



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 30 stp
Institutt for kjemi, bioteknologi- og matvitenskap

***Pseudomonas* isolert fra ubehandlet melk: Vekst og lipolytisk aktivitet ved ulike lagringstemperaturer**

Pseudomonas isolated from raw milk: Growth and lipolytic activity during storage at different temperatures

Ellen Marie Tidemann

Matvitenskap – produksjon og utvikling av næringsmidler

Forord

Denne studien ble gjennomført våsemesteret 2016 og er mitt avsluttende arbeid i matvitenskap, retning produksjon og utvikling av næringsmidler ved NMBU. Arbeidet ble utført hos forskningsgruppen for meieriteknologi og matkvalitet ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM).

Jeg vil benytte anledningen til å rette oppmerksomhet mot alle som har vært delaktig i det praktiske og skriftlige arbeidet med min masteroppgave i form av veiledning og samarbeid.

Jeg vil rette en stor takk til hovedveileder, professor Judith Narvhus, og medveileder, førsteamanuensis Hilde Marit Østlie, for hjelp til utforming av studie, gode tilbakemeldinger, inspirasjon, og ikke minst levende engasjement.

Gjennom forarbeidet med studien har jeg vært så heldig å få samarbeide med medstudent, Oda Bækkelund, en sann gledesspreder og en god diskusjonspartner.

Gjennom det praktiske forskningsarbeidet har jeg fått gleden av å arbeide på et laboratorium med et svært hyggelig arbeidsmiljø. Jeg vil spesielt takke Ahmed Abdelghani, Kari Olsen og May Aalberg for bistand på laboratoriet og god moralsk støtte.

I tillegg vil jeg takke TINE AS for økonomisk bistand til oppgaven og mulighet for prøvetakning hos deres meieri på Kalbakken.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Institutt for kjemi, bioteknologi- og matvitenskap

Ås, 15. juni 2016

Ellen Marie Tidemann

Sammendrag

Kjølelagring av kumelk i verdikjeden frem til varmebehandling på meieriet danner et selektivt miljø for psykrotrofe bakterier. Disse bakteriene tilhører hovedsakelig slekten *Pseudomonas* som har evnen til å produsere termoresistente ekstracellulære enzymer. Disse kan hydrolysere lipider og protein i melk som kan medføre forringelse av melken. På bakgrunn av dette var det ønskelig i denne studien å kartlegge den enzymatiske aktiviteten blant ulike bakteriestammer av *Pseudomonas*, samt undersøke hvordan aktiviteten ble påvirket av ulike lagringstemperaturer.

I denne studien ble evnen til å hydrolysere lipider i melk undersøkt blant åtte *Pseudomonas* spp., isolert fra ubehandlet melk. Isolatene ble inokulert i UHT-melk som ble lagret ved tre ulike temperaturer over ni dager. Utover lagringstiden ved de ulike inkuberingstidene i UHT-melken ble både vekstegenskapene og lipolytiske aktiviteten blant de ulike bakteriestammene kartlagt.

Samtlige av de åtte utvalgte stammene viste god vekst i UHT-melk lagret ved 4, 8 og 22 °C. Lipolytisk aktivitet ble identifisert i melk lagret ved samtlige av de utvalgte inkuberingstemperaturene og det ble observert en økning av lipolytisk aktivitet med lagringstemperatur. Stor variasjon i lipolytisk aktivitet ble observert mellom de ulike bakteriestammene, da de produserte svært ulike mengder frie fettsyrer. Disse resultatene demonstrerer betydningen av en lukket kjølekjede, samt viktigheten av å begrense kontamineringsmengden i melk. Ettersom lipolytisk aktivitet kan forekomme selv ved kjølelagring bør god hygienep praksis bør dermed etterstrebes og forbedres i alle trinn i verdikjeden for å redusere dette.

Abstract

Cold storage of bovine milk in the supply chain, until heat treatment at the dairy, constitutes a selective environment for psychrotrophic bacteria. These bacteria primarily belong to the genus *Pseudomonas*, which have the ability to produce thermoresistant extracellular enzymes. In turn these enzymes cause hydrolyze lipids and protein in milk, resulting in degraded quality. Based on this, the aim of the current study was to identify the enzymatic activity amongst different species of *Pseudomonas* bacteria, and to investigate the effect of different storage temperatures on the process.

In the current study the ability to hydrolyze lipids in milk was investigated amongst eight *Pseudomonas* spp., isolated from raw milk. The isolates were inoculated in the UHT-milk stored at three different temperatures for nine days. In addition to the storage time at certain times of incubation in the UHT-milk, both growth characteristics and the lipolytic activity amongst the different bacteria species were mapped.

All eight chosen species of *Pseudomonas* displayed good growth in UHT-milk stored at 4, 8, and 22 °C. Lipolytic activity was identified in milk stored at all of the chosen incubating temperatures in addition to an increase of lipolytic activity with storage temperature. A significant variation in the lipolytic activity was observed among the species of bacteria, as they produced very different amounts of free fatty acids. These results demonstrate the importance of a closed cooling chain, in addition to limiting the amount of contamination in milk. As lipolytic activity may occur even during cold storage, good hygienic routines should be strived for and improved throughout every step of the supply chain in order to reduce contamination.

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1 Melk som næringskilde	1
1.2 Kjemisk sammensetning	1
1.3 Mikrobiologisk kvalitet i råmelk	3
1.4 Mikrobiologisk kvalitet i varmebehandlet melk	4
1.5 Post-pasteurisering kontaminering	5
1.6 Kvalitetsødeleggelse i melk	5
1.6.1 Psykrotrofe bakterier	6
1.6.2 <i>Pseudomonas</i>	6
1.6.3 Hydrolytiske enzymer i melk	7
1.6.4 Lipolytisk aktivitet i melk	8
1.7 Bakgrunn og hensikt for masteroppgaven	10
2. Materialer og metoder	11
2.1 Isolering av <i>Pseudomonas</i> fra upasteurisert melk	11
2.2 Prøveopparbeidelse og rendyrking	11
2.3 Karakterisering og identifisering	11
2.3.1 Fenotypisk karakterisering	11
2.3.2 Enzymaktivitet	12
2.3.3 Genotypisk identifisering	12
2.4 Vekst av <i>Pseudomonas</i> i melk	15
2.5 Fettsyreanalyse	16
2.5.1 Folchs metode: Ekstraksjon av lipider	16
2.5.2 Fast-fase ekstraksjon (SPE)	16
2.5.3 Dannelse av fettsyremetylestere (FAME)	16
2.5.4 GC-analyse	17
3. Resultater	18

3.1 Fenotypisk karakterisering	18
3.2 Enzymaktivitet.....	18
3.3 Genotypisk identifisering	23
3.4 Vekst av <i>Pseudomonas</i> i melk.....	25
3.5 Analyse av frie fettsyrer	27
3.6 Variasjonen i lipolytisk aktivitet blant de ulike bakteriestammene av <i>Pseudomonas</i>	42
4. Diskusjon.....	45
4.1 Isolering, identifisering og utvalg av bakteriestammer av <i>Pseudomonas</i>	45
4.2 Utvalg av bakteriestammer	45
4.3 Vekst av <i>Pseudomonas</i> i melk.....	46
4.4 Metabolismen til <i>Pseudomonas</i> i melk med hensyn til lipolytisk aktivitet.....	49
4.5 Variasjon mellom ulike <i>Pseudomonas</i> -stammer	51
4.6 Oppsummering og konklusjon.....	53
4.7 Videre arbeid	54
Referanseliste	55

Vedlegg på USB-minnepinne (totalt 4 stk):

1: Diffusjonsanalyse

2: Vekstforsøk

3: Fettsyreanalyse

4: Fettsyreanalyse - gjennomsnitt

1. Introduksjon

1.1 Melk som næringskilde

I løpet av den første levetiden er melk pattedyrets primærernæringskilde da det inneholder de nødvendige næringsstoffene for vekst og utvikling. Melken er et gulhvitt sekret som blir produsert i melkekjertler hos hunnpattedyr. Kumelk er i tillegg en viktig ernæringskilde i vårt kosthold og produktet dominerer i kommersiell meieriproduksjon. Kumelk består hovedsakelig av komponentene vann (87,1 %), laktose (4,6 %), fett (4,0 %), protein (3,3 %), mineraler (0,7 %) og organiske syrer (0,17 %) (Walstra et al., 2005). Arv- og miljøbetingede forhold kan gi variasjoner i den kjemiske sammensetningen, hvorav genetiske faktorer, laktasjonsstadium, sykdom og fôr er noen relevante faktorer.

1.2 Kjemisk sammensetning

Majoriteten av bestanddelene i melk er store, komplekse, sammenhengende strukturer fremfor individuelle molekyler (Damodaran et al., 2007). De mest dominerende strukturene er kaseinprotein og mineraler som sammen danner store kaseinmiceller og lipider som igjen danner fettkuler. Da melk hovedsakelig består av vann og omkring 95 % av lipidene i melk danner fettkuler i vannfasen, blir melk betegnet som en olje-i-vann-emulsjon (Walstra et al., 2005).

I kumelk er 80 % av proteinene lokalisert i kaseinmiceller (Walstra et al., 2005).

Kaseinproteinene klassifiseres ut i fra primærstrukturen som α_{s1} , α_{s2} , β og k-kasein hvor molarratioen er henholdsvis 11:3:10:4. De resterende proteinene (myseproteiner) forekommer som individuelle molekyler i melkeserumet og består hovedsakelig av α -lactalbumin, β -lactoglobulin, immunoglobuliner og serumalbumin.

I kumelk utgjør lipider omkring 4 % av volumet. Lipidene er bestående av 98 % triacylglycerol, og 2 % di- og monoacylglycerol, kolestrerol, fosfolipider, frie fettsyrer og glykolipider (Fox et al., 2015; McKellar, 1989a) (tabell 1). Mengden lipider kan imidlertid variere avhengig av blant annet dyrets rase, laktasjonssteg, årstid, ernæringsstatus, type fôr, alder, helse, samt varighet mellom melking. Melkefettet består av fettsyrer med keto- eller hydroksygrupper med ulikt antall karbonatomer eller forgrenet karbonkjede.

Råstoffet har en bred fettsyresammensetning da 400 ulike fettsyrer har blitt identifisert (Sikorski & Kolakowska, 2010). Av disse har kun et dusin en konsentrasjon over 1 %, hvorav

korte fettsyrer (C4:0 til C10:0) utgjør den største andelen (tabell 2). Fettsyresammensetningen skiller seg i stor grad fra vegetabiliske oljer hvor C18-syrer dominerer. I tillegg har vegetabiliske oljer en større mengde umettet fett, samt et mindre antall ulike fettsyrer (Walstra et al., 2005).

Tabell 1: Prosentandel av ulike lipider i råmelk (Walstra et al., 2005)

Lipid klasser	Alkohol	Prosentandel av melkefett (w/w)
Nøytrale glyserider:		98,7
Triacylglyserider	Glyserol	98,3
Diacylglyserider	Glyserol	0,3
Monoacylglyserider	Glyserin	0,03
Frie fettsyrer		0,1
Fosfolipider:		0,8
Fosfatidylkolin	Glyserol	0,27
Fosfatidyl etanolamin	Glyserol	0,26
Fosfatidyl serin	Glyserol	0,03
Fosfatidyl inositid	Glyserol	0,04
Sphingomyelin	Sphingosin	0,20
Cerebrosider	Sphingosin	0,1
Gangliosider	Sphingosin	0,01
Steroler:		0,32
Kolesterol		0,30
Kolesterol ester	Kolesterol	0,027
Karotenoider + vitamin A		0,002

Tabell 2: Andel (mol %) ulike fettsyrer i nøytrale glyserider, fosfolipider og som frie fettsyrer i råmelk, samt prosent i 3.-posisjon (Walstra et al., 2005).

Fettsyrer	Sammensetning (mol %) i			
	Nøytrale glyserider	Fosfolipider	Frie fettsyrer	Prosent i 3-posisjon
Mettet:	69 (57-80)	45	72	
Smørsyre (C4:0)	8,5 (7-14)	0,0	14,5	97
Kaprønsyre (C6:0)	4,0 (2-7)	0,0	4,5	84
Kaprylsyre (C8:0)	1,8 (1-3,5)	0,2	2	45
Kaprinsyre (C10:0)	3,0 (1,5-5)	0,2	2	33
Laurinsyre (C12:0)	3,6 (2,5 -7)	0,5	2	26
Myristinsyre (C14:0)	10,5 (8-15)	3	9	17
Palmitinsyre (C16:0)	23,5 (20,37)	19	21	12
Stearinsyre (C18:0)	10,0 (6-13)	12	13	22
Oddetallsfettsyrer	2,5 (1,5-3,5)	4,5	2,5	7
Forgrenede fettsyrer	1,1 (0,7-1,8)	0,7	1	
Andre	0,7 (0,3-2)	5		
Enumettet:	27 (18-36)	41	23	
Palmitoleinsyre (C16:1)	1,4	?	1?	23
Oljesyre (18:1)	21 (13-28)	38	20	32
Andre	5,5	3	3,5	
Flerumettet:	2,5 (1-4,3)	8		
Linolensyre (C18:2)	1,8	8	2,3	20
Andre	0,7	0,2		

1.3 Mikrobiologisk kvalitet i råmelk

Kumelk er et optimalt miljø for et stort antall ulike mikroorganismer. Rikelig med næringsstoff, høy vannaktivitet og moderat pH (6,4-6,6) bidrar til at flere ulike bakterier kan vokse i melk (Adams & Moss, 2008). Melken, produsert i jurcellen, blir betraktet som tilnærmet steril, men som følge av kontaminering under melking blir flere ulike typer mikroorganismer regelmessig detektert i råmelk (Quigley et al., 2013). Dette skyldes blant annet mikroorganismer i juret, kontaminering fra melkemaskiner som kan være reservoar for bakterier, eller kontaminering fra andre kilder som hud, gjødsel, støv, jord, vaskemidler og gårdsarbeidere. På bakgrunn av dette er 10^2 - 10^3 bakterier/ml i råmelk vanskelig å unngå (Walstra et al., 2005).

Ettersom flere mikroorganismer kan forårsake uønskede endringer i melk, eller fremkalle sykdom, blir råmelken normalt kjølt ned til omkring 4 °C øyeblikkelig etter melking.

Nedkjøling er vanlig praksis på gårder i industriland da kjøletemperatur reduserer bakteriell vekst (Walstra et al., 2005). Melken blir lagret i kjøletanker før den blir transportert i tankbil til meieriene og lagret videre i kjøletanker på meieriet frem til prosessering. Rutinene sørger for at råmelken kan holde seg under 10 °C fra melking og frem til varmebehandling, noe som legger til rette for at kun psykrotrofe bakterier er i stand til å vokse. Dette gjelder blant annet Gram-negative arter av slektene *Pseudomonas (P)*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, samt psykrotrofe koliforme bakterier og Gram-positive arter av *Bacillus* (Adams & Moss, 2008).

1.4 Mikrobiologisk kvalitet i varmebehandlet melk

Melken blir varmebehandlet med det formål å destruere patogene og kvalitetsødeleggende mikroorganismer, samt inaktivere enzymer (Walstra et al., 2005). Ulike land benytter ulike varmebehandlingsmetoder og ut i fra intensitet blir varmebehandlingsmetodene klassifisert som lav pasteurisering (63 °C i 30 min. / 72 °C i 15 sek.), høy pasteurisering (80-85 °C 1 min.) og ultrapasteurisering (UHT-behandling 135 °C i 1 sek.) (Adams & Moss, 2008; Walstra et al., 2005). Varmebehandlingene etterfølges av raskt nedkjøling til i underkant av 4 °C.

Ved lav pasteurisering blir samtlige patogene og vegetative bakterier destruert med unntak av noen Gram-positive sporedannende bakterier, bakterier fra slektene *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus* og *Lactobacillus*, samt arter fra Gram-negative *Alcaligenes tolerans* (Adams & Moss, 2008; Walstra et al., 2005). I tillegg vil en stor andel enzymer bli inaktivert, men noen kan overleve da flere endogene proteinaser, bakterielle proteinaser og lipaser er varmeresistente (Walstra et al., 2005). Ved høy pasteurisering og UHT-behandling blir alle vegetative bakterier destruert, men på lik måte som ved lav pasteurisering vil ikke alle enzymer bli inaktivert. Bakterielle sporer kan overleve lav og høy pasteurisering men vil bli destruert ved UHT-behandling. Om termisering (varmebehandling ved 60-65 °C i 5-20 sek.) praktiseres som en del av melkeprosesseringen, kan dette potensielt forhindre stor bakteriell vekst før pasteurisering da man unngår produksjon av varmeresistente lipaser og proteaser. Den mikrobielle kvaliteten til pasteurisert melk blir styrt ut i fra forskrifter fra EU som krever at den bør inneholde mindre enn 1 koliform ml⁻¹ og ha et bakterieantall under 3x 10⁴ kde ml⁻¹ ved inkubering ved 30 °C. I tillegg kreves det at melken inneholder mindre enn 10⁵ kde ml⁻¹ ved inkubering ved 21 °C etter lagring i 5 dager ved 6 °C (Directive, 1992). I følge Walstra (2005) vil melken som regel inneholde mellom 500 og 1000 ml⁻¹ bakterier, forutsatt at råmelken ikke inneholder mange varmeresistente bakterier.

1.5 Post-pasteurisering kontaminering

Til tross for gjennomføring av god hygienep praksis i meieriindustrien vil kontaminering etter pasteurisering (PPC) oppstå regelmessig (Sørhaug & Stepaniak, 1997). På bakgrunn av dette vil det ofte være Gram-negative psykrotrofe stammer av *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* og *Psychrobacter* tilstede i melken etter pasteurisering. For å begrense antall bakterier i varmebehandlet melk bør det være tilfredsstillende standarder for hygiene under produksjon, transport og emballering (Walstra et al., 2005). Ettersom rekontaminering som regel forekommer ved pakking etter varmebehandling, kan antall bakterier overført til melken bli betydelig redusert ved bruk av maskiner designet for aseptisk fylling (Sørhaug & Stepaniak, 1997; Walstra et al., 2005). Dannelse av biofilm, bestående av mikroorganismer og cellulære biprodukt festet til overflater, har vært et vedvarende problem i meieriindustrien. (Robinson, 2005). Dette har blant annet blitt demonstrert av en studie gjennomført av Stone og Zottola (1985) som viste at *P.fragi* har god evne til å feste seg til rustfritt stål, selv under dynamisk strømning av melk under prosessering.

I tilfeller der rekontaminering ikke er årsaken til kvalitetsforringelsen av melken, kan forringelsen tilskrives koagulering av pasteuriseringsoverlevende *Bacillus cereus* (Walstra et al., 2005). Til tross for at noen Gram-positive sporedannende bakterier overlever pasteurisering ved lagring av PPC-melk, vil temperaturen til melken avgjøre hvilke bakterier som dominerer ved tidspunktet for kvalitetsforringelsen. Ved temperaturer over 10 °C vil hovedsakelig den termofile mikrofloraen, som overlever pasteurisering, og sporeformere i stand til å overleve pasteurisering dominere. Psykrotrofe bakterier vil derimot dominere under 10 °C da andre bakterier mangler evnen til å vokse ved kjøletemperatur (Walstra et al. 2005). Holdbarhet av pasteurisert melk utover tidsrommet 5-15 dager krever UHT-behandling ettersom denne varmebehandlingen reduserer antall sporer. Da behandlingen også har innvirkning på smaken, blir ikke denne typen melk bestandig foretrukket (Adams & Moss, 2008).

1.6 Kvalitetsødeleggelse i melk

Ettersom melken blir lagret ved kjøletemperatur vil kontamineringsmengden av psykrotrofe bakterier ha større betydning for melkens kvalitet fremfor totalt antall bakterier i pasteurisert melk (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Kvaliteten til meieriprodukter kan bli påvirket av varmeresistente enzymer som produseres av psykrotrofe bakterier i ubehandlet melk. Den kan i tillegg påvirkes av enzymer og andre metabolitter produsert av psykrotrofe bakterier som vokser under kjølelagring etter varmebehandling (Sørhaug & Stepaniak, 1997).

Kvalitetsforringelsen av pasteurisert og ubehandlet melk blir først identifisert når psykotrofantallet overstiger $6 \log \text{ kde ml}^{-1}$, da det kan dannes en uønsket smak.

1.6.1 Psykrotrofe bakterier

Psykotrofe bakterier er en gruppe med Gram-negative og Gram-positive staver som har en optimal temperatur mellom 20 til 30 °C (Walstra et al., 2005). Psykotrofe arter som blir detektert i råmelk inkluderer ofte Gram negative staver av slektene *Pseudomonas*, *Acinobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, psykotrofe koliforme hvorav *Aerobacter* spp. dominerer og Gram-positiv *Bacillus* spp. Til tross for at psykrotrofe kan vokse ved kjøling vokser de relativt sakte slik at bedervelsesprosessen forsinkes (Adams & Moss, 2008). På bakgrunn av dette har effektiviteten til kjølekjeden sammen med antall og type bakterier som kontamineres etter pasteurisering en avgjørende effekt på holdbarheten til melken.

Psykrotrofe bakterier sin evne til å vokse ved lav temperatur skyldes plasmamembranens sammensetning og oppbygningen (Adams & Moss, 2008). Etersom membranlipidene består av flere umettete og korte fettsyrer sammenlignet med andre bakterier vil transporten av oppløste stoffer bli opprettholdt når temperaturen reduseres. Dette resulterer i at psykrotrofe bakterier får næring og kan være aktive til tross for at temperaturen er relativt lav.

Majoriteten av psykrotrofe bakterier produserer proteaser og lipaser som kan hydrolysere protein og fett som igjen kan føre til uønsket smak og endre fysiokjemiske egenskaper i varmebehandlet melk (Walstra et al., 2005). Gram-negative psykotrofe bakterier vil som nevnt tidligere ikke overleve pasteurisering, men dersom et høyt antall er tilstede før pasteurisering ($>10^5 \text{ kde ml}^{-1}$) kan kvalitetsødeleggelse oppstå i prosessert melk som følge av tilstedeværelse av varmeresistente enzymer.

1.6.2 *Pseudomonas*

I ubehandlet melk vil som oftest *Pseudomonas* utgjøre 10 % av mikrofloraen (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Bakterier av slekten *Pseudomonas* kan bli funnet i naturlige habitat som jord, ferskvann, og andre marinemiljø. Bakteriene har i tillegg blitt isolert fra kliniske instrumenter, aseptiske løsninger, kosmetikk samt medisinske produkter (Franzetti & Scarpellini, 2007). Til tross for at bakterien utgjør kun en liten andel av mikrofloraen i råmelk er *Pseudomonas* den viktigste slekten i kjølelagret melk, da de dominerer i rå og pasteurisert melk ved tidspunktet for harskning (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Dette skyldes blant annet at *Pseudomonas*-slekten består av stammer med kortest generasjonstid mellom 3 og 7 °C (McKellar, 1989a) (tabell 3). I flere studier som har undersøkt bakteriefloraen i

råmelk har *P. fluorescens*, *P. fragi* og *P. putida* blitt identifisert i størst grad (De Jonghe et al., 2011; Dogan & Boor, 2003).

I melk lagret ved 4 °C kan flere stammer av *Pseudomonas* spp. produsere enzymer som hydrolyserer lipider og proteiner (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Som følge av dette vil melkens holdbarhet påvirkes av veksten og metabolske aktivitet til *Pseudomonas* spp. ved kjølelagring (Sørhaug & Stepaniak, 1997).

Tabell 3: Generasjonstiden (t) til ulike bakterier detektert i melk (McKellar, 1989a)

		Generasjonstid (t)			
Inkuberingstemperatur (°C)		3	3-5	5-7	7-9
Bakterier	Medium				
<i>Pseudomonas</i> spp.	Pasteurisert melk	8-12	6-7.5	4,5-5	3,5-4
<i>Enterobacter</i> spp.	Pasteurisert melk	17	7.5	5	3.2
<i>Bacillus cereus</i>	Pasteurisert melk	-	-	-	7
<i>Bacillus subtilis</i>	Trypton soyabuljong	26,8	20,9		6,7
<i>Streptococcus faecalis</i>	Steril helmelk	26,4	23,3		18,5

1.6.3 Hydrolytiske enzymer i melk

Ekstracellulære mikrobielle enzymer produsert av *Pseudomonas*-bakterier blir hovedsakelig utskilt i slutten av stasjonærfasen under vekst (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Ved dannelse av tilstrekkelig mengde enzymer vil melken bli endret fysiologisk da de kan hydrolysere lipider og proteiner. Dette skyldes hovedsakelig kasein-hydrolyse av proteaser som kan føre til koagulering av melk og lipaser som hydrolyserer fett. Ikke-denaturert myseprotein blir derimot ikke hydrolysert, da proteaser har lav aktivitet mot disse proteinene. *Pseudomonas* spp. produserer også esteraser, men ettersom flere studier har funnet disse enzymene ubetydelig med tanke på hydrolysing av fett blir ikke disse enzymene sett på som viktig i forbindelse med kvalitetsforringelse av melk (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Dette ble blant annet observert i en studie gjennomført av McKay og medarbeidere (1995) som studerte lipaser og esteraser produsert av *Pseudomonas fluorescens* LS107d2.

Grad av enzymaktiviteten i melk er avhengig av hvilke bakteriestammer som er tilstede i melken. En studie gjennomført av Dogan og Boor (2003) demonstrerer dette da det ble påvist at 51 % av 338 isolater fra ubehandlet melk var protease-positiv, mens 67 % var lipase-positiv. Majoriteten av isolatene ble identifisert som *P. fluorescens*, og 69 % av denne

bakterier innenfor denne arten var positiv for all enzymaktivitet, mens 87,5 % av *P. putida* hadde ingen enzymaktivitet.

1.6.4 Lipolytisk aktivitet i melk

Lipolytiske enzymer (esteraser og lipaser) kan bli definert som carboxylhydrolaser som hydrolyserer acylglyseroler (Chen et al., 2003). Enzymene esteraser, også kalt karboksylaser, hydrolyserer triacylglyseroler med korte fettsyrer, mens lipaser eller triacylglyserol acylhydrolaser har størst aktivitet mot triacylglyseroler med medium lange og lange fettsyrer. Esteraser skiller seg også fra lipaser da de er mer aktive i vannløsninger, mens lipaser er mer aktive i lipid-vann interfasen. Lipaser er i tillegg i stand til å hydrolysere de fleste av esterasesubstratene.

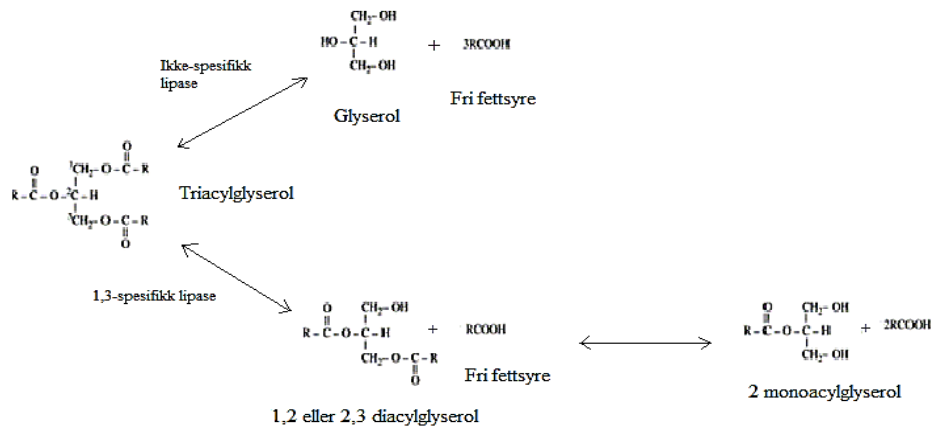
Spesifisiteten til lipolytiske enzymer blir styrt av de molekylære egenskapene til enzymet, strukturen til substratet og faktorer som påvirker bindingen av enzymet til substratet (Chen et al., 2003). På bakgrunn av disse faktorene kan de lipolytiske enzymene bli delt inn i tre grupper. Den første gruppen er ikke-spesifikk da enzym i denne gruppen frigjør frie fettsyrer (FFA) fra alle tre posisjoner i triacylglyserolet. Triacylglyserol kan dermed hydrolyseres fullstendig til FFA og glyserol. Den andre gruppen av lipolytiske enzymer er 1,3-spesifikk, da den frigjør FFA fra ytre 1.- og 3.-posisjon til triacylglyserolmolekylet. Dette gir 1,2-diasylglyserol, 2,3 diasylglyserol, 2-monoacylglyserol og FFA. Da asylnigrering lett forekommer i disse produktene kan disse produktene omdannes videre til 1,3 diasylglyserol, 1-monoacylglyserol, og FFA. Som følge av dette kan inkubering med 1,3-spesifikk lipase resultere i fullstendig hydrolyse av triacylglyserol til FFA og glyserol. Da ingen bakterielle lipaser tilhører den tredje gruppen, blir ikke disse enzymene beskrevet nærmere.

Hydrolyseringen av triacylglyserol er illustrert i figur 1.

Majoriteten av bakterielle lipolytiske enzymer har en spesifisitet for 1.- og 3.-posisjonene i triacylglyserolet og noen hydrolyserer diasylglyseroler og monoacylglyseroler raskere enn triacylglyseroler (Chen et al., 2003). Eksempler på enzymer med 1.- og 3.-posisjon spesifisitet er enzymer produsert av *P. fluorescens* 33 og *P. fluorescens* 2D. I motsetning til lipoprotein lipase (endogen lipase) kan bakteriell lipase hydrolysere lipider i intakte fettglobuler, men mekanismene bak denne aktiviteten er fortsatt ukjent (Chen et al., 2003).

Ekstracellulær lipase produsert av ulike *Pseudomonas*-stammer er relativt varmemestabile. For eksempel hadde lipaser fra *P. fluorescens* SIK WI 90 % inaktivering etter 2 min. ved 140 °C i skummet melk (Andersson et al., 1979), og lipase fra *P. fluorescens* MC50 hadde 90 %

inaktivering etter 1,2 min. ved samme temperatur i simulert melkesaltsystem (Swaisgood & Bozoglu, 1984). Som følge av høy varmeresistens kan de til og med overleve UHT-behandling.



Figur 1: Hydrolyse av triacylglycerol av de to store enzymgruppene i) ikke-spesifikk lipase og ii) 1,3- spesifikk lipase (Chen et al., 2003).

McKay og medarbeidere (1995) undersøke *P. fluorescens* LS107d2 som produserer relativt store mengder lipase og esterase. Ved poding av bakteriestammen i melk identifiserte de en økning av fettsyrene C4:0, C16:0, C18:0, C18:1, samt en liten økning i C14:0. Ved hjelp av flere analyser ble det antatt at lipase var ansvarlig for akkumuleringen

Lipolyse bidrar til uønsket smak i meieriprodukter som følge av hydrolysering av triacylglyceroler (Chen et al., 2003). Kortkjedede fettsyrer som smørsyre (C4:0), kapronsyre (C6:0) og kaprylsyre (C8:0) gir skarp og syrlig smak, mens medium fettsyrer som kaprinsyre (C10:0) og laurinsyre (C12:0) har en tendens til å gi såpesmak. Langkjedede fettsyrer (myristinsyre (C14:0), palmitinsyre (C16:0) og stearinsyre (C18:0) bidrar derimot lite til smak og aroma. Kumelk inneholder en lipidkonsentrasjon mellom 37-41 g L⁻¹ (Chen et al., 2003). Hydrolyse av disse lipidene til så lite som 0,37-0,82 g L⁻¹ kan gi uønsket harsk eller oksidert smak til melken. Nivået av kort- og mediumkjedede fettsyrer (C4-C12) i ulike type melkeprøver og de tilhørende grenseverdiene er listet i tabell 4.

Tabell 4: Konsentrasjonen av kort- og mediumkjedede fettsyrer i ulike melkeprøver og typiske terskelkonsentrasjoner for uønsket smak (Chen et al., 2003).

Frie fettsyrer	Konsentrasjon ($\mu\text{mol ml}^{-1}$)				Terskel for uønsket smak ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
	Råmelk	Pasteurisert melk	UHT-melk	Harsk melk	
Smørsyre (C4:0)	0,04	0,02	0,15	0,31-0,04	0,28
Kaprønsyre (C6:0)	0,03	0,01	0,05	0,14-0,42	0,12
Kaprylsyre (C8:0)	0,02	0,01	0,03	0,06–0,19	0,05
Kaprinsyre (C10:0)	0,02	0,02	0,04	0,16–0,46	0,04
Laurinsyre (C12:0)	0,03	0,02	0,03	0,13–0,32	0,04

Frie fettsyrer kan i tillegg være forløpere for andre relativt intense smakskomponenter som blant annet acetoedikksyre, β -ketosyrer, metylketoner og estere (Chen et al., 2003).

Observasjoner i en studie gjennomført av McKay og medarbeidere (1995) der lipolytisk aktivitet til *P. fluorescens* ble undersøkt, antyder sterkt at FFA profilen i melk er en balanse mellom akkumulering og degradering av frie FFA. Umettede fettsyrer frigjort under lipolyse er utsatt for oksidasjon og samtidig dannelse av aldehyder og ketoner, som gir bismak beskrevet som oksidert pappsmak eller metallisk smak (Chen et al., 2003).

1.7 Bakgrunn og hensikt for masteroppgaven

Da kumelk kjølelagres før behandling, under håndtering og prosessering har aktiviteten til psykrotrofe bakterier størst betydning for kvaliteten og dermed holdbarheten til melk. På bakgrunn av dette er det viktig å generere kunnskap om bakterienes enzymaktivitet under disse prosessene i verdikjeden slik at det kan utarbeides tiltak som kan forbedre kvaliteten til produktet. Dette gjelder spesielt med hensyn til bakterier av slekten *Pseudomonas* ettersom disse bakteriene vanligvis dominerer ved tidspunktet for kvalitetsforringelsen av melken.

Hensikten med denne studien er å undersøke variasjonen av lipolytisk aktivitet blant ulike *Pseudomonas*-stammer isolert fra ubehandlet melk, samt innvirkningen av ulike lagringstemperaturer på bakterievekst og lipolytisk aktivitet.

2. Materialer og metoder

2.1 Isolering av *Pseudomonas* fra upasteurisert melk

Bakterier av slekten *Pseudomonas* ble isolert fra melkeprøver fra fire ulike silotanker hos Tine meierier ved dyrking på *Pseudomonas* CFC Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) tilsatt cetrimide-fucidin-cephalodine supplement (Merck) etter dyrking ved 22 °C i 72 timer. For å identifisere bakteriestammer med lipolytisk aktivitet ble det gjennomført en diffusjonsanalyse hvor 32 kolonier fra *Pseudomonas* CFC agar ble overført til tributyrinagar (Oxoid LTD, Basingstoke, Hants, England) ved hjelp av sterile tannpirkere. Kolonier på tributyrinskålene ble undersøkt for klaringssoner etter inkubering ved 22 °C i 24 timer.

2.2 Prøveopparbeidelse og rendyrking

En tilstrekkelig mengde prøvematerialer til alle analyser ble opparbeidet ved å inokulere podematerial fra de 32 kolonnene på tributyrinagar i steril næringsbuljong (Nutrion Broth (NB, Merck)). Podet medie ble inkubert ved 22 °C i 24 timer og fryst ned ved -80 °C i kryorør (Sarsedt, Nünbrecht, Tyskland) med 60 % glycerol (1:1).

For å sikre at bakteriene i de nedfryste bakterieløsningene var rene ble podematerial fra de fryste kryorørene oppdyrket i NB (Merck) ved 22 °C i 24 timer før overflatespredning på Brain Heart Infusion agar (BHI, Oxoid) som ble inkubert ved 22 °C i 24 timer. Renkultur fra BHI agar ble inokulert og oppdyrket i NB ved 22 °C i 24 timer og fryst ned ved -80 °C med 15 % (v/v) glyserol (Merck) frem til bruk.

Podemateriale til vekstforsøk ble opparbeidet ved å dyrke bakteriekulturer i NB ved 22 °C i omkring 24 timer til løsningen var moderat blakket, noe som erfaringsmessig tilsvarte 10^8 kde ml⁻¹. Bakterieløsningen ble fortynnet 10x i Ringersløsning (Merck) og ytterligere 10x ved tilsats av NB tilsatt 15% glyserol ved nedfrysning til ønsket frysestockkonsentrasjon på 10^5 kde ml⁻¹. For å bekrefte at kulturene hadde 10^5 kde ml⁻¹ ble 0,1 ml fra 10^6 fortytning plattet ut på «Plate count agar» (PCA, Merck) og inkubert ved 22 °C i 24 timer før og etter nedfrysning av kulturen i eppendorfrør ved -80 °C.

2.3 Karakterisering og identifisering

2.3.1 Fenotypisk karakterisering

For å bekrefte at stammene var katalase-positive, Gram-negative stavbakterier ble det utført mikroskopering (Leica DM750, Tyskland), samt at 3 % kaliumhydroksid og 3 % hydrogenperoksid (Merck) ble tilsatt til henholdsvis Gram-bestemmelse og katalasetesting.

Ved tilsetning av 3 % kaliumhydroksid (Merck) og 3 % hydrogenperoksid (Merck) ble prøvematerialet undersøkt for henholdsvis viskositetsendringer og gassdannelse som indikerer tilstedeværelse av Gram-negative bakterier og katalase-positive bakterier. Morfologien til bakteriene ble undersøkt under mikroskopet ved å lage Gram-preparat (tillaget etter Grams metode) og våtpreparat av podematerial fra kolonier på BHI agar.

2.3.2 Enzymaktivitet

Bakterienes lipolytiske aktivitet ble undersøkt nærmere ved hjelp av API®ZYM (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankrike) som detekterer tilstedeværelse av enzymene esterase (C4), esterase lipase (C8) og lipase (C14). Metoden ble utført i henhold til protokollen til BioMérieux SA. Det ble undersøkt for fargeomslag som indikerer nedbrytning substratene 2-naftylbutyrat, 2-naftylkaprilsyre eller 2-naftylmyristinsyre. I tillegg ble det utført en mer omfattende diffusjonsanalyse for å undersøke bakterienes lipolytiske aktivitet ved ulike temperaturer. I denne diffusjonsanalysen ble en bakteriestamme fra et annet masterprosjekt (Amundsen, 2015) også testet; *P. fluorescens* ATCC 17400 (b) levert av A. L. Holck fra Nofima, Ås, Norge. Bakteriene ble inkubert på tributyrin agar (Oxoid LTD) ved 4 °C, 7 °C, 22 °C og 30 °C etter overføring ved bruk av sterile tannpirkere. Klaringssonene til de ulike fremvokste koloniene ble målt etter 24, 48 og 78 timer.

2.3.3 Genotypisk identifisering

For å identifisere artene til de isolerte bakteriene ble det gjennomført 16 S rDNA-sekvensering. Genomisk DNA fra bakteriene ble ekstrahert etter «protocol for boiling extraction of genomic DNA from cultured cells» fra dkfz (German cancer research senter, Heidelberg, Tyskland). Supernatant med genomisk DNA ble overført til eppendorfrør og lagret ved 4 °C frem til bruk.

Ekstrahert genomisk DNA ble amplifisert ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR). En reaksjonsblanding ble tillaget etter protokoll fra Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad, Hercules, USA). Reagensene og konsentrasjonene til de ulike reagensene i reaksjonsblandingen er listet i tabell 5. Volum DNA som ble tilsatt prøven ble vurdert ut ifra konsentrasjonen av isolert genomisk DNA bestemt ved hjelp av nanodrop spektrofotometer (Thermo Scientific, NANODROP 2000 UV-VIS spectrophotometer, Wilmington, USA). Mengde destillert vann som ble benyttet ble bestemt ut ifra mengde genomisk DNA slik at totalmengden i prøven ble 40 µl.

Tabell 5: Konsentrasjon og volum (μl) til de ulike reagensene i reaksjonsblandingen

Reagenser	Konsentrasjon	Volum (μl)
Iproof HF buffer (BIO-RAD)	1x	8
dNTPs	200 μM	0,8
Forward primer (F1)	0,2 μM	2
Reverse primer (R5)	0,2 μM	2
dH ₂ O		23,8/25,3
Iproof DNA polymerase (BIO-RAD)	0,02 U/ μl	0,4
Template DNA	7,5 -150 ng	3/1,5

Amplifisering ble gjennomført ved hjelp av C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). PCR programmet ble utført i henhold til en protokoll fra Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad). Temperatur, varighet og antall sykluser i hvert steg i programmet er beskrevet i tabell 6.

Tabell 6: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$), varighet (min) og antall sykluser i de ulike stegene i PCR-programmet

Steg	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Varighet (min)	Antall sykluser
Initiell denaturering	98	00:30	1
Denaturering	98	00:10	
Hybridisering	55	00:30	35
Polymerisering	72	00:45	
Endelig polymerisering	72	10:00	1

For å bekrefte at 16S-rRNA ble amplisert ble det gjennomført agarose gel elektroforese på PCR produktene. En 1 % agaroseløsning ble laget ved å fortynne agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) i 1x TAE buffer. Agaroseløsningen ble kokt i mikrobølgeovn, kjølt ned til 60 $^{\circ}\text{C}$ og blandet med 1,5 μl fargestoff (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, Hayward, CA, USA). Agaroseløsningen ble deretter støpt i et geleelektroform (Bio-rad) og dekket med 1x TAE buffer i et geleelektroforesekar. PCR produktene ble preparert med appliseringsbuffer (GelPilot® DNA Loading Dye) og Milli-Q

vann før amplifisering på gel. Blandingsforholdet mellom PCR-løsningen, appliseringsbuffer og Milli-Q vann er beskrevet i tabell 7.

Tabell 7: Blandingsforholdet mellom ulike reagenser i preparert PCR-løsning

Reagens	Volum (μ l)
PCR løsning	3 μ l
GelPilot® DNA Loading Dye, 5x	1,5 μ l (0,5 μ l per 10 μ l)
Milli-Q vann	6 μ l

Brønnene i agarosegelen ble tilsatt 7-8 μ l preparert PCR-løsning. For å bekrefte tilstedeværelse av 16SrRNA ble det benyttet DNA-størrelsemarkør (Quickload ladder, New England BioLabs Inc, USA) som viser fragmenter mellom 100 -1517 basepar. Elektroforesen (PowerPac 300, Bio-Rad) ble kjørt på 80 volt i 40 min. DNA-båndene ble synliggjort ved hjelp av UV-lys fra Chemidoc XRS+ system (Trans UV) (Bio-Rad) og detektert ved bruk av Quantity One® Software (Bio-Rad).

PCR-produktene ble rensset for primere, nukleotidzymer, salter og andre urenheter ved hjelp av E.Z.N.A® Cycle Pure Kit (Omega Biotek, Georgia, USA). Rensingen ble gjennomført i henhold til produsentens protokoll (Omega Biotek). Renset PCR produkt ble klargjort i henhold til GATCs Biotek (Tyskland) instruksjoner med hensyn til Sanger sekvensering. Løsningene ble preparert med forward primer (1F) og reverse primer (5R) (vol:vol, 8 μ l:2 μ l) i 2 separate rør pr bakterieisolat (1 primer/rør) før de ble sendt til GATC Biotek (Tyskland) for sekvensering . Sekvensen til primerne er listet i tabell 8. Etter sekvenseringen ble datafilen med sekvensene behandlet i Bio Edit Sequence Alignment Editor (Bio edit, versjon 7.2.5). Dårlige signaler ved 3'- og 5'enden på DNA-trådene ble kuttet vekk, og resulterte i sekvenser omkring 1200-1300 bp. Sekvensene ble sammenlignet med publiserte sekvenser ved bruk av nukleotiddatabasen i BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

Tabell 8: Sekvensen primer 1F og 5R

Primer	Sekvens
1F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
5R	GGTTACCTTGTTACGACTT

2.4 Vekst av *Pseudomonas* i melk

På bakgrunn av resultatene fra DNA-sekvenseringen, diffusjonsanalysen og fenotypiske undersøkelser ble åtte ulike bakteriestammer med varierende enzymaktivitet valgt ut til vekstforsøk. De åtte isolerte bakteriekulturene ble inokulert i substratet ultrapasteurisert H-melk (1l, utløpsdato 20 mai) tilsendt fra Tine Meierier. Samtlige melkekartonger i vekstforsøket var fra samme batch og ble lagret ved 4 °C frem til bruk.

De 8 isolerte kulturene ble inokulert direkte i hver sin UHT-melkekartong. For å oppnå en bakteriekonsentrasjon omkring 10^3 kde ml^{-1} i melken ble hver melkekartong inokulert med 1 % bakteriekultur fra nylig opptinte eppendorfrør med 10^5 kde ml^{-1} . Innholdet i melkekartongen ble fordelt på tre sterile 1-L-blåtoppflasker (330 ml hver) og inkubert ved tre ulike temperaturer (4 °C, 8 °C og 22 °C) i 9 døgn. Vekstforsøket ble utført i triplikat og det ble utført prøveuttak av melken regelmessig over ni dager ved hvert forsøk, se tabell 9.

Tabell 9: Tidsintervaller for prøveuttak av melk lagret ved ulike temperaturer

Inkuberingstemperatur	Tidsintervaller for prøveuttak (dag)
4 °C	0, 2, 4, 9
8 °C	0, 2, 4, 9
22 °C	0, 1, 2, 3, 6, 9

Ved hvert prøveuttak ble det tatt ut 15 ml melk til fettsyreanalysen og 1 ml til mikrobiell undersøkelse sterilt. Prøven til fettsyreanalysen ble fryst ned umiddelbart ved -20 °C i sterilt Falconrør. Melken ble ristet før hvert uttak, samt de dagene det ikke var uttak. Det ble totalt utført 88 uttak i hvert forsøk, samt 1 nullprøve og 1 blindprøve.

For å undersøke vekstutviklingen til de inokulerte bakteriestammene ble det utført mikrobiell analyse for hvert prøveuttak. Det ble det laget fortynningsrekker ved å overføre 1 ml eller 0,1 ml prøvematerialet til henholdsvis 9 ml eller 9,9 ml Ringers løsning (Merck) ($10^{-1}/10^{-2}$ fortykning). Løsningen ble blandet ved bruk av vortexmikser. Fra utvalgte fortynningsrør ble 0,1 ml overflatespredd i duplikat på PCA-agar. Skålene ble inkubert på 22 °C i 24 timer før antall kolonier på skålene ble beregnet.

2.5 Fettsyreanalyse

2.5.1 Folchs metode: Ekstraksjon av lipider

Ved ekstraksjon av lipider ble det benyttet tint prøvemateriale fra vekstforsøket. For å hindre at løsningen ikke oversteg 4 °C før prøvepreparering ble prøven tint og oppbevart i isvann før den ble ristet på vortexmikser. Frie fettsyrer ble ekstrahert fra 1 g prøvemateriale i Büchirør ved bruk av en modifisert metode av Folch og medarbeidere (1957) som beskrevet av Inglingstad (2016). Før ekstraksjonen ble prøvene tilsatt interne standarder (Larodan, Malmö Sverige) (tabell 10) løst i kloroform (1:100) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) og deretter tilsatt 20 ml kloroform:metanol (2:1) (Sigma-Aldrich). Type, konsentrasjon (mg/ml) og volum (µl) til indre standard benyttet i metoden er beskrevet i tabell 5. Prøvene ble ristet på en Orbital shaker i 15 min ved 150 rpm, før tilsetning av 4 ml 0,9 % NaCl og sentrifugert i 10 min ved 2000 rpm i romtemperatur. Den nederste fasen i løsningen ble overført til Hack-rør og tørket med nitrogen ved 40 °C til den fikk en fast konsistens. Rørene ble lagret på kjølerom i GC-rør etter tilsats av 1 ml kloroform (Sigma-Aldrich) frem til ekstraksjon av fettsyrer.

Tabell 10: Standard tilsatt ved ekstraksjon av lipider.

Standard	Fettsyre	Konsentrasjon (mg/ml)	Volum (µl)
Triglyserid	Nonadekansyre (C19:0)	10	250
	Pelargonsyre (C9:0)	10	150
Frie fettsyrer	Nonadekansyre (C19:0)	10	250
	Pelargonsyre (C9:0)	10	150

2.5.2 Fast-fase ekstraksjon (SPE)

De frie fettsyrene fra prøvene ble isolert ved fast-fase ekstraksjon (SPE). SPE-prosedyren ble gjennomført ved bruk av GX-274 ASPEC (Gilson, USA) automatiske system. Aminopropyl kolonnene (Bond Elut NH2, 500 mg, Agilent Technologies, Middleton, USA) ble fuktet med 7 ml hexan (Sigma-Aldrich) og tilsatt løsningen med de ekstraherte lipidene. Nøytrale lipider ble eluert med 5 ml kloroform (Sigma-Aldrich) og frie fettsyrer ble eluert med 5 ml dietyleter:edikksyre (98:2) (Sigma-Aldrich). Løsningen ble overført til Hack-rør og fordampet under N₂-gass ved 40 °C.

2.5.3 Dannelse av fettsyremetylestere (FAME)

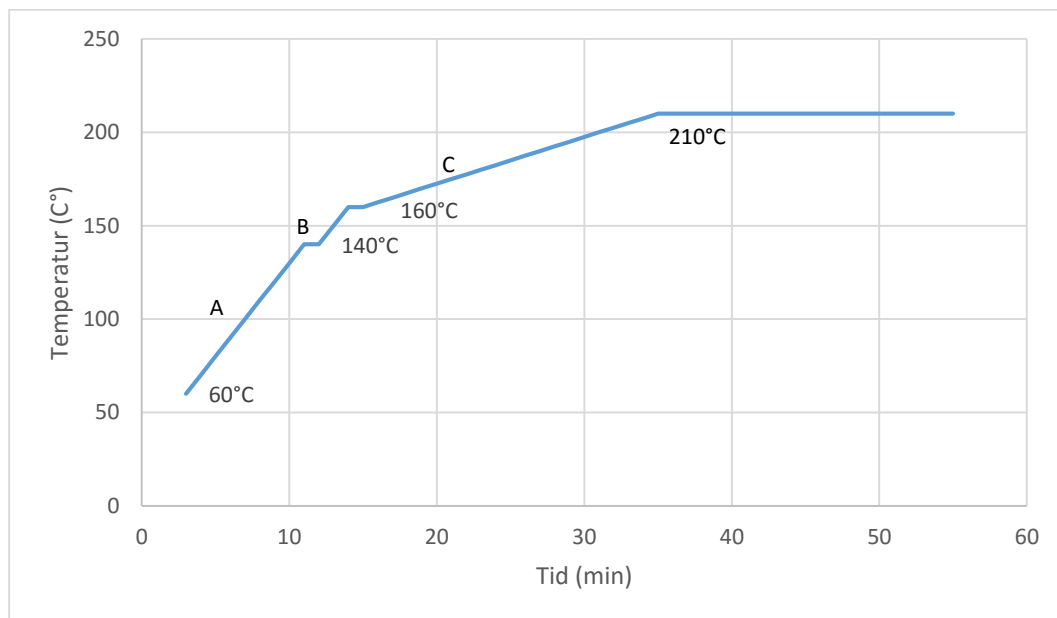
De frie fettsyrene og nøytrale lipidene ble metylert ved å tilsette henholdsvis 1,5 ml natriummetoksid (CH₃Ona) (Sigma-Aldrich) og 1 ml 10 % Bortrifluoridmetanol-løsning (1,3 M)

(BF3 MeOH) (Sigma-Aldrich). Løsningen med nøytrale lipider ble tilsatt 2 ml heksan (Sigma-Aldrich) før risting ved 300 rpm i 30 min og løsningen med frie fettsyrer ble satt i vannbad i 5 min ved 70 °C. Løsningen med nøytrale lipider ble fryst ned men ikke tatt med videre. Løsningen med frie fettsyrer ble tilsatt 1 ml heksan (Sigma-Aldrich) etter avkjøling slik at det ble dannet to faser i hver prøve. Øvre fase (heksanlaget) i samtlige prøver ble overført til GC-rør og lagret på 4 °C frem til gasskromatografi (GC) analyse.

2.5.4 GC-analyse

Isolert FAME ble identifisert ved hjelp av en gasskromatograf (GC) (Agilent 6890N GC System, Matriks, Norge) med flammeionisasjonsdetektorer (FID). Prøvene ble injisert med Agilent autosampler 7683B, med en split 1:25. Fettsyrene ble separert ved hjelp av en 50 m CP-Sil 88 kapillærkolonne med 0,25 mm indre diameter og 0,20 µl filmtykkelse.

Temperaturprogrammet som ble benyttet er illustrert i figur 1. FID-signaler ble overført til Agilent OpenLAB software (versjon A.04.05) som styrer systemet og behandler informasjonen. FAME ble identifisert ved å sammenligne tidspunktet komponentene passerer detektoren med standarder fra Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sverige).



Figur 2: Temperaturprogrammet benyttet i GC. A og B: Temperaturstigning 10°C per min. C: Temperaturstigning 2,5 °C per min.

3. Resultater

Fenotypisk og genotypisk karakterisering, samt analyser som undersøker enzymaktivitet ble gjennomført for å henholdsvis identifisere de isolerte bakteriestammene og kartlegge deres lipolytiske egenskaper. Forundersøkelsene ble etterfulgt av et vekstforsøk hvor vekstegenskapene til 8 utvalgte bakteriestammer ble bestemt ved ulike lagringstemperaturer (4, 8 og 22 °C) samt en fettsyreanalyse for å undersøke lipolytisk aktivitet ved de ulike lagringstemperaturene over tid (9 dager).

3.1 Fenotypisk karakterisering

For å bekrefte at de 32 utvalgte bakteriestammene var katalasepositive, Gram-negative stavbakterier ble det utført mikroskopering, samt tilsetning av kaliumhydroksid og hydrogenperoksid for henholdsvis Gram-reaksjonsbestemmelse og tilstedeværelse av katalaseenzymet. Resultatene fra mikroskoperingen viste at samtlige stammer var staver og ved tilsetning av kaliumhydroksid og hydrogenperoksid ble det observert henholdsvis viskositetsendringer og gassdannelse hos alle stammer. Dette indikerte at isolatene var Gram-positive og katalasepositive.

3.2 Enzymaktivitet

Den lipolytiske aktiviteten til 32 utvalgte bakteriestammer ble undersøkt ved hjelp av en diffusjonsanalyse hvor klaringssonene til de ulike stammene ble bestemt etter inkubering ved 22 °C i 24 timer i tributyrinagar. Størrelsen på klaringssonene (mm) til de ulike isolerte bakteriene (1-32) er listet i tabell 11.

I diffusjonsanalysen ble det observert variasjon mellom de ulike stammene etter inkubering, da klaringssonene varierte fra 0 til 3 mm (tabell 1). Bakteriestammene med størst klaringszone var stamme 9, 10, 13 og 14 da de hadde klaringssoner på henholdsvis 2, 2, 3 og 1,5 mm.

Tabell 11: Oversikt over størrelsen på klaringssonene (mm) til de ulike isolerte bakteriene (1-32)

Bakterie- stamme	Klarings- sone (mm)	Bakterie- stamme	Klarings- sone (mm)	Bakterie- stamme	Klarings- sone (mm)	Bakterie- stamme	Klarings- sone (mm)
1	1	9	2	17	-	25	0,5
2	-	10	2	18	1	26	-
3	-	11	-	19	1	27	1
4	-	12	-	20	-	28	-
5	1	13	3	21	1	29	-
6	1	14	1,5	22	1	30	0,5
7	-	15	-	23	-	31	-
8	-	16	1	24	1	32	0,5

Bakterienes enzymaktivitet ble undersøkt nærmere ved hjelp av API®ZYM som detekterer blant annet tilstedeværelse av enzymene esterase (C4), esterase lipase (C8) og lipase (C14). Enzymer som ble detektert hos de ulike bakteriestammene samt hvilken melketank bakteriekulturen ble isolert fra er listet i tabell 12.

I analysen ble det testet positivt for både esterase (C4) og esterase lipase (C8) hos 12 bakteriestammer (1, 4, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 20, 23, 27 og 30) og kun esterase (C4) hos 2 bakteriestammer (22 og 27) (tabell 12). Ingen av bakteriestammene testet positivt for lipase (C14).

Tabell 12: Oversikt over hvilke enzymer som ble detektert hos de ulike isolerte bakteriestammene (1-32), samt hvilken tank stammene ble isolert fra.

Tank	Bakteriestamme	Esterase (C4)	Esterase Lipase (C8)	Lipase (C14)
1	1	X	X	
	2			
	3			
	4	X	X	
	5			
	6			
	7			
	8			
2	9	X	X	
	10	X	X	
	11	X	X	
	12			
	13	X	X	

	14		
	15	X	X
	16	X	X
	17		
	18	X	X
	19		
3	20	X	X
	21		
	22	X	
	23	X	X
	24		
	25*		
	26*		
	27	X	
	28		
4	29		
	30	X	X
	31		
	32		

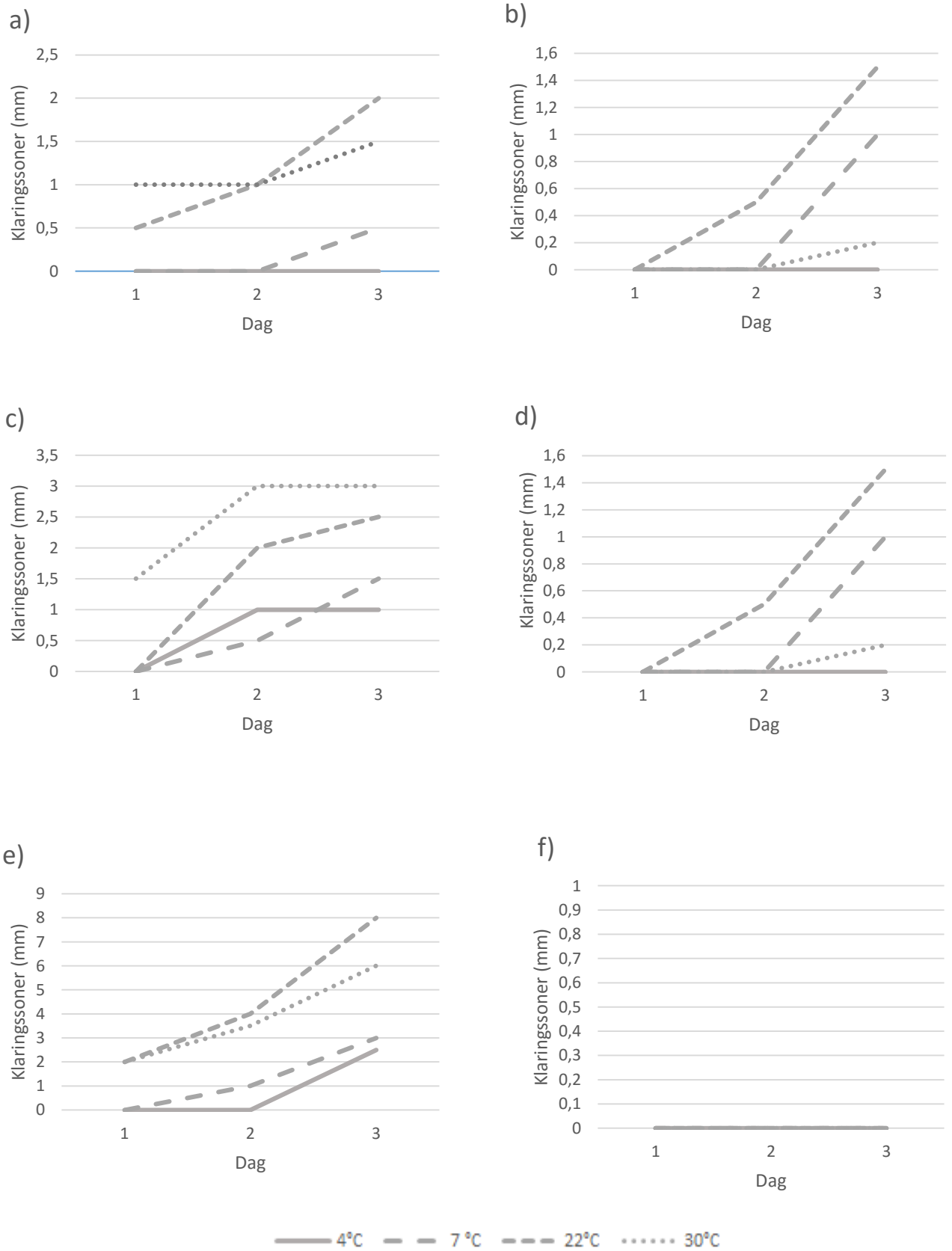
X= fargeomslag som indikerer tilstedeværelse av esterase (C4), esterase lipase (C8) eller lipase (C14)

*= tilsatt lite prøvematerial

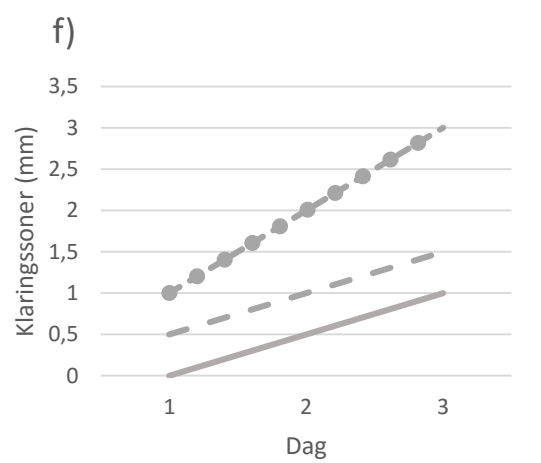
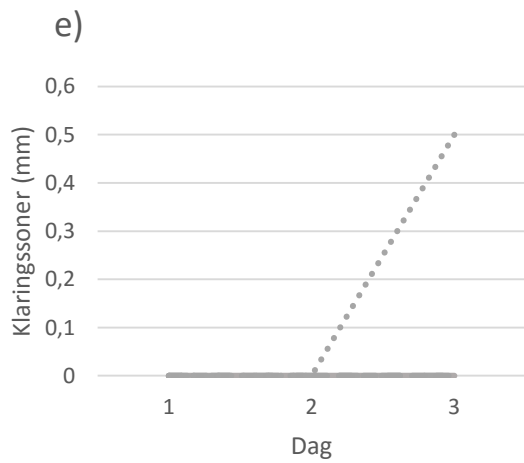
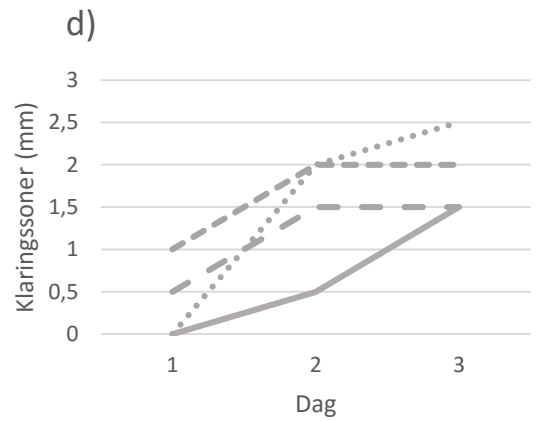
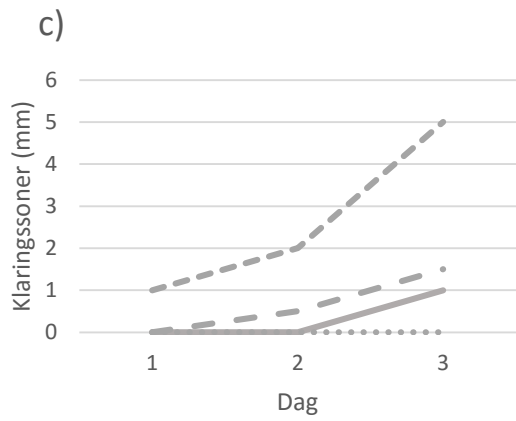
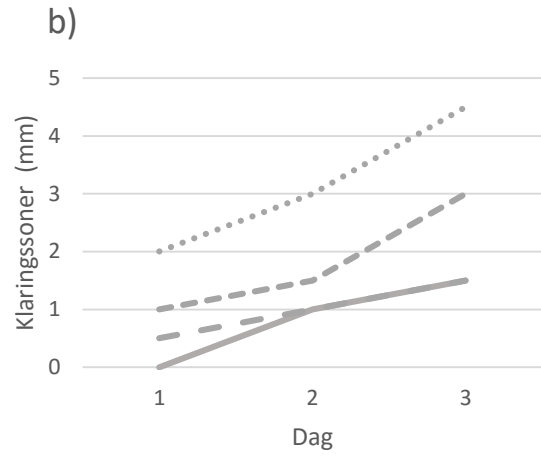
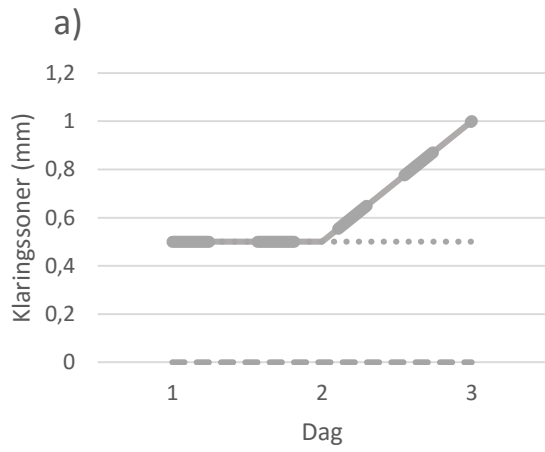
En mer omfattende diffusjonsanalyse ble utført på 13 isolerte bakteriestammer utvalgt på bakgrunn av resultatene fra api@ZYM-analysen og forrige diffusjonsanalyse, samt bakteriestammen *P. fluorescens* ATCC 17400 (b) fra et tidligere masterprosjekt.

Klaringssonene (mm) som ble målt i diffusjonssanalysen ved inkubering i 4 °C, 7 °C, 22 °C og 30 °C etter 1, 2 og 3 dager er illustrert i figur 2 og 3.

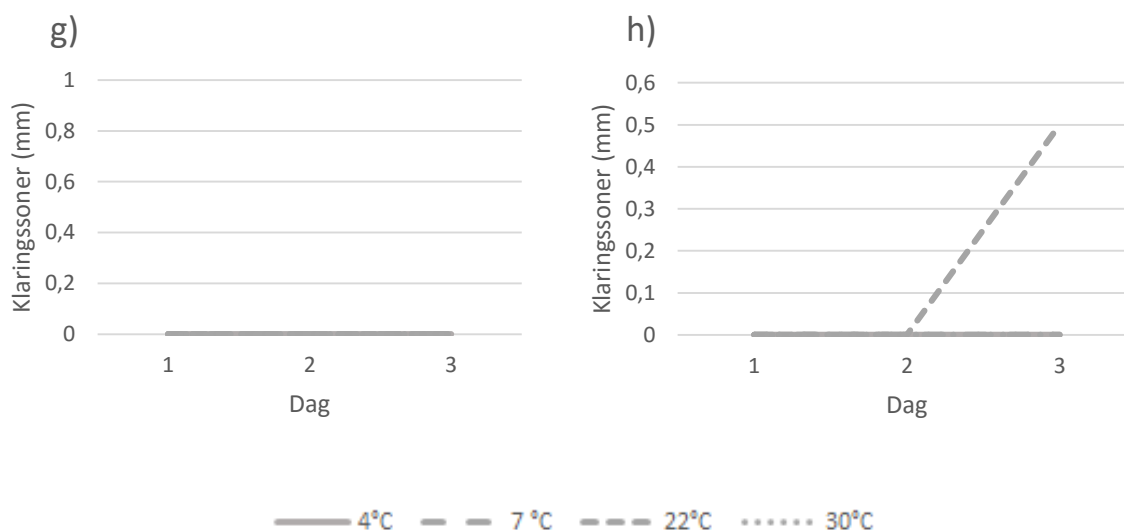
I diffusjonsanalysen ble det observert klaringssoner hos samtlige stammer med unntak av stamme 12 og 32, som ikke hadde klaringssoner ved noen inkuberingstemperaturer (figur 2f og 3g). Bakteriestammene som hadde klaringssoner ved samtlige inkuberingstemperaturer var 6, 9, 16, 22 og 30. Mange bakteriestammer manglet klaringssone ved 4 °C (1, 2, 8, 12, 26, 32 og b) og de fleste stammene hadde størst klaringssone ved 22 °C etter 3 dager (stamme 1, 2, 8, 9, 18, 30 og b).



Figur 2.a-1.f: Klaringssonene (mm) produsert av henholdsvis stamme 1,2, 6, 8, 9 og 12 dag 1, 2 og 3 ved inkuberingstemperaturene 4, 7, 22 og 30 °C



— 4°C - - 7°C - - - 22°C 30°C



Figur 3.a-2.h: Klaringsonene (mm) til bakteriestamme 15,16, 18, 22, 26, 30, 32 og b dag 1,2 og 3 ved inkuberingstemperaturene 4, 7, 22 og 30 °C

3.3 Genotypisk identifisering

De isolerte bakteriene ble identifisert i forhold til slekt ved å sammenligne sekvensene fra 16S rDNA-sekvensering med publiserte sekvenser ved bruk av nukleotiddatabasen i BLAST. Bakteriestamme, tanken bakterien ble isolert fra, samt hvilken slekt og potensiell art bakteriene tilhører er listet i tabell 13.

Resultatene fra 16S rDNA-sekvenseringen viser at samtlige av bakteriestammene kan tilhøre slekten *Pseudomonas* (stamme 1-33) og noen kan i tillegg tilhøre slekten *Bacillus* (1, 4-7, 22 og 24) (tabell 13). *Pseudomonas*-artene som fikk flest treff var *P. fluorescens*, *P. fragi* og *P. putida* da henholdsvis 32, 28 og 18 bakteriestammer kan tilhøre disse.

Tabell 13: Oversikt over bakteriestammenes slekt og potensielle art

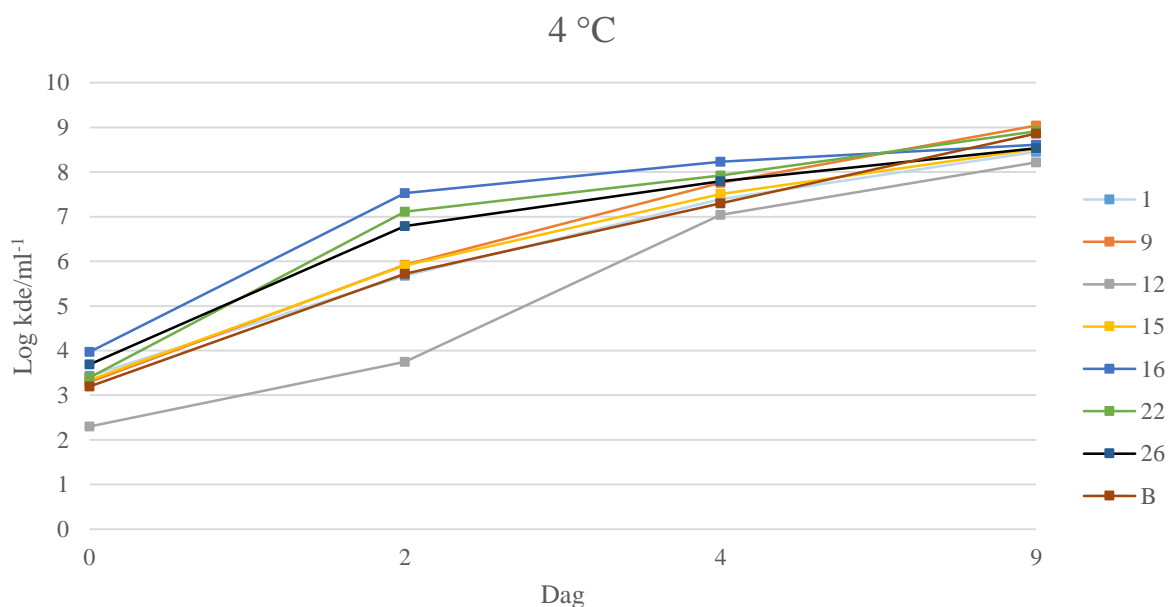
Bakterie kultur	Tank	Slekter og potensielle arter
1	1	<i>Pseudomonas fluorescence</i> (cs) / <i>baetica</i> / <i>helmanticensis</i> / <i>moraviensis</i> eller <i>Bacillus</i>
2	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>lundensis</i> / <i>psychrophila</i> / <i>deceptionensis</i> / <i>taetrolens</i>
3	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>lundensis</i> / <i>psychrophila</i> / <i>deceptionensis</i> / <i>taetrolens</i>
4	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cs) / <i>baetica</i> / <i>jessenii</i> / <i>helmanticensis</i> / <i>koreensis</i> eller <i>Bacillus</i>
5	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i> eller <i>Bacillus</i>
6	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i> eller <i>Bacillus</i>
7	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i> eller <i>Bacillus</i>
8	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i> / <i>psychrophila</i> / <i>syringae</i> / <i>deceptionensis</i> / <i>taetrolens</i>
9	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cs) / <i>trivialis</i> / <i>mandelii</i> / <i>poae</i> (cs) / <i>salomonii</i> / <i>simiae</i> / <i>putida</i>
10	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cs) / <i>trivialis</i> / <i>mandelii</i> / <i>poae</i> (cs) / <i>salomonii</i> / <i>simiae</i> / <i>putida</i>
11	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cs) / <i>trivialis</i> / <i>mandelii</i> / <i>poae</i> / <i>salomonii</i> / <i>simiae</i> / <i>putida</i> / <i>extremaustralis</i> / <i>veronii</i>
12	2	<i>Pseudomonas psychrophila</i> / <i>fragi</i>
13	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cs) / <i>trivialis</i> / <i>mandelii</i> / <i>poae</i> (cs) / <i>salomonii</i> / <i>simiae</i> / <i>putida</i>
14	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>syringae</i> (cs) / <i>trivialis</i> / <i>putida</i>
15	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>cedrina</i> / <i>marginalis</i> / <i>azotoformans</i> / <i>synxantha</i> / <i>gessardii</i>
16	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>psychrophila</i> / <i>fragi</i> (cs) / <i>putida</i>
17	3	<i>Pseudomonas psychrophila</i> / <i>fragi</i>
18	3	<i>Pseudomonas psychrophila</i> (cs) / <i>fragi</i> / <i>putida</i>
19	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i>
20	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>jessenii</i> / <i>baetica</i> / <i>helmanticensis</i> / <i>moorei</i> /
21	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i>
22	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i> eller <i>Bacillus</i>
23	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cs) / <i>antarctica</i> / <i>salomonii</i> / <i>meridiana</i> / <i>veronii</i> / <i>auricularis</i> / <i>constantinii</i> / <i>marginalis</i>
24	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i> eller <i>Bacillus</i>
25	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i>
26	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>psychrophila</i> / <i>fragi</i> / <i>lundensis</i> / <i>deceptionensis</i> / <i>taetrolens</i> / <i>syringae</i>
27	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i>
28	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>psychrophila</i> / <i>deceptionensis</i> / <i>lundensis</i> / <i>syringae</i>
29	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>psychrophila</i> / <i>lundensis</i> / <i>deceptionensis</i> / <i>syringae</i> / <i>taetrolens</i>
30	4	<i>Pseudomonas fluorescens fragi</i> / <i>psychrophila</i> (cs) / <i>putida</i>
31	4	<i>Pseudomonas fragi</i> / <i>psychrophila</i>
32	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>fragi</i> / <i>putida</i>

*cs= «complete sequence»

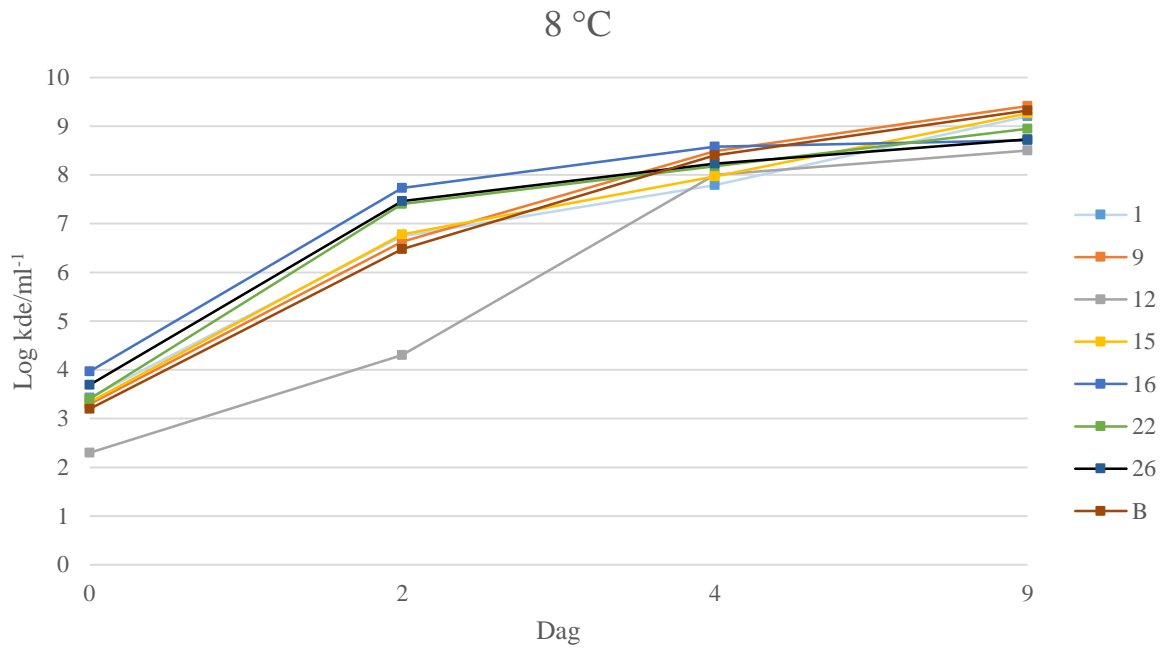
3.4 Vekst av *Pseudomonas* i melk

For å undersøke vekstegenskapene til ulike stammer av *Pseudomonas* ble 8 utvalgte bakteriestammer inkubert i UHT melk ved 4, 8 og 22 °C. Bakteriestammene ble utvalgt på bakgrunn av resultatene fra diffusjonsanalysen og API@ZYM. Bakterievekst ble bestemt etter inkubering i 0, 2, 4, og 9 dager ved 4 og 8 °C (figur 4a og b), samt etter 0, 1, 2, 3, 6 og 9 dagers inkubering ved 22 °C (figur 4c).

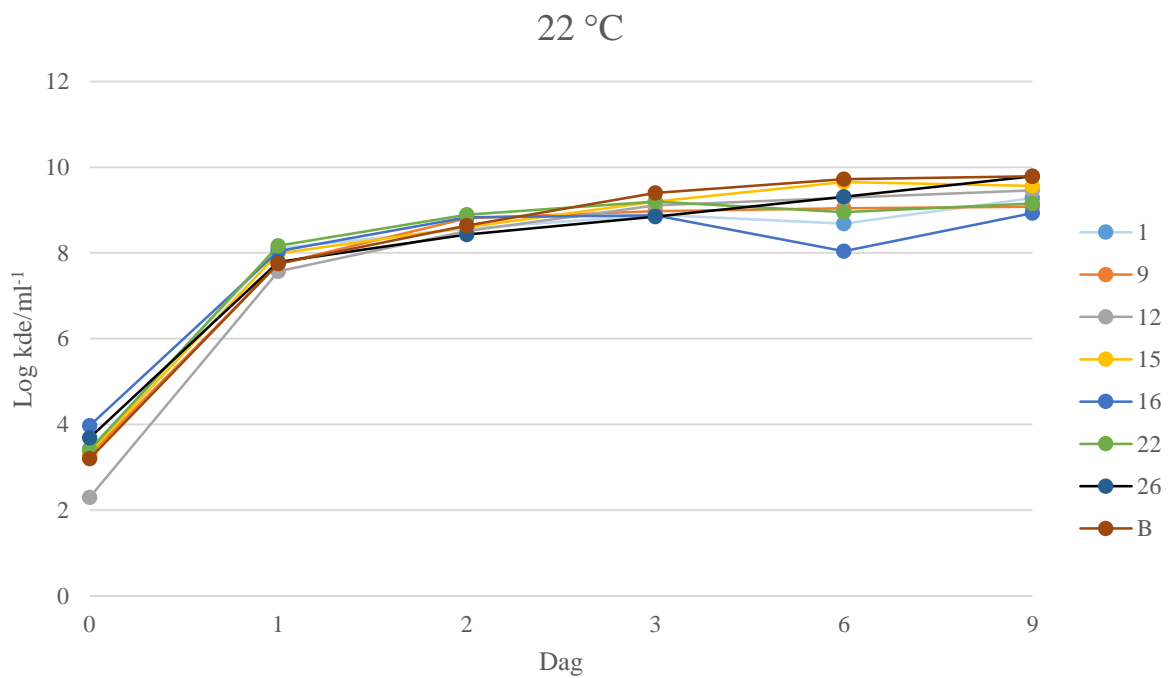
I vekstforsøket ble det detektert svært liten variasjon i vekst (log kde ml⁻¹) mellom stammene ved 4, 8 og 22 °C, da stammer ved samme inkuberingstemperatur viste samme veksttrend (figur 4a-c). Bakteriekonsentrasjonen hos de ulike stammene økte fra 2-4 log kde ml⁻¹ til 8- 9 log kde ml⁻¹ i løpet av 9 dager ved alle tre inkuberingstemperaturene. Ved 4 og 8 °C var det detektert størst økning i bakterietall fra dag 0 til dag 2 med unntak av stamme 12 som hadde størst økning fra dag 2 til dag 4 (figur 4a og b). Denne bakteriestammen hadde i tillegg lavest bakteriekonsentrasjon ved dag 0 med 2,3 log kde ml⁻¹. Ved 22 °C ble det observert en kraftig økning i vekst de første 24 timene, da konsentrasjon økte fra en startkonsentrasjon mellom 2,3 og 3,97 log kde ml⁻¹ til en konsentrasjon mellom 7,57 og 8,17 log kde ml⁻¹ (figur 4c). Lavest veksthastighet ble derimot observert ved 4 °C (figur 4a).



Figur 4.a: Bakteriekonsentrasjonen (log kde ml⁻¹) til stamme 1, 9, 12, 15, 16, 22, 26, b ved inkuberingstemperatur 4 °C



Figur 4.b: Bakteriekonsentrasjonen (log kde ml⁻¹) til stamme 1, 9, 12, 15, 16, 22, 26, b ved inkuberingstemperatur 8 °C

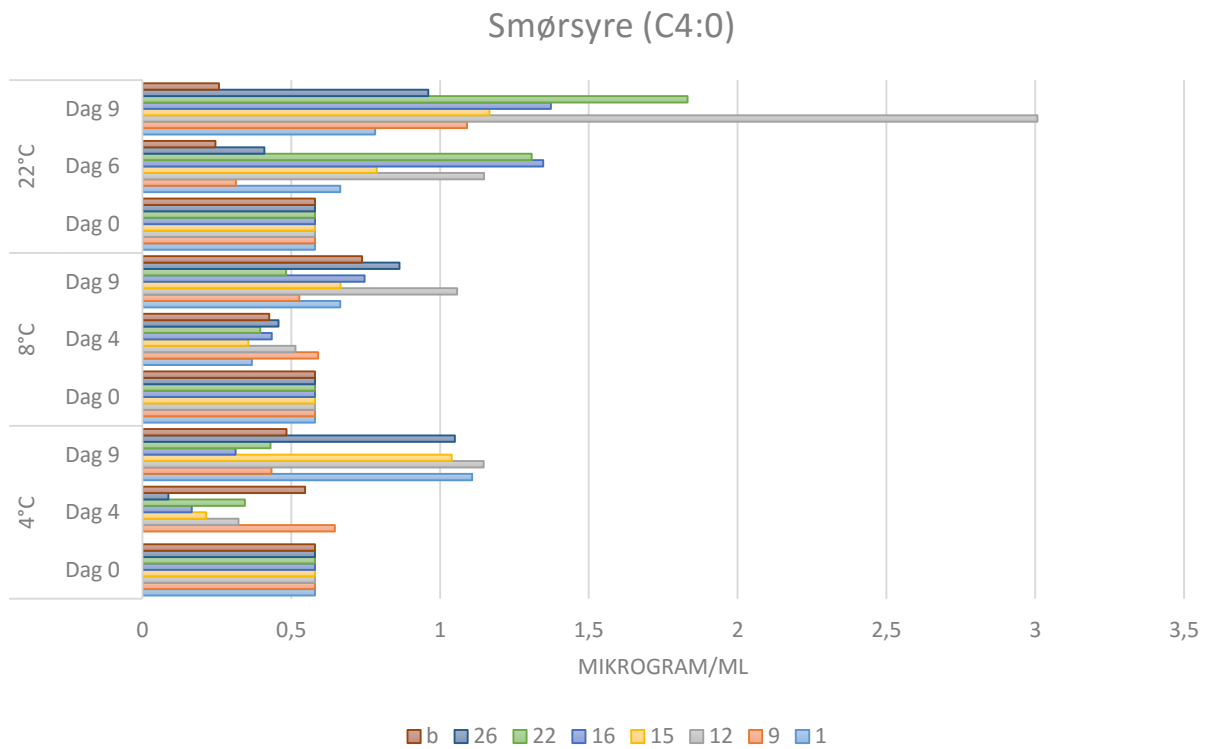


Figur 4.c: Bakteriekonsentrasjonen (log kde ml⁻¹) til stamme 1, 9, 12, 15, 16, 22, 26, b ved inkuberingstemperatur 22 °C

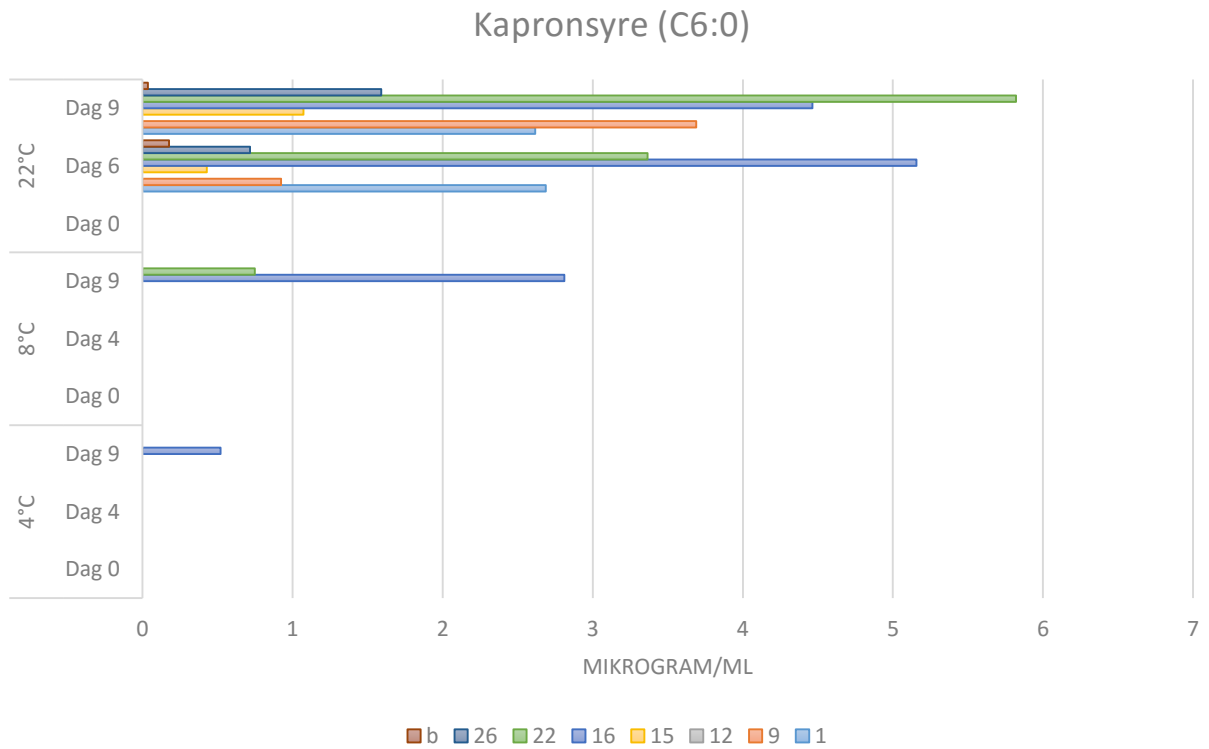
3.5 Analyse av frie fettsyrer

Bakteriestammens lipolytiske aktivitet ble estimert ved å identifisere og kvantifisere ulike frie fettsyrer fra prøveuttak i vekstforsøket ved hjelp av GC. I analysen ble det benyttet 2 paralleller (2 og 3) fra vekstforsøket. Resultatene fra analysen er illustrert i figur 5.1-5.24, og viser den gjennomsnittlige konsentrasjonen ($\mu\text{g/ml}$) av utvalgte fettsyrer i UHT-melken inkubert med ulike utvalgte bakteriestammer (1, 9, 12, 15, 16, 22, 26 og b), varighet (dag 0, 4, 6, 9) og inkuberingstemperatur (4, 8, 22 °C). Konsentrasjoner under deteksjonsgrensen ble registrert som 0. Etersom fettsyre C22:1c Δ 13 ble kun detektert ved inkubasjon i 9 dager ved 22 °C ble fettsyren ikke vist i figurene nedenfor. Skalaen på akse som viser konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$) av de ulike frie fettsyrene er justert for mengde detektert.

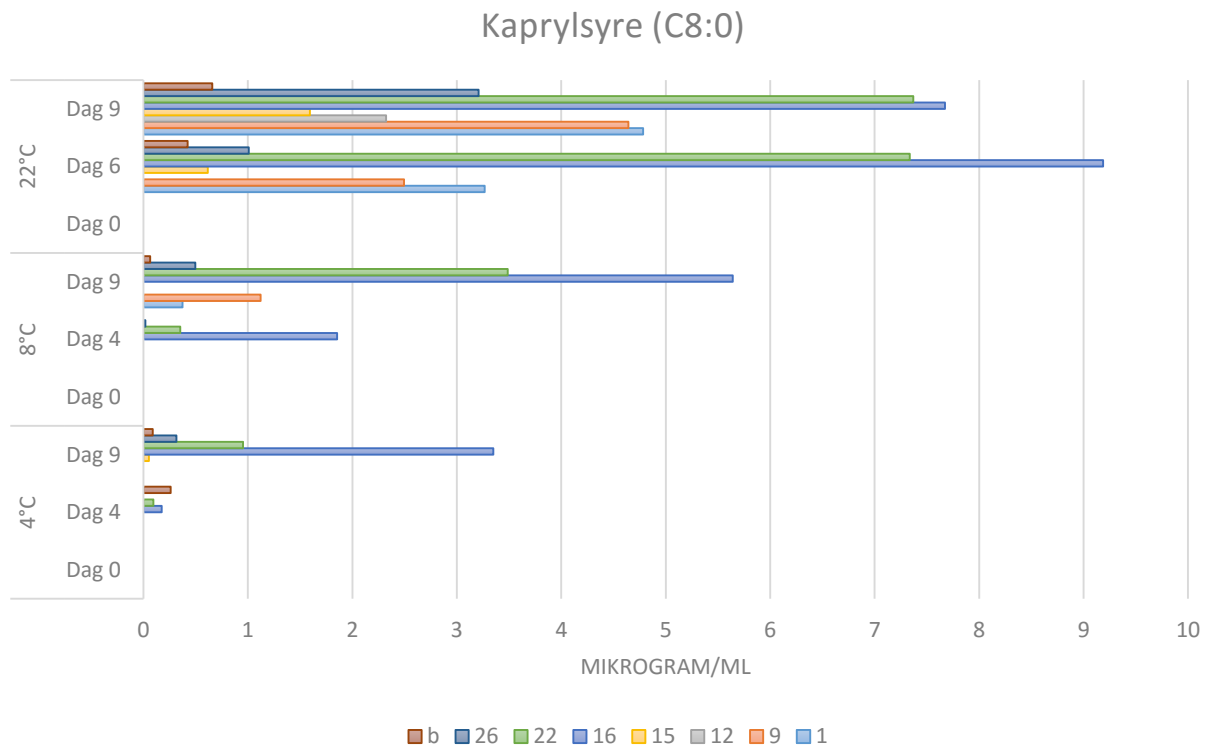
Resultatene fra GC-analysen viser at konsentrasjonen av de ulike korte fettsyrene (C4:0, C6:0 og C8:0) i melken viser ulike trender med hensyn til inkuberingstemperatur, inkuberingstid, samt podet bakteriestamme (figur 5.1-5.3). Konsentrasjonene av fettsyren C4:0 skiller seg fra C6:0 og C8:0, da det ble observert redusert konsentrasjonen fra dag 0 dag 4 i nærmest samtlige melk inkubert ved 4 og 8 °C. Majoriteten av de detekterte konsentrasjonene av fettsyrene C6:0 og C8:0 økte derimot med inkuberingstemperatur og inkuberingstid. Blant de tre korte fettsyrene ble det detektert størst konsentrasjoner av C8:0 ved alle inkuberingstemperaturer.



Figur 5.1: Smørsyrekonsentrasjonen (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

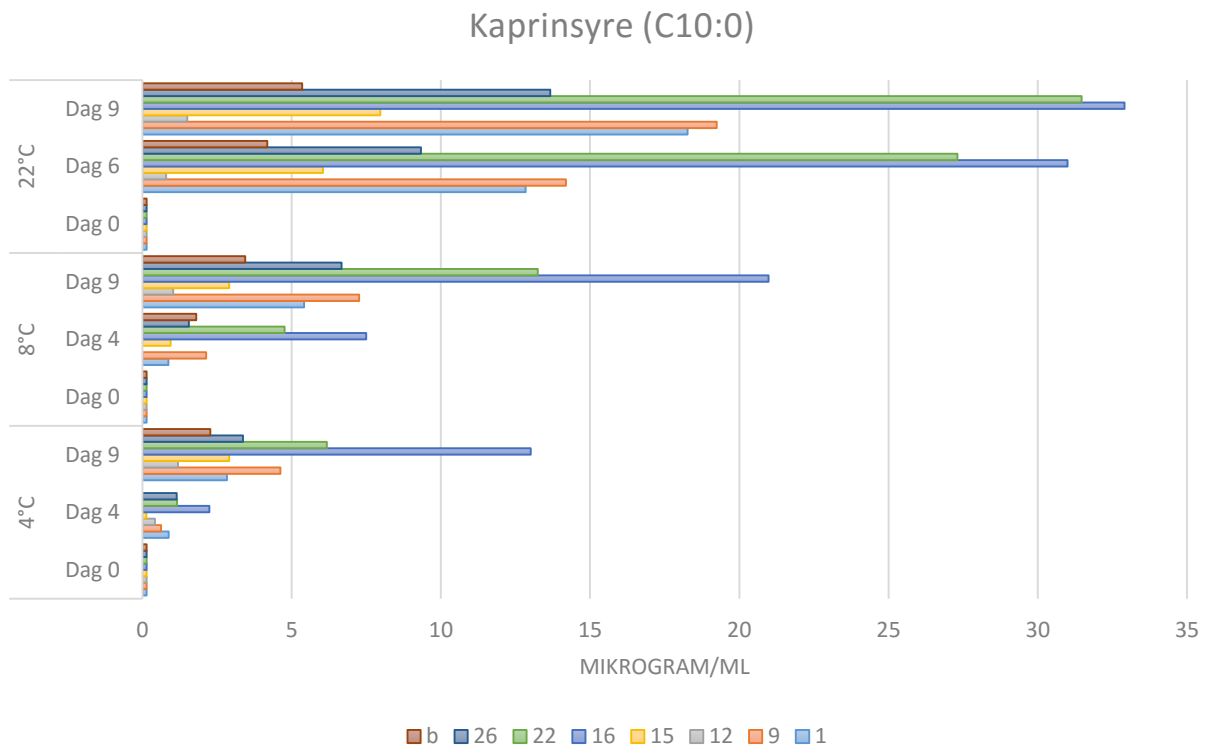


Figur 5.2: Kapronsyrekonsentrasjonen (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

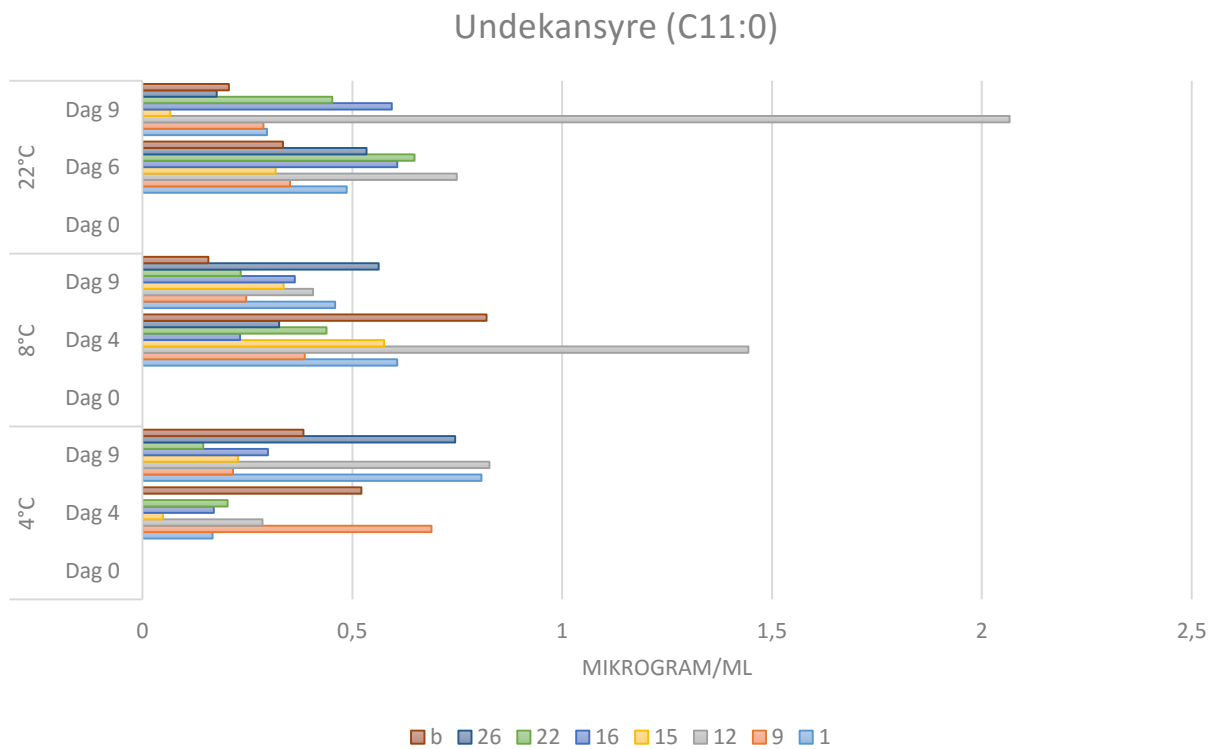


Figur 5.3: Kaprylsyre ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulike temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

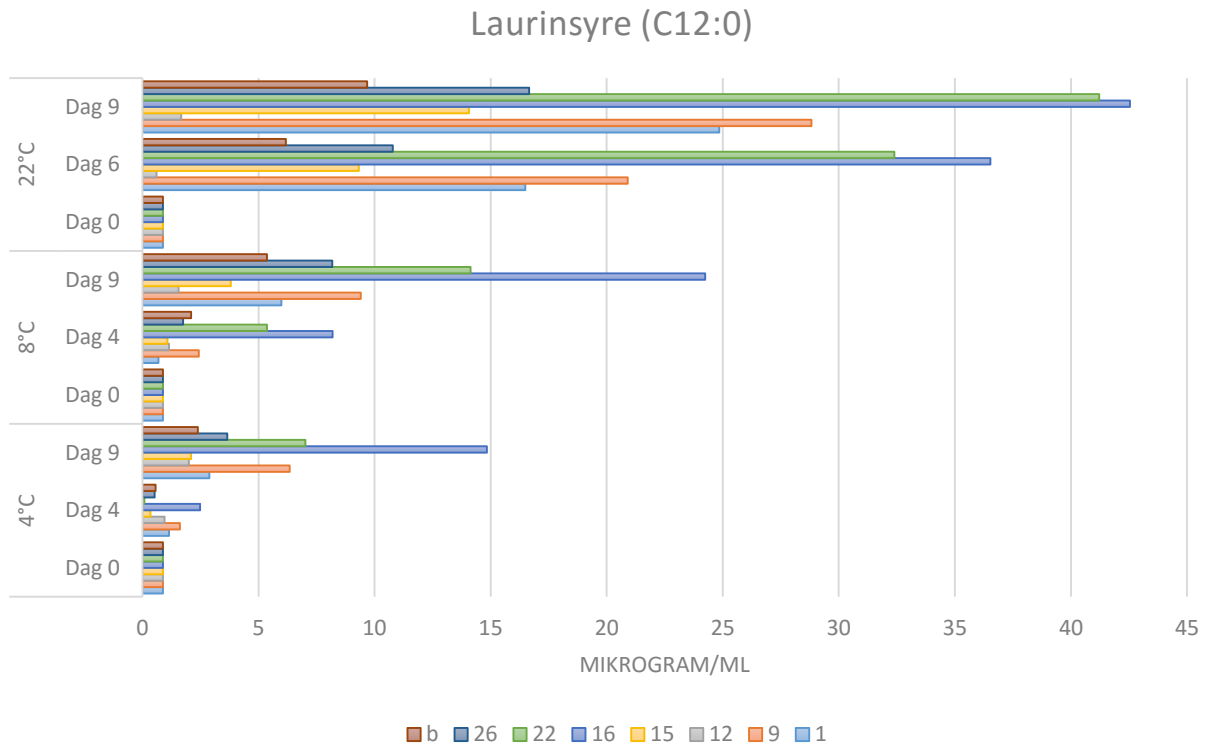
Blant de medium lange fettsyrene (figur: 5.4-5.7) detektert i melken ble det generelt observert svært høye konsentrasjoner C10:0 og C12:0 ved alle utvalgte inkuberingstemperaturer, inkuberingstider, og podet bakteriestamme sammenlignet med C11:0 og C12. De detekterte konsentrasjonene for C10:0 økte med hensyn til inkuberingstemperatur og inkuberingstid. For fettsyrene C11:0, C12:0 og C13:0 ble det observert en lignende trend, men også noe reduksjon av konsentrasjon over tid i melk podet med enkelte bakteriestammer.



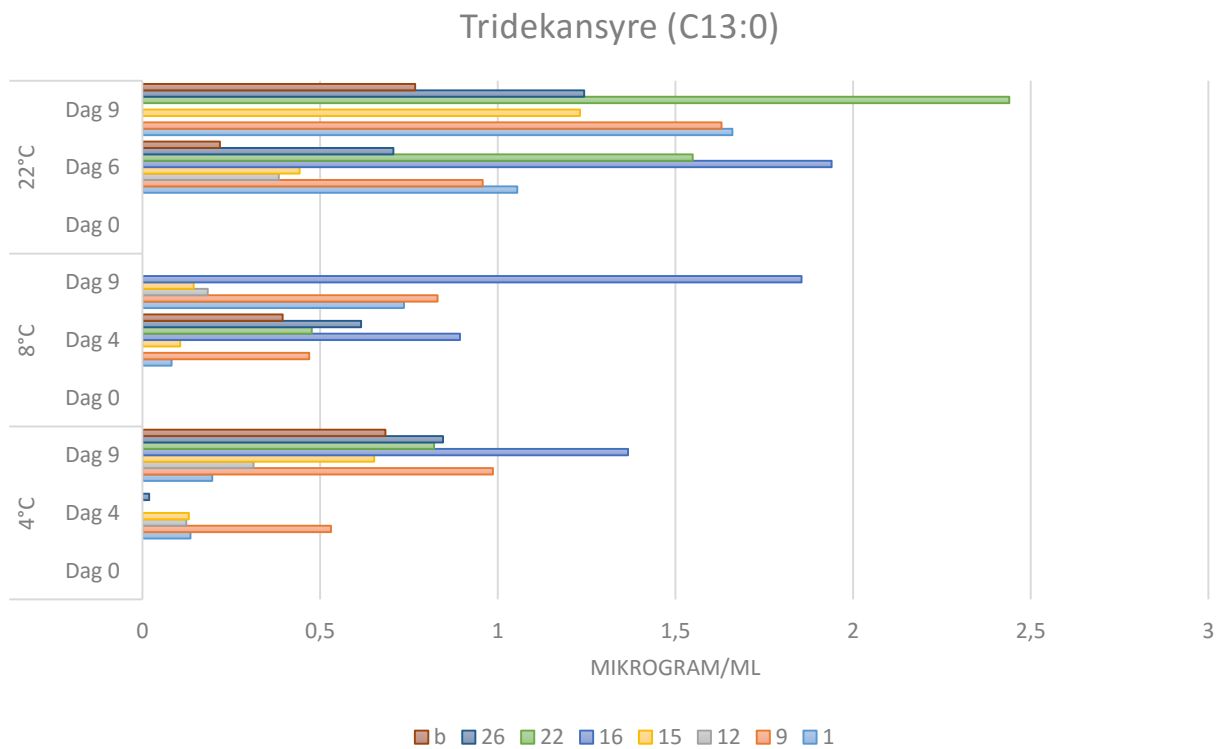
Figur 4.4: Kaprinsyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



Figur 4.3: Undekansyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

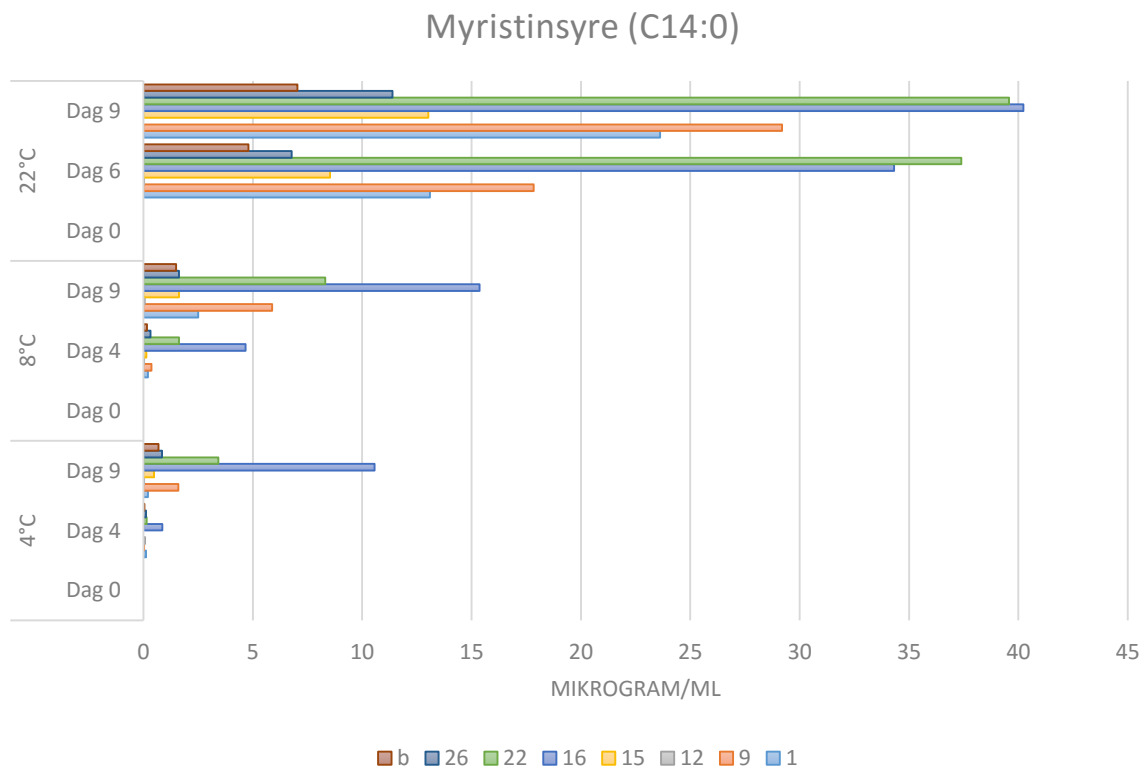


Figur 5.4: Laurinsyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

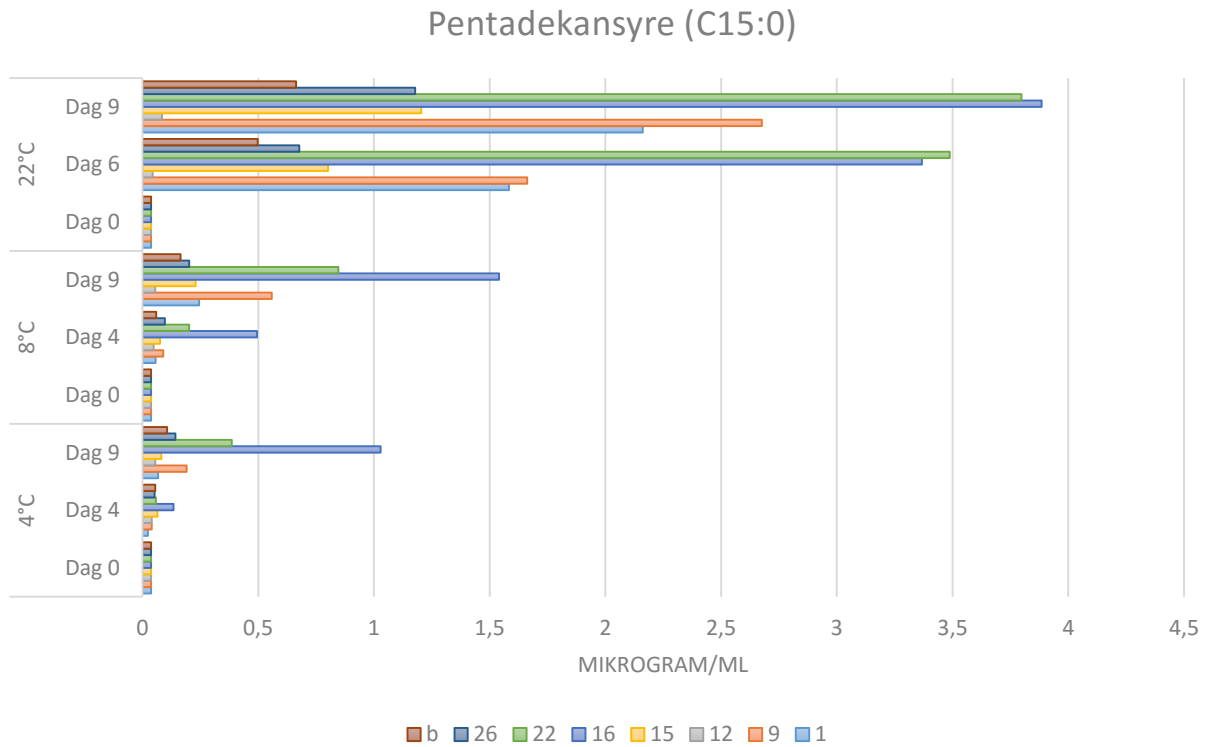


Figur 5.7: Tridekansyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

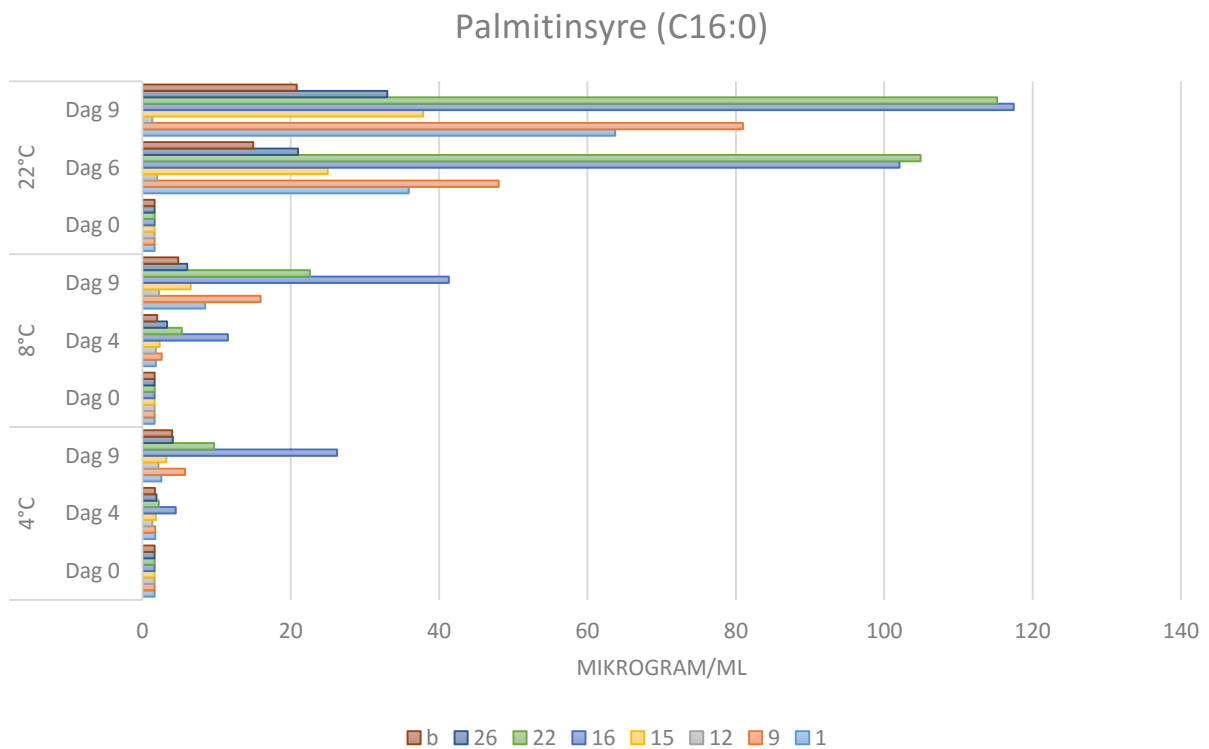
Konsentrasjonen til samtlige lange fettsyrer (figur 5.8-5.14) som ble detektert viste en økning med hensyn til inkuberingstemperatur og inkuberingstid, med unntak av konsentrasjonen av C23:0, samt C14:0, C16:0, C18:0 i melk podet med stamme 12. Konsentrasjonen av fettsyre 23:0 skilte seg fra de andre frie fettsyrene da det ble observert en reduksjon i konsentrasjon underveis inkubasjonstiden i samtlige melk, med unntak av melk podet med bakteriestamme 16. Størst konsentrasjon ble detektert av fettsyrene C14:0, C16:0, C18. Svært få og lave konsentrasjoner av 17:0 og C21:0 ble detektert dag 4 i melk inkubert ved 4 °C.



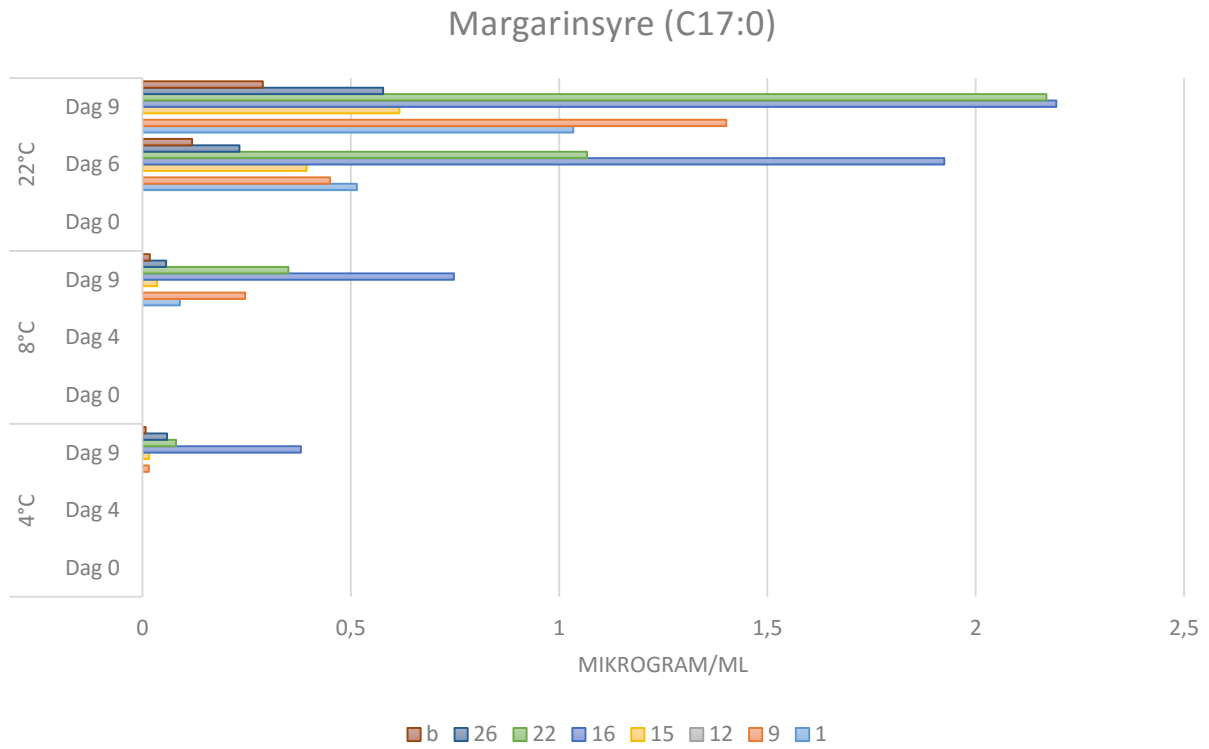
Figur 5.8: Myristinsyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



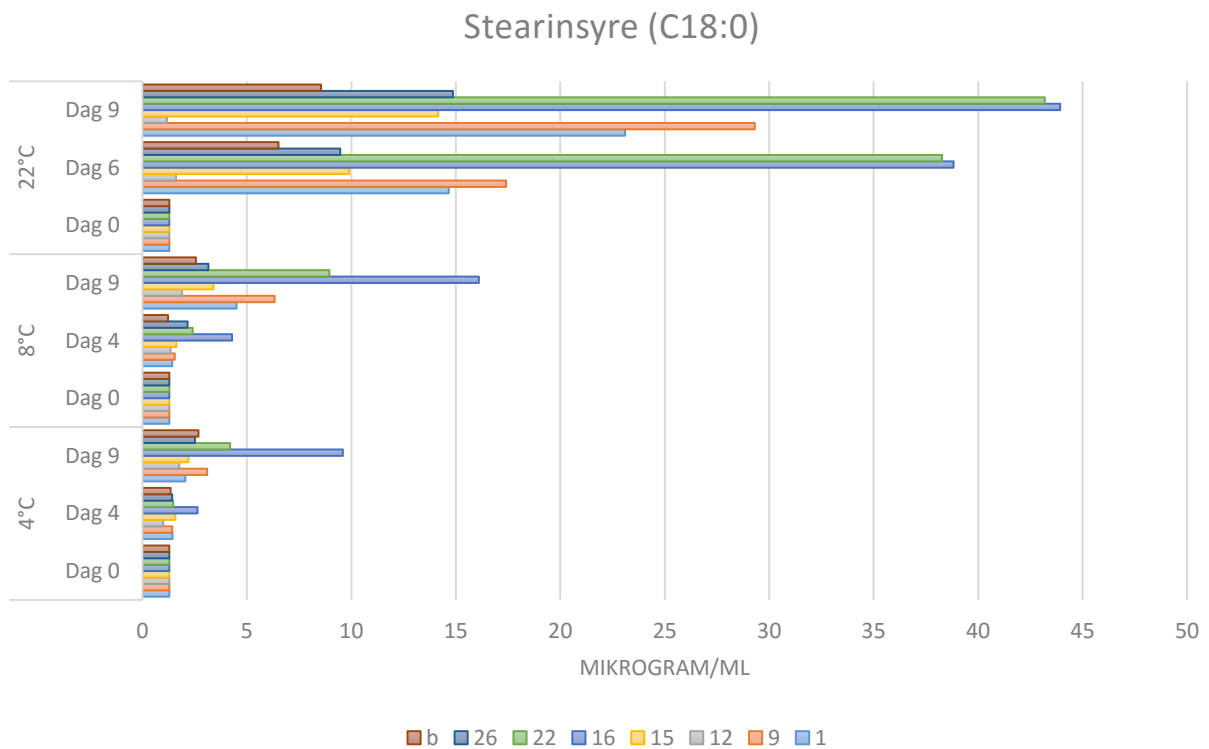
Figur 5.9: Pentadekansyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



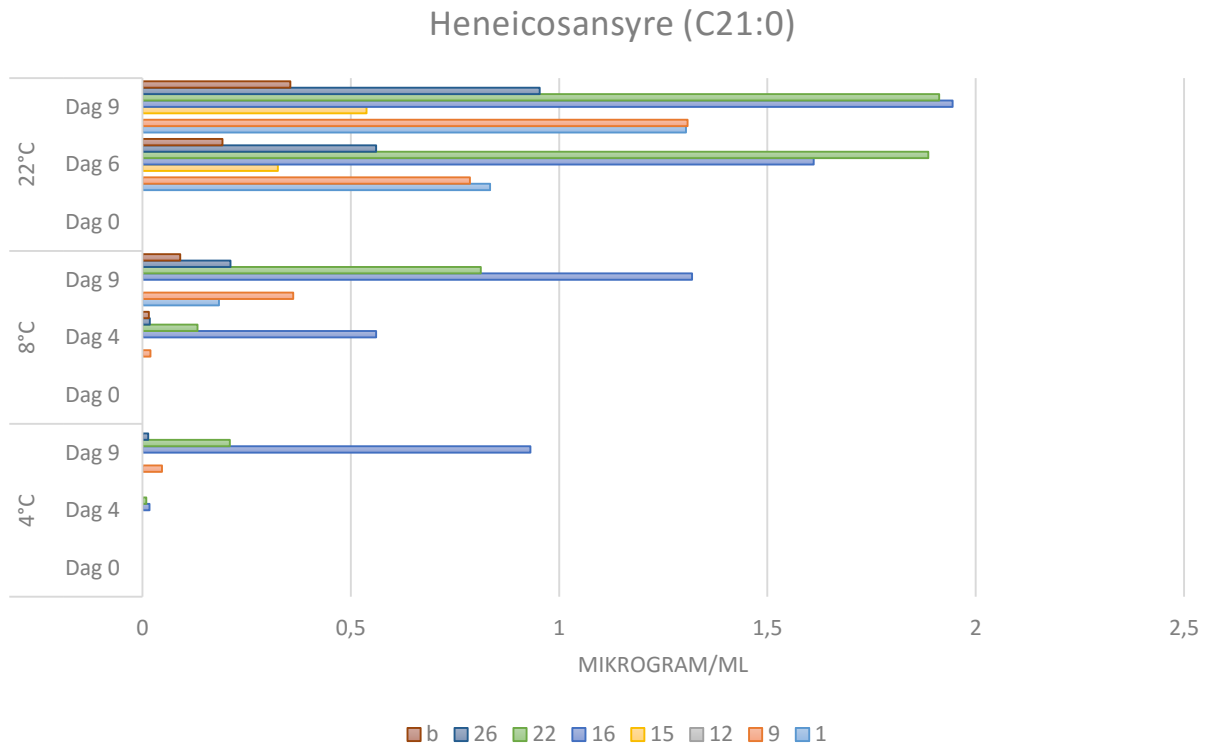
Figur 5.10: Palmitinsyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



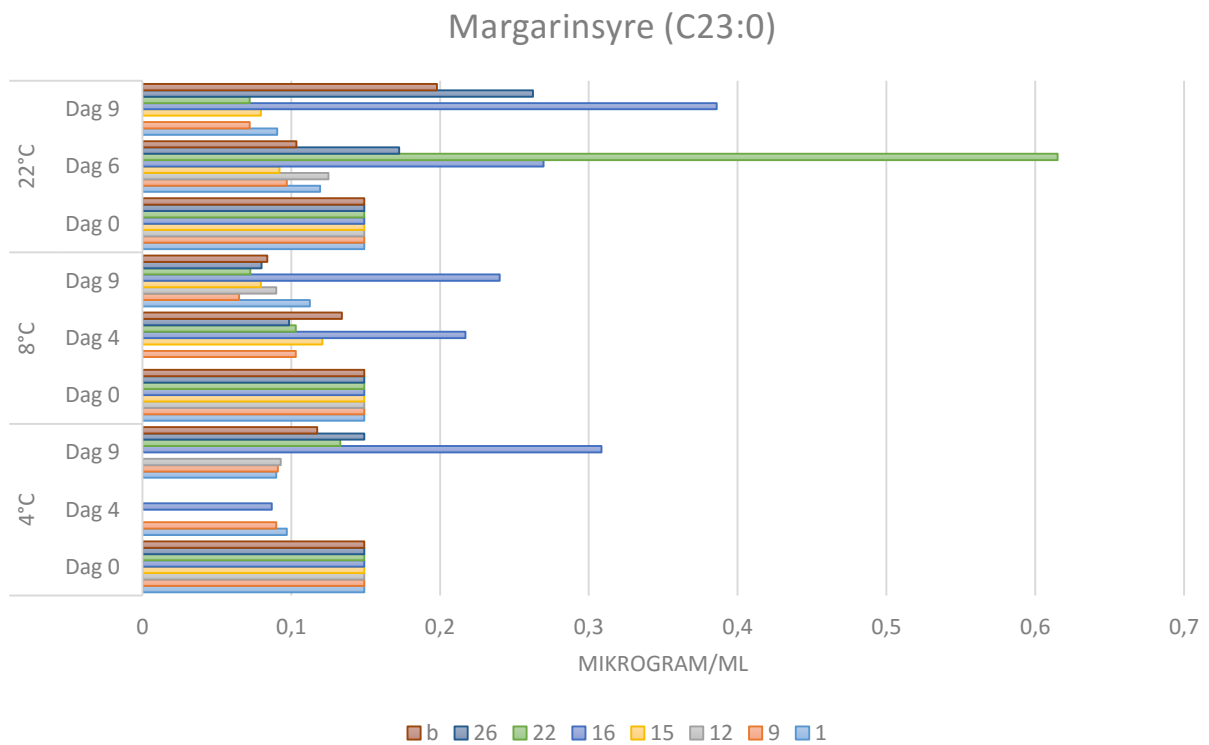
Figur 5.11: Margarinsyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



Figur 5.12: Stearinsyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



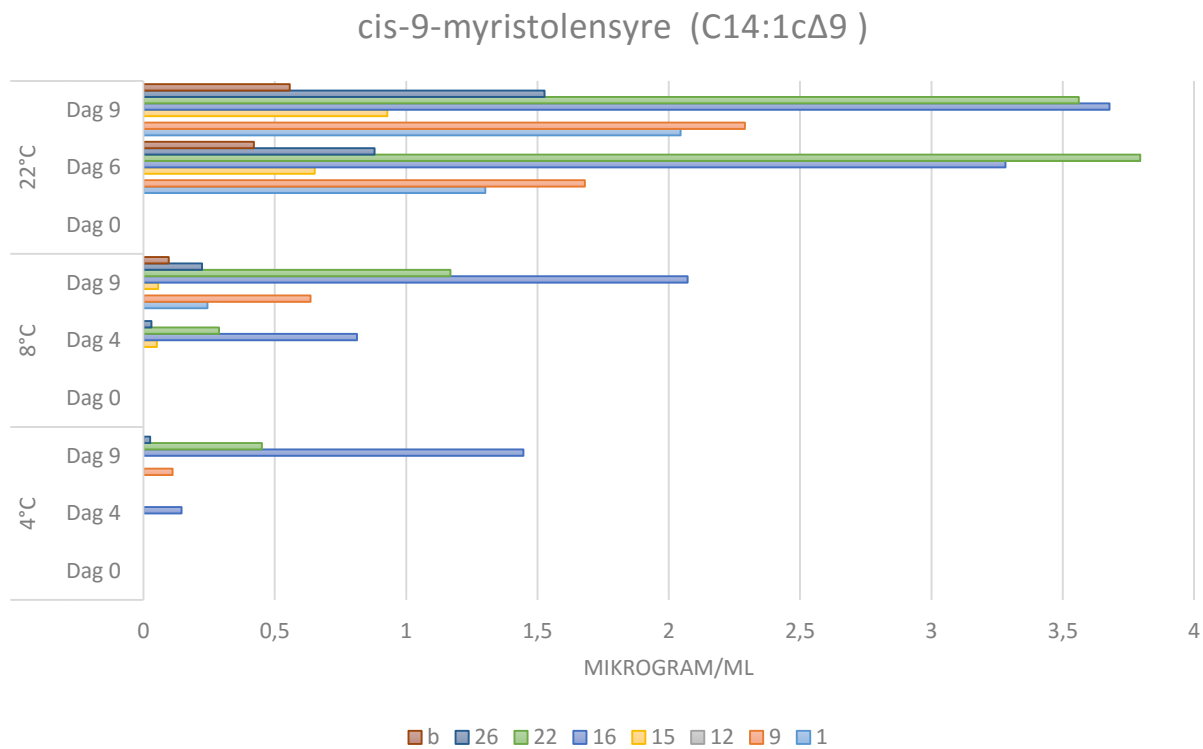
Figur 5.13: Heneicosansyre ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



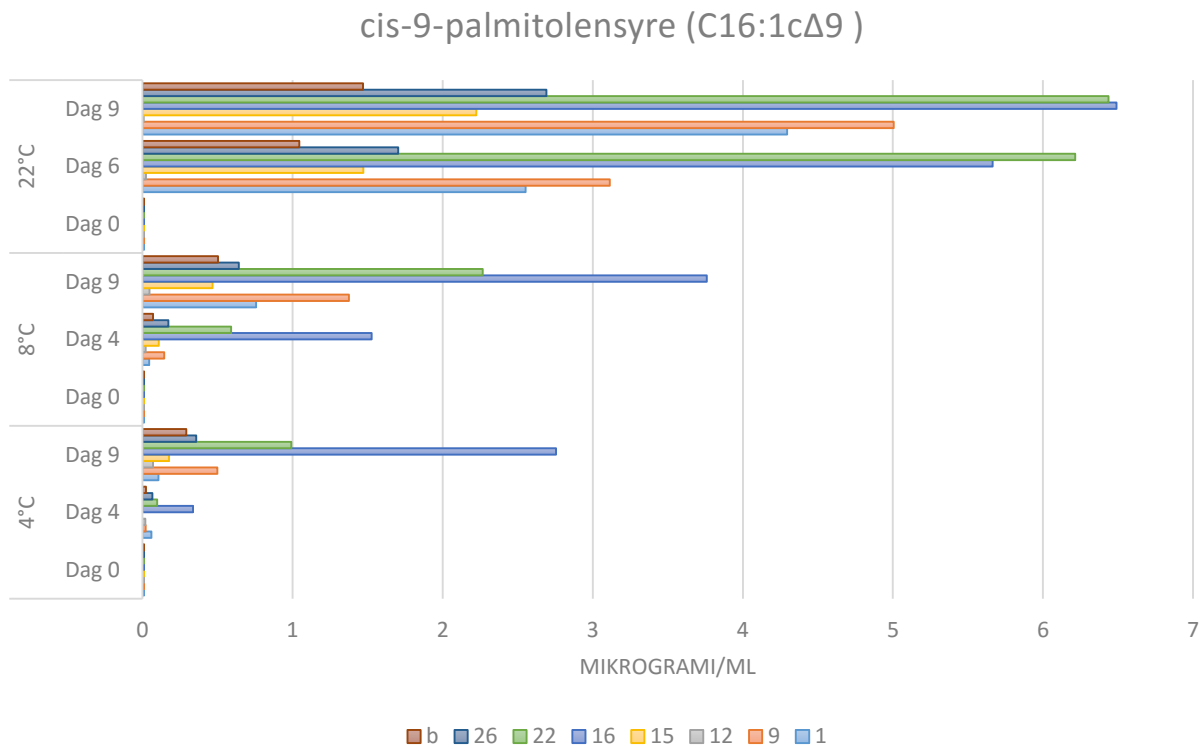
Figur 5.14: Margarinsyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

Konsentrasjonen av samtlige enumettede fettsyrener (figur 5.15-5.20) detektert i melken var lav, da konsentrasjonene detektert varierte mellom 0,009 til 6,49 $\mu\text{g/ml}$ (figur 4.16).

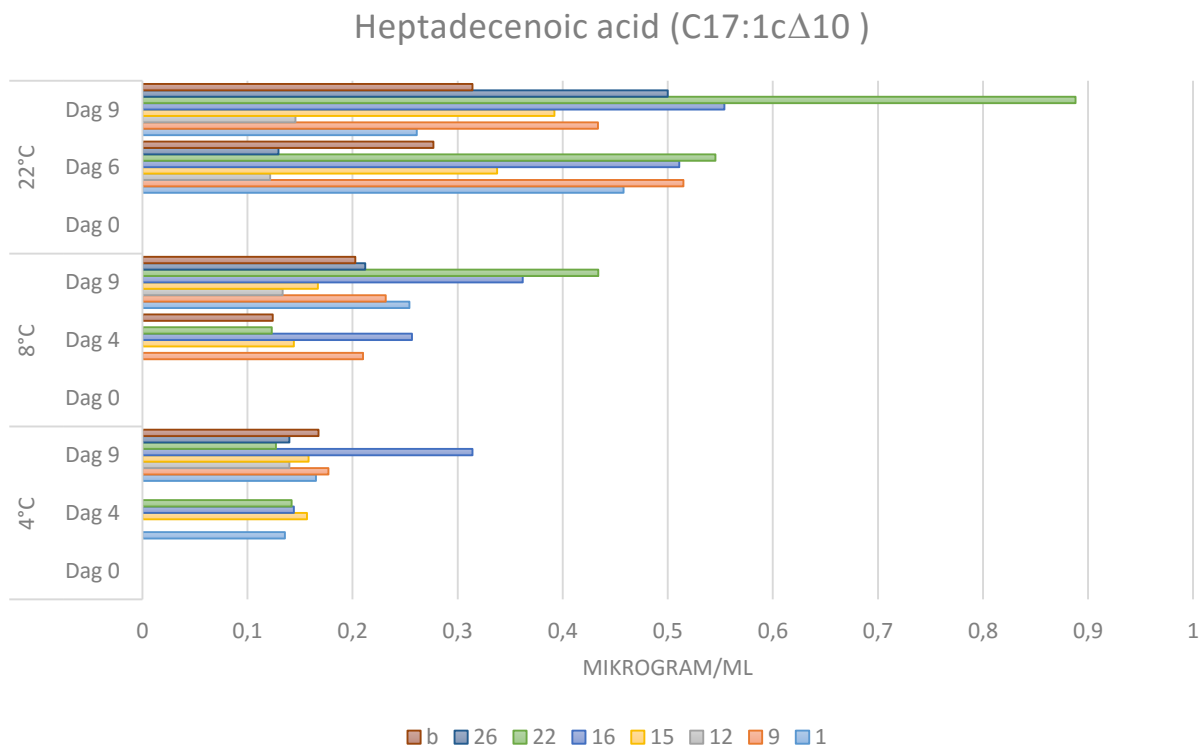
Fettsyrener C14:1 Δ 9, C16:1 Δ 9, C17:1 Δ 10, C18:1 Δ 9 og C20:1 Δ 11 økte med inkuberingstid og inkuberingstemperaturen i melken. Det ble observert en reduksjon av C18:1 Δ 9 fra dag 0-4 (melk podet med stamme 1,9,12,15, b). I melk inkubert ved 4 °C ble det ikke detektert C14:1 Δ 9, C18:1 Δ 9 eller C20:1 Δ 11 etter 4 dager, med unntak av melken podet med bakteriestamme 16 som inneholdte fri C14:1 Δ 9.



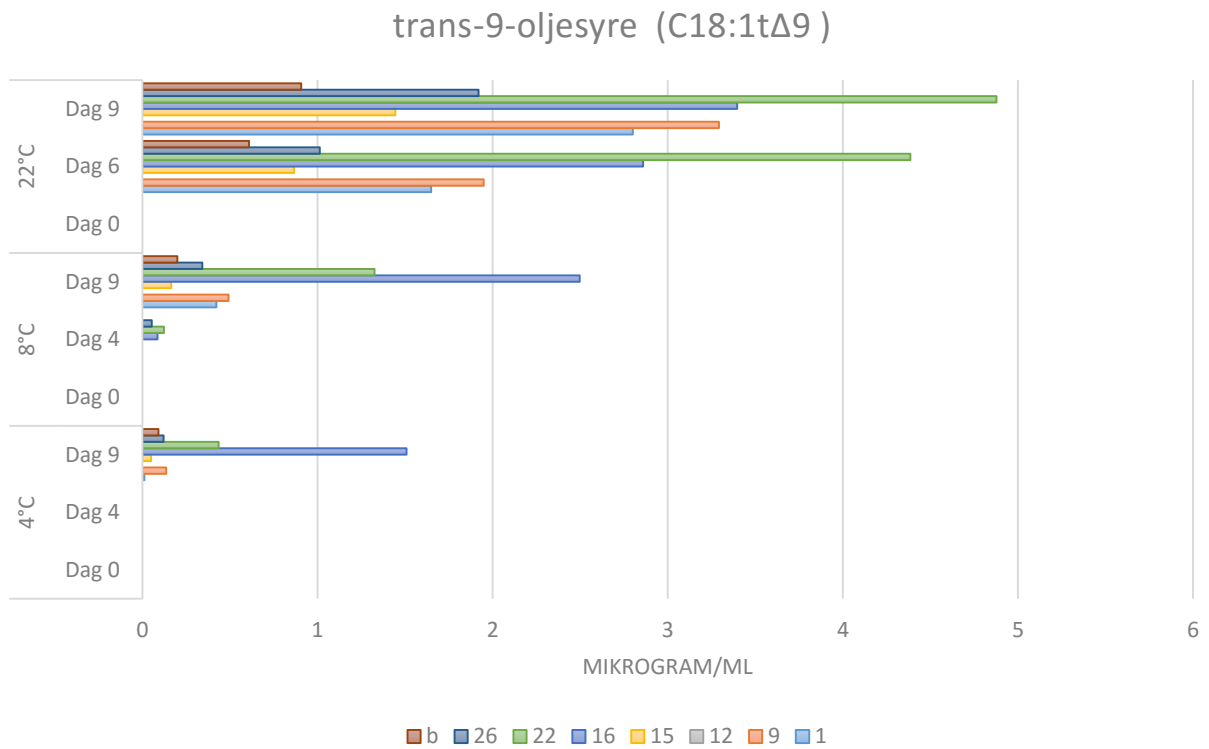
Figur 5.15: cis-9-myristolensyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



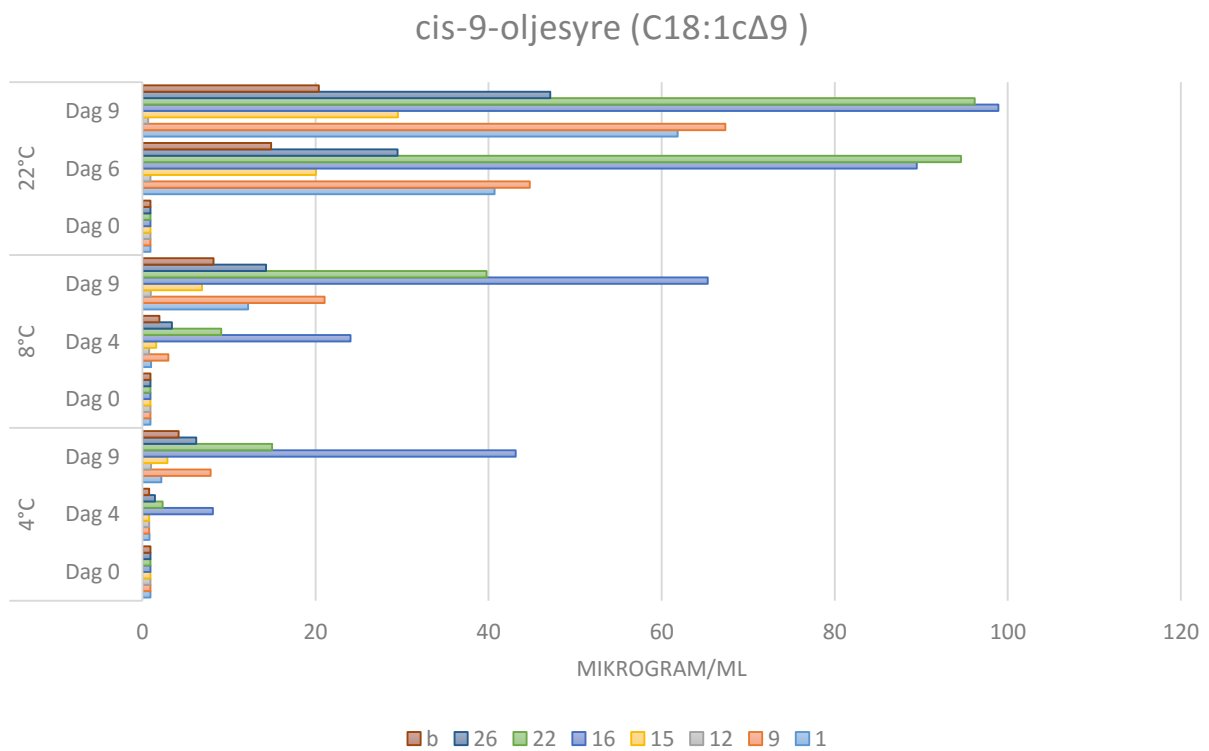
Figur 5.16: Cis-9-palmitolensyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



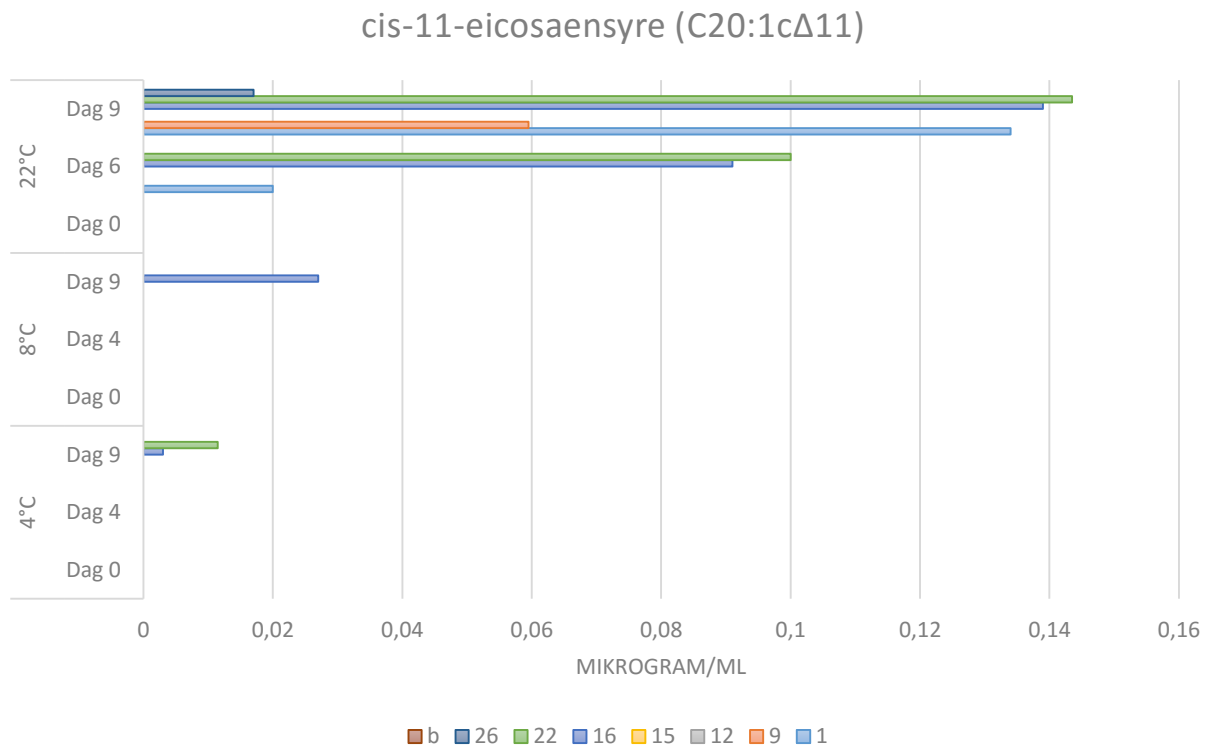
Figur 5.17: Heptadecenoicsyren ($\mu\text{g/ml}$) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



Figur 5.18: Trans-9-oljesyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

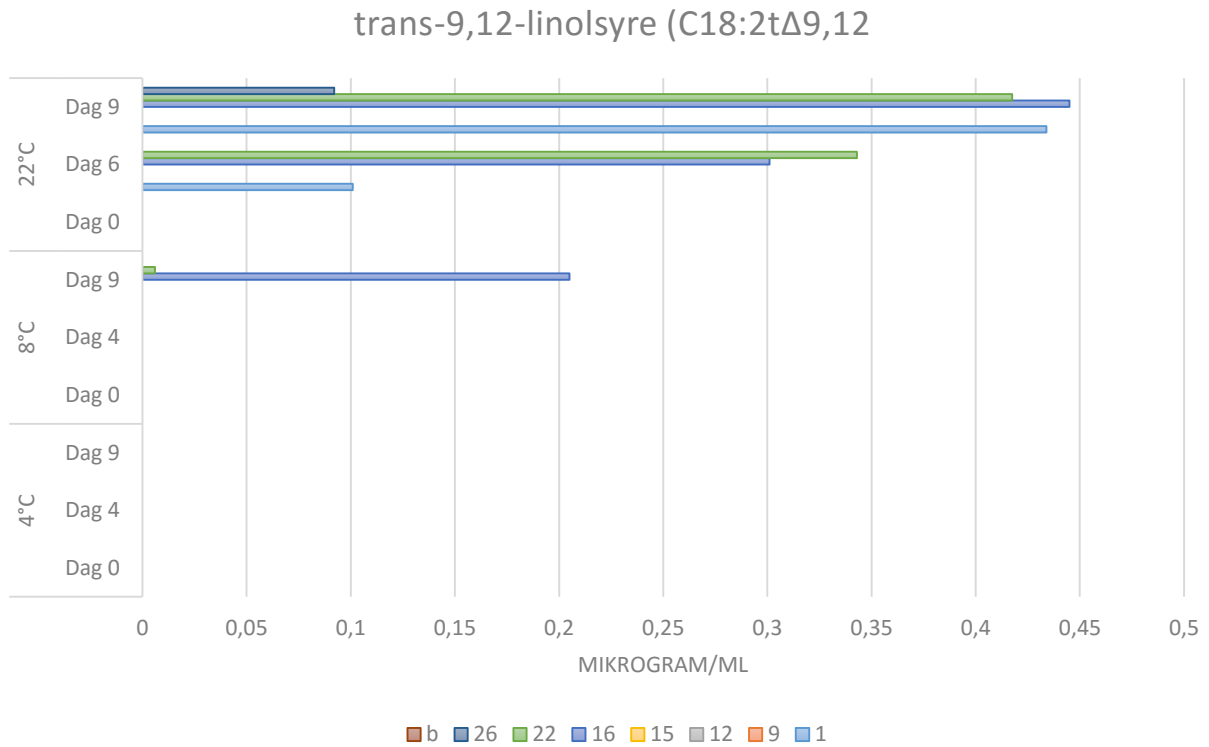


Figur 5.19: Cis-9-oljesyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

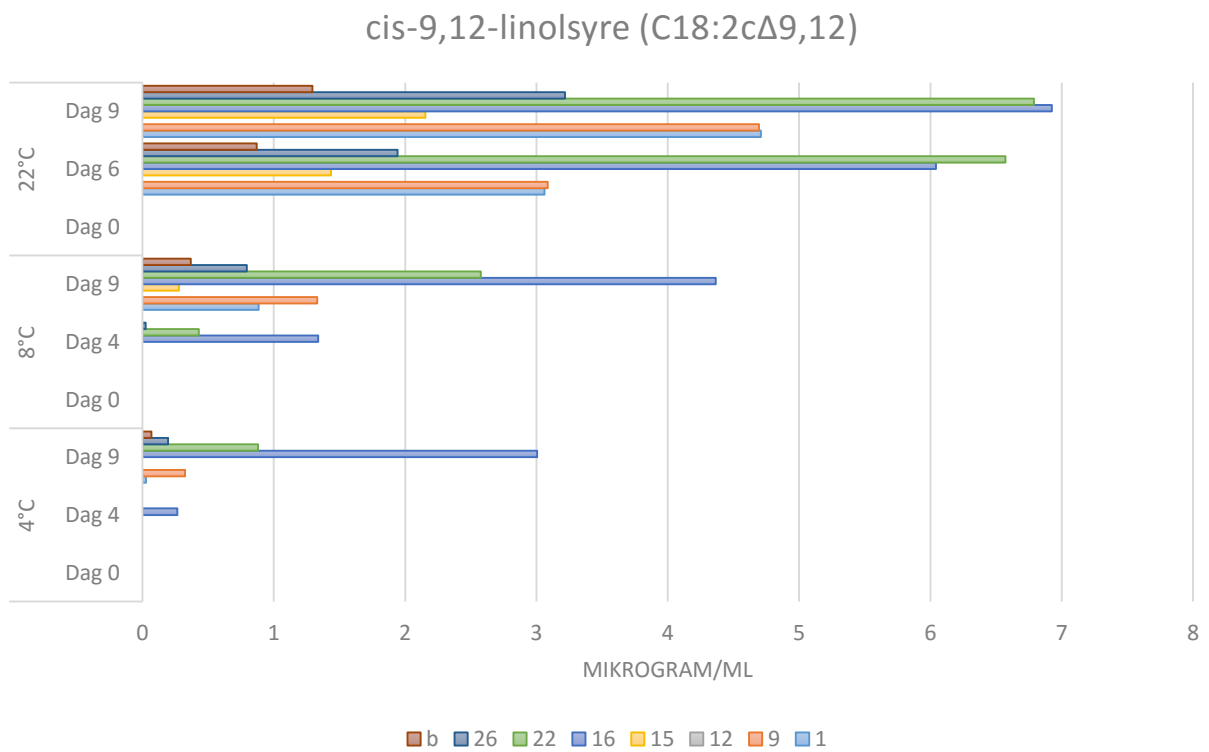


Figur 5.20: Cis-11-eicosaensyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

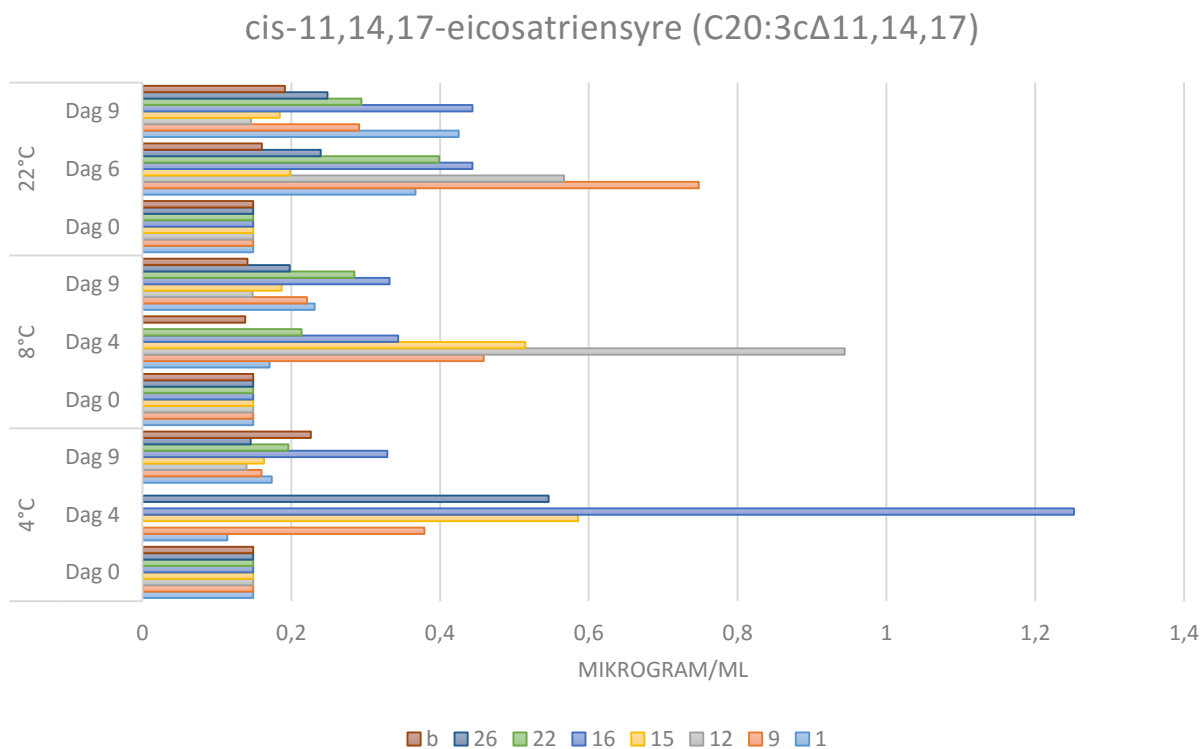
Resultatene fra analysen av flerumettede fettsyrer (4.21-4.24) viste ulike trender, da C18:2tΔ9,12 og C18:2cΔ9,12 i melk økte med inkuberingstemperaturen og inkuberingstiden, mens de resterende detekterte fettsyrene, C20:3cΔ11,14,17 og C20:4cΔ5,8,11,14, ble redusert i løpet av inkuberingstiden. Konsentrasjonene til de ulike fettsyrene var lave da den varierte fra 0,006 µg/ml-6,92 µg/ml.



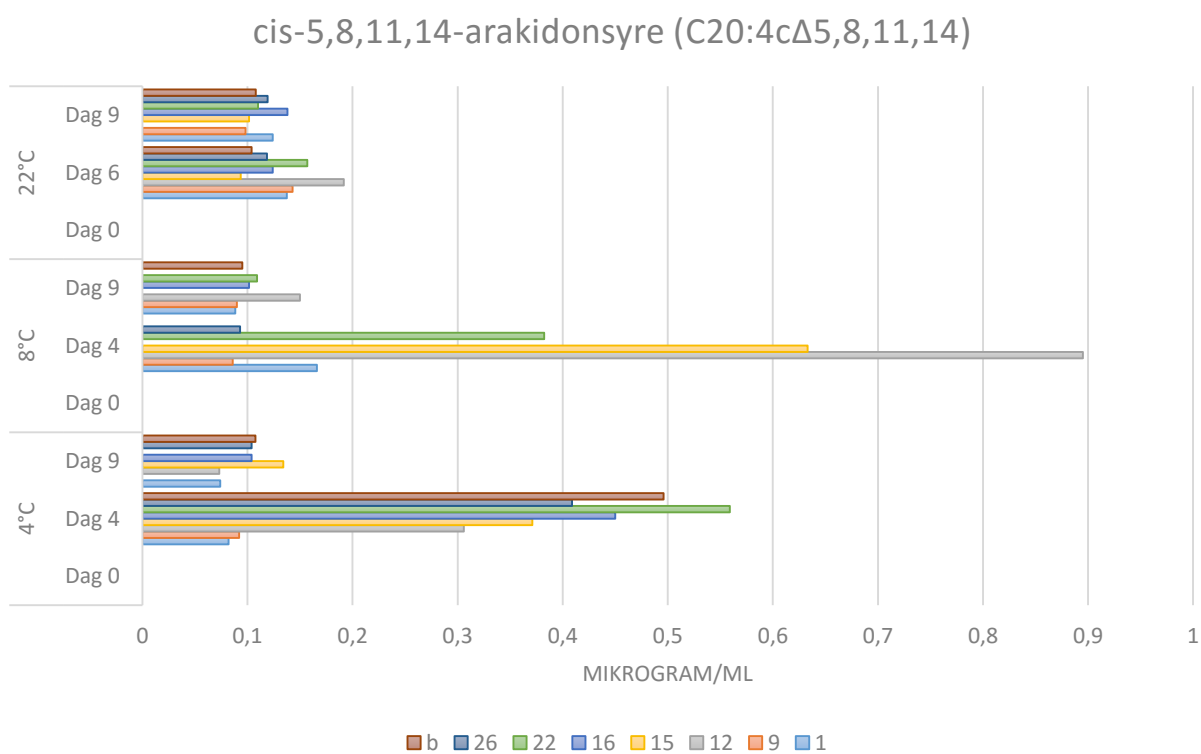
Figur 5.21: Trans-9,12-linolsyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



Figur 5.22: Cis-9,12-linolsyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)



Figur 5.23: Cis-11,14,17-eicosatriensyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

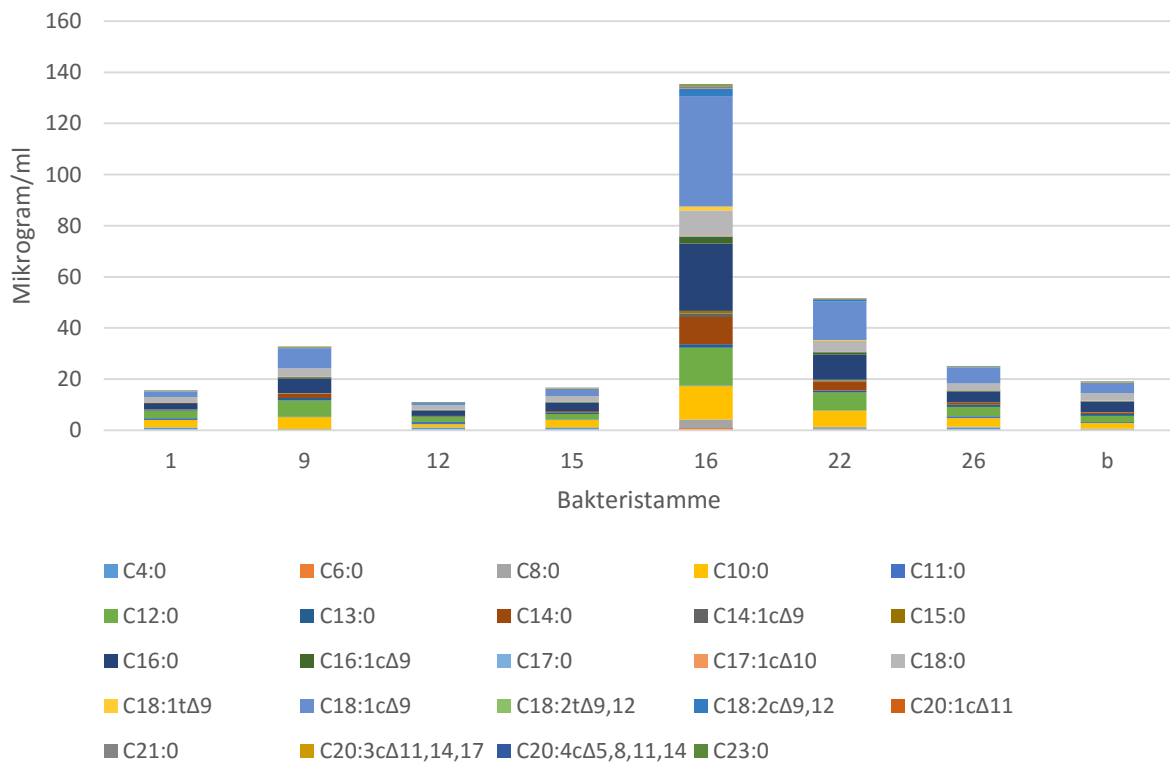


Figur 5.24: Cis-5,8,11,14-arakidonsyre (µg/ml) i UHT-melk podet med ulike bakteriestammer (1, 19, 12, 15, 16, 22, 26 og b) og inkubert ved ulik temperatur (4, 8, 22 °C) og tid (0, 4, 6 og 9 dager)

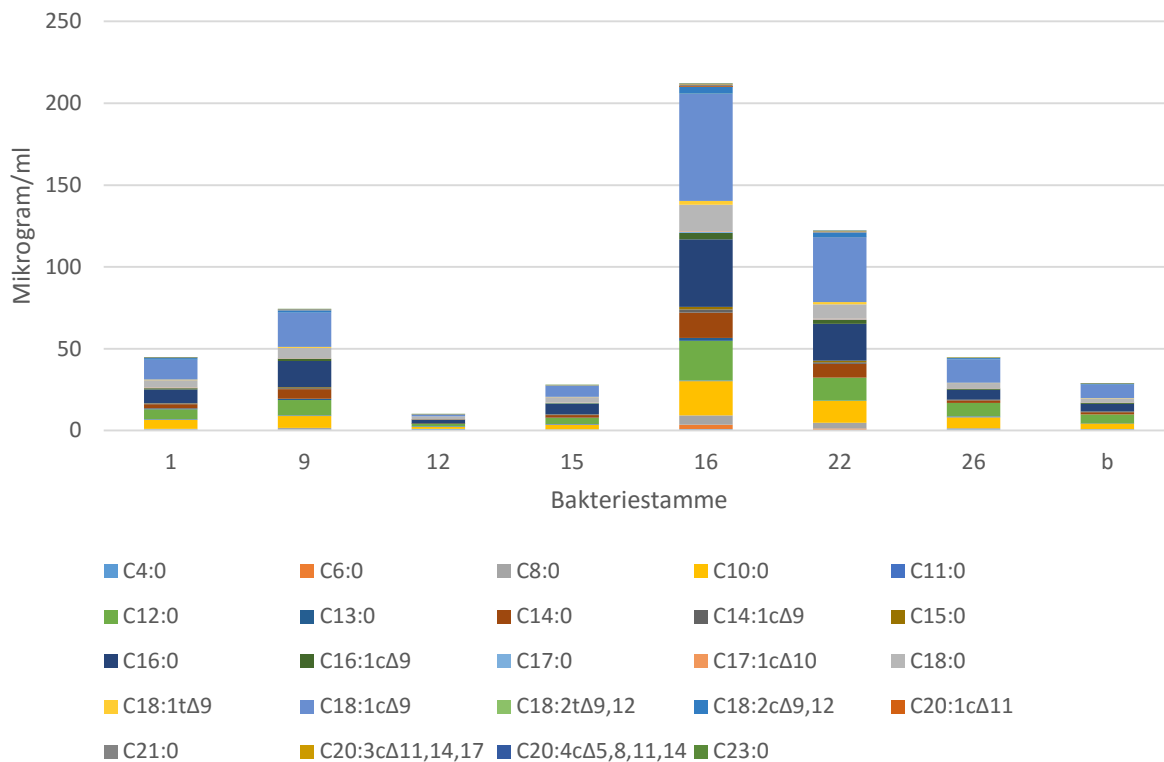
Samlet viser resultatene i analysen at majoriteten av fettsyrene detektert øker med melkens inkubasjonstid og inkubasjonstemperatur (C6:0, C8:0, C10:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C21:0, C14:1, C16:1cΔ9, C17:1cΔ10, C18:1cΔ9, C20:1cΔ11, C18:2tΔ9,12, C18:2cΔ9,12). De resterende detekterte fettsyrene har derimot noe redusert konsentrasjon ved dag 4 eller dag 9 forhold til henholdsvis dag 0 og 4/6 ved samme inkubasjonstemperatur. Størst konsentrasjon ble detektert hos de medium lange- og lange fettsyrene ettersom det ble detektert betydelige større konsentrasjon av C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1cΔ9 sammenlignet med resterende fettsyrene. Konsentrasjonen til de korte, flerumettede-, oddetall- og de resterende enumettede fettsyrene var generelt lav.

3.6 Variasjonen i lipolytisk aktivitet blant de ulike bakteriestammene av *Pseudomonas*

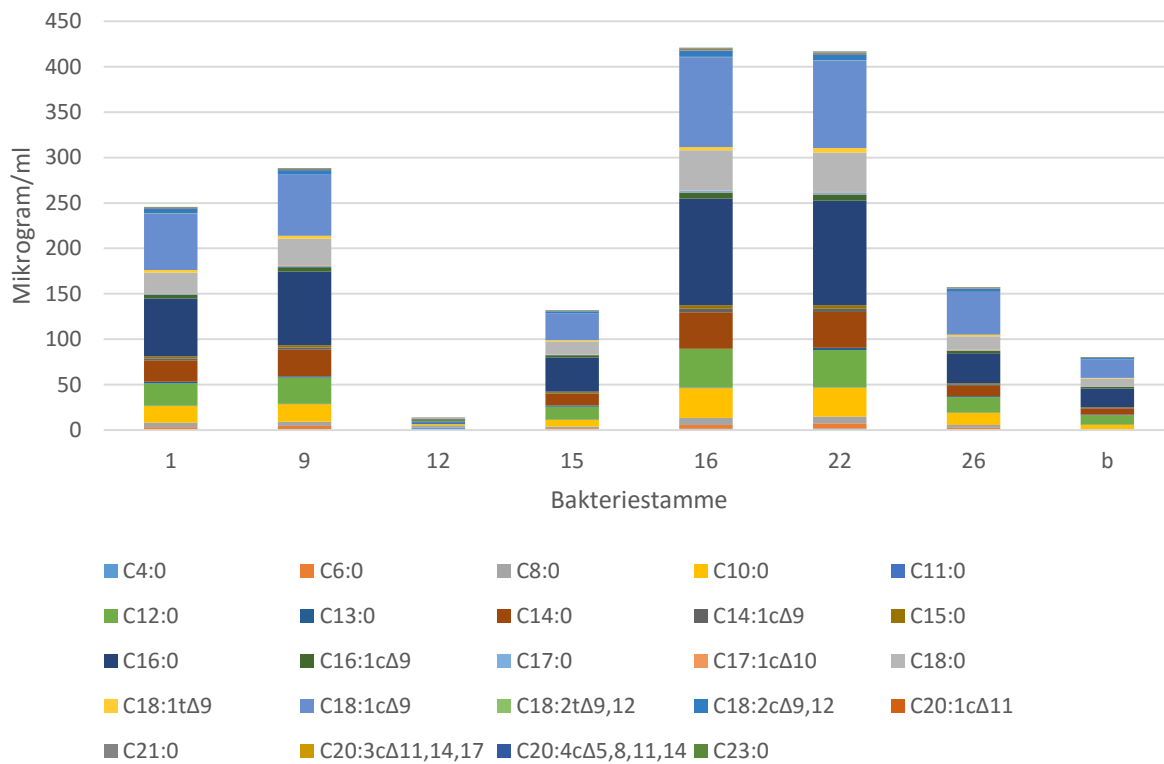
For å undersøke nærmere variasjonen i lipolytisk aktivitet mellom de ulike bakteriestammene podet i UHT-melk ble konsentrasjonen av hver FFA hos hver bakteriestamme illustrert i en figur. Figur 6.1-6.3 viser konsentrasjonen av alle de ulike FFA i melk inkubert i 9 dager ved henholdsvis 4, 8 og 22 °C.



Figur 6.1: Konsentrasjonen (µg/ml) FFA i UHT-melk podet med bakteriestamme 1,9, 12, 15, 16, 22, 26 og b og inkubert ved 4 °C i 9 dager



Figur 6.2: Konsentrasjonen ($\mu\text{g/ml}$) til ulike FFA i UHT-melk podet med bakteriestamme 1,9, 12, 15, 16, 22, 26 og b og inkubert ved 8°C i 9 dager



Figur 6.3: Konsentrasjonen ($\mu\text{g/ml}$) av ulike FFA i UHT-melk podet med bakteriestamme 1,9, 12, 15, 16, 22, 26 og b inkubert ved 22°C i 9 dager

Figur 6.1-6.3 viser tydelig at konsentrasjonen av FFA øker med inkuberingstemperaturen. UHT-melk inokulert med stamme 16 og 22 hadde størst konsentrasjon av FFA ved alle tre inkuberingstemperaturene (4, 8 og 22 °C) etter 9 dager. UHT-melk inokulert med bakteriestamme 12, 15 og b viste derimot minst konsentrasjon av FFA. Figurene viser i tillegg at de ulike FFA produsert i UHT-melk lagret ved 4, 8 og 22 °C utgjorde omtrent like stor andel av totalkonsentrasjon.

4. Diskusjon

I denne studien ble lipolytisk aktivitet i ubehandlet kjølelagret melk undersøkt ved å simulere de mikrobiologiske forholdene som forekommer i denne type melk. Fokuset ble lagt på bakteriestammer av slekten *Pseudomonas* da disse dominerer ved kjølelagring. Ubehandlet kjølelagret melk ble i dette prosjektet forsøkt etterlignet ved å tilføre isolerte *Pseudomonas* bakteriestammer fra ubehandlet melk til UHT-melk. Melken ble dermed inkubert ved ulike temperaturer slik at en kan undersøke hvordan ulike lagringstemperaturer kan påvirke bakteriestammens metabolisme og vekst i melk frem til varmebehandling på meieriet.

4.1 Isolering, identifisering og utvalg av bakteriestammer av *Pseudomonas*

Ved gjennomføring av en rekke analyser av fenotypiske og genotypiske karakteristikk ble bakteriestammer av slekten *Pseudomonas* isolert fra ubehandlet melk og identifisert. Ettersom flere bakteriearter kan potensielt vokse på *Pseudomonas* CFC agar (Flint & Hartley, 1996) ble katalase-test, KOH-test (3 %), mikroskopering, samt 16S rRNA sekvensering utført for å forsikre om at bakteriene isolert tilhørte slekten *Pseudomonas*. De tre førstnevnte analysene bekreftet at samtlige av bakteriene var Gram-negative, katalasepositive staver. På bakgrunn av resultatene fra 16S rRNA-sekvenseringen ble bakterieslekter uten disse fenotypiske egenskapene eliminert. Følgelig ble det konkludert med at samtlige av isolatene tilhørte *Pseudomonas*, ettersom kun denne slekten gjenstod som match etter 16S rRNA sekvenseringen.

I denne oppgaven ble lipolytisk aktivitet kun undersøkt hos isolater identifisert på slektsnivå da variasjonen innen 16S rRNA-genet hos *Pseudomonas* ikke tillater spesifikk identifikasjon på stammenivå (Dogan & Boor, 2003). Resultatene fra 16S rRNA-sekvenseringen viser at isolatene stemte overens med flere bakteriearter av slekten *Pseudomonas*, og majoriteten av isolerte bakteriestammer hadde 16S rRNA i overensstemmelse med artene *fluoresces* (n=28), *fragi* (n=23) og *putida* (n=19). Ettersom flere studier viser til samme resultat blir det antatt at disse artene representerer majoriteten av bakteriene isolert i denne studien (De Jonghe et al., 2011; Dogan & Boor, 2003).

4.2 Utvalg av bakteriestammer

I denne studien ble bakteriestammer som viste varierende lipolytisk aktivitet valgt ut til vekstforsøk og fettsyreanalyse blant de ulike stammene av *Pseudomonas*. For å sikre at de hadde evnen til å hydrolysere fett ble bakteriestammer som hadde evnen til å spalte tributyrin,

i tillegg til at de testet positiv for tilstedeværelse av lipolytiske enzymer ved APIZYM, valgt ut og undersøkt nærmere. Av bakteriestammer som ble benyttet i vekstforsøket (1, 9, 12, 15, 16, 22 og b) var det kun 1, 9 og 22 som viste klaringszone ved begge diffusjonsanalysene og testet positivt for tilstedeværelse av lipolytisk enzym. Resultatene i de to analysene viste ikke konsekvent samsvar da det ble identifisert esterase (C4) hos noen isolater, men ikke klaringszone i tributyrin i diffusjonsanalysen og motsatt. En mulig årsak til dette kan være at bakteriene er avhengig av aktivering og betingelsene for aktivering ikke var tilstede. Bakteriestamme 12 viste ingen lipolytisk aktivitet, men ble tatt med videre som en kontrollstamme for negativ enzymaktivitet.

Hvorvidt nettopp isolatene med størst lipolytisk aktivitet ble valgt ut til analyse av fettsyrer er vanskelig å fastslå. Funn som indikerer grad av samvariasjon størrelse på klaringszone og enzymaktivitet, varierer med ulike studier (Litthauer et al., 2010; McKellar, 1989a). I tillegg har bruk av tributyrin blitt kritisert for å være begrenset til å identifisere esterase-aktivitet, og ikke lipase-aktivitet ettersom esterase favoriserer spaltning av korte fettsyrer og lipaser har maksimal aktivitet mot medium lange og lange fettsyrer (McKellar, 1989b). Da noen stammer av *Pseudomonas* produserer esterase som ikke hydrolyserer i melk blir det spekulert i om en i tillegg bør benytte agarer som består av triacylglyserid med lengre fettsyrer (trikaprin, triolin, trikaproin) for å undersøke hele enzymaktivitetsspekteret som kan ha betydning i melk (McKay et al., 1995).

4.3 Vekst av *Pseudomonas* i melk

Ulik lagringstemperaturer og lagringsvarighet av melk har vært i fokus i mange studier da disse faktorene har vist seg å ha stor innvirkning på vekstforløpet til psykotrofe bakterier i ubehandlet melk (De Jonghe et al., 2011; Lin et al., 2015; Phillips & Griffiths, 1987). I vekstforsøket ble ubehandlet melk forsøkt simulert ved å inokulere *Pseudomonas* i UHT-melk som ble inkubert i 9 dager ved 3 ulike temperaturer (4 °C, 8 °C og 22 °C)

Inokuleringsmengden av *Pseudomonas* i UHT-melk i vekstforsøket varierte mellom 2,3 og 3,9 log kde ml⁻¹. Ulike inokuleringsmengder, til tross for nedfrysning av lik bakteriemengde til vekstforsøket, gir en mistanke om at bakterier døde under nedfrysning. Det kan imidlertid også skyldes begrensninger i metoden for kvantifisering av bakterieantall (Poindexter & Leadbetter, 1986). I en omfattende studie gjennomført av Cempírková og Mikulová (2009) ble det i gjennomsnitt funnet 2,82 log kde ml⁻¹ psykotrofe bakterier i 491 prøveuttak fra melk på ulike gårder, og kontamineringsmengden varierte mellom 1,70 og 3,2 log kde ml⁻¹. Da

inokuleringsmengden i vår studie var noe høyere enn kontamineringsmengdene av psykotrofe bakterier identifisert i ubehandlet melk av Cempírková og Mikulová (2009) blir det konkludert med at UHT-melken er noe ulik ubehandlet melk i gårdstanken med tanke på bakterieinnhold.

Inokulering av *Pseudomonas* (2,5-3,9 log kde ml⁻¹), tidsaspektet (0-9 dager), og en av inkuberingstemperaturene (4 °C) i vekstforsøket gir melken mange av de samme egenskapene som ubehandlet melk lagret på gården, samt under transport og lagring på meieri. På bakgrunn av dette blir det antatt at vekstforløpet til de inokulerte isolatene i dette vekstforsøket samsvarer i stor grad med noen av de mikrobielle endringene som forekommer i ubehandlet melk. At konsentrasjonen av *Pseudomonas* er tilnærmet lik konsentrasjonen av totalt antall bakterier har blitt demonstrert i en studie av De Jonghe og medarbeidere (2011). Til tross for at innvirkning av en kompleks mikroflora på vekstforløpet til *Pseudomonas* ikke er tatt høyde for i forsøket, kan vi derfor allikevel slutte at konsentrasjonen av det totale antallet bakterier i ubehandlet melk er nærmest sammenfallende med mengden av *Pseudomonas*. Etersom melken i dette forsøket var en monokultur, kunne ikke hvorvidt bakteriestammene har en innvirkning på hverandres vekst undersøkes.

Resultatene i vekstforsøket viser hvordan vekstforløpet til bakteriestammene av *Pseudomonas* er relatert til temperatur og tid. I løpet av 9 dager med inkubering hadde samtlige bakteriestammer inkubert i melk (1, 9, 12, 15, 16, 22, 26, b) ved ulike temperaturer (4 °C, 8 °C og 22 °C) en konsentrasjon mellom 8 og 10 log kde ml⁻¹. De inokulerte bakteriestammene hadde tilnærmet samme veksthastighet i UHT-melk inkubert ved samme temperatur. Hvorvidt bakteriestammene er i lagfase eller logfase rett etter de blir inokulert i UHT-melken kan ikke fastslås som følge av for få bestemmelser av bakteriekonsentrasjon. For å identifisere hvorvidt bakteriene var i en tilpasningsfase (lagfase) ville kvantifisering av bakterieantallet flere ganger mellom inokuleringstidspunktet og dag 1 vært foretrukket.

Da størst veksthastighet ble detektert mellom inokuleringstidspunktet og dag 1 og dag 2 for henholdsvis melk inkubert ved 4 og 8 °C og melk inkubert ved 22 °C blir det konkludert med at bakteriestammene har begynt å formere seg aktivt (logfase) i løpet av den tiden. Etter inkubering i 2 dager ved 4 °C og 8 °C og 1 dag ved 22 °C ser det ut til at bakteriene begynner å gå over til stasjonær fase da veksthastigheten blir betraktelig redusert.

Størst veksthastighet ble observert i melk inkubert ved 22 °C som er i overensstemmelse med vitenskapelig funn som tilsier at bakterier av *Pseudomonas* har maksimum veksttemperatur

mellom 20 og 25 °C. Maksimal veksthastighet ble observert de 2 første dagene i melk inkubert ved 4 °C og 8 °C og første dagen ved 22 °C, da bakteriekonsentrasjonen økte med henholdsvis mellom 1,45 og 3,71 log kde ml⁻¹, 2 og 5 log kde ml⁻¹, samt 4,07 og 5,24 log kde ml⁻¹. På bakgrunn av disse resultatene blir det antatt at det vil være betydelig bakterievekst av *Pseudomonas* i kjølelagret ubehandlet melk allerede på gården og under transport til meieriet. Ut i fra resultatene blir det i tillegg antatt at temperaturøkning opp mot 8 °C allerede i begynnelsesstadiet i verdikjeden vil ha stor innvirkning på vekstforløpet til *Pseudomonas* i ubehandlet melk da det ble observert større bakteriekonsentrasjon etter inkubering i 2 dager ved 8 °C sammenlignet med melken inkubert ved 4 °C. De samme trendene ble observert av De Jonghe og medarbeidere (2011) som undersøkte vekst av psykrotrofe bakterier i ubehandlet melk. I studien ble det for optimal og ikke-optimal lagringstemperatur benyttet henholdsvis 3,5 og 6 °C de fire første dagene (gårdstank), deretter 6 og 10 °C i 8 timer (transport) og avslutningsvis 6 og 10 °C i 24 timer (meieritank). Resultatene viste at konsentrasjonen av *Pseudomonas* i melk lagret ved suboptimal temperatur (6 °C) var 1 log kde ml⁻¹ høyere sammenlignet med melk lagret ved optimal temperatur (3,5 °C) i slutten av lagringen i gårdstanken (4 dager). Lenger ut i simuleringen av verdikjeden (5 dager) ble forskjellen mellom de to ulike lagringene større (2 log kde ml⁻¹). Den samme trenden utover i lagringsperioden ble ikke observert i vekstforsøket i denne studien da kun fire bakteriestammer (9, 12, 16 og 26) viste økning i konsentrasjonsforskjell mellom 4 °C og 8 °C, mens forskjellen ble redusert hos de resterende stammene (1, 15, 22, b). En mulig årsak til ulike veksttrender kan være bruk av ulike inkuberingstemperaturer. I vekstforsøket ble den samme inkuberingstemperaturen benyttet under hele lagringsperioden, mens i studien til De Jonghe (2011) har de endret temperaturene underveis i lagringen for å simulere temperaturøkninger som kan forekomme under transport. Ulike resultater kan i tillegg skyldes at studien bruker ubehandlet melk med en mer sammensatt mikroflora, mens UHT-melken i vekstforsøket her er en monokultur.

Det kan tyde på at bakteriestammene inokulert i vårt vekstforsøk var i en annen vekstfase enn bakteriene i studien av ubehandlet melk gjennomført av De Jonghe (2011). Bakteriestammene var i en tidlig stasjonær fase ved nedfrysning som kan medføre at bakteriestammene starter i en tilstand som ga god vekst. De Jonghe (2011) identifiserte i sin studie en konsentrasjon av *Pseudomonas* under 4 log kde ml⁻¹ de første dagene. Dette skiller seg betraktelig fra vekstforløpet til *Pseudomonas* i vårt vekstforsøk da veksthastigheten i vår studie var svært høy i samme tidsrom.

Det kan spekuleres hvorvidt resultatene i vekstforsøkene i vår studie kan relateres til vekstforløpet til ulike bakterier av slekten *Pseudomonas* i varmebehandlet melk ettersom melken ble inokulert med bakterier av *Pseudomonas* fra ubehandlet melk. *Pseudomonas* forekommer ofte også i varmebehandlet melk som følge av rekontaminering etter pasteurisering under blant annet pakking (Eneroth et al., 1998). *Pseudomonas* vil etterhvert dominere under kjølelagring av varmebehandlet melk noe som gjør denne slekten til den viktigste bakterien også i denne type melk. En studie gjennomført av Dogan og Boor (2003) undersøkte genetisk diversitet blant *Pseudomonas* bakterier i ubehandlet og varmebehandlet melk. I forsøket deres ble det observert at bakteriene fra ubehandlet melk var ulike bakteriene fra varmebehandlet melk, med tanke på enzymaktivitet.

4.4 Metabolismen til *Pseudomonas* i melk med hensyn til lipolytisk aktivitet

Flere stammer av *Pseudomonas* har et metabolsk potensial til å degradere triacylglyserider i melk som fører til dannelse av produkter som kan ødelegge kvaliteten til melken. Kartlegging av ulike *Pseudomonas*-bakterier i melk og bakteriernes hydrolytiske egenskaper har vært i fokus i mange studier (De Jonghe et al., 2011; Dogan & Boor, 2003; Fox & Stepaniak, 1983). Som følge av et stort antall ulike arter innenfor slekten *Pseudomonas* og stor variasjon i hydrolytiske egenskaper har omfanget og variasjon av lipolytisk aktivitet i ubehandlet melk ikke blitt kartlagt.

Den lipolytiske aktiviteten til *Pseudomonas* har vist seg i mange studier å være sterkt avhengig av inkuberingstemperatur, som ved bakterieveksten (De Jonghe et al., 2011; Makhzoum et al., 1995). I verdikjeden forekommer det ofte temperaturvariasjoner under lagringen og endringer i meieriproduksjonssystemet som kan føre til endringer i enzymaktivitet før varmebehandling av melk. I denne studien ble det undersøkt hvordan ulike lagringstemperaturer påvirker aktiviteten til lipolytiske enzymer og variasjon i lipolytisk aktiviteten blant de ulike bakteriestammene av *Pseudomonas*. Ved å analysere endringen i konsentrasjon av ulike fettsyrer i melken i vekstforsøket ble degraderingen av asylglyseroler i melken av *Pseudomonas* estimert.

Resultatene fra analysen av fettsyrene i UHT-melk podet med ulike stammer av *Pseudomonas* viste at majoriteten av fettsyrene detektert økte i konsentrasjon med økt inkuberingstemperatur og inkuberingstid i melk. Sett i sammenheng med resultatene i vekstforsøket blir det ikke antatt at stor vekstøkning er ensbetydende med høy enzymaktivitet. Dette demonstreres tydelig ved sammenligning av bakterieveksten estimert i UHT-melk

inokulert med bakteriestamme 12 og akkumulering av fettsyrer i samme melk, da det ble observert stor vekst ved alle lagringstemperaturer men svært lav eller ingen konsentrasjon av ulike frie fettsyrer. På bakgrunn av at ulike bakteriestammer av *Pseudomonas* kan ha ulik lipolytisk aktivitet til tross for lik mengde i melk blir bakterietall estimert i melk kun et grovt mål på kvaliteten.

Størst konsentrasjon av de ulike fettsyrene ble i hovedsakelig detektert etter inkubering i 9 dager ved 22 °C. Da også konsentrasjonen av bakteriene var størst ved dette tidspunktet og ved denne temperaturen, blir det antatt at konsentrasjonen av bakterier har en innvirkning på grad av lipolytisk aktivitet i melken. Da det kun ble gjennomført fettsyreanalyse på melk inkubert ved 0, 4, 6 og 9 dager er det vanskelig å estimere hvor lang tid det tok etter inokulering før enzymene ble aktive.

Lavere akkumulering av FFA i melken ved lav inkuberingstemperatur tyder på at enzymene i melken hadde lav hydrolytisk aktivitet ved lave temperaturer. Hvorvidt dette skyldes at det blir produsert mindre ekstracellulære enzymer eller om enzymene blir produsert, men har lav aktivitet ved lav temperatur, kan ikke estimeres på bakgrunn av denne analysen. Da det ble observert en akkumulering av FFA ved lav inkuberingstemperatur (4 °C) i melken fra dag 0 til dag 4 blir det antatt at det vil forekomme lipolytisk aktivitet i ubehandlet melk hvis melken lagres utover 4 dager før pasteurisering, forutsatt at inokuleringsmengden i melken i dette vekstforsøket er lik kontamineringsmengden. Det blir i tillegg antatt at lipolytisk aktivitet kan øke med temperaturøkninger i verdikjeden da det ble observert en større akkumulering av FFA i melk inkubert ved 8 °C enn ved 4 °C.

Blant de ulike fettsyrene detektert i melken ble det observert størst konsentrasjon av medium lange og lange fettsyrer da det var betydelig større konsentrasjon av C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1cΔ9 i melken sammenlignet med de andre fettsyrene. Enumettede-, flerumettede- og oddetalls fettsyrer derimot, representerer den laveste konsentrasjonen. Disse funnene stemmer godt overens med observasjonene i en studie gjennomført av McKay og medarbeidere (1995) som detekterte størst konsentrasjon av de lange fettsyrene (C16:0, C18:0 og C18:1) i melk av stammen *P. fluorescens* LS107d2. I tillegg ble det i studien observert høy akkumulering av C4:0. McKay og medarbeidere (1995) konkluderte med at konsentrasjonen av de ulike FFA i melken er et resultat av nedbrytning av asylglyserol som frigjør FFA og videre nedbrytning av FFA ettersom det ble detektert reduksjon i konsentrasjon av fettsyren C4:0 med inkuberingstiden i melken. Da det ble observert reduksjoner av enkelte fettsyrer

utover lagringstiden i UHT-melken i denne studien antas også nedbrytning av FFA i vårt forsøk.

Fettsyrer kan oksideres i melk og omdannes til andre kjemiske komponenter. På bakgrunn av dette er det vanskelig å estimere den totale nedbrytningen av asylglyserol forårsaket av bakteriestammer av *Pseudomonas*. Et mer nøyaktig estimat av nedbrytningen krever dermed flere analyser. Et forslag er isolering og analysering av de nøytrale lipidene i melken ved hjelp av GC og dermed undersøke sammenhengen mellom konsentrasjonen av nøytrale lipider og FFA utover i inkuberingstiden. Hvorvidt det er en sammenheng mellom disse kjemiske komponentene kan gi en indikasjon på om det er liten eller høy grad av oksidasjon i melken.

Estimering av konsentrasjonen av korte fettsyrer i melk kan være en utfordring da de er svært vannløselig og flyktige noe som gjør det vanskelig å isolere de fra melk (Liu, 1994). I denne studien ble det detektert lave konsentrasjoner av korte fettsyrer. Dette skiller seg fra funnene i studien gjennomført av McKay og medarbeidere (1995) som detekterte høy akkumulering av fettsyren C4:0 i melk inokulert med *P. fluorescens* LS107d2. Hvorvidt dette skyldes mindre hydrolysering av triglyserid med C4:0 eller fettsyren ikke har blitt fullstendig detektert i melken er uklart. Ved isolering av fett i melkeprøven kan de korte fettsyrene i melken blant annet bli gjenværende i NaCl-fasen fremfor kloroform som blir tatt med videre til analysering som følge av høyere vannløselighet eller fordampet under tørking med N₂-gass som følge av høy flyktighet.

Ekstracellulære enzymer produsert av *Pseudomonas* er svært varmeresistente da de kan overleve UHT-behandling (Walstra et al., 2005). På bakgrunn av dette kan noe av akkumuleringen av ulike fettsyrer i UHT melken i dette forsøket skyldes nedbrytning fra enzymer som allerede var tilstede i melken fremfor enzymer produsert av de ulike *Pseudomonas* stammene inokulert. Et mer nøyaktig estimat av lipolytisk aktivitet til bakteriestammene kan dermed bli generert ved å undersøke fettsyrene i UHT-melk uten inokulerte bakteriestammer slik at en kan identifisere hvorvidt det er enzymer tilstede som overlevde pasteurisering og påvirker resultatene eller enzymer produsert av stammene.

4.5 Variasjon mellom ulike *Pseudomonas*-stammer

For å få et innblikk i variasjonen av lipolytisk aktivitet blant ulike stammer av *Pseudomonas* i melk ble de utvalgte bakteriestammene (1,8, 12, 15, 16, 22 og b) i denne studien sammenlignet på bakgrunn av evnen til å hydrolysere asylglyseroler.

I UHT-melk inokulert med bakteriestamme 1 ble det detektert økning av samtlige fettsyrer som tyder på at denne bakteriestammen produserer lipolytiske enzymer som har evnen til å hydrolysere et bredt spekter av fettsyrer. Da det ble detektert enkelte fettsyrer i UHT-melken inkubert ved 22 °C og ikke i melk inkubert ved 4 og 8 °C (C6:0, C8:0, C14:1, C18:2 og C20:1) blir det antatt at aktiviteten til enzymene produsert av bakteriestamme 1 blir noe begrenset ved lav temperatur (4 °C og 8 °C). Det kan dermed konkluderes med at kjølelagring av ubehandlet melk ville begrenset lipolytisk aktivitet noe hos denne bakteriestammen.

De samme lipolytiske egenskapene ble også observert ved bakteriestamme 9.

Konsentrasjonen av de ulike fettsyrene i UHT-melk inokulert med bakteriestammene 1 og 9 befant seg i hovedsak i det midtre sjiktet av de detekterte konsentrasjonene i denne studien. På lik måte som i UHT-melk med bakteriestamme 1 ble det detektert enkelte fettsyrer ved 22°C, men ikke ved 4°C og 8°C (C6:0, C8) som indikerer at kjølelagring også her vil ha en begrenset effekt på den lipolytiske aktiviteten. Til tross for dette antas det at begge stammene er viktige i forbindelse med forringelse av kjølelagret melk, da det ble observert akkumulering av svært mange fettsyrer i UHT-melk podet med disse bakteriestammene.

UHT-melk podet med bakteriestamme 12 ble brukt som en kontroll for manglende lipolytisk aktivitet slik at validiteten til diffusjonsanalysen og API@ZYM kunne vurderes. Resultatene i fettsyreanalysen viste at melk podet med denne stammen viste økt men lav konsentrasjon av samtlige fettsyrer utover inkubasjonsperioden, med unntak av C14:0, C17:0, C18:1, C18:2, C18:2, C20:1, C21:0. Da resultatene i diffusjonsanalysene og API@ZYM indikerte at bakteriestamme 12 ikke hadde lipolytisk aktivitet kan det slutes at metodene kun bør brukes til grov kartlegging av lipolytisk aktivitet. Disse bør så og kombineres med andre analyser for bedre presisjon.

UHT-melk podet med bakteriestamme 12, b og 15 hadde generelt lav fettsyrekonsentrasjon sammenliknet med den podet med de resterende bakteriestammene. I tillegg viste disse lavest veksthastighet i begynnelsen av inkuberingsperioden. I UHT-melk inokulert med bakteriestamme 16 og 22 ble det derimot påvist størst akkumulering av FFA og størst veksthastighet av bakteriene i begynnelsen av inkuberingsperioden. På bakgrunn av disse trendene blir det antatt at lipolytisk aktivitet påvirkes av veksthastigheten til bakteriestammene. I UHT-melk podet med bakteriestammen 26 ble det også observert akkumulering av samtlige fettsyrer. På bakgrunn av resultatene i fettsyreanalysen ble det antatt at enzymene produsert av denne bakterien hadde middels lipolytisk aktivitet sett i forhold til de andre bakteriestammene.

Ut ifra endringen i konsentrasjon av de ulike utvalgte fettsyrene i melken ble det bekreftet at alle bakteriestammene produserer enzymer med lipolytisk aktivitet. I tillegg kan en observere at de lipolytiske enzymene til de ulike inokulerte bakteriestammene har noen felles egenskaper. Den mest fremtredende fellesfaktoren var evnen til å hydrolysere medium lange og lange fettsyrer da disse hadde størst konsentrasjon i samtlige melkeprøver fra vekstforsøket. I tillegg antas det at den lipolytiske aktiviteten til enzymene produsert av de ulike bakteriestammene øker med inkuberingstemperatur, ettersom akkumuleringen av de ulike fettsyrene økte med temperatur i samtlige melkeprøver.

Ved siden av å kartlegge bakterieantallet i ubehandlet melk kan det, på bakgrunn av disse funnene, være hensiktsmessig å kartlegge lipolytisk aktivitet hos de ulike bakteriestammene for å begrense kvalitetsforringelse. Dette, som følge av den store variasjonen mellom bakteriestammene i lipolytisk aktivitet demonstrert i denne studien.

4.6 Oppsummering og konklusjon

Som følge av at ubehandlet melk blir kjølelagret gjennom hele verdikjeden frem til varmebehandling vil psykrotrofe bakterier, hovedsakelig bakterier av slekten *Pseudomonas*, dominere mikrofloraen i melk. Denne studien viser at flere bakteriestammer av *Pseudomonas* har evnen til å vokse og hydrolysere lipider i kjølelagret melk (4 °C), forutsatt at melken inneholdt 2,3-3,93 log kde ml⁻¹ *Pseudomonas* og bakteriene var i log fase ved inokulering. I tillegg viste resultatene at konsentrasjonen av *Pseudomonas* og frie fettsyrer kan øke med lagringstemperaturen. Dette demonstrerer viktigheten av en ubrutt kjølekjede fra melken blir lagret på gårdstanken til den blir varmebehandlet på meieriet. Ved å unngå temperaturøkninger vil veksten av *Pseudomonas* bli noe begrenset og det blir antatt at færre varmeresistente enzymer blir produsert som senere kan bidra til kvalitetsødeleggelse av pasteurisert melk.

Resultatene i studien viser tydelig at graden av kvalitetsødeleggelse i melk avhenger av hvilke bakterier som er tilstede i melken. Dette skyldes at ulike stammer av *Pseudomonas* har ulik grad av lipolytisk aktivitet. Da vekst av *Pseudomonas* ikke kan unngås i kjølelagret melk bør graden av kontaminering reduseres gjennom å forbedre hygienepraktisen på gården, under transport og under prosessering slik at produksjon av ekstracellulære varmeresistente enzymer begrenses før pasteurisering av melken.

4.7 Videre arbeid

Dersom arbeidet med denne studien ikke hadde vært avgrenset av tid, ville en prioritet være å gjennomføre flere gjentakelser av vekstforsøket og fettsyreanalysen. Dette for å sikre flere paralleller. Statistiske analyser på noen av datasettene, ville også kunne resultere i sikrere slutninger.

For å redusere graden av kvalitetsødeleggelse i melk kan det være hensiktsmessig å igangsette tiltak som begrenser kontaminering av bakterier som produserer enzymer med høy hydrolytisk aktivitet. Dette krever at en kan identifisere kontamineringskildene til bakterier med høy hydrolytisk aktivitet. På bakgrunn av dette hadde det vært interessant å isolere og identifisere *Pseudomonas*-stammer i råmelk da dette har størst betydning for kvalitetsødeleggelse i melk, for så gjøre det samme i ulike miljøer som mistenkes å være viktige kontamineringskilder. Videre kunne identifisering av ulike bakteriestammer av *Pseudomonas* med høy lipolytisk aktivitet vært hensiktsmessig før varmebehandling. Dette, da det muliggjør sortering av melk på bakgrunn av innhold av varmeresistente ekstracellulære enzymer. Melk med disse kvalitetene kan derfor benyttes i produkter der langtidslagring ikke er nødvendig.

Ulike stammer av *Pseudomonas* produserer både lipolytiske og proteolytiske enzymer. Ettersom fettkulene er omringet av kaseinmiceller kan det tenkes at proteolytiske enzymer kan gjøre lipidene mer tilgjengelig for lipolytiske enzym ved å hydrolysere protein. Som følge av dette kunne det vært nyttig å undersøke hvorvidt det er noe samspill mellom disse enzymene med tanke på hydrolyseringen av komponenter i melk.

Referanseliste

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (red.). (2008). *Food Microbiology*. 3. utg. Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Amundsen, S. L. (2015). *Pseudomonas fluorescens i melk: Vekst og metabolisme under lagring ved ulike temperaturer, med spesielt fokus på proteolytisk aktivitet*. Master thesis. ås, Norge: Norwegian University of Life Sciences.
- Andersson, R., Hedlund, C. & Jonsson, U. (1979). Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 62 (3): 361-367.
- Cempírková, R. & Mikulová, M. (2009). Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech J Anim Sci*, 54 (2): 65-73.
- 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.
- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (red.). (2007). *Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition*. 4. utg. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- 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.
- Directive, C. (1992). *Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products*. 0001-0031 s.
- Dogan, B. & Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and environmental microbiology*, 69 (1): 130-138.
- Eneroth, Å., Christiansson, A., Brendehaug, J. & Molin, G. (1998). Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International dairy journal*, 8 (9): 829-834.
- Flint, S. & Hartley, N. (1996). A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas* species that cause spoilage of milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 6 (2): 223-230.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem*, 226 (1): 497-509.

- Fox, P. F. & Stepaniak, L. (1983). Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. *Journal of Dairy Research*, 50 (01): 77-89.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (red.). (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2. utg. Sveits: Springer International Publishing.
- Franzetti, L. & Scarpellini, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of microbiology*, 57 (1): 39-47.
- Inglingstad, R. A. (2016). Quality og Norwegian goat milk for cheese production *International Dairy Journal*.
- Lin, H., Shavezipur, M., Yousef, A. & Maleky, F. (2015). Prediction of growth of *Pseudomonas fluorescens* in milk during storage under fluctuating temperature. *Journal of dairy science*.
- Litthauer, D., Abbai, N. S., Piater, L. A. & van Heerden, E. (2010). Pitfalls using tributyrin agar screening to detect lipolytic activity in metagenomic studies. *African Journal of Biotechnology*, 9 (27): 4282-4285.
- Liu, K.-S. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (11): 1179-1187.
- Makhzoum, A., Knapp, J. & Owusu, R. (1995). Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. *Food microbiology*, 12: 277-290.
- McKay, D., Dieckelmann, M. & Beacham, I. (1995). Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: the roles of lipase and esterase studied using recombinant strains over-producing, or specifically deficient in these enzymes. *Journal of applied bacteriology*, 78 (3): 216-223.
- McKellar, R. C. (red.). (1989a). *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. Boca Raton Florida: CRC Press.
- McKellar, R. C. (1989b). *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*: Taylor & Francis.
- Phillips, J. & Griffiths, M. (1987). The relation between temperature and growth of bacteria in dairy products. *Food Microbiology*, 4 (2): 173-185.
- Poindexter, J. S. & Leadbetter, E. R. (red.). (1986). *Methods and Special Applications in Bacterial Ecology*, b. 2. USA: Plenum Press.
- 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.

- Robinson, R. K. (2005). *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*. 3. utg. Canada: Wiley.
- Sikorski, Z. Z. E. & Kolakowska, A. (red.). (2010). *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. U.S: CRC Press.
- Stone, L. S. & Zottola, E. A. (1985). Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. *Journal of Food Science*, 50 (4): 951-956.
- Swaigood, H. E. & Bozoglu, F. (1984). Heat inactivation of the extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MC50. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (1): 7-10.
- 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.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (red.). (2005). *Dairy Science and Technology, Second Edition*. 2. utg. Boca Raton, FL: CRC Press.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway