalanin (0,038 µmol/g) > L-tyrosin (0,021 µmol/g) > L-valin (0,018 µmol/g). Hos 7 av 21 aminosyrer ble det observert en økning i frie aminosyrer ved 8 °C, dag 9, der størst økning ble registrert hos L-leucin (1,119 µmol/g) > L-valin (0,472 µmol/g) > L-glutaminsyre (0,470 µmol/g) > L-serin (0,425 µmol/g) > L-ornitin (0,423 µmol/g).

Mengder av frie aminosyrer ved 22 °C lå generelt en del høyere enn ved 4 og 8 °C. Det ble observert noe økning ved dag 2 hos L-treonin, L-alanin, L-tyrosin, L-valin, L-metionin, L-fenylalanin, L-leucin og L-ornitin. Ved dag 9 var økningen i frie aminosyrer størst hos L-leucin (7,037 µmol/g) > L-glutaminsyre (5,157 µmol/g) > L-lysin (4,868 µmol/g) > L-tyrosin (3,044 µmol/g) > L-valin (2,815 µmol/g). For kun tre aminosyrer, L-asparagin, L-glutamin og L-arginin, kunne det ikke detekteres noen økning ved 22 °C, dag 9.

En sammenligning av aminosyreutvikling for dag 9 ved 8 og 22 °C ga et relativt likt bilde. De skilte seg fra hverandre kun med tanke på L-tyrosin og L-valin og med L-ornitin og L-lysin i forholdet til hvilke av stolpene som var høyest.



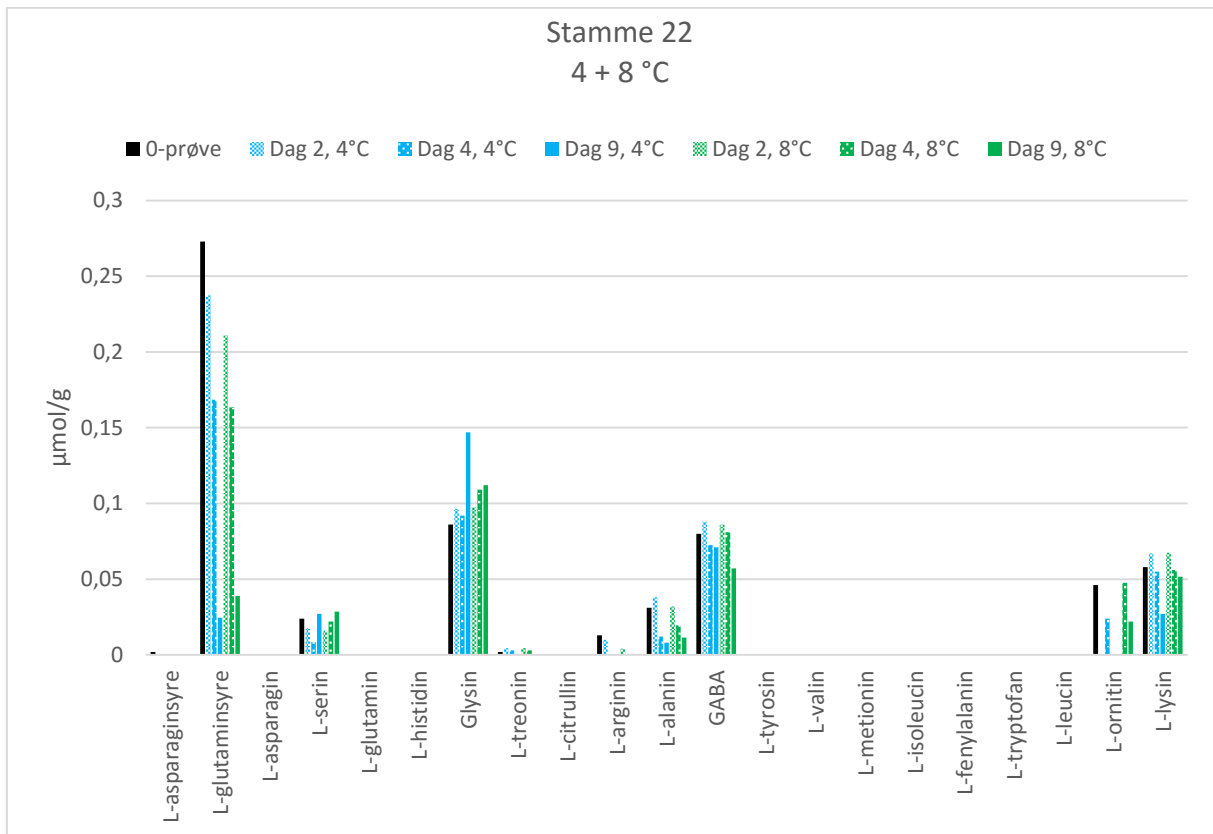
Figur 3.14: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 16 ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.



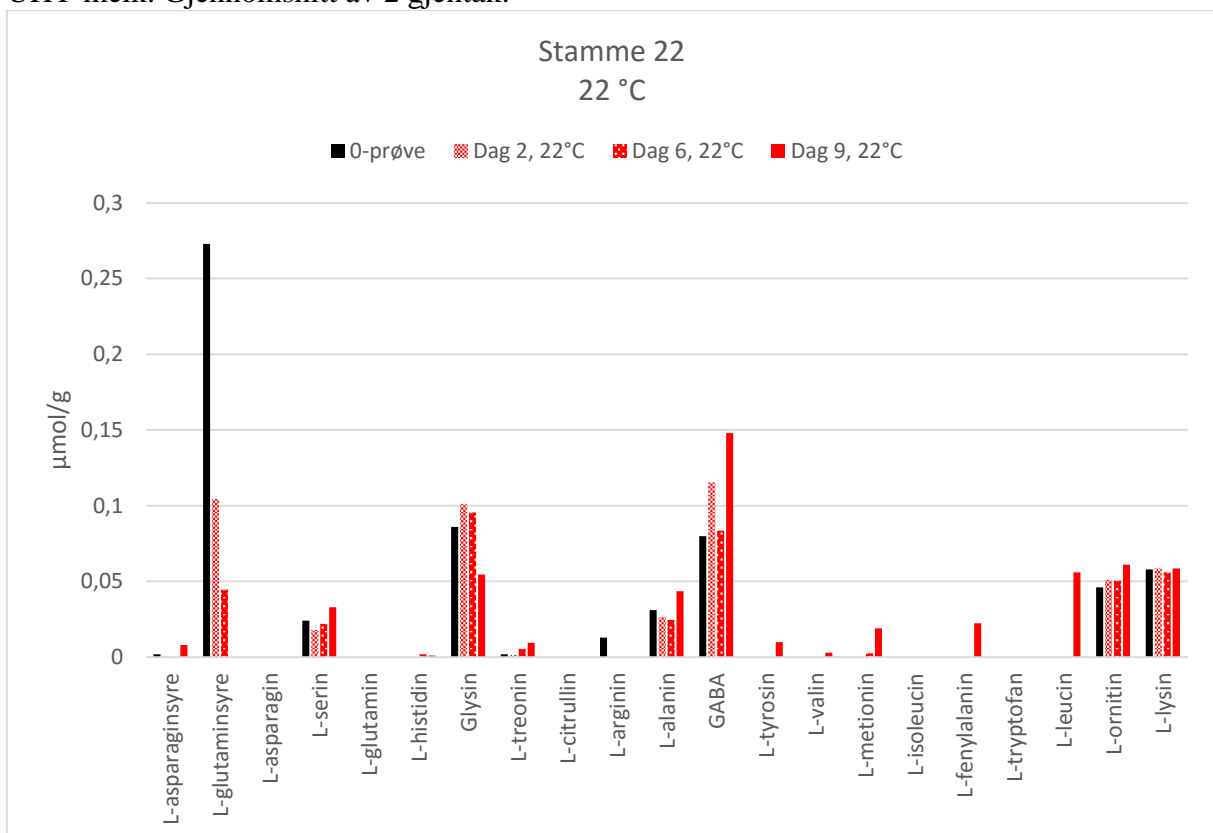
Figur 3.15: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 16 ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

Stamme 16

Med unntak av L-ornitin kunne ingen økning observeres i mengden frie aminosyrer for stamme 16 ved 4 og 8 °C. Ved 22 °C kunne det se ut til å ha skjedd en økning i aminosyrene GABA og L-leucin ved dag 9 til henholdsvis 0,085 µmol/g og 0,083 µmol/g, i tillegg til små økninger hos de fleste aminosyrer, med unntak av L-asparagin, L-glutamin, L-isoleucin og L-tryptofan. Økningen var likevel svak, da y-aksene er lave i **Figur 3.14** og **Figur 3.15**. En reduksjon i frie aminosyrer i forhold til opprinnelig mengde i melk ble sett hos L-glutaminsyre ved alle temperaturer og hos L-alanin ved 4 og 8 °C.



Figur 3.16: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 22 ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

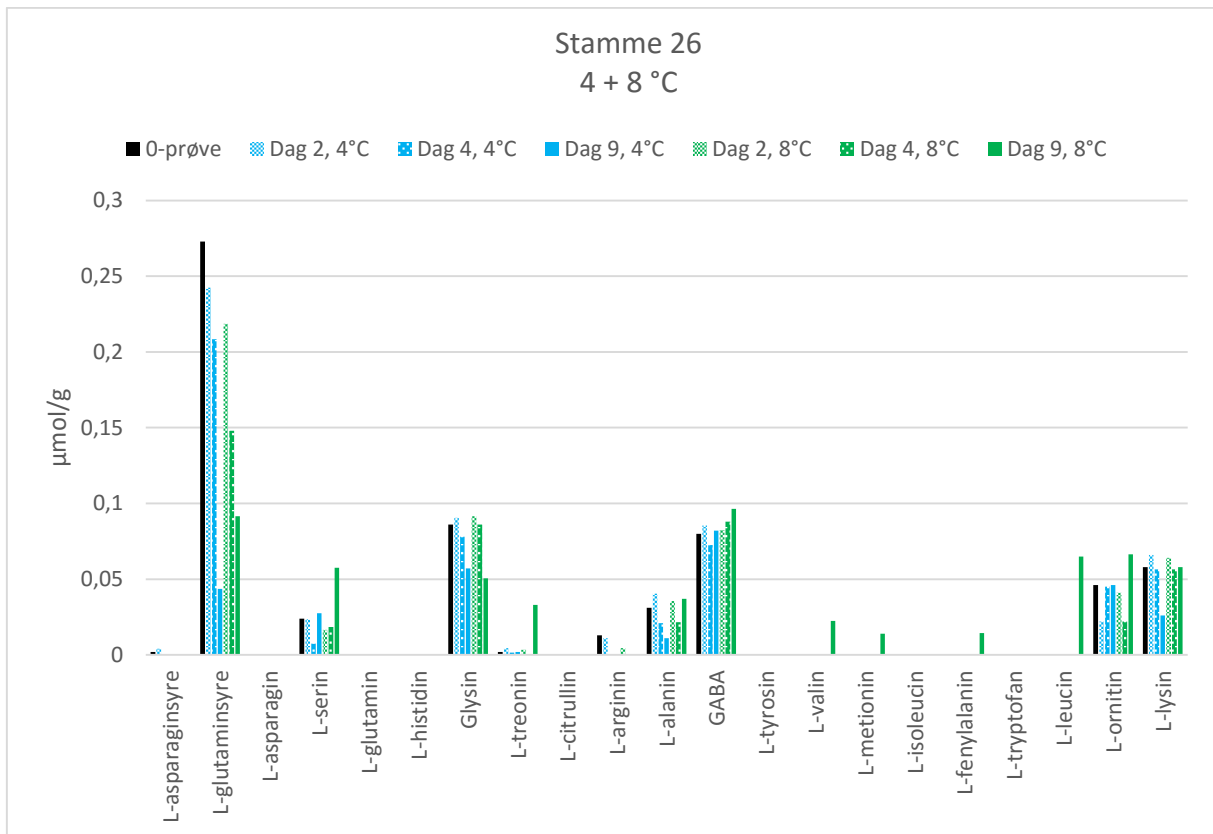


Figur 3.17: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 22 ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

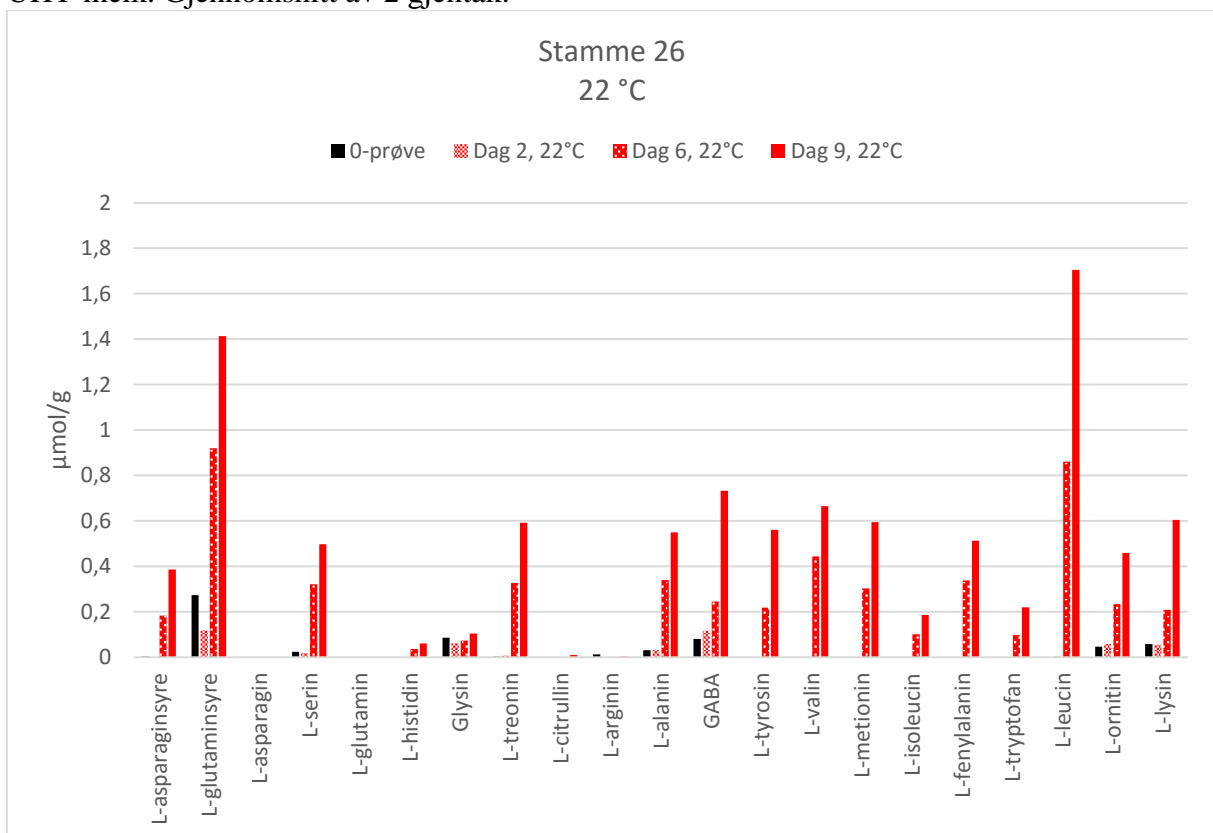
Stamme 22

Ingen økning i mengden frie aminosyrer kunne observeres ved 4 og 8 °C for stamme 22, med unntak av en økning ved 4 °C, dag 9, for glysin til 0,061 µmol/g. Økningen i glysin gjenspeilet seg derimot ikke ved 8 eller 22 °C. Økningen var likevel svak, da inndelingen av y-aksen er lav i **Figur 3.16**

Ved 22 °C ble en liten økning i aminosyrene GABA og L-leucin ved dag 9 observert, i tillegg til noe svakere økning for flere av de andre aminosyrene. Økningen var her også svak, da inndelingen av y-aksen er svært lav i **Figur 3.17**. Det så ut til å ha skjedd nesten like lite ved 22 °C som ved 4 og 8 °C. En reduksjon i frie aminosyrer fra opprinnelig mengde i melk kunne ses hos L-glutaminsyre ved alle temperaturer og hos L-alanin, GABA, L-ornitin og L-lysin ved 4 og 8 °C og glysin ved 22 °C.



Figur 3.18: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 26 ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

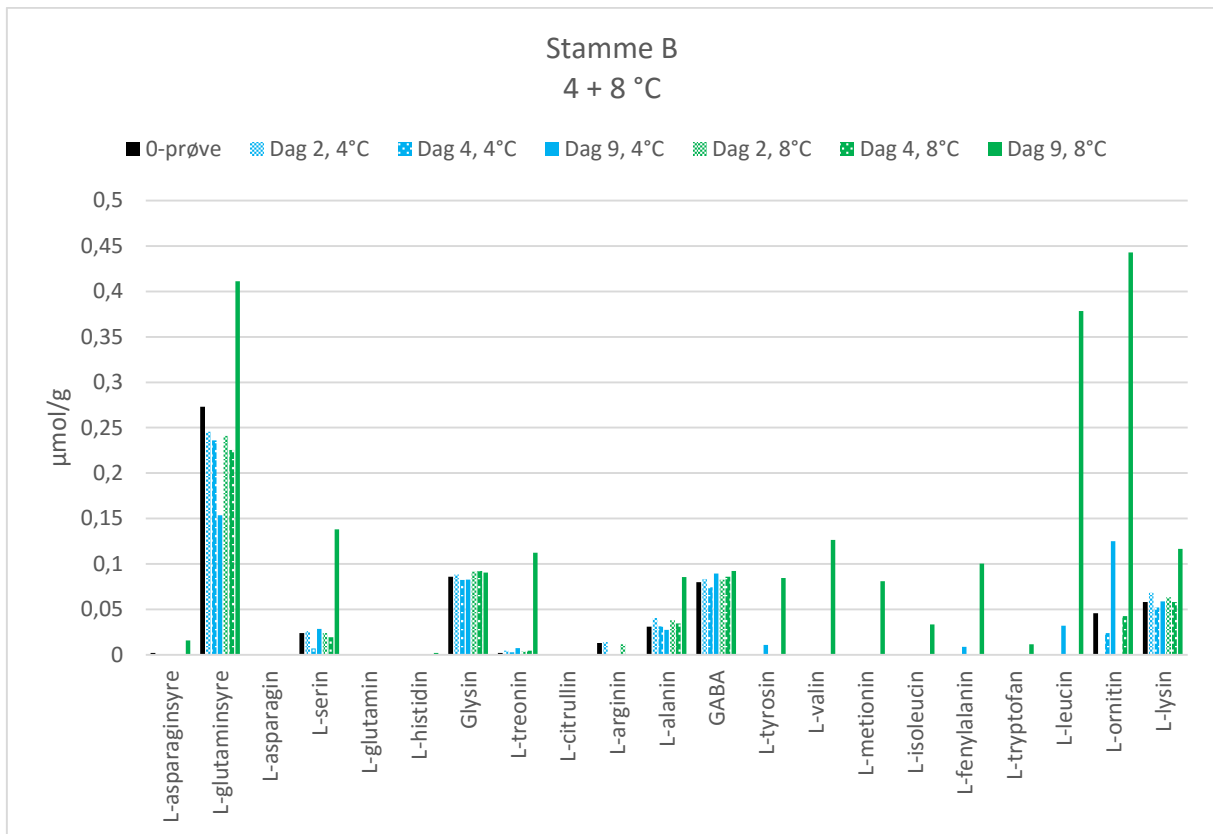


Figur 3.19: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme 26 ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

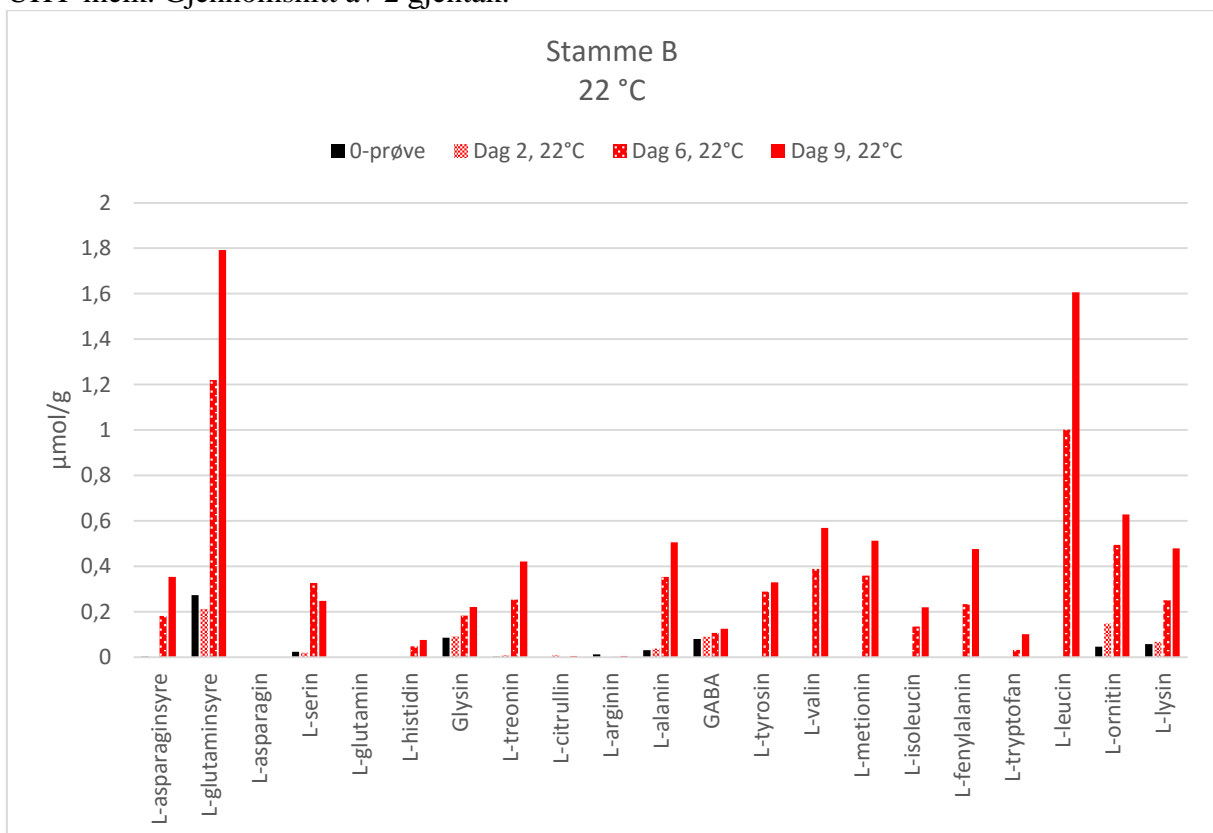
Stamme 26

For stamme 26 ved 4 og 8 °C hadde den eneste økningen i mengde frie aminosyrer skjedd ved 8 °C, dag 9. Her skjedde en økning hos aminosyrene L-serin, L-treonin, GABA, L-valin, L-metionin, L-fenylalanin og L-leucin, men økningen var svak og lå i området 0,015-0,065 µmol/g. En reduksjon av L-glutaminsyre og glysin ble observert også ved 4 og 8 °C.

Ved 22 °C hadde det skjedd en svak, og jevnt over lik, økning hos de fleste aminosyrene ved dag 6 og 9, med unntak av L-asparagin, L-glutamin, glysin, L-citrullin og L-arginin, der ingen eller kun en liten økning ble observert. Den største økningen ble registrert for L-leucin med 1,705 µmol/g, etterfulgt av L-glutaminsyre med 1,141 µmol/g.



Figur 3.20: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme B ved 4 og 8 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.



Figur 3.21: Utvikling av mengde frie aminosyrer over tid for stamme B ved 22 °C i UHT-melk. Gjennomsnitt av 2 gjentak.

Stamme B

Stamme B viste lite eller ingen økning i mengden frie aminosyrer før ved 8 °C, dag 9, hvor 14 av 21 aminosyrer hadde økt. Økningen var her størst hos L-ornitin og L-leucin med henholdsvis 0,397 og 0,379 µmol/g og med jevnt over lik økning for de resterende 12 aminosyrene. En liten økning ved 4 °C kunne ses hos L-tyrosin, L-fenylalanin, L-leucin og L-ornitin ved dag 9, med størst økning hos L-ornitin på 0,079 µmol/g.

Ved 22 °C kunne ble det registrert økning i mengden frie aminosyrer ved både dag 6 og 9, med størst økning målt ved dag 9 for L-leucin og L-glutaminsyre med henholdsvis 1,607 og 1,519 µmol/g. Alle aminosyrer viste en svak økning, med unntak av L-asparagin, L-glutamin, L-citrullin og L-arginin, der ingen eller veldig svak økning ble observert. L-ornitin økte svakt ved dag 2.

Oppsummering kvantifisering av frie aminosyrer

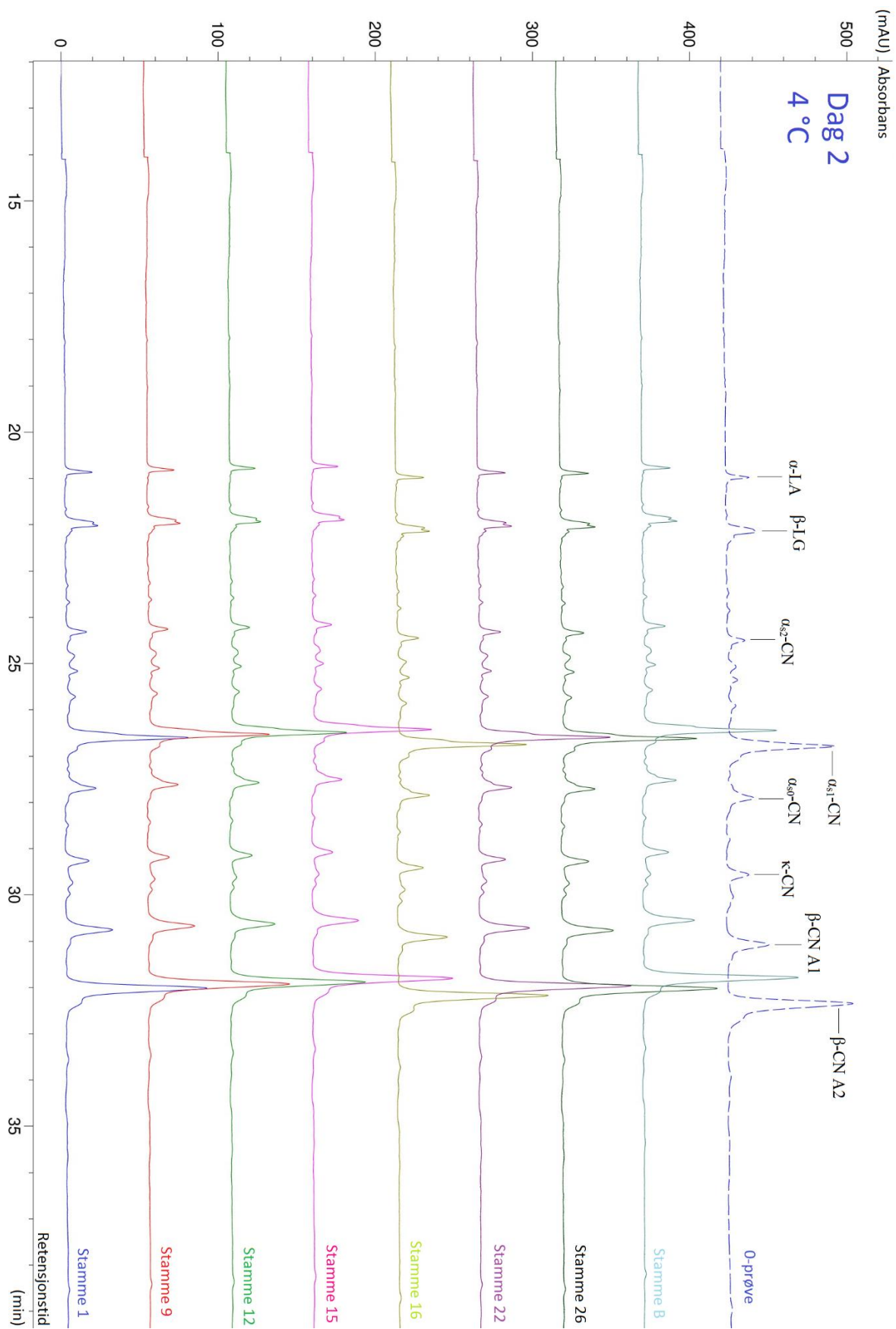
I UHT-melk inkubert med de 8 stammene var økningen i frie aminosyrer størst for stamme 9 ved alle temperaturer. Etter 9 dager, der økning ble registrert, økte L-leucin mest av aminosyrene ved alle temperaturer. Nivåene av L-leucin ved 8 °C, dag 9, var størst for stamme 9, med oppimot 1,4 µmol/g prøve. Ved 22 °C lå tilsvarende nivå for L-leucin på ~9,5 µmol/g prøve for stamme 9. Stamme 1 lignet på mange måter stamme 9 og 15 i aminosyreprofil, men stamme 1 viste ingen økning i frie aminosyrer ved 4 °C, noe stamme 9 og 15 viste. Stamme 12 viste så og si ingen tegn til økning i mengde frie aminosyrer. Kun en reduksjon av visse aminosyrer ble registrert, noe som tydet på at stammen hadde anvendt disse til vekst. Anvendelse av frie aminosyrer til vekst ble også sett hos de andre stammene ved 4 og 8 °C. Ved 22 °C var dette sjeldent synlig grunnet stor økning i frie aminosyrer. Stamme 16 og 22 hadde svært like profiler ved alle tre temperaturer og viste generelt liten endring i aminosyrekonsentrasjon. De få forskjellene mellom de to stammene lå i en økning i glycin for stamme 22 ved 4 °C, dag 9, og en minimal tendens hos stamme 16 til noe høyere nivåer av frie aminosyrer ved 22 °C, dag 6 og 9.

Stamme 26 skilte seg fra de andre stammene med en betydelig økning i aminosyren GABA ved dag 6 og 9, der det ble målt 0,652 µmol/g prøve ved dag 9. Stamme 26 viste i likhet med stamme 1 ingen tendens til å danne frie aminosyrer ved 4 °C, dag 9, kun ved 8 °C ved noe lavere verdier enn stamme 1. Stamme B delte til tross for lavere verdier av aminosyrer og et

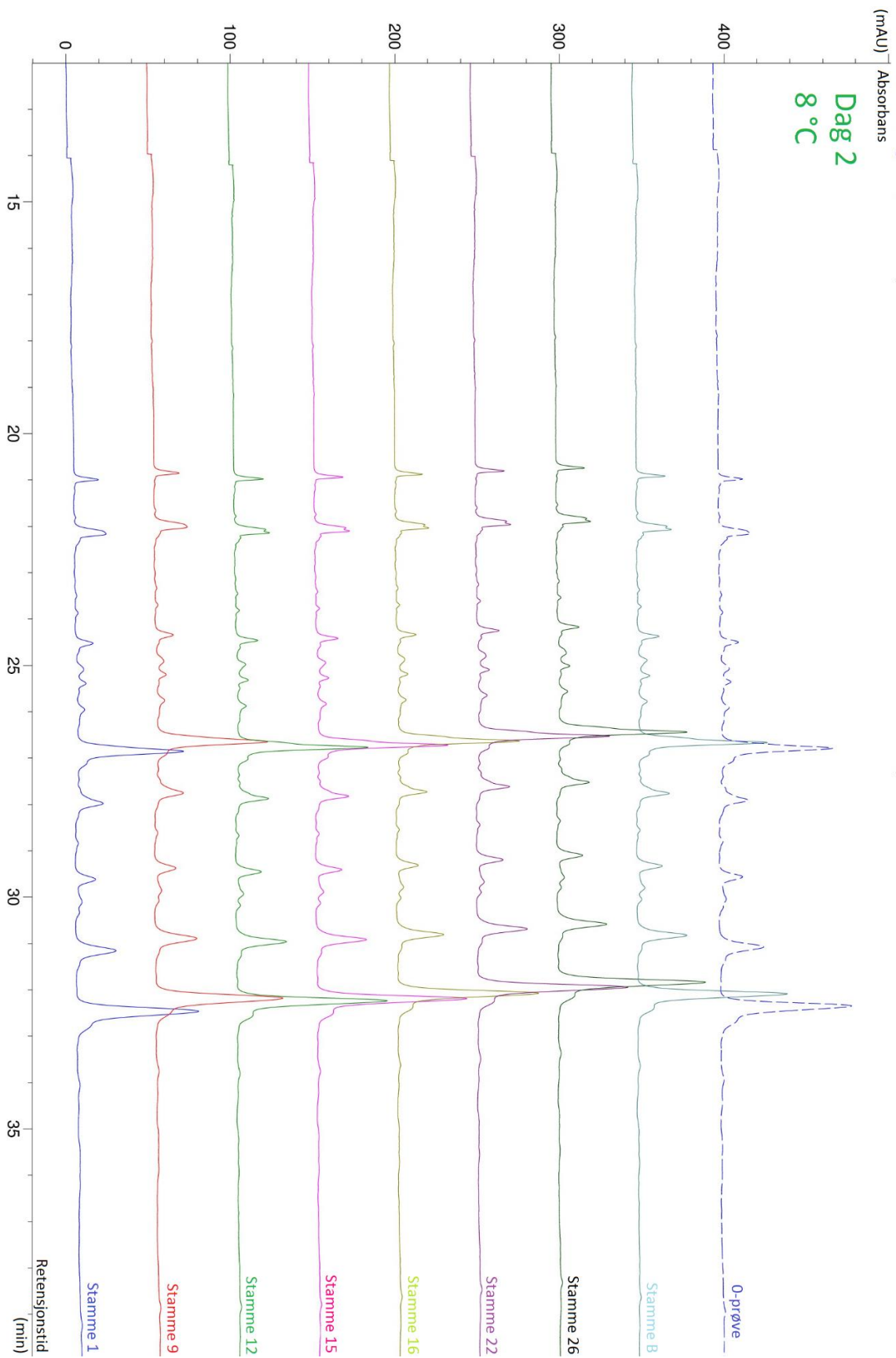
høyt nivå av L-ornitin, mange likhetstrekk med stamme 9 og 15. Ved sammenligning av aminosyreprofilene for stamme 1, 9, 15, 26 og B ved 22 °C ble det oppdaget mange likhetstrekk. Av disse hadde stamme 9 omsatt aminosyren L-ornitin fullstendig etter 6 og 9 dager, men var den eneste av de fem stammene med tilstedeværelse av L-arginin etter 6 og 9 dagers inkubasjon.

3.3.2 Kapillærelektroforese av peptid- og proteinnedbrytning

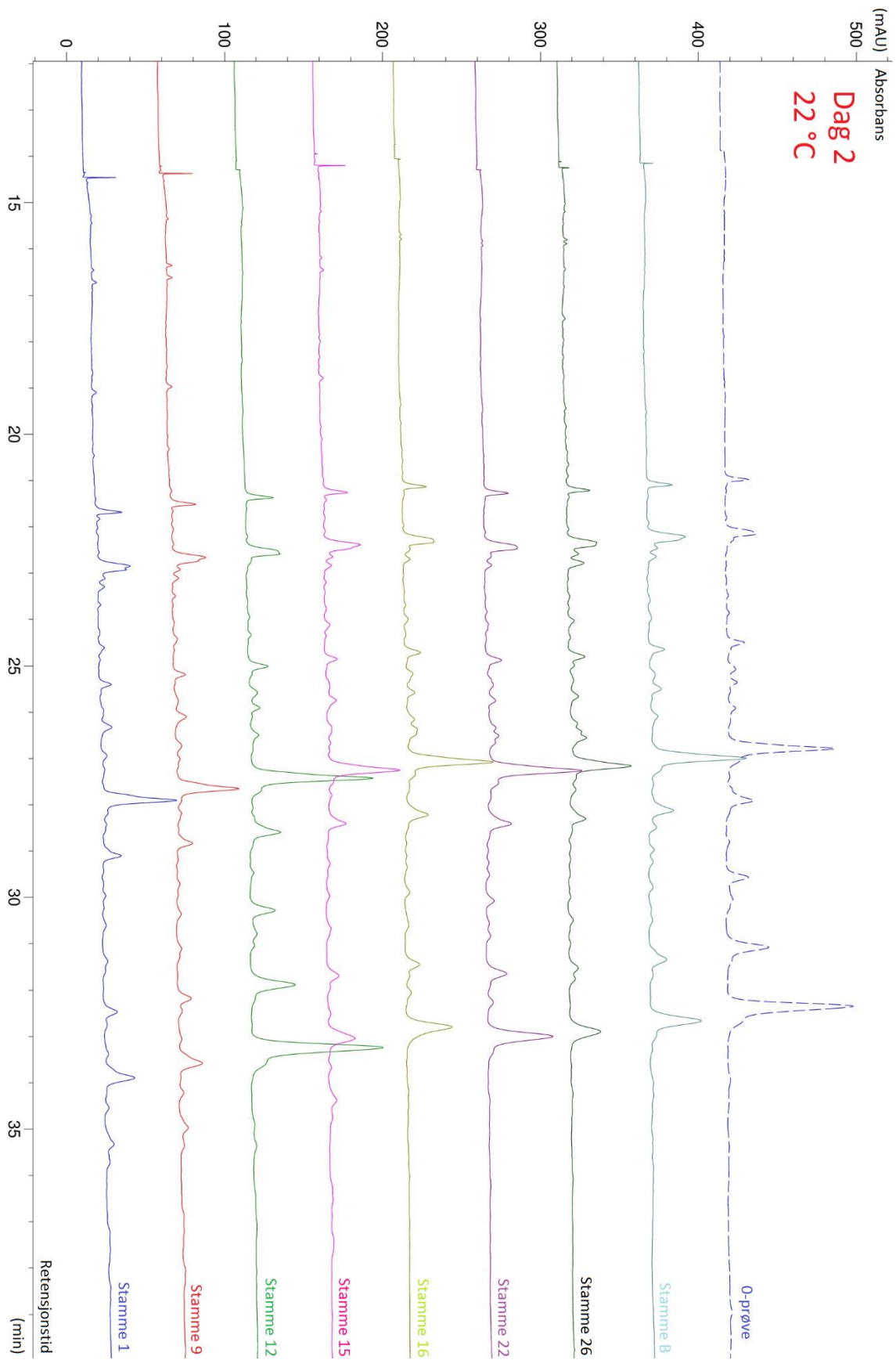
Peptid- og proteinnedbrytning som følge av enzymatisk nedbrytning av proteolytiske enzymer ble undersøkt ved hjelp av kapillærelektroforese. I **Figur 3.22-3.30** illustreres kapillærelektroferogram fra utvalgte prøver fra delforsøk 2. Elektroferogram for 0-prøvemelk er plassert øverst i alle figurer, men er kun med som illustrasjon på proteintopper tilstede i 0-prøven. Toppene i 0-prøven kan ikke sammenlignes med toppene i elektroferogrammene, da 0-prøven ikke ble analysert sammen med noen av de andre prøvene. Med unntak av 0-prøve har derimot resten av elektroferogrammene i hver figur blitt kjørt samtidig og kan sammenlignes. Stamme 12 kan derimot brukes som sammenligning i hver figur, da den ikke viser spesielt tegn til proteolytisk aktivitet og fungerer på den måten som kontrollprøve. Retensjonstid på x-aksen starter ikke ved 0 minutter, da det er zoomet inn på området av interesse. Det er zoomet likt inn på alle elektroferogrammene for å gi mulighet for sammenligning. Avstanden mellom elektroferogrammene er like.



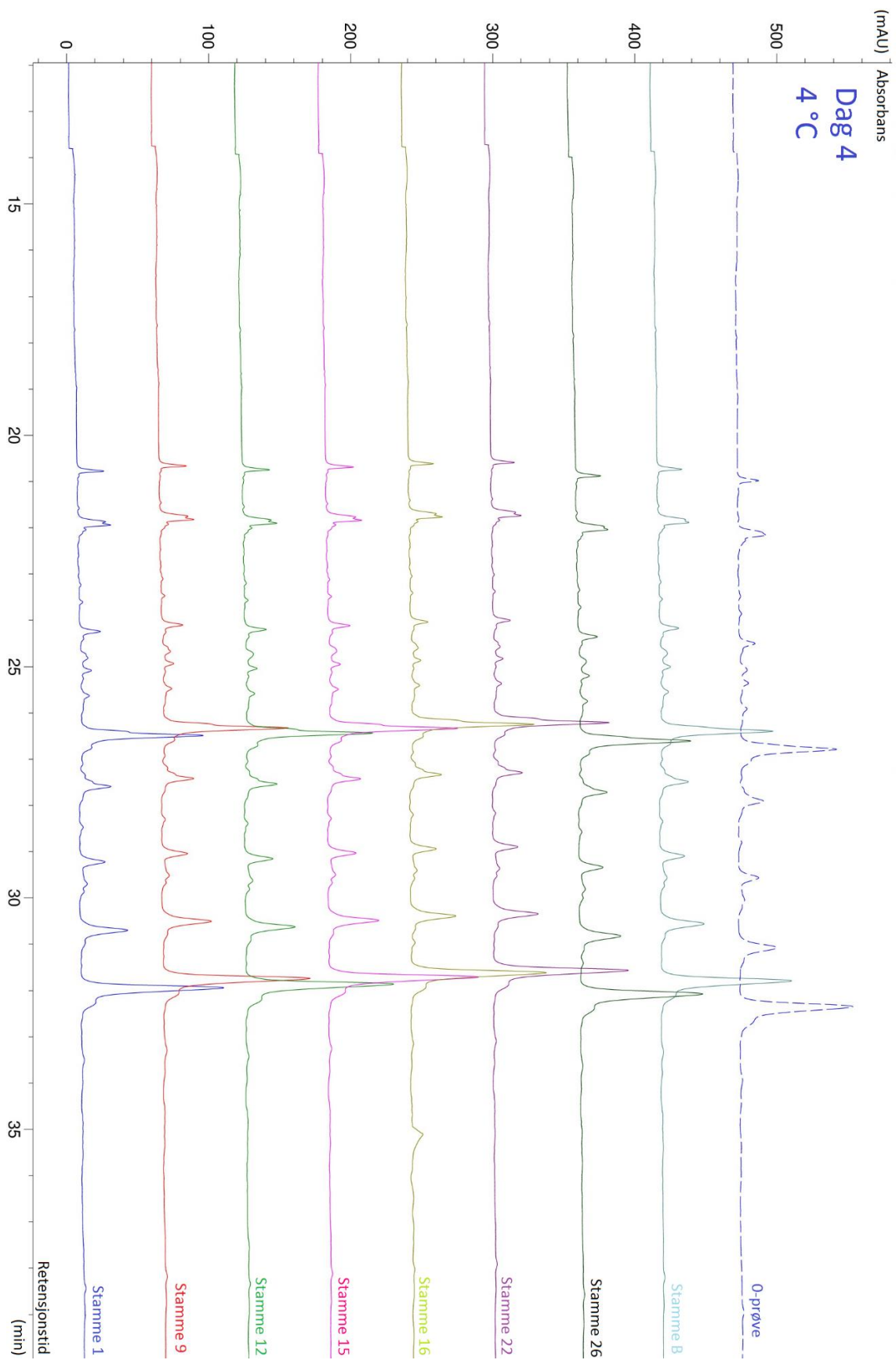
Figur 3.22: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 2 inkubert ved 4 °C i UHT-melk. Proteintoppene for 0-prøve er merket i henhold til Heck et al. (2008).



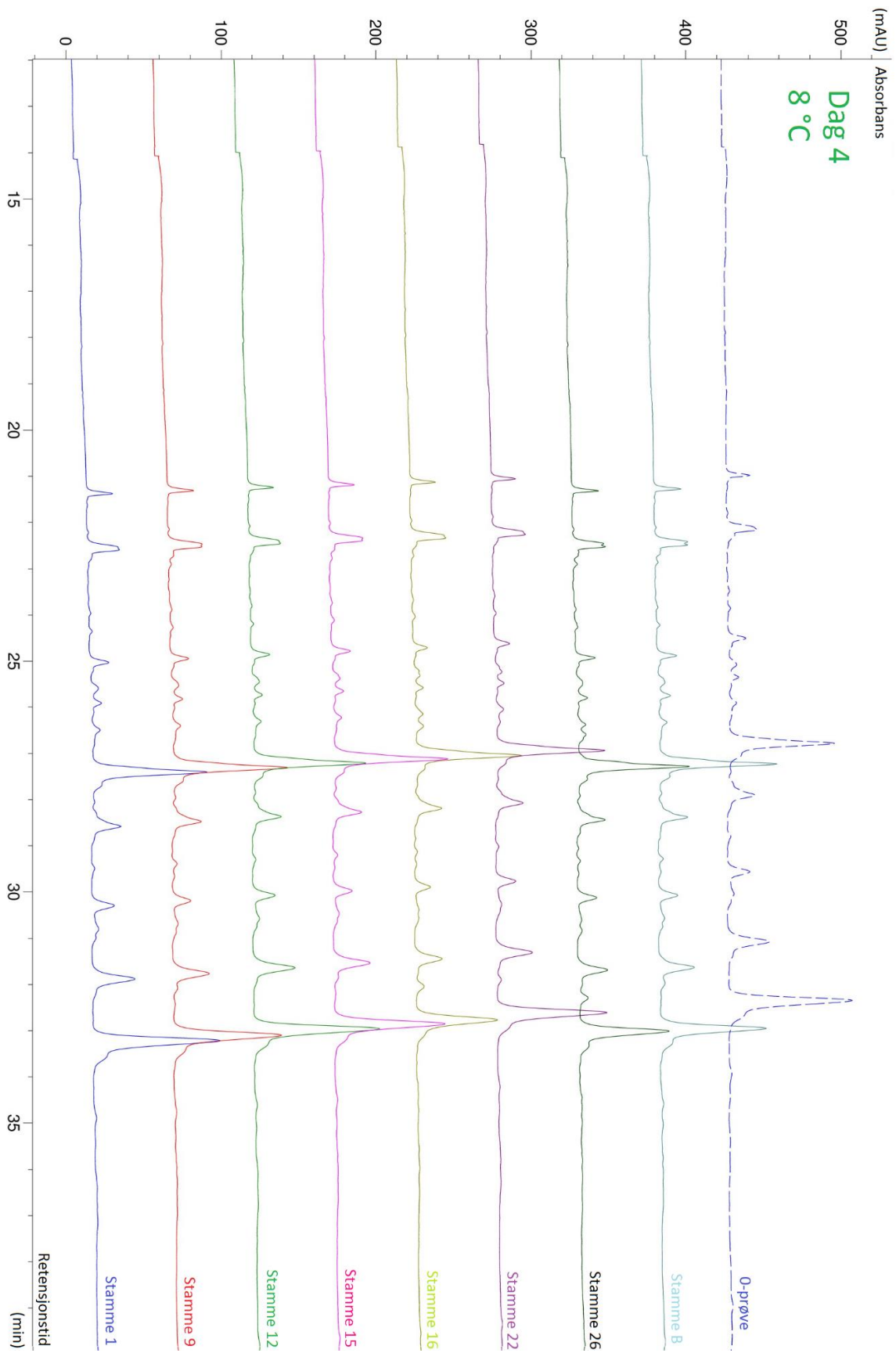
Figur 3.23: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 2 inkubert ved 8 °C i UHT-melk.



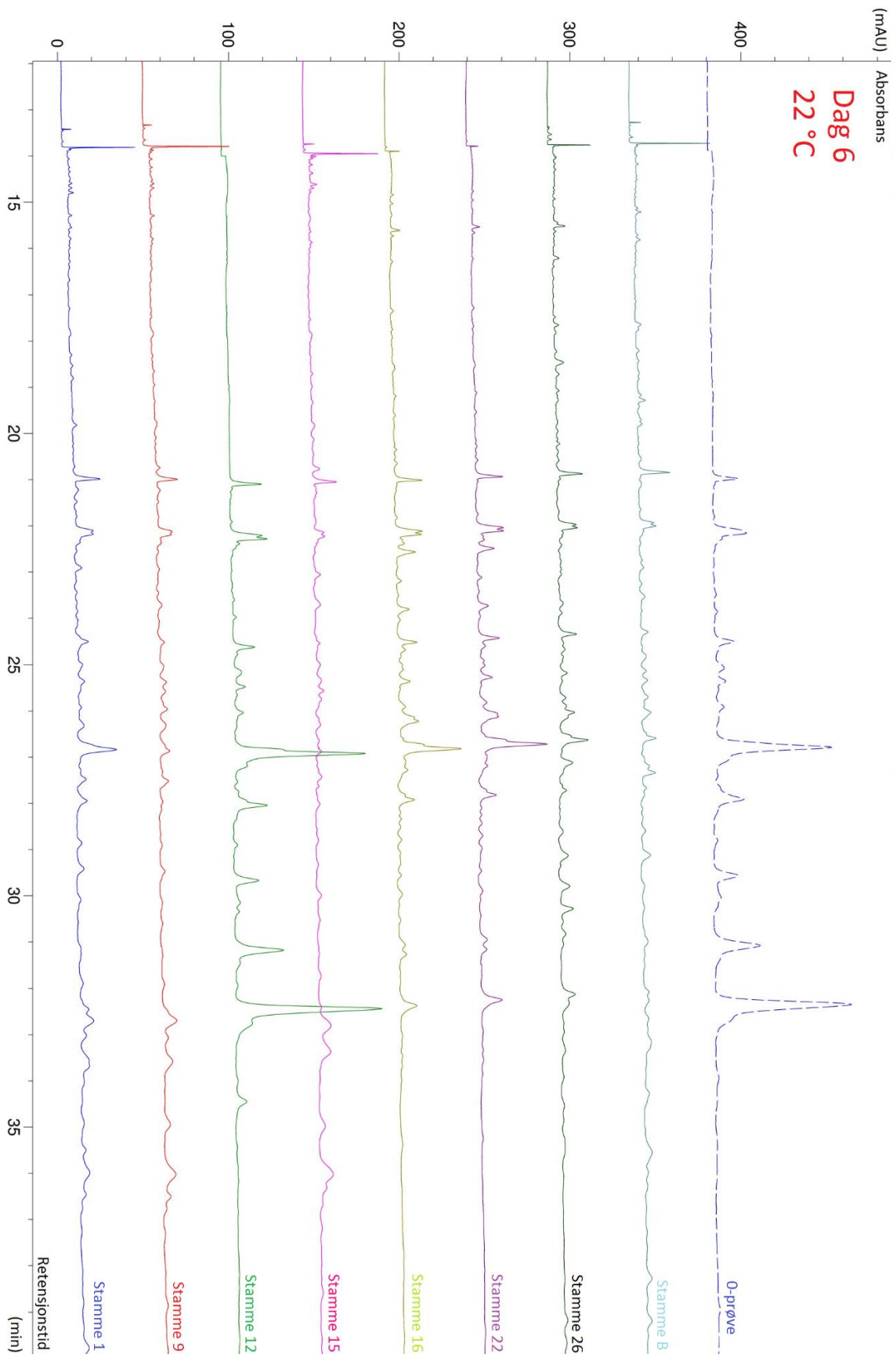
Figur 3.24: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 2 inkubert ved 22 °C i UHT-melk.



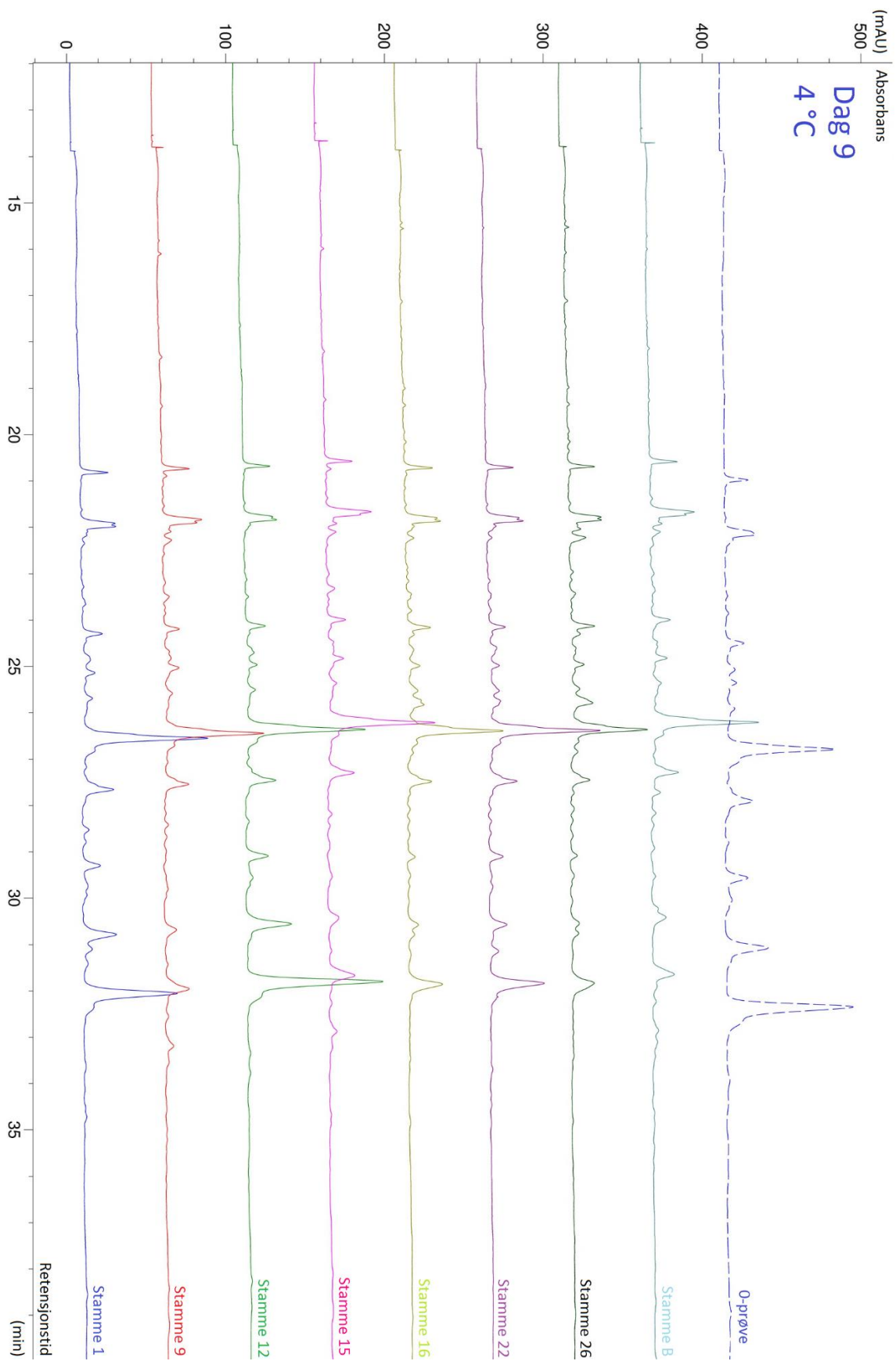
Figur 3.25: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 4 inkubert ved 4 °C i UHT-melk.



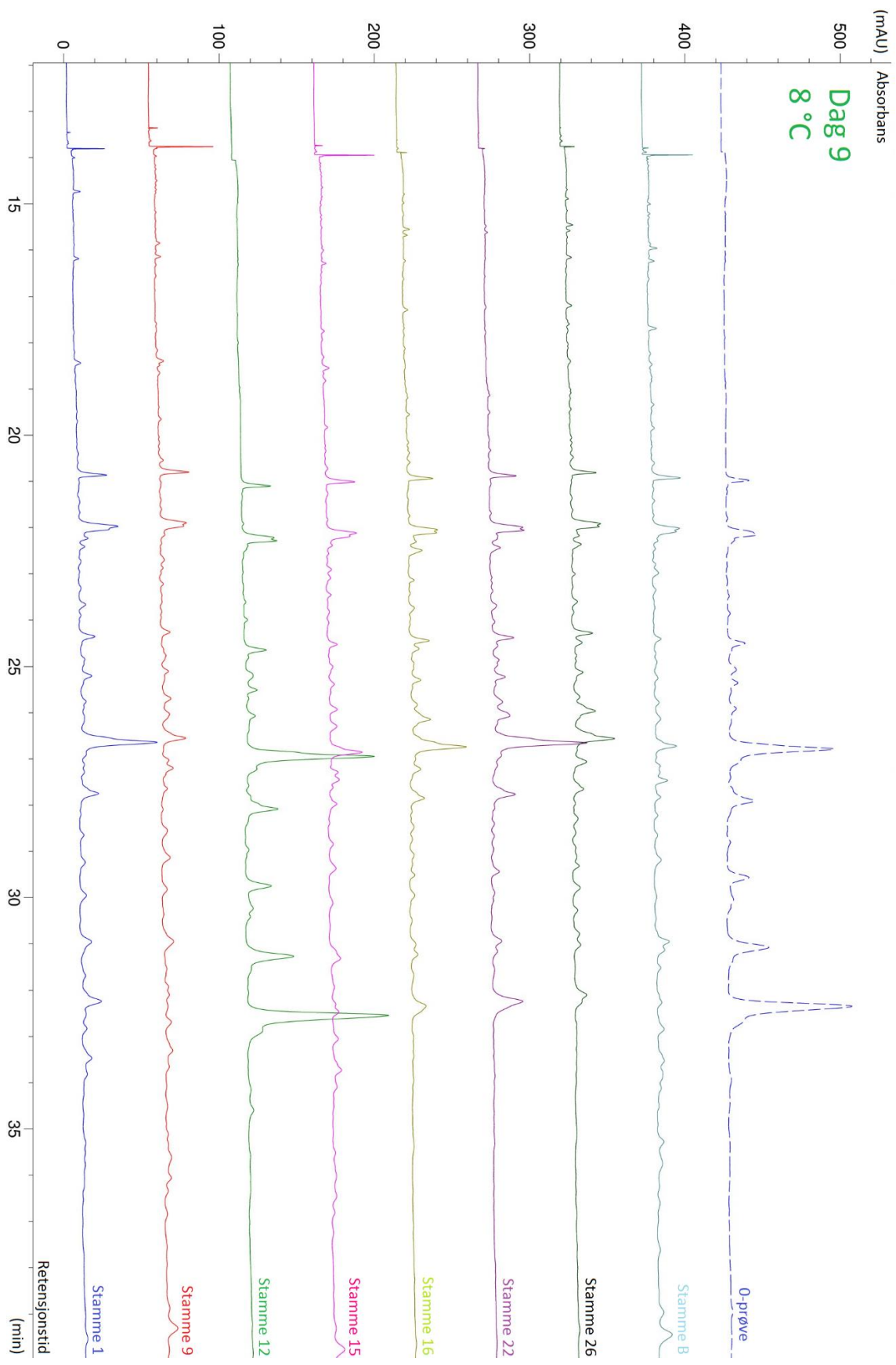
Figur 3.26: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 4 inkubert ved 8 °C i UHT-melk.



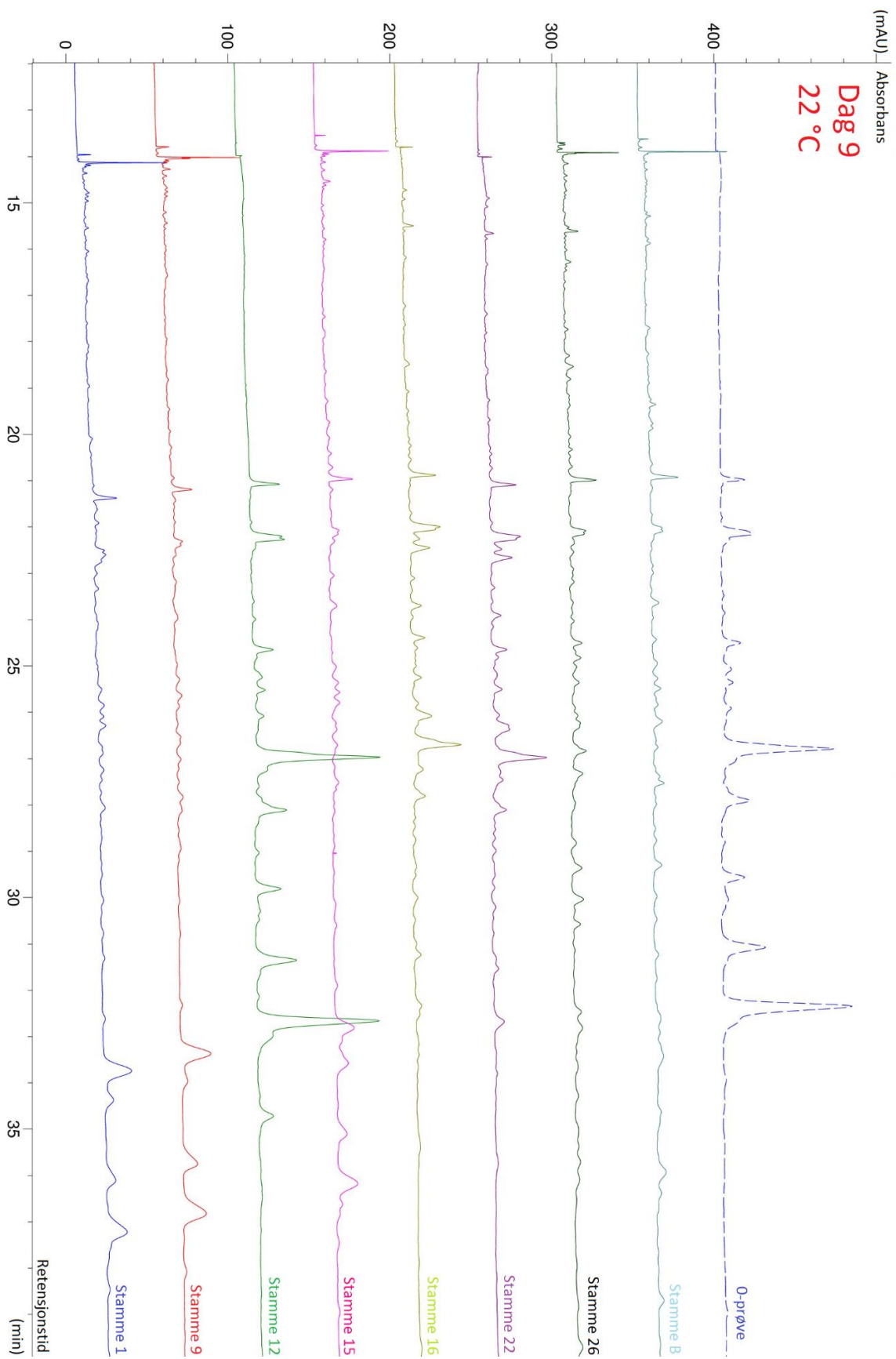
Figur 3.27: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 6 inkubert ved 22 °C i UHT-melk.



Figur 3.28: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 9 inkubert ved 4 °C i UHT-melk.



Figur 3.29: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 9 inkubert ved 8 °C i UHT-melk.



Figur 3.30: Kapillærelektroferogram av 0-prøve og 8 stammer for uttak dag 9 inkubert ved 22 °C i UHT-melk.

Det skjedde ingen nedbrytning av myseproteinene α -LA og β -LG under vekstforsøket før melken hadde stått i 9 dager ved 22 °C. Her ble det hovedsakelig observert noe nedbrytning av β -LG hos stamme 1, 9, 15, 26 og B, men også en svak nedbrytning av α -LA for stamme 1, 9 og 15. Fokuset vil videre rette seg mot toppene til kaseinproteinene; α _S-, κ - og β -kasein.

Stamme 12 så ikke ut til å ha proteinaseaktivitet ut fra kapillærelektroferogrammene, men en topp med retensjonstid på 35 minutter ved 8 og 22 °C, dag 9, og 22 °C, dag 6, kan ha tydet på en svak evne til å bryte ned kaseinproteinene. At toppene for α _{S1}- og β -kasein A2 ved 22 °C, dag 9, var like høye indikerte muligens det samme, da β -kasein A2-toppen i 0-prøve er høyere enn α _{S1}-kaseintoppen.

Etter 2 og 4 dager ved 4 °C, og 2 dager ved 8 °C, var det ingen indikasjon på nedbrytning av proteinene for noen av stammene sammenlignet med 0-prøvemelk, som vist i **Figur 3.22**, **Figur 3.23** og **Figur 3.25**. Ved dag 4 kunne noe reduksjon i toppen for β -kasein A2 ses ved 8 °C i **Figur 3.26**. At toppen for β -kasein A2 var lavere eller ved lik høyde som toppen for α _{S1}-kasein kan ha indikert en reduksjon i β -kasein A2 hos alle stammer med unntak av stamme 1 og 12 ved 8 °C, dag 4. En ekstra liten topp med retensjonstid 26-27 minutter for stamme 16 og 26 kan ha indikert størst nedbrytning her, da toppen for β -kasein var lavere enn α _{S1}-kaseintoppen for disse stammene.

Ved 22 °C (**Figur 3.24**) ble det observert flere endringer etter kun 2 dager. Ved 22 °C hadde det skjedd en tydelig reduksjon i α _{S1}-, κ - og β -kasein A1 og A2 for alle stammer med unntak av stamme 12 etter 2 dager. En svak reduksjon kunne også observeres for α _{S2}- og α _{S0}-kaseintoppene ved 22 °C etter 2 dager for noen av stammene, i tillegg til en økning i mindre peptider over hele retensjonstiden, som flere steder kom til syne som nye småtopper og adderte til allerede eksisterende topper. Ved 22 °C, dag 6 (**Figur 3.27**), var mye av kaseinproteinene brutt ned for de fleste av stammene utenom stamme 12, med størst nedbrytning for stamme 9 og 15. Deler av toppen for α _{S1}-kasein var fortsatt ikke brutt ned for stamme 1, 16, 22 og 26 ved dag 6, men toppen så ut til å bli ytterligere redusert etter 9 dager ved 22 °C. Sett bort ifra at deler av α _{S1}-kaseintoppen fremdeles sto igjen for stamme 16 og 22 etter 9 dager var så å si alt kaseinet brutt ned til mindre peptider for stamme 1, 9, 15, 26 og B ved 22 °C. Dette resulterte i et bredt spekter av peptider spredt utover hele retensjonstiden fra 14-40 minutter. Stamme 1, 9 og 15 skilte seg ut ved å ha flere topper ved høy retensjonstid etter 9 dager ved 22 °C.

Etter 9 dager viste **Figur 3.28** og **Figur 3.29** ved henholdsvis 4 og 8 °C at κ - og β -kaseinene ble brutt ned før eller i større grad enn α_S -kaseinene. Størst proteinaseaktivitet ved 4 °C ble observert for stamme 9, 15, 16, 26 og B. Samme tendens ble observert ved 8 °C, bare i større grad enn ved 4 °C, med tydeligst nedbrytning for stamme 9, 15 og B.

4 DISKUSJON

Tilstedeværelse og påfølgende vekst av populasjoner av psykrotrofe bakterier kan føre til kvalitetsforringelse av melk. Utvikling av psykrotrofe bakterier under langvarig kjøling av rå melk på gården og på meieriet før varmebehandling er fremdeles veldig viktig for holdbarheten av varmebehandlede melkeprodukter. Bruk av lav lagringstemperatur for å holde bakterienivået nede (1-4 °C) kan føre til oppfattelsen av at rå melk kan lagres lenger før prosessering. Lengre lagringstid ved lave temperaturer fører derimot til en selektiv fordel for psykrotrofe bakterier, spesielt med tanke på *Pseudomonas*, som kan tilføres melken via biofilmer i melketanker, kontaminert restvann og jord. Da psykrotrofe bakterier er en kilde til betydelige økonomiske konsekvenser for meieriindustrien, har det foregått, og foregår fremdeles, omfattende forskning på området. Hovedformålet er utvikling av effektive kontrolltiltak og etablering av regelverk for å sikre kvalitet og trygge meieriprodukter (De Jonghe et al. 2011; Oliveira et al. 2015).

Gjennom isolering av psykrotrofe stammer fra slekten *Pseudomonas* ble det i denne oppgaven undersøkt og vist mangfoldet blant proteinaseproduserende bakterier i rå melk. For å kunne relatere funnene til meieriindustriens virksomhet ble det isolert stammer fra kommersiell rå melk på silo ved Kalbakken (TINE SA). Stammene ble dyrket i UHT-behandlet melk ved tre ulike temperaturer og det ble målt vekst og proteolytisk nedbrytning ved utvalgte tidspunkt. Enzymatisk aktivitet av ekstracellulære proteinaser ble undersøkt ved hjelp av kjemiske analyser utført på CE og HPLC. Innledende forsøk, som diffusjonsanalyser, API ZYM og 16S rDNA-sekvensering, var med på å bygge opp under resultatene i hovedforsøket, samt bidra til å danne et bilde av kompleksiteten omkring psykrotrofe bakterier i melk.

4.1 Innledende forsøk på isolater fra rå melk

Et vedvarende problem i avdekkingen av forringelsesmikrobiotaen i melk er den uavklarte situasjonen omkring taksonomien av slekten *Pseudomonas*. Identifikasjon baserer seg fortsatt hovedsakelig på fenotypisk karakterisering, en metodologi som ble utdatert på grunn av introduksjonen av genotypisk karakterisering. En entydig basert fylogenetisk identifisering er derimot ikke fastlagt for molekylære DNA-metoder enda, slik at selv nylige studier fortsatt baseres delvis på fenotypiske metoder. Marchand et al. (2009) anså det som sannsynlig i deres studie at misidentifikasjon av mange proteolytiske isolat av *P. fluorescens* i tidligere studier

ved bruk av fenotypisk karakterisering har ført til en overestimering av artens sentrale rolle som kvalitetsforringer i melk. Tradisjonelle mikrobiologiske tilnærminger for å studere psykrotrofe bakterier i melk basert på fenotypisk karakterisering er tidkrevende, mangler diskriminerende evne og sensitivitet. De er i tillegg ofte ineffektive i å etablere årsakssammenheng mellom kontaminering i ferdig produkt og kilden til kontaminering (De Jonghe et al. 2011; Oliveira et al. 2015).

Genotypisk karakterisering ble i denne studien utført ved Sanger sekvensering av 16S rRNA-genet. Resultatene foreslo til sammen 30 potensielle arter for de 32 isolatene innen slekten *Pseudomonas*. 16S rDNA-sekvensering har dårlig oppløsningsevne ved og under artsnivå på grunn av nær identiske 16S rRNA-gensekvenser mellom arter av slekten *Pseudomonas*. Sekvenseringen avklarte derfor kun med sikkerhet at de 32 isolatene tilhørte slekten *Pseudomonas*. Blant de 30 potensielle artene ble *fluorescens* foreslått som mulig art for hele 28 av 32 isolat. Det trenger nødvendigvis ikke å ha betydning at flertallet av isolatene tilhørte denne arten. På grunn av lav oppløsningsevne for 16S rDNA-sekvensering var det umulig å konkludere med hvilke arter de ulike isolatene representerte. Det var kun mulig å se på trender, som at artene *mandelii* og *salomonii* gikk igjen hos flere av isolatene i tank 2. Dette kan tyde på at en viss type stamme gikk igjen i de ulike tankene, eller at det har blitt isolert én av samme art flere ganger fra den respektive tanken, slik at mange av de samme artene ble foreslått. Om sekvenseringen av de samme isolatene hadde blitt sammenlignet med databasen BLAST på et senere tidspunkt kunne utfallet ha blitt mer pålitelig, da sammenligningen er avhengig av databasens allerede innlagte sekvenser, som stadig inneholder flere sekvenser. 16S rDNA-sekvensering vil likevel ikke være god nok alene for artsdifferensiering av *Pseudomonas* spp.. Det resultatene derimot viste var at den psykrotrofe mikrobiotaen i rå melk kan være meget kompleks med hensyn til *Pseudomonas* spp., noe som støttes av mange studier (Marchand et al. 2009; Martens et al. 2008).

På grunn av den langsomme evolusjonære utviklingen og derav konserverte naturen til 16S rRNA-genet har sekvensering av dette genet vært mye brukt i genotypisk karakterisering, da områder med forskjeller kan brukes til å skille nært beslektede bakterier. Nettopp den høyt konserverte naturen til ribosomale gener gjør 16S rDNA-sekvensering lite nyttig når det gjelder artsdifferensiering av *Pseudomonas*, på grunn av nær identiske 16S rRNA-gensekvenser mellom arter i slekten, som nevnt. Dette ble vist i denne studien og i andre studier av blant annet Caldera et al. (2016) og Marchand et al. (2009), til tross for at det er 16S rDNA-sekvensering som tradisjonelt benyttes til identifisering av bakterier. Sekvensering

av flere mindre konserverte «housekeeping» gener, som *rpoB*, *gyrB* og *rpoD*, eller sekvensering av *aprX*-genfamilien, har blitt utført for å oppnå en mer diskriminerende fylogenetisk evaluering av *Pseudomonas*-isolater i studier av blant annet Marchand et al. (2009), Mulet et al. (2010) og Caldera et al. (2016). I den nyere studien av Caldera et al. (2016) ble de kjente melkeforringene *Pseudomonas fragi*(-lignende) og *Pseudomonas gessardii*(-lignende) funnet, i tillegg til flere andre arter som *Pseudomonas proteolytica*, *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas rhodesiae* og *Pseudomonas peli*(-lignende). Av disse ble både *P. fragi* og *P. gessardii* foreslått som potensielle arter i 16S rDNA-sekvenseringen utført i dette studiet.

Resultatene fra diffusjonsanalysene og API ZYM var med på å differensiere og skille de ulike stammene fra hverandre sammen med 16S rDNA-sekvensering. I forbindelse med de innledende forsøkene var ønsket å undersøke mangfoldet blant stammer isolert fra rå melk, samt om det fantes forskjeller i stammer isolert fra de ulike tankene. Resultatene fra API ZYM viste fosfatase- og fosfohydrolase-aktivitet hos tilnærmet alle 32 stammer, utenom fosfatase-aktivitet hos stamme 10 og 11. Av testens 5 proteolytiske enzymer (leucin, valin og cystin arylamidase, trypsin og α -chymotrypsin) ble kun leucin og valin arylamidase detektert, der leucin arylamidase ble detektert hos alle 32 stammer. Av stammer isolert fra tank 1 og 2 ble valin arylamidase detektert hos betraktelig færre stammer (2, 7, 8 og 14) sammenlignet med stammer isolert fra tank 3 og 4, der kun stamme 21 og 23 manglet produksjon av valin arylamidase. Dette kan ha indikert at stammer isolert fra tank 3 og 4 hadde større evne til peptidnedbrytning enn stammer isolert fra tank 1 og 2. Det er likevel ikke sikkert at valin arylamidase har vært utslagsgivende for grad av proteolytisk aktivitet. Diffusjonsanalysen ved 22 °C viste en relativt jevn spredning i proteolytisk og lipolytisk aktivitet i alle 4 tanker. I diffusjonsanalysen ved 22 °C ble det, i kontrast til API ZYM, målt høyere grad av lipolyse kontra proteolyse blant stammer isolert fra tank 3 og 4 enn fra tank 1 og 2. Dette kan likevel ha vært tilfeldigheter, da 32 stammer ikke er representativt og danner kun et lite bilde av den komplekse mikrobiotaen som eksisterer i rå melk. API ZYM er en metode basert på visuell bedømming av fargeendring, slik at det kan være usikkerheter forbundet med metoden i om fargeendring har skjedd/ikke skjedd. Grad av fargeendring kan også være vanskelig å bedømme. Uten identifisering av bakterieisolatene til lavere nivå enn slekt var det vanskelig å skille de fra hverandre og støtte opp under resultatene fra de innledende forsøkene.

Diffusjonsanalysen ved 4 ulike inkuberingstemperaturer viste stor variasjon i grad av proteolytisk nedbrytning hos 14 av de undersøkte stammene, noe som ikke så ut til å være

påvirket av hvilken tank stammene var isolert fra. Spennet i evne til proteolytisk nedbrytning var stort, helt fra ingen indikasjon på proteolyse ved noen av temperaturene (stamme 12 og 31), til høy proteolytisk evne over hele temperaturområdet fra 4 til 30 °C (stamme 2, 8, 9 og 15). Blant de de mest psykrotrofe stammene (2, 15 og 26) ble klaringssoner opp mot 4 cm målt ved 7 °C for stamme 2, 15 og 26, med klaringssoner opp mot 8 cm ved 22 °C til sammenligning. Dette indikerte relativt god proteolytisk aktivitet selv ved lave temperaturer som 7 °C, og viser viktigheten av å holde kjølekjeden. Resultatene bygger opp under viktigheten av valg av stamme(r) ved undersøkelse av proteolytisk aktivitet i melk grunnet ekstracellulære varmemestabile proteinaser, da store forskjeller i proteolytisk aktivitet mellom isolerte stammer kan forekomme selv fra samme tank.

4.2 Vekstforsøk med *Pseudomonas* i melk

UHT-melk ble i forsøket benyttet i all hovedsak for å ha et sterilt substrat å inokulere stammene i, slik at kun vekst av inokulerte stammer ble målt. UHT-melk som substrat ble i tillegg valgt for å redusere eventuell påvirkning av den naturlige melkeproteinase plasmin, som det er uenighet om hvor mye har å si for proteolyse i lagret UHT-melk. Plasmin er, i likhet med bakterielle proteinaser, også meget varmemestabile. For å utelukke mulig forstyrrende bakgrunnsaktivitet av plasmin under vekstforsøket, burde UHT-melk uten bakterier ha blitt inkubert parallelt med inokulert UHT-melk ved de ulike lagringstemperaturene (Datta & Deeth 2001).

Resultatene fra vekstforsøket viste at melk er et godt vekstmedium for psykrotrofe bakterier av slekten *Pseudomonas*. Veksten økte raskest og var høyest i melk inkubert ved 22 °C, der samtlige 8 stammer nådde stasjonær fase innen 2-3 dager ved 9 log CFU ml⁻¹. Noen stammer nådde nærmere 10 log CFU ml⁻¹ etter 9 dagers lagring. Vekstkurvene for de 8 utvalgte stammene i melk inkubert ved 4 og 8 °C var flatere og viste tregere vekst enn ved 22 °C, men etter 9 dagers lagring var bakterietallet oppe i tilsvarende verdier som ved 22 °C. Dette stemmer godt overens med at vekstoptimum for psykrotrofe bakterier ligger omkring 20 til 30 °C, i tillegg til den unike evnen gruppen har til å vokse og trives ved temperaturer under 7 °C. Stamme 12 så i den forbindelse ut til å være noe mindre psykrotrof, grunnet tregere vekst enn de andre stammene ved 4 og 8 °C (Adams & Moss 2008).

Ifølge Walstra et al. (2006c) ligger kriteriet for kvalitetsforringelse på $3 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹. Champagne et al. (1994) påpeker blant annet at antallet psykrotrofe bakterier nødvendig for å produsere bismak varierer mellom stammer og bestemmes av lengden på lagfasen og vekstraten ved lagringstemperaturen, i tillegg til den proteolytiske aktiviteten og varmebestandigheten til enzymene. Ut ifra vekstforsøk ved 4 °C nådde de ulike stammene et nivå som tilsa forringelse etter alt fra 2-4 dager, avhengig av stamme. Dette vil gjelde for startkonsentrasjoner på 10^3 - 10^4 CFU ml⁻¹ i melk. Ved 8 °C ble nivåer på $3 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹ nådd etter omtrent 2-3 dager for samtlige stammer, sett bort fra stamme 12.

Bakteriekonsentrasjonen i hygienisk tappet rå melk rett etter melking ligger ofte under $5 \cdot 10^3$ CFU ml⁻¹. Startkonsentrasjoner på nærmere 10^4 CFU ml⁻¹, som målt for stamme 16 og 26 i dette forsøket, vil da representere et relativt høyt nivå sammenlignet med hygienisk tappet rå melk. Det må tas i betraktning at platespredning, metoden benyttet som mål på bakterievekst i dette forsøket, kan ha bidratt til noe unøyaktig telling grunnet stammens spredende evne på skål.

TINE betaler melkebøndene sine basert på kvaliteten av rå melken ved leveranse etter «TINEs regelverk om bedømmelse og betaling av leverandørmelk etter kvalitet». Dette er for å stimulere til produksjon av melk av høy hygienisk kvalitet. I 2014 fikk 98,87 % av TINEs rå melk-leveranser betegnelsen elitemelk basert på bakterietall, der melk med bakterietall $\leq 1 \cdot 10^5$ BC ml⁻¹ ($2 \cdot 10^4$ CFU ml⁻¹) havner i denne kategorien. Denne statistikken indikerer altså at det står bra til med den hygieniske kvaliteten av rå melk som leveres hos Norges største meieriaktør. Rå melk mottas ikke ved meieriet om bakterietallet når eller overskrider $8 \cdot 10^4$ CFU ml⁻¹. Dette var nivåer som ble nådd relativt raskt i vekstforsøkene helt ned til 4 °C. Om resultatene ses i sammenheng med vekst av psykrotrofe bakterier i rå melk tilsa vekstforsøket at melk lagret ved 4 °C nådde nivåer som ville ha ført til melkestopp ved TINEs meierier før 24 timer hadde gått (TINE SA 2014a; TINE SA 2014b; Walstra et al. 2006c).

Svært lite forskning har, frem til 2000-tallet, forsøkt å undersøke og kartlegge vekst av *Pseudomonas* og påvirkning av lagringstemperatur gjennom den første delen av meierikjeden, før varmebehandling av rå melk. De Jonghe et al. (2011) var en av de første til å studere nettopp dette. Det ble i den forbindelse studert effekt av lagringstemperatur, der det under optimale og suboptimale forhold ble benyttet henholdsvis 3,5 og 6 °C i gårdstank (4 dager), 6 og 10 °C under transport (8 timer) og 6 og 10 °C i meieritank (24 timer). Rå melken ble de 4 første dagene to ganger daglig varmet opp til 6 og 10 °C for henholdsvis optimale og

suboptimale forhold. Dette var for å simulere oppvarming av melk i gårdstank ved tilstrømning av ny varm melk i tanken ved melking. Forsøket viste at bakterietallet forholdt seg relativt stabilt i gårdstanken, selv under suboptimale forhold. Her skilte vekstforsøk utført i denne oppgaven seg fra De Jonghes, ved at dette forsøkets stammer hadde rask initiell vekst og så ut til å mangle lag-fase. Dette kan ha skyldtes at melken i dette forsøket ble inokulert med aktivt voksende celler, som kan ha ført til en overestimering av bakterienivået. Studien av De Jonghe et al. (2011) viste en forskjell på hele 2 log CFU ml⁻¹ mellom optimale og suboptimale forhold etter nærmere 6 dagers lagring, med nivåer på 10⁶ og 10⁸ CFU ml⁻¹, respektivt. Forlenget lagring under suboptimale forhold hadde med andre ord signifikant effekt på vekst av *Pseudomonas* i rå melk. Overraskende viste studien også at suboptimal lagring av rå melk i gårdstank (6 °C) ikke så ut til å ha en effekt på bakterienivået, så lenge rå melk ikke ble lagret lenger enn 3 dager på gården. Ifølge Walstra et al. (2006a) vil betydelig vekst av psykrotrofe bakterier kunne etablere seg etter 4 eller 5 dagers lagring av rå melk, slik at lagring i opptil 3 dager på gården og ytterligere 1 dag ved meieriet før prosessering ser ut til å være i grenseland med tanke på bakterievekst (De Jonghe et al. 2011; Walstra et al. 2006a).

Det er flere grunner til at det er vanskelig å trekke linjer mellom dette studiet med vekst av *Pseudomonas* i UHT-behandlet melk kontra forsøk utført med rå melk. Det må blant annet tas i betraktning at dette forsøket ble utført på renkulturer inokulert i UHT-behandlet steril melk, som ikke vil være tilfellet for rå melk. Rå melk har en mangfoldig og kompleks mikrobiota, der alle bakterier konkurrerer mot hverandre i vekst og utnyttelse av næringsstoffer. Variasjon i vekstforløp mellom ulike stammer av *Pseudomonas* og bruk av monokultur kontra den komplekse mikrobiotaen tilstede i rå melk kan spille inn på de observerte forskjellene. Vekstforsøk utført i denne oppgaven foregikk i tillegg ved konstant inkuberingstemperatur. Det kan også tenkes at stammene i dette forsøket var bedre tilpasset rask vekst i melk, da de hadde oppholdt seg lenge i rå melk før isolering. Studien av De Jonghe et al. (2011) representerer kanskje et bilde som er nærmere faktiske forhold i meieriindustrien, sammenlignet med denne studien (De Jonghe et al. 2011; Quigley et al. 2013; Sørhaug & Stepaniak 1997).

Tatt i betraktning av at temperaturen ofte fluktuerer i lagret rå melk på gårdstank grunnet påfylling av varmere melk i tank ved melking, ved transport i isolerte tankbiler uten kjøling og ved mottak og lagring ved meieri, er det likevel ikke usannsynlig at nivåer fra vekstkurver i dette forsøket kan rekke å etablere seg i rå melk før varmebehandling. Psykrotrofe bakterier fra restvann i melkemaskiner, -rørverk eller -kjølere kan tilføre rå melk aktivt voksende

stammer som ikke trenger lag-fase og kan vokse raskt i melk, som vist av stammene i dette forsøket. Ved lang transportvei av rå melk kan reisen i spesielle tilfeller ta oppimot 24 timer i tankbiler uten kjøling, i tillegg til at melken som kjent mottas ved meieriet kun om temperaturen ikke overstiger 10 °C. Trenden i meieriindustrien ser i tillegg ut til å gå mot sjeldnere henting, og færre og større meierier. Om suboptimale temperaturforhold skjer parallelt med lang oppbevaring av melk, ofte i forbindelse med helg, kan rå melk raskt nå bakterienivåer som fører til kvalitetsforringelse. Dette understreker viktigheten av å holde kjøletemperaturen nede før rå melk når meieriet, da det er her melkens standard settes (Walstra et al. 2006a).

Meieriet klarer ikke alltid å prosessere rå melk innen 4 dager etter melking. I slike tilfeller kan termisering benyttes, en moderat varmebehandling ved eksempelvis ~65 °C i 15 sekunder, som reduserer antallet psykrotrofe bakterier betraktelig. Dette benyttes ofte i Norge i forbindelse med lagring av rå melk over helg. Etter termisering kan melken ofte lagres i ytterligere 3-4 dager ved 6-7 °C uten vesentlig økning i bakterietallet, forutsatt at ingen rekontaminering av psykrotrofe bakterier skjer. En slik behandling dreper nesten alle psykrotrofe bakterier og antas skyldes en inhibering av videre vekst på grunn av termisk sjokk av de gjenværende bakteriene, ifølge Champagne et al. (1994). Termisering av rå melk allerede ved gården kan representere et forebyggende tiltak ved forlenget lagring over 3 dager i gårdstank eller ved meieriet. Et annet tiltak kan være LTI-behandling for å inaktivere allerede produserte enzymer, eller bruk av ekstremt høyt trykk for å eliminere både mikrobielle celler og enzymer. Det trengs derimot mer forskning for å belyse aspekter ved både LTI- og trykk-behandling om slike metoder skal tas i bruk (Sørhaug & Stepaniak 1997; Walstra et al. 2006a).

Dette studiet kan også ses i sammenheng med post-pasteuriserings kontaminering (PPC) etter varmebehandling av melk, som pasteurisering eller UHT-behandling. Ved aseptisk pakking er det vanlig å forvente kontaminering i mindre enn 1 av 10^5 pakninger, orienterer Walstra et al. (2006f) om. Sørhaug og Stepaniak (1997) fastslår i den sammenheng at om nivået av PPC med psykrotrofe *Pseudomonas* var på kun 1 CFU ml⁻¹, så ville en mengde på $3 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹ (kriteriet for forringelse) nås etter 10 dager med en generasjonstid på 9,4 timer ved 4 °C. Dette er vanskelig å unngå i praksis om ikke aseptisk pakking benyttes. Alle langtidsholdbare melkeprodukter produsert i Norge er derimot aseptisk pakket. Med tanke på den lave forekomsten av mikrobiell kontaminering ved aseptisk pakking ser ikke nødvendigvis PPC ut

til å utgjøre et stort problem for langtidsholdbare produkter. Selv om 1 av 10^5 pakninger vil kunne gi økonomiske tap i forbindelse med kvalitetsproblemer på for eksempel årsbasis. Den initielle kjølelagringen av rå melk før prosessering ser i større grad ut til å kunne utgjøre et problem for UHT-behandlede produkter. Selv overlevelse av små mengder enzymer i UHT-behandlede langtidsholdbare melkeprodukter kan over tid føre til kvalitetsproblemer, spesielt ved lagring av melk i romtemperatur nærmere optimumstemperatur for enzymene (30-45 °C). Minimumsparametere for enzymaktivitet, som aktivitet ved 4 °C og lavere, ser i den forbindelse ut til å være minst like viktig for kvalitet, om ikke viktigere, enn de mye studerte optimumsparametrene for enzymaktivitet.

I Norge er det pasteurisert melk som er konsummelk og som utgjør størsteparten av salget av melk. Pasteurisert melk blir ikke aseptisk pakket som langtidsholdbare melkeprodukter og er derfor mer utsatt for rekontaminering. Rekontaminering etterfulgt av pasteurisering (PPC), av hovedsakelig *Pseudomonas*, ser ut til å være hovedårsaken til forringelse av pasteurisert melk ved temperaturer < 7 °C, som beskrevet av Sørhaug og Stepaniak (1997). Dette er med på å begrense holdbarheten på pasteurisert melk til 11 dager fra den tappes på kartong. Forlenget holdbarhet av pasteurisert melk vil derfor ikke kunne oppnås uten innføring av mer hygieniske pakkemaskiner, som aseptisk pakking (TINE SA 2005).

4.3 Frie aminosyrer og protein- og peptidnedbrytning

Proteinaser fra *Pseudomonas* spp. kan produseres ved kjøleromstemperatur, hovedsakelig ved enden av log-fasen, som beskrevet av flere forfattere, blant annet av Sørhaug og Stepaniak (1997). Samme forfatter påpeker i den forbindelse at mange stammer av *Pseudomonas* spp. kan produsere tilstrekkelige mengder proteinaser til å hydrolysere alt tilgjengelig kasein til løselige peptider ved vekst i melk ved 4 °C. Ut i fra resultater oppnådd ved hjelp av de kjemiske analysene utført på HPLC og CE ser proteinasene også ut til å være aktive ved lave temperaturer ned mot 4 °C, bare i mye mindre grad enn ved 22 °C. Der tydelig reduksjon av toppene i proteinmønsteret kunne ses i elektroferogrammene hos stammer inkubert ved 22 °C etter kun 2 dager, kunne ikke tydelig reduksjon i proteinmønsteret ses før etter 9 dager ved 4 °C. Det var ikke mulig å observere en reduksjon i proteinmønsteret etter 4 dager for UHT-melk lagret ved 4 °C rent visuelt. For å bedre ha kunnet vurdere minimale reduksjoner i toppene i elektroferogrammet burde toppene ha blitt integrert, noe det ikke var tid til i denne studien. Etter 4 dagers lagring ved 8 °C var det derimot mulig å observere noe reduksjon av

toppen for β -kasein A2 for de fleste av stammene i ulik grad (stamme 9, 15, 16, 22, 26 og B). Etter 9 dagers lagring hadde tilstrekkelig proteolytisk nedbrytning skjedd for de fleste av stammene ved både 4, 8 og 22 °C. Første etter 9 dagers lagring ved 8 °C ble en økning i frie aminosyrer registrert hos flere stammer (1, 9, 15, B og svakt 26), mens tilstrekkelig økning i frie aminosyrer etter 9 dager ved 4 °C kun ble observert hos et fåtall stammer (9, 15 og B). Ved 22 °C startet økningen av frie aminosyrer for samtlige stammer allerede etter 6 dager, i tillegg til noe svak økning etter 2 dager. Det så altså ut til at reduksjon av de store kaseinfraksjonene startet noe tidligere enn det var mulig å observere økning i frie aminosyrer. Dette ble eksemplifisert godt i UHT-melk ved 22 °C, der tydelig proteolytisk nedbrytning av kasein ble observert etter kun dag 2 i elektroferogrammene, mens betraktelig økning i frie aminosyrer ble registrert først etter 6 dager. Ifølge McKellar (1989c) er de fleste proteinaser produsert av psykrotrofe bakterier av typen endopeptidaser. Dette kan føre til at de store kaseinene først brytes ned til mindre peptider, før de videre blir brutt ned til frie aminosyrer, som vist i denne studien. Det er også en mulighet at frie aminosyrer først ble brukt til vekst i den eksponentielle fasen, og da veksten avtok fortsatte proteinasene å bryte ned proteinene, som førte til økning av frie aminosyrer på et senere tidspunkt i den stasjonære fasen (Sørhaug & Stepaniak 1997).

Forsøk utført av Amundsen (2015) på stamme B ved 7 °C, indikerte ingen nedbrytning av proteinmønsteret i elektroferogrammet ved dag 4. I egne forsøk utført på samme stamme ved 8 °C viste elektroferogrammet etter 4 dager noe nedbrytning av topp for β -kasein A2 hos stamme 9, 15, 16, 22, 26 og B, som nevnt. Dette ble observert da toppen for β -kasein A2 var omtrent like høy eller lavere enn topp for α_{S1} -kasein ved dette tidspunktet. Disse funnene bygger opp under viktigheten av å holde en ubrutt kjølekjede, da en økning på kun 1 °C, fra 7 til 8 °C, over en periode på 4 dager kan gi forskjellige utslag i proteolyse, som vist i de to studiene.

Chen et al. (2003) beskriver at de fleste proteinaser fra psykrotrofe bakterier i all hovedsak angriper kasein fremfor myseproteiner og at β - og κ -kasein er mer mottagelige for proteolyse enn α_S -kaseinene. Proteinene i denne studien bekreftet en preferanse for nedbrytning av kasein overfor myseproteiner ut i fra resultater fra kapillærelektroferogrammene. Myseproteinene α -LA og β -LG forble forholdsvis lite nedbrutt gjennom vekstforsøk i UHT-melk, med unntak av delvis nedbrytning av β -LG etter 9 dager ved 22 °C for stamme 1, 9, 15, 26 og B. Den delvise nedbrytningen av β -LG skjedde etter at nesten alt kasein var nedbrutt,

der kun en liten del av toppene for α_S -kaseinene var igjen for stamme 16 og 22. I en studie beskrevet av McKellar (1989c) ble β -LG degradert i større grad enn α -LA ved 7 °C etter 9 dager, noe resultater fra dette forsøket også indikerte. Preferansen for nedbrytning av kasein skyldes dets mangel på sekundær struktur og utstrakte natur, som beskrevet av Sweeney og Fox (2013). En mottagelighet for nedbrytning av β - og κ -kasein overfor α_S -kaseinene var tydelig i elektroferogrammet etter 9 dager ved 4 °C. Toppen for κ -kasein var helt nedbrutt for mange av stammene (9, 15 og B), og toppene for β -kasein A1 og A2 var sterkt redusert for de fleste stammene utenom stamme 1 og 12. Samtidig var toppene for α_{S2} -, α_{S1} - og α_{S0} -kasein fremdeles rimelig intakte sammenlignet med 0-prøve melk.

Proteolytisk nedbrytning av hovedsakelig kaseinproteinene resulterte i et bredt spekter av mindre peptidtopper spredt utover hele retensjonstiden fra 14-40 minutter. Ut ifra kapillærelektroferogrammene var det umulig å tyde hvilke peptider disse toppene representerte. Flere steder adderte de nydannende toppene seg i tillegg til allerede eksisterende topper. Miralles et al. (2001) beskriver, ved hjelp av kapillær sone-elektroforese («capillary zone electrophoresis» (CZE)), en ko-migrering av β -LG og para- κ -kasein i elektroferogrammet. Para- κ -kasein er hoveddegraderingsproduktet fra proteolytisk nedbrytning av κ -kasein hos psykrotrofe bakterier. En nøyaktig kvantifisering av økningen av para- κ -kasein kunne vært av stor betydning for å bestemme graden av proteolytisk nedbrytning med utgangspunkt i proteolytiske enzymer i melk. Sialinsyre er en annen mulig markør for mål på proteolytisk aktivitet beskrevet i en studie av Zalazar et al. (1996), et karbohydrat tilstede i κ -kaseinets glykomakropeptid. Nevnte forfatter viste til en økning på 50-215 % i nivået av fri sialinsyre i UHT-melk under lagring frem til utløpsdato sammenlignet med nylig pasteurisert melk (Datta & Deeth 2001; Miralles et al. 2001).

Det ble observert dannelse av gel i UHT-melk oppbevart ved 22 °C etter 9 dagers lagring for noen av stammene og melken hadde skilt seg og dannet klumper hos alle stammer utenom stamme 12 ved denne temperaturen. Det samme var ikke tilfellet for inkubering ved 4 og 8 °C, selv om klumpdannelse og/eller økt viskositet ble observert for alle stammene ved 8 °C etter 9 dager, unntatt stamme 12. Dannelse av gel er et fenomen man finner i blant annet UHT-behandlet melk. Geldannelse skyldes varmebehandlingen og dannelse av $\beta\kappa$ -kompleks som spaltes av bakterielle proteinaser og fører til dannelse av en tredimensjonal proteingel. Geldanning under lagring av UHT-melk har blitt assosiert med proteolyse av kasein i flere studier. Proteolyse har blitt knyttet til både naturlig tilstedeværende melkeproteinaser, som

plasmin, og proteinaser produsert av psykrotrofe bakterier ved kontaminering av rå melk. Griffiths et al. (1988) fant at holdbarheten til UHT-melk var mye kortere da den var prosessert fra rå melk lagret ved 6 °C enn ved 2 °C i 4 dager. Hovedårsaken til observasjonen var rettet mot termostabile bakterielle proteinaser assosiert med høy bakterievekst i rå melk (Datta & Deeth 2001).

Det har blitt funnet sammenheng mellom produksjon av ekstracellulære enzymer og celletettheten som oppstår i sen log- og tidlig stasjonær fase. Dette gjelder kulturer som har nådd 10^8 CFU ml⁻¹, ifølge McKellar (1989d). Andre forfattere igjen, som Dunstall et al. (2005), oppgir denne sammenhengen i kulturer $>10^6$ CFU ml⁻¹. Relatert til egne resultater under vekstforsøk kan syntese av proteinaser og påfølgende nedbrytning i proteinmønsteret se ut til å ha skjedd først etter at kulturene nådde oppimot 10^8 CFU ml⁻¹. Ved 22 °C ble tydelig reduksjon i proteinmønsteret registrert etter kun to dager, på et tidspunkt kulturene hadde nådd en slik bakteriekonsentrasjon. Svak nedbrytning kunne observeres etter 4 dager ved 8 °C, samtidig som kulturene lå på rundt 10^8 CFU ml⁻¹. Først etter 9 dager var det mulig å observere proteolytisk aktivitet i elektroferogrammet ved 4 °C, der bakteriekonsentrasjonen hadde nådd over 10^8 CFU ml⁻¹.

Sammenhengen mellom celletetthet og proteolyse kan tyde på en «quorum sensing»-mekanisme, selv om ingen rapporterte bevis støtter opp under en slik hypotese. «Quorum sensing» er et fenomen en kun har observert i den prokaryote verden og er en måte for bakterier å regulere genekspressjon på som følge av deres populasjonsstørrelse ved hjelp av kjemiske signalmolekyler. Hos et stort utvalg av psykrotrofe bakterier foregår celle-til-celle-kommunikasjon via «quorum sensing» signalmolekyler kalt N-acyl-homoserin-laktoner (AHL). Produksjon av ulike AHL i både rå og pasteurisert melk av psykrotrofe bakterier som *Pseudomonas* kan tyde på at «quorum sensing» spiller en rolle i forringelse av melk og melkeprodukter (Dunstall et al. 2005; Liu et al. 2007; Oliveira et al. 2015).

4.4 Sammenfatning av resultater

Samlet gir resultatene et innblikk i mangfoldet blant *Pseudomonas* stammer isolert fra rå melk og deres forskjellige evne til proteolytisk nedbrytning i melk. Det ser i den forbindelse ut til at forskjeller og likheter mellom stammene endrer seg ved de ulike inkuberingstemperaturene om en tar utgangspunkt i proteinmønsteret i elektroferogrammene. Ved for eksempel 22 °C kunne likheter i proteinmønsteret ses mellom stamme 1, 9 og 15, mellom 16 og 22 og mellom 26 og B ved dag 9. De samme likhetene ble også observert ved 22 °C, dag 2 og 6. Ved 4 og 8 °C ble derimot likheter observert mellom stamme 9, 15 og B og mellom stamme 16 og 26 ved dag 9. Forskjeller i proteolytisk aktivitet ved ulike temperaturer mellom stammene bekreftes av diffusjonsanalysen ved ulike temperaturer. Her bekreftes blant annet den reduserte evnen til proteolyse for stamme 1 ved 4 °C, som observert i elektroferogrammet etter 9 dagers lagring.

I forbindelse med mål på proteolytisk nedbrytning i dette forsøket kan det se ut til å være mer hensiktsmessig å studere elektroferogrammene kontra kvantifisering av frie aminosyrer. Ved lagring av UHT-melk ved 22 °C var det vanskelig å skille vekstkurvene fra hverandre, da de fleste stammene vokste like godt ved denne temperaturen. Det ble observert at stamme 16, 22 og 26 trivdes best og hadde raskest initiell vekst sammenlignet med de andre stammene ved 4 og 8 °C. I tillegg var økningen i frie aminosyrer ved 4 og 8 °C minst for nettopp stamme 16, 22 og 26, sett bort i fra stamme 12. Økt vekst har trolig ført til økt forbruk av frie aminosyrer for disse stammene, slik at liten økning av frie aminosyrer ikke nødvendigvis indikerte mindre grad av proteolyse. Ulik vekstforløp mellom stammene førte til ulik omsetting av frie aminosyrer, som var med på å forstyrre tolkningen av HPLC-resultatene. Kvantifiseringen av frie aminosyrer kunne derfor ikke tolkes alene, men ble sett i sammenheng med de resterende resultatene.

I en nyere oversiktsartikkel av Oliveira et al. (2015) fremheves viktigheten av valg av stammer gjennom arbeid utført av Jaspe et al. (1995), i henhold til ved hvilket tidspunkt stammer isoleres fra rå melk. Sistnevnte forfatter demonstrerte i eget forsøk at *Pseudomonas* spp. isolert fra rå melk lagret ved 7 °C i 3 dager vokste ti ganger raskere ved 7 °C, hadde 1000 ganger mer proteolytisk aktivitet og var 280 ganger mer lipolytisk enn *Pseudomonas* spp. isolert fra fersk tappet rå melk. Rå melk i denne studien ble, før isolering av stammer, lagret i 7 dager ved 4 °C etter mottak fra meieriet. Dette vil si at rå melken kan ha vært lagret i opptil 10 dager om en forventer 3 dager fra melking til levering fra meieriet. Det ble blant annet

antydning i nevnt studie av De Jonghe et al. (2011), med oppdagelsen av antatte nye arter under suboptimale forhold, at slike forhold indikerte favorisering av utvikling av en større diversitet i *Pseudomonas*-mikrobiota med forringende potensial. Med tanke på at lave temperaturer selekterer for psykrotrofe bakterier, kan det se ut til at denne gruppen over tid blir bedre rustet til å vokse i melk, spesielt ved suboptimale temperaturer (Jaspe et al. 1995; Oliveira et al. 2015).

De kjemiske analysene tydet på lite proteolytisk nedbrytning i UHT-melk oppbevart under optimale forhold ved 4 °C før etter 9 dagers lagring. Ved å trekke linjer til lagring av rå melk er det derimot ikke vanlig praksis å oppbevare rå melk i 9 dager før varmebehandling. Lagring av rå melk opp mot 4 dager før prosessering er innenfor normalen, slik at resultatene for 4 dager er mer aktuelle overfor meieriindustrien i praksis. Da ingen påvisbar nedbrytning av kasein ble observert etter 4 dagers lagring ved 4 °C, kan det tyde på at det enda ikke har blitt produsert proteinaser i rå melk på dette tidspunktet. På grunn av lavt bakterienivå kan det ha vært tilfelle at det ikke har blitt produsert nok enzym for å gi synlig utslag i elektroferogrammene, men dette er helt umulig å si basert på resultatene i denne studien. Det hadde vært interessant å undersøke ved hvilket tidspunkt enzymproduksjon fant sted kontra når proteolytisk nedbrytning ga utslag ved ulike temperaturer, for å lettere kunne forutsi for eksempel holdbarhet av UHT-behandlet melk. Flere forfattere har forsøkt å korrelere nivåer av bakterielle proteinaser med tidspunkt for gelering av UHT-melk under lagring og på den måten prøve å komme med anbefalinger for maksimumsnivåer av proteinaser for å sikre lang holdbarhet. Tolkning av slike studier er derimot komplisert, da ulike metoder for å måle proteinaseaktivitet har blitt brukt (Datta & Deeth 2001).

I en studie av Adams et al. (1975) ble det funnet at alle proteinaser produsert av psykrotrofe bakterier isolert fra rå melk overlevde varmebehandling ved 149 °C i 10 sekunder. Temperaturområdet for UHT-behandling ligger på 135-145 °C i 1-2 sekunder, altså en varmebehandling ved lavere temperatur og tid enn i studien av Adams, der alle proteinasene overlevde. Nødvendig varmebehandling for å inaktivere proteinaser tilstrekkelig ville ha ført til en ødelagt og brunfarget melk på grunn av Maillard-reaksjoner, ifølge Walstra et al. (2006b). Psykrotrofe bakterier kan altså vokse og produsere proteinaser som overlever UHT-behandling og ha langtidsvirkende effekt i melk over tid, uten at proteinaser kan detekteres i rå melk med dagens metoder. Dette vil spesielt gjelde langtidsholdbar UHT-behandlet melk, som på grunn av aseptisk pakning kan oppbevares i inntil 6 måneder ved romtemperatur. Det

er derfor av stor betydning å opprettholde optimale lagringsforhold og en konstant kjølekjede i den første fasen av meierikjeden, for å dermed hindre dannelsen av ekstracellulære termostabile proteinaser som kan overleve varmebehandling og forringe melken over tid. I Norge brukes for det meste pasteurisert melk med kort holdbarhet (11 dager), nettopp for å sikre god kvalitet på melken (Opplysningskontoret for Meieriprodukter 2016; TINE SA 2005; Walstra et al. 2006c; Walstra et al. 2006d).

4.5 Avslutning og konklusjon

Ut fra resultater i dette studiet ser ikke produksjon av ekstracellulære varmestabile proteinaser av psykrotrofe bakterier ut til å forårsake proteolytisk nedbrytning i UHT-melk ved optimal oppbevaring ved 4 °C over en periode på 4 dager. Dette sett bort ifra at nivåene var så lave at proteolyse ikke ble registrert. Enzymene så ut til å ha blitt produsert og ført til nedbrytning av fortrinnsvis kasein ved 4 °C, men ikke før etter 9 dagers lagring. At studiet ble basert på monokulturer kan ha vært med på å overestimere grad av bakterievekst, da det vil være mer konkurranse om næringsstoffer i rå melk på grunn av en kompleks mikrobiota. Inokulering av aktivt voksende celler i UHT-melken kan ha ført til ytterligere overestimering av grad av proteolyse på grunn av manglende lag-fase.

Trenden i meieriindustrien går mot sjeldnere henting av gårdsmelk og lengre kjøreavstander på grunn av færre og større gårder, noe som kan føre til forlenget lagring av rå melk og følgelig mer vekst av psykrotrofe bakterier, spesielt ved forhøyet temperatur. Produksjon av proteinaser under suboptimale forhold i rå melk kan få konsekvenser for melkens holdbarhet, spesielt under lagring av UHT-melk ved romtemperatur, nærmere enzymenes optimumstemperaturer. Dette understreker viktigheten av å opprettholde en ubrutt kjølekjede med minst mulig heving av kjøleromstemperatur i den initielle oppbevaringen av rå melk. Det vil fortsatt være viktig å begrense graden av kontaminering av psykrotrofe bakterier så langt det lar seg gjøre, da den aldri vil kunne utelukkes helt. Tiltak, som termisering ved ulike tidspunkt og LTI- og trykkbehandling, kan bidra til å få bukt med problemene knyttet til vekst og påfølgende produksjon av proteinaser.

Samlet gir dette studiet et innblikk i mangfoldet blant slekten *Pseudomonas* i rå melk og deres forskjellige evne til proteolytisk nedbrytning i melk blant de ulike stammene. På grunn av varierende grad av proteolyse kan valg av stammer til dels forklare forskjellene mellom ulike studier og bidra til å gjøre det vanskelig å med sammenligning mellom studier. Den

tradisjonelle tilnærmingen til psykotrofe bakteriers forringelse av melk har vært studier av frittflytende kulturer, en tilnærming som mest sannsynlig har forvrengt og villedet forståelsen av bedervelsesprosesser i naturlige omgivelser i produksjonsmiljøet. En bedre taksonomisk ramme vil også være nødvendig i forbindelse med karakterisering og identifisering av kvalitetsforringere i melk, da fenotypisk karakterisering av mange proteolytiske isolat har ført til en delvis feilidentifikasjon av *Pseudomonas* spp..

4.6 Videre arbeid

Mer forskning på metoder som raskt kan gi mål på enzymaktivitet i rå melk kan bli nyttig i vurdering av hva rå melk bør brukes til, der rå melk med høyest mengde proteinase eksempelvis ikke bør gå til langtidsholdbare melketyper. En tilnærming til dette vil kunne være å identifisere viktige melkeforringere blant *Pseudomonas* stammer, for på den måten å raskt kunne teste tilstedeværelse av disse, før det bestemmes hva melken bør brukes til. Bedre og mer entydige taksonomiske metoder for identifisering av den kvalitetsforringende mikrobiotaen i melk vil være viktig i den forbindelse, spesielt for sammenligning av funn blant ulike studier. Analysering av såkalte «housekeeping» gener, ved hjelp av MLVA, er en metode som blant annet har vist seg nyttig i flere nyere studier.

Ut i fra analysene som ble utført i studien ble det kun målt grad av enzymaktivitet, det var ikke mulig å detektere hvorvidt enzymene var blitt produsert. Å undersøke om enzymer er tilstede i kjølelagret rå melk, til tross for ingen påvisbar enzymaktivitet, vil kunne være nyttig i arbeidet med å forhindre kvalitetsforringelse av melk. Det kunne derfor ha vært av interesse å undersøke under hvilke betingelser enzymer blir produsert og under hvilke betingelser de er aktive.

Avslutningsvis er det verdt å nevne at fremtidige studier utvilsomt vil dra nytte av en eksperimentell tilnærming som etterligner biofilmer funnet i tanker og meieriprosesseringsmiljøer, for å bedre kunne relatere funn til meieriindustrien i praksis.

5 Kilder

- Adams, D., Barach, J. & Speck, M. (1975). Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, 58 (6): 828-834.
- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). "Factors affecting the growth and survival of microorganisms in foods". *Kap. 3 i: Food Microbiology, 3rd Edition*. University of Surrey, Guildford, UK: RSCPublishing. 20-62 s.
- Amundsen, S. L. (2015). *Pseudomonas fluorescens i melk: Vekst og metabolisme under lagring ved ulike temperaturer, med spesielt fokus på proteolytisk aktivitet*. Hovedoppgave. IKBM, NMBU, Ås. 94 s.
- ATCC. (u.å.). *Pseudomonas fluorescens Migula (ATCC® 17400™)*. Tilgjengelig fra: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/17400.aspx> [Brukt 04.06.16].
- Biomérieux. (2014). *api@ZYM. Pakningsvedlegg*: Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrike.
- BLAST. (2016). *Basic Local Alignment Search Tool*. Tilgjengelig fra: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome [Brukt 25.01.16 & 01.02.16].
- Bucky, A. R., Hayes, P. R. & Robinson, D. S. (1988). Enhanced inactivation of bacterial lipases and proteinases in whole milk by a modified ultra high temperature treatment. *Journal of Dairy Research*, 55 (03): 373-380.
- Bütikofer, U. & Ardö, Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *Bulletin-FIL-IDF (Belgium)*, 337: 24-32.
- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J. & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54: 142-153.
- Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D., Mafu, A. A., Griffiths, M. W. & White, C. (1994). Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34 (1): 1-30.
- Chen, L., Daniel, R. M. & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International dairy journal*, 13 (4): 255-275.
- Craven, H. & Macauley, B. (1992). Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage 1. Identification of types. *Australian Journal of Dairy Technology*, 47 (1): 38.
- Datta, N. & Deeth, H. (2001). Age gelation of UHT milk—a review. *Food and Bioprocess Processing*, 79 (4): 197-210.
- Datta, N. & Deeth, H. C. (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT-Food Science and Technology*, 36 (2): 173-182.

- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P. & Heyndrickx, M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (2): 460-470.
- DiLiello, L. R. (1982). *Methods in Food and Dairy Microbiology*: Avi Pub. Co.
- Dunstall, G., Rowe, M. T., Wisdom, G. B. & Kilpatrick, D. (2005). Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of *Pseudomonas* spp. of raw milk origin. *Journal of Dairy Research*, 72 (3): 276-280.
- Gebre-Egziabher, A., Humbert, E. & Blankenagel, G. (1980). Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. *Journal of Food Protection*®, 43 (9): 709-712.
- Griffiths, M., Phillips, J., West, I. & Muir, D. (1988). The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. *Food Microbiology*, 5 (2): 75-87.
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic acids symposium series. 95-98 s.
- Heck, J., Olieman, C., Schennink, A., Van Valenberg, H., Visker, M., Meuldijk, R. & Van Hooijdonk, A. (2008). Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 18 (5): 548-555.
- Jaspe, A., Oviedo, P., Fernandez, L., Palacios, P. & Sanjose, C. (1995). Cooling raw milk: change in the spoilage potential of contaminating *Pseudomonas*. *Journal of Food Protection*®, 58 (8): 915-921.
- Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A. & Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9): 5644-5650.
- Liu, M., Wang, H. & Griffiths, M. (2007). Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6): 2174-2184.
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J. & Heyndrickx, M. (2009). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environmental Microbiology*, 11 (2): 467-482.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. & Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11 (2): 133-147.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. & Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using

- 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (1): 200-214.
- McKellar, R. C. (1989a). "Assay methods for proteinases". Kap. 7 i: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- McKellar, R. C. (1989b). "Effect on the quality of dairy products". Kap. 9 i: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 228-244 s.
- McKellar, R. C. (1989c). "Physical and biochemical effects on milk components". Kap. 8 i: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- McKellar, R. C. (1989d). "Regulation and control of synthesis". Kap. 5 i: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 153-172 s.
- Mestawet, T. A., Girma, A., Ådnøy, T., Devold, T. G., Narvhus, J. A. & Vegarud, G. E. (2014). New insights in goat breeds of Ethiopia: High content of α s1-CN and its association with coagulation properties, whey syneresis and micelle size. *Small Ruminant Research*, 119 (1–3): 146-155.
- Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M. a. A., Amigo, L., Krause, I. & Ramos, M. (2001). Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para- κ -casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 915 (1): 225-230.
- Moe, K. M., Porcellato, D. & Skeie, S. (2013). Metabolism of milk fat globule membrane components by nonstarter lactic acid bacteria isolated from cheese. *Journal of Dairy Science*, 96 (2): 727-739.
- Mulet, M., Lalucat, J. & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12 (6): 1513-1530.
- Oliveira, G. B. d., Favarin, L., Luchese, R. H. & McIntosh, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (2): 313-321.
- Opplysningskontoret for Meieriprodukter. (2016). *UHT-varmebehandling*. Tilgjengelig fra: <http://www.melk.no/melk-og-meierifakta/meieribibliotek/meerileksikon/melk/langtidsholdbar-melk/faktaark/uht-varmebehandling/> [Hentet 21.05.16].
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37 (5): 664-698.
- Samaržija, D., Zamberlin, Š. & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62 (2): 77-95.
- Sweeney, P. L. H. & Fox, P. F. (2013). "Chemistry of the caseins". Kap. 4 i: *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*: New York: Springer.

- Sørhaug, T. & Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8 (2): 35-41.
- Tidemann, E. M. (2016). *Pseudomonas isolert fra ubehandlet melk: Vekst og lipolytisk aktivitet ved ulike lagringstemperaturer*. Hovedoppgave. IKBM, NMBU, Ås. 65 s.
- TINE SA. (2005). *TINEboka*: Mediaprint AS.
- TINE SA. (2014a). *TINE Handel. Hel & Lett Tinemelk Langtidsholdbar 1 liter*. Tilgjengelig fra: https://www.tinehandel.no/tine_esa/cc/zSearchResultAll.jsp?sessionkey=DTJ2-159L-EQPU-HGQD-4NZH-RS2U-4QCD-UG6P&sku=3502 [Hentet 12.04.16].
- TINE SA. (2014b). TINEs regelverk om bedømmelse og betaling av leverandørmelk etter kvalitet. Oslo. Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/cms/praktisk-informasjon/tines-regelverk/attachment/346898?ts=14a7119b071> [Hentet 09.04.16].
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006a). "General aspects of processing". *Kap. 6 i: Dairy Science and Technology, Second Edition*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 207-223 s.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006b). "Heat treatment". *Kap. 7 i: Dairy Science and Technology, Second Edition*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 225-272 s.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006c). "Microbiology of milk". *Kap. 5 i: Dairy Science and Technology, Second Edition*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 175-203 s.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006d). "Milk components". *Kap. 2 i: Dairy Science and Technology, Second Edition*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 17-108 s.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006e). "Milk: Main characteristics". *Kap. 1 i: Dairy Science and Technology, Second Edition*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 3-16 s.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006f). "Packaging". *Kap. 15 i: Dairy Science and Technology, Second Edition*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 411-417 s.
- Wibetoe, G. (2009). *Kromatografi. I Store norske leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/kromatografi> [Hentet 09.04.16].
- Zalazar, C., Palma, S. & Candiotti, M. (1996). Increase of free sialic acid and gelation in UHT milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 51 (1): 22-23.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway