



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

## **Vekst og metabolisme av *Bacillus* spp. i UHT-melk ved ulike lagringstemperaturer, med fokus på proteolytisk aktivitet**

Growth and metabolism of *Bacillus* spp. in UHT-milk at different temperatures, with a focus on proteolytic activity

Rikke Hole

Matvitenskap - Matvaretrygghet, kvalitet og hygiene

## Forord

Masteroppgaven “Vekst og metabolisme av *Bacillus* spp. i UHT-melk ved ulike lagringstemperaturer, med fokus på proteolytisk aktivitet” ble utført som avsluttende arbeid innen masterstudiet Matvitenskap, retning matvaretrygghet, kvalitet og hygiene ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) i Ås. Oppgaven utgjorde 30 av 120 studiepoeng, og arbeidet ble utført ved forskningsgruppen for meieriteknologi og matkvalitet ved Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (KBM). Arbeidet startet i starten av januar, og ble avsluttet i slutten av mars, dette inkluderte 10 uker med laboratorierelaterte oppgaver.

Hovedmålet for oppgaven var å undersøke den proteolytiske aktiviteten hos *Bacillus* spp. i UHT-melk ved ulike temperaturer. Oppgaven var en liten del av et større samarbeidsprosjekt mellom TINE SA og NMBU.

En stor takk til hovedveileder professor Judith Narvhus og delveileder førsteamanuensis Hilde Marit Østlie for deres engasjement, veiledning og mange gode råd.

I tillegg vil jeg takke avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani, overingeniør Kari Olsen og ingeniør May Helene Aalborg for deres gode hjelp på laboratoriet og deres engasjement. En takk til TINE SA for økonomisk støtte.

Denne oppgaven markerer slutten på et givende studieløp og har vært både utfordrende og lærerik. Jeg har hatt stort læringsutbytte av oppgaven, både med praktisk arbeid på laboratoriet og underveis i skriveprosessen. Jeg har fått en større forståelse for utfordringer i meieriindustrien.

Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet  
Fakultet for Kjemi, Bioteknologi- og Matvitenskap  
Ås, 15 mai 2017

---

Rikke Hole



## Sammendrag

Melk er veldig næringsrikt og har høy vannaktivitet og tilnærmet nøytral pH. Melk er dermed et utmerket miljø for vekst av mikroorganismer, spesielt bakterier. Kontaminasjon og vekst av sporedannende bakterier, slik som *Bacillus* spp. kan ha en negativ innvirkning både på produktkvalitet og matvaretrygghet. Arter og stammer av denne slekten kan produsere ekstracellulære, hydrolytiske enzymer som protease, lipase og lecitinase som kan medføre kvalitetsforringelse med bismak og strukturelle defekter. Til tross for moderne produksjonsteknologi og steriliseringsteknikker kan slik kvalitetsforringelse fremdeles gi store økonomiske tap, samt at det kan medføre et dårligere rykte for bedriften.

Denne masteroppgaven var en liten del av et større samarbeidsprosjekt mellom TINE SA og NMBU. Hensikten med oppgaven var å undersøke enzymaktivitet hos ulike *Bacillus* stammer isolert fra melkeprøver fra TINE SA, og mangfoldet en kan finne blant disse. Innledningsvis ble det gjort et forsøk på et større utvalg av 55 stammer av ulike *Bacillus* arter, for å undersøke proteolytisk, lipolytisk og fosfolipolytisk aktivitet ved hjelp av diffusjonsanalyse. Diffusjonsanalysen ble utført ved fire ulike temperaturer over tid. Deretter ble det i et hovedforsøk fokusert på proteolytisk aktivitet hos seks utvalgte stammer av *Bacillus* spp dyrket i UHT-melk ved tre ulike temperaturer; 4, 8 og 22 °C. De ulike stammene var én av hver av *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis* og fire stammer *Bacillus cereus* med ulik opprinnelse. Det var av spesiell interesse å undersøke om de ulike artene viste enzymaktivitet ved lave temperaturer som 4 og 8 °C, som da kunne knyttes opp mot noen av utfordringene meieriindustrien opplever i dag.

Samlet ga resultatene i denne masteroppgaven en oversikt over evnen de ulike artene, og også flere stammer innen *B. cereus* hadde til å uttrykke proteolytisk aktivitet i UHT-melk ved ulike temperaturer. Det var generelt lav vekst, metabolsk aktivitet og proteinnedbryting, med noen unntak, etter inkubering ved 4 °C etter 11 dager. Disse lave effektene ble mer tydelig etter inkubasjon ved 8 og 22 °C. *Bacillus mycoides* og en stamme av *B. cereus* var derimot i stand til å vokse og uttrykke enzymaktivitet etter inkubasjon ved 4 °C og i tillegg var én stamme av *B. cereus* også i stand til å uttrykke noe proteolytisk aktivitet ved samme temperatur til tross for manglende vekst ved 4 °C. I de tilfellene det ble observert proteolytisk aktivitet var det kaseinene som var nedbrutt. Myseproteinene viste små eller ingen tegn til nedbrytning i de fleste tilfeller. *Bacillus licheniformis* viste seg å være mindre proteolytisk enn de andre



stammene i dette forsøket, og denne stammen uttrykte generelt liten aktivitet både når det gjaldt vekst og metabolisme.

I melken inkubert ved 22 °C var det mulig å observere de største endringene både av innhold av frie aminosyrer, flyktige komponenter, organiske syrer og karbohydrater.

Funnene understreker viktigheten av å opprettholde en ubrutt kjølekjede, og viser at det bør igangsettes tiltak for å redusere kontamineringsfarer, samt holde et stort fokus på hygiene og lav temperatur gjennom hele verdikjeden.

## Abstract

Milk is very nutritious and has high water activity and approximately neutral pH. Milk is therefore an excellent environment for the growth of microorganisms, especially bacteria. Contamination and growth of spore-forming bacteria, such as *Bacillus* spp., can adversely affect the quality of the product and the food safety. Species and strains of this genus can produce extracellular, hydrolytic enzymes such as protease, lipase and lecithinase, which can cause quality degradation such as off flavour and structural defects. Despite modern production technology and sterilization techniques, such deterioration of quality can still cause major financial losses, and may lead to a bad reputation for the company.

This master thesis was a small part of a larger collaborative project between TINE SA and NMBU. The main purpose of the study was to investigate the enzyme activity in various *Bacillus* strains isolated from milk samples from TINE SA, and the diversity one can find among these. Initially, a large sample of 55 strains of different *Bacillus* species were investigated with the help of diffusion analysis to determine whether or not they could express proteolytic, lipolytic and phospholipolytic activity. The diffusion analysis was performed at four different temperatures over time. Thereafter, the proteolytic activity was in focus, and six strains of *Bacillus* spp. were chosen to be examined further in a main experiment, where they were to be grown in UHT-milk at three different temperatures; 4, 8 and 22 °C. The different strains were one of each of *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis* and four strains of *Bacillus cereus* of different origins. It was of special interest to investigate whether the various species showed enzyme activity at low temperatures like 4 and 8 °C, which could then be linked to some of the challenges the dairy industry is experiencing today.

Overall, the results of this master thesis gave an overview of the ability the various species, and also several strains within *B. cereus* had to express proteolytic activity in UHT milk at different temperatures. In general, the growth, metabolic activity and protein degradation was low, with some exceptions, after incubation at 4 °C after 11 days. These low effects became more apparent after incubation at 8 and 22 °C. *Bacillus mycoides* and a strain of *B. cereus* were on the other hand, able to grow and express enzyme activity after incubation at 4 °C and in addition, one strain of *B. cereus* was also able to express some proteolytic activity at the same temperatures despite lack of growth at 4 °C. In those cases where proteolytic activity was observed, the caseins were degraded. Whey proteins showed little or no signs of

degradation in most cases. *Bacillus licheniformis* proved to be less proteolytic than the other strains in this experiment, and this strain generally expressed little activity both in terms of growth and metabolism.

In the milk incubated at 22 °C, the biggest changes of both free amino acids, volatile components, organic acids and carbohydrates were observed. The findings in this study emphasize the importance of maintaining a continuous cold chain, demonstrating that measures should be taken to reduce contamination hazards, while maintaining a high focus on hygiene and low temperature throughout the value chain.

## Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	III
Abstract	V
<b>1.0 Innledning</b>	<b>1</b>
1.1 Melk som næringsmiddel	1
1.2 Melkens sammensetning	1
1.3 Melk som substrat for bakterier	2
1.4 Kilder til kontaminering	3
1.5 Mikroorganismer i råmelk	4
1.6 Varmebehandling av melk	5
1.7 Sporedannende bakterier	5
1.7.1 <i>Bacillus</i>	6
1.8 Hydrolytiske enzymer	7
1.8.1 Proteinase i melk	8
1.8.2 Lipolyse i melk	8
1.8.3 Lecitinase i melk	9
1.8.4 Enzymaktivitet for <i>Bacillus</i> spp	9
1.8.5 Effekter på melken	11
1.9 Hensikt med oppgaven	12
<b>2.0 Material og metoder</b>	<b>13</b>
2.1 Bakteriestammer	13
2.2 Tillaging av dyrkingsmedier	13
2.3 Forsøk	14
2.3.1 Innledende forsøk, analyse av enzymaktivitet ved diffusjonsanalyse	14
2.3.2 Hovedforsøk, vekstforsøk	17
2.3.3 Prøveopparbeidelse av podemateriale	17
2.3.4 Poding av melk	18
2.3.5 Uttak vekstforsøk	18
2.4 Kjemiske analyser	19
2.4.1 Kapillærelektroforese	19
2.4.2 Frie aminosyrer	20
2.4.3 Flyktige komponenter	22
2.4.4 Organiske syrer og karbohydrater	23
<b>3.0 Resultater</b>	<b>25</b>
3.1 Innledende forsøk, analyse av enzymaktivitet ved diffusjonsanalyse	25
3.2 Hovedforsøk, vekstforsøk	30
3.2.1 Vekst av <i>Bacillus</i> i melk	30
3.2.2 Antall sporer i melk	33
3.3 Kjemiske analyser	33
3.3.1 pH	33
3.3.2 Organiske syrer og karbohydrater	34
3.3.3 Kapillærelektroforese	40
3.3.4 Frie aminosyrer	60
3.3.5 Flyktige komponenter	64

<b>4.0 Diskusjon</b>	<b>69</b>
4.1 <i>Analyse av enzymaktivitet ved diffusjonsanalyse, proteinnedbrytning og frie aminosyrer</i>	69
4.1.1 Inkubasjon ved 4 °C	70
4.1.2 Inkubering ved 8 °C	72
4.1.3 Inkubering ved 22 °C	73
4.2 <i>Vekstforsøk med Bacillus spp. i UHT-melk</i>	75
4.2.1 Inkubasjon ved 4 og 8 °C	75
4.2.2 Inkubasjon ved 22 °C	77
4.3 <i>Flyktige komponenter, organiske syrer og karbohydrater</i>	78
4.3.1 Inkubasjon ved 4 og 8 °C	78
4.3.2 Inkubasjon ved 22 °C	79
4.4 <i>Sammenfatning av resultater</i>	81
4.5 <i>Oppsummering og konklusjon</i>	82
4.6 <i>Videre arbeid</i>	83

## 5.0 Referanser

Vedlegg på USB; totalt 6 stk

1. Resultat fra innledende diffusjonsanalyse
2. Rådata for vekstforsøk
3. Kvantifisering for frie aminosyrer vha HPLC, rådata
4. Kvantifisering av organiske syrer og karbohydrater vha HPLC, rådata
5. Kvantifisering av proteinnedbrytning vha kapillærelektroforese, rådata
6. Kvantifisering av flyktige komponenter vha HSGC, rådata

## 1.0 Innledning

### 1.1 Melk som næringsmiddel

Melk er definert som sekreter fra melkekjertlene hos pattedyr, og den gir næring til avkommet. Melk er dermed veldig næringsrik, og blir av samme grunn brukt til menneskelig konsum, enten i opprinnelig form eller i form av andre bearbeidede meieriprodukter (Walstra et al. 2005). I 2016 konsumerte nordmenn gjennomsnittlig 86 liter kumelk i året, per person (Melk.no 2016 a). Ved inngangen av 2013 var tallet på antall melkekuer i Norge rundt 240 000. Dette tallet er fallende, sammen med antall gårdbrukere som produserer melk. Likevel øker melkeleveransen da gårdene blir større og hver ku produserer mer melk (TINE u.å).

### 1.2 Melkens sammensetning

Sammensetningen til melken vil av naturlige årsaker variere noe, men rundt 90 % av melken er vann. Innholdet av andre substanser utenom vann kalles tørrstoff og tørrstoffet består gjennomsnittlig av 4,6 % laktose, 4,0 % fett, 3,3 % protein, 0,7 % mineraler og 0,17 % organiske syrer. I tørrstoff skiller det mellom fettholdig tørrstoff og ikke fettholdig tørrstoff. Fettet består hovedsakelig av triglyserider, og fettsyrene varierer i lengde og metning, hhv 2-20 karbonatomer og 0-4 dobbeltbindinger. Melken inneholder også andre lipider som fosfolipider, kolesterol, frie fettsyrer, mono- og diglyserider. Karbohydratet i melk er laktose, et disakkarid bestående av glukose og galaktose (Walstra et al. 2005).

Proteinsammensetningen i melken bestemmer i stor grad næringsverdien og andre teknologiske egenskaper til melken. Proteinsammensetningen i melk varierer med årstid, laktasjonsfase, fôr og helsetilstanden til kua, men den er hovedsakelig bestemt av genetiske faktorer (Heck et al. 2008).

Melkeprotein består av to hovedgrupper, kasein og myseprotein. Kasein utgjør rundt 80 % av proteinene i melk, og de resterende 20 % er utgjort av proteingruppen myseproteiner (Melk.no 2016 b). Kasein er en blanding av fire proteiner:  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -kasein. Av de fire proteintypene er det  $\alpha_{S1}$ - og  $\beta$ -kasein som dominerer med et innhold på rundt 30 % av hver (Ulleberg u.å; Walstra et al. 2005).  $\alpha_{S1}$ -kasein har en høy negativ nettoladning og et høyt fosfatinnhold.  $\alpha_{S2}$  varierer i antallet esterfosfatgrupper, med 10-14 per molekyl, og den inneholder to cysteinrester som danner en S-S bro. De er veldig sensitive ovenfor  $Ca^{2+}$  og proteinet kan felles ut ved svært lave nivåer av kalsium (Univeristy of Guelph 2017).

$\kappa$ -kasein skiller seg i stor grad fra de andre kaseinene ved at den har to cysteinrester som danner intermolekylære disulfidbindinger.  $\beta$ -kasein er det mest hydrofobe kaseinet fordi den har et stort antall av prolinrester (Walstra et al. 2005).

Kaseinene har spesifikke egenskaper. De kan til en viss grad bli fosforylert og de har liten eller ingen sekundærstruktur. Fosforylering er en viktig posttranslasjonell modifisering av melkeprotein som opptrer utelukkende på kaseiner og ikke på myseproteiner. På grunn av de sterke kalsiumbindende egenskapene er disse fosfatgruppene ikke bare viktig for den ernæringsmessige verdien i melken men også for de fysikalske kjemiske egenskapene til kaseinmicellene (Heck et al. 2008).

Kaseinene er for det meste hydrofobe og de har høy negativ ladning. De er tilstede i melk i store aggregater kalt kaseinmiceller, og den høye negative ladningen er nødvendig for å holde kaseinmicellene i kolloidal suspensjon. Kaseinproteinene og mineraler danner sammen store kaseinmiceller og lipider. 95 % av lipidene i melk befinner seg i fettkuler i melkeserumet med relativt store fettglobuler med en tynn ytre membran. På bakgrunn av dette blir melk betegnet som en olje-i-vann-emulsjon (Walstra et al. 20015).

Myseprotein består av  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG) og  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA), hvor hovedtypen er  $\beta$ -laktoglobulin. Løseligheten til  $\beta$ -laktoglobulin er sterkt avhengig av pH og ionestyrke, og det feller ikke ut ved surgjøring av melk. Dette gjelder også andre serumproteiner.  $\alpha$ -laktalbumin sin biologiske funksjon er å fungere som et koenzym for syntesen av laktose. Proteinet er et lite, og mer eller mindre et globulært molekyl som er kompakt foldet. Det kan kun assosiere med proteiner ved lav ionisk styrke. De fleste serumproteinene er typiske globulære proteiner. De har relativt høy hydrofobisitet og inneholder peptidkjeder som er kompakt foldet sammen. De blir uløselige ved pH verdier under 6,5 dersom melken blir varmebehandlet. Denne endringen er relatert til denaturering av de involverte proteinene. I tillegg inneholder melk flere mindre proteiner, inkludert flere enzymer (Walstra et al. 2005).

### **1.3 Melk som substrat for bakterier**

Ettersom at melken er veldig næringsrik, har høy pH og høy vannaktivitet er den et utmerket miljø for vekst av mikroorganismer, spesielt bakterier. Det er flere mikroorganismer som kan være tilstede i melk og meieriprodukter og derved forårsake sykdom. Noen av de er *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, fremmedmugg og gjær (Mattilsynet 2016 a). Det er likevel flere forhold som

gjør det ugunstig for bakterier å vokse i melk. Laktose er ikke egnet som energikilde for alle bakterier. Noen bakterier benytter frie aminosyrer som en nitrogenkilde, og fersk melk inneholder kun små mengder aminosyrer. Melk har et lavt innhold av jern, noe som er essensiell næring for flere bakterier, i tillegg har melken mye oksygen noe som gjør det vanskelig for anaerobe bakterier å vokse. Disse faktorene gjør at det er flere bakterier som ikke vokser i rå melk (Walstra et al. 2005).

Sitronsyre og små mengder av andre organiske syrer, spormengder av melkesyre og pyrodruesyre kan oppstå i melkeserum. Tilstedeværelse og aktivitet av noen bakterier kan øke konsentrasjonen av disse syrene. Andre forbindelser slik som urinsyre dannes ved nedbrytning av nitrogenholdige stoffer. De fleste aminosyrer, så vel som deres derivater, finnes i spormengder i fri løsning. Melk inneholder proteiner og peptider (små og store) som kan hydrolyseres av proteinaser og peptidaser til peptider og aminosyrer og skaffe tilveie essensielle næringsstoff. Også fett kan hydrolyseres av lipaser til frie fettsyrer (Walstra et al. 2005).

#### **1.4 Kilder til kontaminering**

Melken i juret er tilnærmet steril, og tilstedeværelsen av bakterier i melk er et resultat av kontaminering etter melking. Så snart melken forlater juret blir den kontaminert med bakterier og tilført oksygen (Walstra et al. 2005). Det er mange årsaker til at melken kan bli kontaminert og rør, kjøleanlegg, skitne jur og utilstrekkelig rengjøring av utstyr for både lagring og transport er noen av de. Tanker for lagring av melk, rørledninger og tappemaskiner er en betydelig kilde for kontaminering av *Bacillus* arter til melk og meieriprodukt (Simões et al. 2010).

Biofilm i rør kan også være en årsak til at melken blir kontaminert (de Santana et al. 2004; Simões et al. 2010). Wijman et al. (2007) bekrefter at innen for 24 timer, kan *B. cereus* danne biofilm i alle melkesystemer som er delvis fylt i løpet av teknologiske operasjoner eller hvor rester av væsken blir liggende igjen på slutten av prosessen. Avhengig av forholdene kan biofilm bestå av opp til 90 % sporer, og dette kan tyde på at dette er et gunstig område for dannelsen av sporer. Sporene til *B. cereus* er i stand til å separere seg fra biofilmen, og de kan slippes ut i produksjonsmiljøet. Av denne grunn er tilstedeværelse av sporer av *Bacillus* spp i pausterisert melk, i de fleste tilfeller, ikke et resultat av post-pasteurisering kontaminering, slik som tidligere tenkt (Samaržija et al. 2012).



Generelt kan det sies at kildene til kontaminering av *Bacillus* spp. i råmelk varierer med sesong. I vinterhalvåret er det høy, silofoer og støv som blir ansett som hovedkildene, og i sommermånedene er hovedkilden jord på spenene (Samaržija et al. 2012). I et forsøk gjort av Christiansson et al. (1999) ble det bekreftet at antallet av sporer i melk er signifikant korrelert til graden av jordforurensning på spenene. Høyt vanninnhold i jord, lav fordamping av vann og skitne rør er vist til å være noen av de viktigste faktorene som korrelerer med høye konsentrasjoner av sporer (Christiansson et al. 1999).

For å produsere trygg, pasteurisert melk er gode råvarer, god hygienep praksis, god styring med varmebehandlingsprosessen og oppbevaringstemperatur en forutsetning. Dersom dette ikke er på plass kan melk bli ansett som et risikoprodukt. Produkter som er varmebehandlet slik at konkurrerende mikroflora er drept og kun sporedannere overlever kan være årsak til matforgiftning forårsaket av *B. cereus* da det emetiske toksinet er varmebestandig (Mattilsynet 2012).

### 1.5 Mikroorganismer i råmelk

I de fleste industriland er praksisen at melk på gården blir kjølt ned umiddelbart etter melking og deretter blir den holdt kjøling frem til prosessering. Dette inkluderer frakting med tankbil med kjøling og oppbevaring på kjøletanker. Gjennom hele denne prosessen skal melken holde en temperatur på lavere enn 7 °C, og dermed er det kun psykrotrofe organismer som er i stand til å vokse. De psykrotrofe artene som oftest blir isolert fra råmelk er, utenom de Gram-negative arter av slektene *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*. Av de psykrotrofe koliforme bakteriene er det Enterobacter som er mest vanlig å isolere, og de Gram-positive arter av *Bacillus* spp kan også bli isolert (Adams & Moss 2008).

De Gram-negative psykrotrofe bakteriene vil ikke overleve pasteurisering, men *Pseudomonas* spp. har i likhet med *Bacillus* spp. egenskapen til å produsere ekstracellulære lipaser og proteaser som er varmeresistente. Dersom denne bakterien er tilstede i konsentrasjoner større enn  $10^5$  / ml kan det bli dannet tilstrekkelig med enzymer før pasteurisering til å forårsake kaseindegradering i melken (Adams & Moss 2008).

Dyrehelsestatus i utviklingsland er ikke like god som statusen i Norge. I andre land kan både salmonellose, tuberkulose, brucellose og sykdommer fra andre mikroorganismer forekomme, mens Norge har fristatus for tuberkulose og brucellose. Det er generelt lite salmonella i norske besetninger, og også relativt lite *Listeria monocytogenes* og *Campylobacter* i rå melk. Til tross for dette bør rå melk varmebehandles da melken likevel kan inneholde mikroorganismer som kan forårsake sykdom. Barn, personer med svekket immunforsvar og gravide ikke bør konsumere produkter laget av rå melk da de er spesielt utsatt for å bli syke (Mattilsynet 2016 b).

Norsk melk og meieriprodukt har jevnt over en god mikrobiologisk kvalitet, men likevel blir nesten 1,7 % av melken som produseres nedgradert på grunn av utilstrekkelig kvalitet og dette gir store økonomiske tap i industrien (Mellegård 2015).

### 1.6 Varmebehandling av melk

Det er fire ulike metoder som vanligvis blir brukt for varmebehandling av melk. Lav-pasteurisering (Low Temperature Holding, LTH) ved 62,8 °C i 30 min har for de fleste land, inkludert Norge, blitt byttet ut med pasteurisering (High Temperature Short Time, HTST) som består av å holde melken ved 71,7 °C i 15 sek. En annen metode er ultrapasteurisering (Ultra High Temperature, UHT) som innebærer at melken holdes ved 135 °C i 1 sek. Sterilisering av melk innebærer å holde temperaturen over 100 °C i 20-40 min, men denne metoden blir mindre og mindre brukt i dagens industri. Felles for disse metodene er at melken kjøles ned til 4 °C eller mindre raskt etter varmebehandlingen (Adams & Moss 2008).

Foringelse av pasteurisert melk er vanligvis grunnet post-pasteurisering kontaminering og vekst av *Pseudomonas* spp. *Alcaligenes* og *Acinetobacter*. I melk som blir utsatt for svært lave nivåer av post-pasteurisering kontaminering kan forringelse skyldes vekst av *Bacillus* spp. som har overlevd pasteurisering. For å forlenge holdbarhetsdatoen til melk er det viktig å redusere antall sporer tilstede i melken. UHT-pasteurisering kan oppnå dette, men melk som har blitt utsatt for denne type varmebehandling får ofte en kokt smak (Adams & Moss 2008).

### 1.7 Sporedannende bakterier

Kontaminasjon og vekst av sporedannende bakterier i meieriprodukter kan ha en negativ innvirkning både på produktkvalitet og på matvaretryggheten. Noen sporedannende bakterier kan danne toksiner som kan medføre matforgiftning, et eksempel på dette er *Bacillus cereus*

som kan forårsake både emetiske- og diarétype matforgiftning. Mengden som skal til for å forårsake sykdom varierer, men på dette stadiet er melken ofte allerede åpenbart forringet med fæl lukt og koagulering. Da vil konsumenten sannsynligvis ikke konsumere melken, og dermed er det oftest heller snakk om et kvalitetsproblem enn et helseproblem (Walstra et al. 2005).

Når sporedannende bakterier blir utsatt for stress i omgivelsene kan de gå over i et overlevelsesh stadium kalt dvaletilstand hvor sporer blir produsert. Varmerbehandling kan enkelt inaktivere vegetative celler av *B. cereus*, men sporene er betydelig mer varmebestandige. Når sporer blir varmeaktivert i et egnet miljø som inneholder næring kan noen av disse våkne opp, germinere. Germinerte sporer kan gi opphav til tette populasjoner av vegetative celler som kan produsere hydrolytiske enzymer og toksiner (Andersen Borge et al. 2001).

### 1.7.1 *Bacillus*

Artene under *Bacillus* slekten tilhører familien *Bacillaceae*, og artene er alle sporedannende, Gram-positive og bevegelige bakterier. Jord er det viktigste reservoaret, hvor man kan finne opp til  $10^6$  sporer/g jord. Det er hovedsakelig fire arter som kan forårsake matbåren sykdom; *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* og *Bacillus pumilus*. Disse bakteriene vokser ved 10-40 °C, og de kan ikke vokse over 50 °C (Granum 2015). I vintersesongen er det størst forekomst av mesofile *Bacillus* spp. i pasteurisert melk, og på sommeren og høsten er det psykrotrofe *Bacillus* arter som dominerer (André et al. 2017). *Bacillus cereus* vokser under både aerobe og anaerobe forhold, mens de tre andre artene regnes som strikt aerobe. Enkelte stammer av de tre artene kan likevel vokse anaerobt (Granum 2015).

#### 1.7.1.1 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* sprer seg lett fra sitt naturlige reservoar som er jord, til matvarer og bakterien har blitt isolert fra matvarer som ris, krydder, grønnsaker, kjøtt, egg og meieriprodukter. I meieriindustrien kan bakterien komme inn på meieriet ved spredning fra gress til jurene på beitende kyr, og dermed videre til råmelken. Sporene overlever pasteurisering, og etter germinering kan cellen formere seg under rette temperaturforhold (Granum 2015).

I Norge i dag er trolig *B. cereus* den hyppigste årsaken til bakteriell matforgiftning, men dette er vanskelig å si sikkert da arten ikke er meldepliktig. *Bacillus cereus* kan forårsake to typer matforgiftning som har helt forskjellige symptomer og inkubasjonstid. Den ene typen forårsaker diaré og er den mest vanlige, den andre kalles den emetiske typen og forårsaker

oppkast. Infektiv dosen er  $10^3$ - $10^5$  log kde/ml for diarétypen og  $10^5$ - $10^8$  log kde/g for den emetiske typen. Den emetiske typen er relativ sjelden i Norge, men den er likevel et økende problem. Sykdom forårsaket av den emetiske typen er en intoksikasjon der et preformert toksin kommer inn i kroppen gjennom maten. Store mengder av dette toksinet vil kunne forårsake leversvikt, da det emetiske toksinet ikke brytes ned i leveren. Dette kan ha fatale konsekvenser, og det er dermed viktig å ha stort fokus på riktig varmebehandling og lagring av mat. Diaré forårsaket av *B. cereus* skyldes en infeksjon, og symptomene er på grunn av enterotoksiner som blir produsert under vegetativ vekst i tarmen (Granum 2015). Bakterien har psykrotrofe egenskaper som gjør at den kan vokse og produsere toksiner i pasteurisert melk ved kjøletemperaturer helt ned til temperaturområdet 4-7 °C (Lin et al. 1998).

#### **1.7.1.2. *Bacillus licheniformis***

*Bacillus licheniformis* vokser ved 10-40 °C og matretter kan kontamineres fra jord og vegetabiler. Infektivdosen for *B. licheniformis* er større enn  $10^7$  log kde/ml og dermed har den en høyere infektiv dose enn diarétypen forårsaket av *B. cereus* ( $10^3$ - $10^5$  log kde/ml), og i noen tilfeller også den emetiske typen ( $10^5$ - $10^8$  log kde/g). *Bacillus licheniformis* skiller seg også fra *B. cereus* ved at den har en lenger varighet. Typiske retter involvert i matforgiftning er gjerne kjøttretter med vegetabiliske innslag, bakeprodukter og kylling. Denne bakterien forårsaker diare i 90 % av sykdomstilfellene, og oppkast i 50% (Granum 2015).

#### **1.7.1.3 *Bacillus mycoides***

*Bacillus mycoides* er ikke like godt studert som mange av de andre i *Bacillus* slekten. *Bacillus mycoides* er en psykrotrof bakterie som vokser ved 5-37 °C, og ved en pH verdi på 7,0-9,0 (Corry et al. 2011; Patiño-Navarrete & Sanchis 2017). Fylogenetisk er *B. mycoides* stammene bredt fordelt innenfor *B. cereus* gruppepopulasjonen (Wiedmann & Zhang 2011). *Bacillus mycoides* er nært beslektet med *B. cereus* men de skiller seg fra hverandre ved at *B. mycoides* ikke er patogen, ofte viser en svak hemolyse på blod agar og den er ikke bevegelig. *Bacillus cereus* derimot viser hemolyse og bevegelighet. Både *B. mycoides* og *B. cereus* er penicillinfølsomme, og *B. mycoides* har en rhizoid vekst ved undersøkelse av eggeplommereaksjon ved utplating (Granum 2015). *Bacillus mycoides* kan også skilles fra *B. cereus* ved at de har en forskjellig fettsyreprofil (Nakamura & Jackson 1995).

### **1.8 Hydrolytiske enzymer**

Melk inneholder store mengder med enzymer. De fleste enzymene i melken har tilsynelatende liten biologisk funksjon, selv om de er tilstede i store mengder. Det finnes tre typer hydrolytiske enzymer og disse er proteinaser, lipaser og fosfolipaser. Enzymer av mikrobiell

opprinnelse kan være tilstede i mikroorganismer og enten bli skilt ut av organismen selv, ekstracellulære enzymer, eller bli frigjort etter lysis. Eksempler på slike enzymer er proteinaser og lipaser (Walstra et al. 2005).

Hydrolytiske enzymer fra psykrotrofe bakterier har et temperaturoptimum på 30-45 °C, og de har en lav aktiveringsenergi. På bakgrunn av dette er de mer aktive ved 4-7 °C enn enzymer fra mesofile organismer. De er varmesensitive i området 50-60 °C (Sørhaug & Stepaniak 1997).

### 1.8.1 Proteinase i melk

Enzymer som hydrolyserer peptidbindinger har mange navn som proteaser, proteinaser, peptidaser og proteolytiske enzymer. Begrepet proteinase blir her brukt for gruppen med proteolytiske enzymer som angriper peptidbindinger i proteiner og polypeptid. Det er to melkeproteinaser som har blitt studert i detalj; plasmin, en serin proteinase og katepsin D, en asparaginprotease. Disse proteinasene oppstår fra brystvevceller, blodplasma eller leukocytter. Plasmin kan hydrolysere alle kaseiner i melk, men enzymet foretrekker  $\alpha_{S1}$ - og  $\beta$ -kasein. Plasmin hydrolyserer derimot ikke  $\alpha$ -laktalbumin og  $\beta$ -laktoglobulin. Katepsin D kan degradere alle melkeproteiner utenom  $\beta$ -laktoglobulin (Chen et al. 2003).

Det har blitt observert at plasminaktivitet i melk øker med 30-40 % etter varmebehandling ved 72 °C i 15 sek. Økningen av aktivitet ble sett i sammenheng med nedbrytning av hemmere for plasminogene aktivatorer. For å sikre fravær av plasminindusert proteolyse i melkeprodukt kreves en varmebehandling på 115 °C i 20 min eller 120 °C i 15 min.

Proteinaseproduksjon fra psykrotrofe bakterier er normalt på sitt høyeste sent i bakterienes eksponentielle vekstfase eller i stasjonærfasen. Proteinaser produsert av mesofile og termofile bakterier er mer varmestabile. Proteinaseaktivitet i melk og melkeprodukt blir ofte rapportert som frigjøring av aminosyren tyrosin. Dermed kan nivået av tyrosin være en hjelpfull indikator på den generelle proteolyseaktiviteten i melk (Chen et al. 2003).

### 1.8.2 Lipolyse i melk

Lipoprotein lipase er ikke særlig aktiv i fersk melk selv om den er tilstede i høye konsentrasjoner, men dette enzymet, og noen andre, kan forringe melk under lagring. En rekke esteraser kan hydrolysere fettsyreestere. Lipoprotein lipase frigjør fettsyrer fra tri- og diglyserid og er kun aktive ved olje-vann grensesnittet, mens andre esteraser angriper

estere i vannløsning. Det lipolytiske enzymet er i stor grad bundet til kaseinmiceller (Walstra et al. 2005).

Melkelipoproteiner lipaser blir kalt LPL og det er et relativt ustabil enzym. Det er bevist at varmebehandling ved 72 °C i 15 sek vil nesten fullstendig inaktivere LPL i melk. De fleste bakterielle lipaser er ekstracellulære og produseres sent i log fasen eller tidlig i stasjonærfasen av vekst (Chen et al. 2003).

### 1.8.3 Lecitinase i melk

Lecitinase er en type fosfolipase som virker aktivt når det er lecitin tilstede.

Enzymet er forholdsvis varmestabil, og 45 % av aktiviteten gjenstår etter varmebehandling i boratbuffer i 10 minutt ved 100 °C. Enzymet blir aktivert av Ca<sup>2+</sup>, hemmet av fluorid, citrat og fosfat, og spesielt hemmet av klor (Macfarlane & Knight 1941).

*Bacillus cereus* og *B. mycoides* produserer lecitinase som spalter lecitin til fosforylcholin og et diglyserid. For optimal enzymaktivitet krever den tilstedeværelse av Ca-ioner innenfor et smalt konsentrasjonsområde på 1-4 x 10<sup>-3</sup> M. Ved denne konsentrasjonen av Ca-ioner vil lecitin flokkulere fra sin emulsjon. *Bacillus cereus* lecitinase er meget motstandsdyktig mot varme. I et forsøk gjort av Chu (1949) ble enzymet varmebehandlet i et forseglet rør i boratbuffer som holdt en pH verdi på 7. Etter 30 min ved 60 °C ble 20 % av aktiviteten inaktivert, og etter ytterligere 10 min i kokende vann var 30 % av aktiviteten intakt.

### 1.8.4 Enzymaktivitet for *Bacillus* spp

Det er flere mikroorganismer som kan overleve vanlig varmebehandling av melk, og blant disse er sporene til *Bacillus* spp. svært vanlig. *Bacillus* spp. er en meget heterogen gruppe av bakterier som kjennetegnes ved forskjellige ernæringsmessige krav, evnen de har til å vokse under forskjellige temperaturer og pH-verdier, og motstandsevnen ovenfor osmotisk trykk. Blant bakterier isolert fra råmelk, varmebehandlet melk og meieriprodukter er *Bacillus stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis* og *Bacillus circulans* de mest vanlige. Sporene til disse termoresistente, aerobe psykrotrofe eller fakultativt anaerobe bakteriene aktiveres umiddelbart etter varmebehandling av melk ved at de danner vegetative celler. De vegetative cellene fra *Bacillus* spp. har en stor evne til å danne et bredt spekter av termostabile ekstracellulære og intracellulære hydrolytiske enzymer etter celledeling (Chen et al. 2003; Chen et al. 2004; Janštová et al. 2004). *Bacillus* arter syntetiserer generelt en stor variasjon av ekstracellulære enzymer, og de fleste oppstår

normalt sent i den eksponentielle fasen eller tidlig i stasjonærfasen, før sporulering (Chen et al. 2004).

I 40-84 % av tilfellene har *Bacillus* spp. (hovedsakelig *B. cereus*) isolert fra melk vist evnen til å uttrykke både proteolytiske og lipolytiske aktiviteter, og i 80 % av tilfellene også fosfolipolytisk aktivitet. *Bacillus* spp. viser mangfoldig proteolytisk aktivitet og visse arter av denne slekten kan produsere mer enn én type av proteinaser samtidig (Nabrdalik et al. 2010; Samaržija et al. 2012). Imidlertid er type og aktiviteten av de proteolytiske enzymene avhengig av art og stammer av *Bacillus* spp. så vel som av temperatur. Proteolyse av kaseinsubstanser er en av hovedreaksjonene når det gjelder proteolyse av melkeprotein. Blant kaseinfraksjonene blir  $\kappa$ -kasein raskest hydrolysert når temperaturen i melken er høyere enn 4 °C og resultatet er dannelse av et para- $\kappa$ -kaseinkompleks. Nedbrytningen av  $\alpha$ - og  $\beta$ -kasein er mindre utpreget ved samme temperatur, og er generelt ikke observert ved temperaturer på 4 °C. Ved inkubering i 7 dager ved 20 °C vil  $\kappa$ -kasein være fullstendig nedbrutt. Reduksjonen av  $\beta$ -kasein kan nå opp til 70 %, og  $\alpha$ -kasein vil holde seg stabil lengst av melkeproteinene med et minimalt tap (Janštová et al. 2004).

Resultatet av de proteolytiske endringene forårsaket av *Bacillus* spp. forårsaker en betydelig økning i konsentrasjonen av den frie aminosyren tyrosin (Nabrdalik et al. 2010).

Konsentrasjonen av denne aminosyren kan gå fra en opprinnelig verdi på 0,65 mg/ml og opp til 2,13 mg/ml (Janštová et al. 2004). Det antas derimot at dette vil gjelde andre aminosyrer det bli analysert for også.

Det har blitt vist at omtrent 50 % av *Bacillus* spp. stammer isolert fra melk er i stand til å vokse ved 2 °C. De hydrolytiske enzymene beholder 30-100 % av sin aktivitet etter konvensjonell varmebehandling av melk; pasteurisering ved 72 °C i 15 sek. De proteolytiske enzymene vil derfor påvirke næringsinnhold og de sensoriske egenskapene i produktet til og med når det ikke er levedyktige bakterier tilstede. Sett fra et økonomisk og kvalitetsperspektiv, er de hydrolytiske termostabile enzymene dannet av *Bacillus* spp. og *Pseudomonas* spp. de enzymene som har den største betydningen og som gir størst økonomisk tap for meieriindustrien (Brown 2000; Janštová et al. 2004; Samaržija et al. 2012).

Gram-positive sporedannende bakterier slik som *Bacillus* spp. er til stede i rå melk i mindre grad enn Gram-negative psykrotrofe bakterier slik som *Pseudomonas*. En årsak til dette kan være at de Gram-positive har en lengre generasjonstid og en lengre lag fase i temperaturområdet mellom 2-7 °C. Derimot kan disse bakteriene dominere i melk når den blir

lagret over lengre perioder ved 10 °C, noe som kan være aktuelt i en butikkdisk. Det har blitt vist at stammer isolert fra melk kan vokse ved en temperatur ved 2 °C, og derfor blir *Bacillus* spp. ansett som den viktigste årsaken til forringelse av melk og melkeprodukt (Brown 2000).

#### 1.8.5 Effekter på melken

Generelt vil proteaser av psykrotrofe bakterier etter varmebehandling destabilisere kasein ved hydrolyse, og resultatet av dette er dannelse av en gelstruktur eller koagulering av sterilisert melk under lagring (Samaržija et al. 2012).

Den lipolytiske aktiviteten til *Bacillus* spp. er høyere ved temperaturer over 4 °C, og lipaser fra nesten alle arter isolert fra melk viser en viss grad av spesifisitet for nedbrytning av mono- og diacylglyceroler. Vesentlig lipolytiske forandringer i form av økt konsentrasjonen av frie fettsyrer i melken er blitt bekreftet av tilstedeværelsen av *B. licheniformis* og *B. cereus* (Chen et al. 2004; Janštová et al. 2004).

Produksjon av hydrolytiske, ekstracellulære enzymer som protease, lipase og lecitinase kan medføre forringelse av pasteurisert melk. Forringelsen forårsaket av disse enzymene innebærer kvalitetsforringelse som bismak og strukturelle defekter. Enzymene kan produseres så snart sporer germinerer etter varmeaktivering ved pasteurisering (Lücking et al. 2013).

De mest vanlige effektene av lecitinase- og proteolytisk aktivitet fra *B. cereus* er henholdsvis ”bitty cream” og søtkoagulering. Proteolytisk aktivitet kan også medføre bitter og rått bismak, og lipolytisk aktivitet kan gi fruktig og harsk bismak. Slik kvalitetsforringelse kan til tross for moderne teknologi og steriliseringsteknikker gi store økonomiske tap, samt at det kan medføre et dårligere rykte for bedriften (De Jonghe et al. 2010; Lücking et al. 2013).



## 1.9 Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å undersøke aktivitet hos ulike isolater av *Bacillus* spp. isolert fra melkeprøver fra TINE SA, og mangfoldet en kan finne blant disse.

Innledningsvis ble proteolytisk aktivitet, lipolytisk og lecitinase aktivitet undersøkt i et stort forforsøk på et større utvalg av 55 stammer. Deretter ble det fokusert på proteolytisk aktivitet i et hovedforsøk med seks utvalgte stammer. Det er kjent at *Bacillus* stammer kan produsere ekstracellulære enzymer og det var ønskelig å undersøke enzymaktiviteten ved ulike temperaturer. Effekten av proteolytisk aktivitet skulle undersøkes i dybden over tid ved tre ulike temperaturer hos seks ulike stammer av *Bacillus* dyrket i melk. De ulike stammene var *B. mycoides*, *B. licheniformis* og fire *B. cereus* med forskjellig opprinnelse.

Denne masteroppgaven var en videreføring av en tidligere masteroppgave om termoresistente bakterier i melk skrevet ved IKBM, NMBU (Reinholdtsen 2015). Oppgavens nye vinkling inkluderte undersøkelse av vekst og metabolisme for de isolerte *Bacillus* stammene ved lave temperaturer. I tillegg skulle deres kvalitetsødeleggende potensiale undersøkes ved å se på tilstedeværelsen av proteinaser, lipaser og fosfolipaser.

## 2.0 Material og metoder

I denne oppgaven ble det benyttet ferdig isolerte nedfryste stammer fra et samarbeidsprosjekt mellom NMBU og TINE SA. Prosjektet kalt «Bakteriefloraen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom» har som mål å fremskaffe mer kunnskap om sammensetning og dynamikk hos bakteriefloraen i norsk melk og melkeprodukter. Resultatene er ment å være nyttig i arbeid med kvalitetssikring og risikovurdering, og det er ønskelig å redusere svinn under og etter produksjon av melk og melkeprodukter (Mellegård 2015).

### 2.1 Bakteriestammer

Prøvematerialet i dette forsøket bestod av 55 stammer av *Bacillus* av forskjellig bakgrunn. De isolerte stammene var fryst ned i «Brain Heart Infusion» (BHI, Oxoid, Hampshire, England) ved -80 °C, hvorav stammene 31-55 var fryst ned i BHI med 15% glycerol (Merck, Darmstadt, Tyskland). Stammene var isolert fra melkeprøver fra to TINE meierier (A og B) hvor melken ble tatt ut fra silotank, balansetank, og kartong. Melken fra kartong ble analysert fersk og etter lagring i 13 dager ved to forskjellige lagringstemperaturer, 4 og 8 °C.

### 2.2 Tillaging av dyrkingsmedier

Mediene som ble brukt i denne oppgaven var BHI, tributyrin agar (Oxoid), skummetmelk agar bestående av Plate Count Agar, (PCA, Merck) tilsatt 4 % skummetmelkpulver (TINE Meieriet Brumunddal) og Egg Yolk Agar bestående av Nutrient agar, (Oxoid) tilsatt 8 % egg yolk (Oxoid).

BHI er et næringsrikt medium som er godt egnet for oppdyrking av *Bacillus*. Dette mediet ble benyttet både som buljong og som agar, og ved sistnevnte bruksområde ble det tilsatt agar (1,5%) (VWR Chemicals, Italia) til buljongen under tillagingen.

Følgende fremgangsmåte var felles for all medietillaging. Ingrediensene ble veid opp i rent glassutstyr. Etter tilsetting av destillert vann ble flaskene ristet godt for å løse opp alle klumper og med hensyn til bedre oppløsning ble flaskene satt i kokevannbad før autoklaving. Vekstmedier ble autoklavert ved 121 °C i 15 minutter. Det ble benyttet ferdigstøpte agarskåler, og mediet ble dermed etter autoklaving temperert til rundt 48 °C før det ble støpt på agarskåler, rundt 20 ml i hver skål. Støpingen av skåler foregikk i sterilskap for å unngå kontaminering fra miljøet. Platene stod der over natten, og ble oppbevart på ved 4 °C med bunnen opp frem til de skulle brukes.

## 2.3 Forsøk

Det praktiske arbeidet ble inndelt i et innledende forsøk og et hovedforsøk med 3 gjentak. Det innledende forsøket ble utført for å få en oversikt over enzymaktiviteten til en større mengde ulike stammer.

### 2.3.1 Innledende forsøk, analyse av enzymaktivitet ved diffusjonsanalyse

Prøvematerialet bestod av 55 stammer av *Bacillus* fra ulike kilder (tabell 1) og stammene ble undersøkt ved bruk av diffusjonsanalyse ved fire ulike temperaturer. Hensikten med forsøket var å påvise enzymaktivitet hos de forskjellige stammene, og stammene ble analysert for proteolyse-, lipolyse og lecitinaseaktivitet. En enkel metode for å studere enzymaktivitet er ved diffusjonsanalyser hvor bakterier inokuleres på agar og eventuelle klaringssoner rundt bakteriekoloniene måles og forteller grad av enzymaktivitet.

**Tabell 1:** Stammer for innledende forsøk. Alle stammene er fra prosjektet «Bakteriefloraen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom» mellom TINE SA og NMBU. Stamme 31-55 er isolert og identifisert av Reinholdtsen (2015) og var fryst ned i BHI med 15 % glycerol. A og B representerer hvilke meieri stammene er isolert fra. Bakterieisolatene (31-55) er identifisert ved 16S rDNA sekvensering og parentes representerer alternative funn ved sekvenseringen. B og TR er isolatnummer.

Nr	Stamme	Nr	Stamme
1	B, Silotank B, oppstart dag 1, B1	29	A, Balansekasse C, oppstart dag 1, B146
2	B, Silotank C, oppstart dag 1, B3	30	B, Kartong 1A, dag 13, 8 °C, B148
3	A, Balansekasse A, oppstart dag 1, B6	31	A, Balansetank, <i>B. cereus</i> ( <i>Bacillus thuringensis</i> og <i>Bacillus toyonensis</i> ), TR 2
4	A, Balansekasse B, oppstart dag 1, B13	32	B, Silotank, <i>B. licheniformis</i> , TR 53
5	A, Balansekasse C, oppstart dag 1, B16	33	A, Balansetank <i>B. licheniformis</i> , TR 66
6	B, Silotank, oppstart dag 1, B17	34	B, Silotank, <i>B. licheniformis</i> , TR 91
7	B, Silotank, oppstart dag 1, B19	35	B, Silotank, <i>B. licheniformis</i> , TR 99
8	B, Silotank, oppstart dag 1, B21	36	A, Kartong 1, 13 dager 4 °C, <i>Kocuria rhizophila</i> ( <i>Kocuria varians</i> , <i>Kocuria marina</i> ), TR 114
9	A, Balansekasse, oppstart dag 1, B23	37	A, Kartong 3, 13 dager 4 °C, <i>B. licheniformis</i> ( <i>Bacillus sonorensis</i> ), TR 122B
10	B, Kartong 1A, dag 13, 4 °C, B27	38	A, Kartong 2, 13 dager 8 °C, <i>B. mycoides</i> ( <i>Bacillus weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 136
11	B, Kartong 1A, dag 13, 4 °C, B32	39	A, Kartong 3, 13 dager 8 °C, <i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 138
12	B, Kartong 1B, dag 13, 4 °C, B33	40	B, Kartong 1, 13 dager 4 °C, <i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 143
13	B, Kartong 2A, dag 13, 4 °C, B34	41	B, Kartong 1, 13 dager 4 °C, <i>B. subtilis</i> ( <i>Bacillus tequilensis</i> ), TR 144
14	B, Kartong 3B, dag 13, 4 °C, B35	42	B, Kartong 2, 13 dager 4 °C, <i>B. licheniformis</i> ( <i>B. cereus</i> ), TR 148
15	A, Kartong 1A, dag 13, 4 °C, B37	43	B, Kartong 1, 13 dager 8°C, <i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 158
16	A, Kartong 3B, dag 13, 4 °C, B40	44	B, Kartong 2, 13 dager 8°C, <i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 166

17	A, Kartong 3B, dag 13, 4 °C, B57	45	B, Kartong 3, 13 dager 8°C, <i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 168
18	B, Kartong 1A, dag 13, 8 °C, B58	46	A, Kartong 3, 13 dager 4°C, <i>B. subtilis</i> ( <i>B. tequilensis</i> ), TR 180
19	B, Kartong 1B, dag 13, 8 °C, B168	47	B, Kartong 3, 13 dager 4°C, <i>B. licheniformis</i> ( <i>B. subtilis</i> ), TR 193
20	B, Kartong 2B, dag 13, 8 °C, B177	48	A, Kartong 2, 13 dager 8°C, <i>B. licheniformis</i> , TR 199
21	B, Kartong 3B, dag 13, 8 °C, B75	49	A, Kartong 3, 13 dager 8°C, <i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> ), TR 240
22	A, Kartong 1A, dag 13, 8 °C, B77	50	B, Kartong 3, 13 dager 4°C, <i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 245
23	A, Kartong 1B, dag 13, 8 °C, B83	51	A, Balansetank <i>B. pumilus</i> ( <i>Bacillus safensis</i> ), TR 315
24	A, Kartong 1B, dag 13, 8 °C, B89	52	A, Kartong 2, fersk melk, <i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> ), TR 335
25	A, Kartong 2B, dag 13, 8 °C, B101	53	A, Balansetank <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ( <i>B. subtilis</i> ), TR 376
26	A, Kartong 2B, Dag 13, 8 °C, B134	54	B, Silotank, <i>B. amyloliquefaciens</i> ( <i>B. subtilis</i> ), TR 387
27	A, Kartong 1, Dag 13 4 °C, B138	55	B, Kartong 3, fersk melk, <i>B. licheniformis</i> , TR 393
28	A, Kartong 3, Dag 13 4 °C, B140		

Tributyryn agar, skummetmelk agar og egg yolke agar medier ble benyttet. Tributyrin agar tester den lipolytiske aktiviteten til bakterien, skummetmelk agar tester proteolyseaktivitet og egg yolke agar tester for lecitinaseaktivitet, en type fosfolipase som oppstår når det er lecitin tilstede. Felles for de to førstnevnte mediene er at dannelse av en klar sone rundt kolonien betraktes som et positivt resultat, mens for egg yolke agar er positivt resultat dannelse av utfelling rundt kolonien (De Jonghe et al. 2010).

Hver stamme ble oppdyrket på BHI agar og inkubert i 24 timer ved 30 °C. Deretter ble en koloni fra BHI-skålen berørt med en steril tannpirker og prikket på overflaten av agarskålen. Skålene ble inkubert ved 4, 8, 22 og 30 °C, og eventuelle klaringssoner ble avlest etter 1, 2 og 3 døgn. For tributyrin agar ble det i tillegg gjort en avlesning etter 5 døgn.

### 2.3.2 Hovedforsøk, vekstforsøk

Resultatene fra diffusjonsforsøket ble brukt til å velge 6 stammer som ble benyttet videre til hovedforsøket. Bakgrunnen for utvelgelsen var at det var ønsket en diversitet i enzymaktivitet hos stammene og forskjellig opprinnelse.

Hovedforsøket var en undersøkelse av vekst av de utvalgte *Bacillus* stammene i melk.

Som substrat for vekstforsøket ble det benyttet langtidsholdbar lettmeik (1,2 % fett) som var UHT behandlet. Melken var levert fra TINE Meierier Østlandet og alt var fra samme produksjonsdag med holdbarhetsdato 22.03.17. Melken ble levert i 1-liters Elopak Pure-Pak kartonger fra Tetra Pak og de ble oppbevart ved 4 °C frem til bruk.

### 2.3.3 Prøveopparbeidelse av podemateriale

Hver utvalgte stamme ble dyrket på BHI agar ved 30 °C i 24 t. Fra BHI-skålene ble materiale fra en koloni podet over i rør med BHI buljong og inkubert ved 30 °C i 24 t. Dagen etter ble kulturene podet over i nye BHI buljongrør for påfølgende 24 t med inkubering. Innholdet i rørene ble overført til Falcon rør (Greiner bio-one, Østerrike) som ble sentrifugert ved 2880  $\times$  g (4000 rpm) i 10 min i en sentrifuge (Centrifuge 5804, Hamburg, Tyskland). Etter sentrifugeringen ble supernatanten helt ut, og det ble tilsatt tilsvarende mengde melk i rørene. Pelleten ble fullstendig løst opp og deretter ble prøven overført til 1,5 ml Eppendorfrør (Gemü GmbH, Sveits) og fryst ned ved - 80 °C.

Det ble bestemt at startverdien av de utvalgte *Bacillus* stammene skulle være tilnærmet log 4 kde/ml. Det var dermed nødvendig å vite bakteriekonsentrasjonen i de frosne kulturene for å sikre lik podemengde ved hver poding. Etter minimum 24 t i fryseren ble innholdet i et Eppendorfrør for hver kultur tint opp og fortynnet i Ringers løsning (Merck). Det ble deretter strøket ut parallelle prøver av -4, -5, -6 og -7 fortytning på BHI agar. Etter inkubering ved 30 °C i 24 t ble antall kolonier telt og dermed kunne antall celler i de nedfrosne prøvene beregnes. På denne måten kunne podemengden beregnes slik at det ble tilsatt log 4 kde/ml med bakterier ved hvert forsøk.

### 2.3.4 Poding av melk

Vekstforsøket ble utført 3 ganger, hvor ett forsøk varte i 2 uker. Beskrivelsen som følger gjelder for et forsøk.

400 ml UHT-melk ble overført til en steril 500 ml flaske og ble inokulert ved å tilsette log 4 kde/ml med opptint podekultur. Flasken ble vendt 10 ganger før det ble overført 40 ml til 10 sterile 50 ml Nunc rør (Greiner bio-one, Østerrike). Rørene ble deretter satt til inkubering ved tre ulike temperaturer. Et rør fra hver stamme ble umiddelbart brukt til analyse (0-prøve), og det ble tatt ut prøver til både kjemisk og mikrobiologisk analyse. De resterende 9 rørene ble satt til inkubering, hvor 3 rør hver ble satt til inkubering ved 4, 8 og 22 °C.

### 2.3.5 Uttak vekstforsøk

Det ble tatt ut prøver til mikrobiologisk og kjemiske analyser etter uttaksplan i tabell 2.

Tidspunkter for uttak ble bestemt etter forventet vekst ved de tre ulike inkubasjonstemperaturer.

Fra Nunc-røret ble det tillaget fortynningsrekker ved at 0,1 ml prøve ble overført til et rør med 9,9 ml steril Ringers løsning. Innholdet i fortynningsrøret ble blandet godt, før prøven ble videre fortynnet til utvalgt og passende fortykning, i forhold til tid og veksttemperatur. 0,1 ml fortynnet prøve ble platespredt i duplikat på BHI skåler. Parallelt med dette ble det tatt ut 2 ml med prøve som ble overført til et tomt, sterilt reagensrør (Corning, NY, USA). Dette røret ble satt i et vannbad som holdt 72 °C i 5 min og innholdet ble fortynnet og deretter platespredt på samme måte som de ikke-behandlede prøvene. Dette ble gjort for å antallsbestemme sporer i prøvene. Prøver til kjemisk analyse ble tatt ut etter mikrobiologisk uttak.

**Tabell 2:** Uttaksplan for kjemiske og mikrobiologiske analyser. Prøvene ble tatt ut etter tilnærmet samme tidspunkt som opprinnelig poding ble utført, +/- 15 min

Dag * / temperatur	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
22 °C	X	X	X	X								
8 °C	X		X		X			X				
4 °C	X			X				X				X

\*1 dag = 24 t

## 2.4 Kjemiske analyser

Parallelt med de mikrobiologiske prøvene ble det utført kjemiske analyser av prøvene.

For flyktige komponenter, frie aminosyrer, organiske syrer og karbohydrater ble alle prøver analysert, noe som utgjorde 60 prøver per forsøk, 180 prøver totalt. For kapillærelektroforese ble alle prøvene fra første uttak analysert, 60 prøver, og deretter deler av andre uttak. Det var ønskelig å ha to verdier slik at resultatet ble en gjennomsnittsverdi, så fra andre forsøk ble alle 0-prøvene, siste uttak for hver stamme ved hver temperatur og alle uttakene etter inkubering ved 8 °C og 22 °C analysert.

### 2.4.1 Kapillærelektroforese

For å analysere proteinnedbrytning ble prøvene analysert ved hjelp av kapillærelektroforese (CE, «capillary electrophoresis»). Metoden er beskrevet av Heck et al. (2008) og Mestawet et al. (2014) med noen modifikasjoner.

I forkant av forsøket ble det preparert en prøvebuffer, hvor det ble tilsatt henholdsvis 39,3 mg og 78,6 mg ditiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) til 5- og 10 ml opptint prøvebuffer. Prøvebufferen bestod av 167 mM hydroksymetyl-aminometan (TRIS; Sigma, St. Louis, MO, USA), 42 mM 3-morpholinopropansulphonic syre (MOPS; Sigma), 67 mM etylendiamin-tetraeddiksyre dinatriumsalt dihydrat (EDTA; Merck), 17 mM D.L-ditiotreitol (DTT; Sigma). Prøvebufferen holdt en pH på  $8,67 \pm 0,1$  (Heck et. al 2008).

Ved prøveuttak ble det overført 600 µl med prøve i et 1,5 ml eppendorfrør og tilsatt 900 µl med prøvebuffer. Prøvene ble raskt mikset opp på en shaker (Grant-bio, PV-1, England) før de ble satt på en roterende PSU-20i orbital shaker fra Biosan (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i romtemperatur i minimum 1 t.

Når prøvene var ferdig inkubert i romtemperatur ble de sentrifugert i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved  $13,2 \times g$  i 3 min for å separere fett. Etter sentrifugeringen ble prøvene filtrert ved hjelp av en 2,5 ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40 mm fra samme produsent. Nålen ble ført gjennom fettlaget og prøven ble filtrert med et 0,45 µm PES-filter (VWR) over i et nytt eppendorfrør. De filtrerte prøvene ble frosset ned ved -20 °C.



Ved prøveopparbeidelse til analysen ble det opptinte prøvematerialet først fortynnet 2 ganger i henhold til Heck et al. (2008) sin metode, men da resultatene ikke ble som forventet ble det avgjort å fortynne prøvene ytterligere 5 ganger. Samplebuffer ble filtrert med et 0,45 µm PES-filter (VWR). Det ble tilsatt 400 µl med samplebuffer i eppendorfrør og deretter tilsatt 100 µl med opptint prøvemateriale. Rørene ble vendt godt for å blande innholdet og deretter ble 100 µl overført til CE-prøverør til videre analysere.

Programvaren som ble brukt var 3D CE ChemStation (Agilent Technologies, Tyskland) og kapillærelektroforesen ble kjørt i en Agilent G1600 AX (Agilent Technologies). Separasjonen ble utført ved bruk av en HPCE standard kapillær (Agilent Technologies) med dimensjon 56 cm x 50 31 µm i.d.. Separasjon skjedde ved 45 °C og lineær spenningsgradient fra 0 til 25 kV i 3 min (Heck et al. 2008; Mestawet et al. 2014).

Metoden for kaseinseparasjon ble utført i henhold til Heck et al. (2008) sin metode. Prøvene ble kjørt med 30 prøver på hver sekvens, hvor hver kjøring tok 72 minutter. Ved starten og ved hver fjerde kjøring ble kapillæren skylt med 0,1 M NaOH i 5 minutter, før en påfølgende skylling med kjørebuffer i 20 minutter. I tillegg ble kapillæren skylt med kjørebuffer i 5 minutter før hver kjøring. Prøvematerialet ble injisert ved anoden i 20 sekunder med et trykk på 34,5 mbar, og UV-deteksjon av proteinene ble utført ved 214 nm.

#### **2.4.2 Frie aminosyrer**

Prøvene ble analysert for frie aminosyrer ved bruk av «High Performance Liquid Chromatography» (HPLC). Metoden er beskrevet av Bütikofer og Ardö (1999) og Moe et al. (2013) men med noen modifikasjoner tilpasset dette forsøket.

Ved prøveuttak ble 5,00 g prøve veid opp i et sterilt 15 ml Nunc rør, som deretter ble fryst ned ved -20°C før videre prøveopparbeidelse. Ved prøveopparbeidelsen etter tining ble prøven tilsatt 5 ml indre standardløsning (0,4 µmol/ml L-norvalin (Sigma-Aldrich, Kina) i 0,1 M HCL (Merck, Tyskland)). Prøvene ble mikset i en shaker av typen Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc, USA) i rundt 1 min før de ble satt i vendemaskin MultiRS-60 Biosan i 15 min. Etter vending ble prøvene satt i et ultralydvannbad (Branson 2510, Soest, Nederland) i 30 min før de ble sentrifugert ved 2500 x g (3400 rpm) i 40 min ved 4°C. Det ble tilsatt 600 µl 4 % trikloreddiksyre (Merck) i et 1,5 ml eppendorfrør og deretter 600 µl av supernatanten. Prøvene ble mikset i en shaker (Grant-bio, PV-1, England) og satt på is i minimum 30 min. Deretter ble prøven sentrifugert i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge ved

15600 x g i 5 min ved 4 °C. Etter sentrifugeringen ble supernatanten overført til en 10 ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) før den ble filtrert med 0,2 µm cellulose acetat-filter (VWR, USA) over i et nytt eppendorfrør. Fra dette røret ble det overført 50 µl av prøven til et HPLC rør, og prøvene ble fryst ned ved -20 °C inntil analysering. Restene i eppendorfrørene ble fryst ned ved -20 °C som en backup.

Før separering av prøven ble det tilsatt 350 µl boratbuffer i de opptinte prøvene (0,4 M med pH 10,2, Agilent Technologies, Tyskland). HPLC-instrumentet som utførte separeringen bestod av utstyret Agilent 1200 serie pumpe (Agilent Technologies, Singapore), Agilent 1200 serie autoinjektor (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie kolonneovn (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie termostat (Agilent Technologies) og en Agilent 1200 serie fluorescensdetektor. Programvaren som ble benyttet var Open LAB EZChrom (Agilent Technologies). I forkant av injiseringen ble prøvene derivatisert og 5 µl av prøven ble mikset med 5 µl OPA-løsning (Agilent), reaksjonstiden var 0,15 min før injisering. Av hver prøve ble det injisert 10 µl i instrumentet og ved hjelp av to mobile faser ble prøvene analysert med en XTera RP 18 kolonne (150 x 4,6 mm; Waters, Mildford, MA). De mobile fasene var A (30 mmol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck), 0,1 mmol/l titriplex III (Merck), pH 7,2 og 0,25 % tetrahydrofuran (Merck) og B (100 mmol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck) og 0,53 mmol/l titriplex III (Merck) pH 7,2, tilsatt 80 % acetonitril (Merck). Hastigheten på mobilfasen var 0,7 ml/min og kolonnen holdt en temperatur på 42 °C. Gradienten på mobilfasen var fra 3,3-20,7 % B i 13 min, 20,7-30 % B i 12 min og 30-100 % B i 4 min.

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

### 2.4.3 Flyktige komponenter

Prøvene skulle også kvantifiseres for flyktige komponenter. For å utføre denne analysen ble det brukt en «headspace gas chromatography» (HSGC) og metoden er beskrevet av Narvhus et al. (1998).

Prøven ble vendt godt før det ble veid opp 10,00 g i en 20 mL headspace-flaske (Machery Nagel, Dueren, Tyskland). Flaskene ble forseglet med teflonbelagt septa med aluminiumring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) før de ble plassert i en Agilent Technologies 7679A automatisk headspace sampler med et 6890 GC system (Agilent Technologies) og en flamme ioniseringsdetektor. Programvaren som ble benyttet for analysen var Open LAB EZChrom (Agilent Technologies).

Som bæregass til dette forsøket ble det benyttet helium (Aga, Norge) med en total gjennomstrømming på 11,1 ml/min. Headspaceflaskene var holdt ved 60 °C med en forvarmingstid på 30 min før de ble mikset i 5 min ved setting 5. Før injeksjon ble headspaceflaskene trykksatt til 10 PSIG i 1,50 min og injeksjonstiden var på 1 min.

For separering av komponentene ble det benyttet en CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland), med en lengde på 25 meter, en indre diameter på 0,53 mm og filmtykkelse på 5,0 µm. Følgende temperaturprogram ble benyttet under analysen; 53 °C i 1 min, økning med 15 °C per min til 70 °C i 2 min, økning med 22 °C per min til 130 °C i 3 min.

Basert på komponentenes ulike flyktighetsgrad og affinitet til kolonnens stasjonære fase ble de flyktige komponentene separert. Ved hjelp av en kalibrering med standardløsninger med kjent konsentrasjon ble identifisering og kvantifisering av de ulike forbindelsene gjennomført. Standardløsningen hadde en kjent konsentrasjon av følgende komponenter: acetaldehyd, diacetyl, etylacetat, 2-butanon, 2-metyl-butanal, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanal, 3-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol (Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, 1-butanol, 2-butanol og 2.3-pentadion (Merck, Tyskland).

#### 2.4.4 Organiske syrer og karbohydrater

Prøvene ble og analysert for organiske syrer og karbohydrater. Denne analysen ble utført ved bruk av HPLC etter en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011) med noen modifikasjoner tilpasset dette forsøket.

Prøvene ble godt blandet før det ble veid opp 1,00 g i et 10 ml rør. I røret ble det deretter tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann, 200 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Tyskland) og 8 ml acetonitril (Merck). Prøvene ble først vendt for hånd, før de ble satt i en vendemaskin av typen MultiRS-60 Biosan i 30 min. Etter vendingen ble prøvene sentrifugert ved romtemperatur i 10 minutter ved 1470 x g (3400 rpm) i en Kutota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Videre ble supernatanten filtrert ved hjelp av en steril sprøyte med 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør (VWR, USA). 25 µl av prøven ble injisert i HPLC-instrumentet.

Prøvene ble analysert ved hjelp av en oppvarmet Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Kolonnen hadde en temperatur på 32 °C og for beskyttelse av kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H-refill (Bio Rad Laboratories).

Tilkoblet til kolonnen var et pumpesystem fra Perkin Elmer serie 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA), en Perkin Elmer Series 200 autosampler (Perkin Elmer) og en Perkin Elmer LC 101 kolonneovn (Perkin Elmer). Den mobile fasen som ble benyttet under dette forsøket var 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), med en hastighet på 0,4 mL/min.

På samme måte som prøvene ble tillaget, ble det også preparert standardløsninger for kalibrering. Komponentene i prøven ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Det ble benyttet forskjellige standardløsninger for karbohydrater og organiske syrer. For karbohydrater ble det benyttet laktose, glukose og galaktose (Merck) og for organiske syrer ble det benyttet sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, eplesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina).

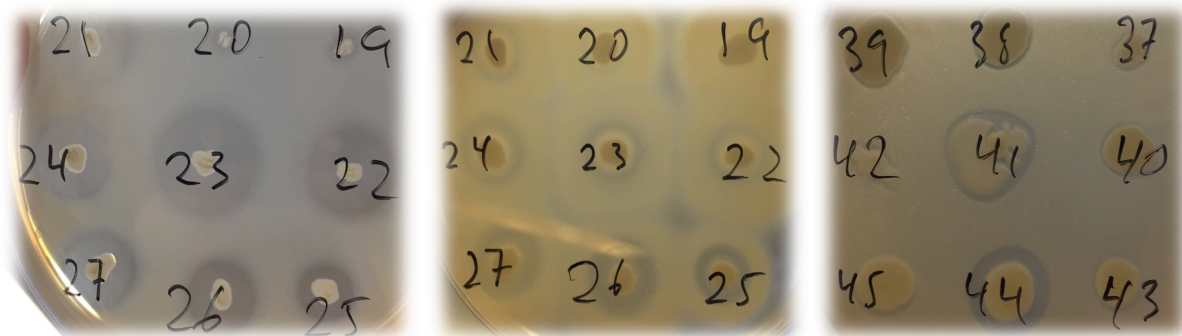
Når det gjaldt karbohydratene og eddiksyre ble disse detektert ved hjelp av en Perkin Elmer Serie 200 RI-detektor (Perkin Elmer), mens for organiske syrer ble disse detektert av en Perkin Elmer Serie 200 UV/VIS (Perkin Elmer) med en bølgelengde på 210 nm.

### 3.0 Resultater

Forsøket ble inndelt i et innledende forsøk og et hovedforsøk etterfulgt av kjemiske analyser. Innledende forsøk på 55 ulike stammer ble utført for å få en oversikt over enzymaktiviteten til et større antall stammer. Forsøket innebar måling av proteolyse-, lipolyse og lecitinaseaktivitet ved diffusjonsanalyse over tid ved fire ulike inkuberingstemperaturer. Resultatene fra diffusjonsforsøket resulterte i utvelgelse av seks stammer som skulle undersøkes videre i et hovedforsøk. Under hovedforsøket ble det utført et vekstforsøk med de seks utvalgte stammene, som ble inokulert i langtidsholdbar UHT-melk og deretter inkubert ved 3 ulike temperaturer. Av dette prøvematerialet ble det over tid tatt ut prøver til mikrobiologiske og kjemiske analyser. De proteolytiske effektene ble undersøkt ved analyse av proteinnedbrytning med kapillærelektroforese (CE) og kvantifisering av frie aminosyrer ved hjelp av HPLC, samt flyktige komponenter ved hjelp av HSGC.

#### 3.1 Innledende forsøk, analyse av enzymaktivitet ved diffusjonsanalyse

Innledningsvis ble det utført et forsøk med en diffusjonsanalyse av 55 ulike stammer for å studere deres enzymaktivitet. Klaringssoner (**Fig 1**) ble avlest og resultatene fra diffusjonsforsøket er vist i **Tabell 3**. Resultatene ble brukt til å velge seks stammer som ble benyttet videre i hovedforsøket. De seks stammene som ble valgt til å undersøkes videre er markert med **fet, blå** skrift i tabellen. Se vedlegg for rådata.



**Figur 1:** Klaringssoner ved diffusjonsanalyse. Til venstre proteolytisk aktivitet på PCA med skummetmelk, i midten lecitinaseaktivitet på egg yolk agar og til høyre er lipolytisk aktivitet på tributyrin agar illustrert. (Foto: Privat).

**Tabell 3:** Klaringssoner (diameterer, cm) for proteolytisk aktivitet på PCA med skummetmelk, lecitinase aktivitet på egg yolk agar og lipolytisk aktivitet på tributyrin agar ved forskjellige inkuberingstemperaturer og avlesningstider. De ulike artene er merket i farger for å enklere kunne se sammenhenger; *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. mycooides*, *B. subtilis*, *K. rhizophila*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*

Temp	PCA med skummetmelk agar (cm)				Egg yolk agar (cm)				Tributyrin agar (cm)			
	4°C	8°C	22°C	30°C	4°C	8°C	22°C	30°C	4°C	8°C	22°C	30°C
Døgn	5 d	3 d	2 d	1 d	5 d	3 d	2 d	2 d	5 d	5 d	5 d	5 d
Stammer												
1	- *	-	0,9	1,7	-	-	2,1	2,4	-	-	-	1,0
2	-	-	1,8	1,4	-	-	1,8	2,2	-	-	0,8	1,3
3	V *	0,7	1,3	1,4	V	0,8	1,8	2,3	-	-	0,9	1,5
4	V	0,8	1,8	1,6	V	1,0	1,9	2,3	-	V	1,0	1,8
5	V	0,6	1,8	1,6	V	0,9	1,9	2,3	V	-	0,8	1,4
6	V	0,7	1,8	1,5	V	0,9	1,8	2,4	V	-	1,0	1,4
7	-	-	1,8	1,8	-	-	2,1	2,4	-	-	0,8	1,3
8	-	-	2,1	1,8	-	-	2,3	2,6	-	-	0,9	1,3
9	-	-	1,8	1,6	-	-	2,1	2,4	-	-	0,8	1,2
10	V	-	1,6	1,2	V	-	1,8	2,2	-	-	V	-
11	-	-	1,6	1,6	-	-	2,1	2,6	-	-	0,9	-
12	-	-	1,3	1,4	-	-	2,0	2,4	-	-	1,1	-
13	V	-	1,5	1,4	V	-	2,0	2,4	-	-	1,1	-
14	-	-	1,6	1,4	-	-	1,9	2,4	-	-	1,5	-
15	-	-	1,3	1,4	-	-	2,0	2,6	-	-	1,2	-
16	V	0,4	1,7	1,5	V	0,6	1,8	2,4	-	-	1,0	-
17	V	0,6	1,7	1,4	V	0,7	1,8	2,4	-	-	0,9	-
18	V	1,0	1,8	1,4	V	0,8	1,8	2,3	-	-	0,9	-
19	V	0,5	1,8	1,4	V	V	1,8	2,3	-	-	1,0	V
20	V	0,4	1,8	1,4	V	V	1,8	2,2	-	-	1,0	1,3
21	0,8	0,7	2,3	1,7	1,2	0,8	2,2	2,4	V	V	1,0	1,1
22	1,0	0,7	2,4	2,0	1,5	0,9	2,2	2,4	V	V	0,9	V
23	1,1	0,9	2,5	1,8	1,5	1,2	2,4	2,6	V	V	0,9	V
24	0,5	0,8	2,0	1,6	1,1	1,0	2,3	2,5	-	-	1,2	1,5
25	0,5	0,5	2,2	1,5	0,4	V	1,6	1,8	-	V	1,1	1,4
26	0,7	0,7	2,3	1,6	1,2	0,9	2,3	2,5	V	V	1,3	1,6

27	0,8	0,7	2,2	1,4	1,4	0,9	2,3	2,4	V	V	1,2	1,8
28	0,5	0,6	2,0	1,4	1,0	0,9	1,9	2,1	V	V	1,0	1,8
29	0,6	0,7	2,1	1,4	1,2	1,1	1,9	2,1	-	V	1,1	1,8
30	0,7	0,6	2,1	1,4	1,8	1,0	2,2	2,4	-	-	0,9	V
31	0,5	0,6	2,1	1,6	V	0,4	1,9	2,4	-	V	1,1	V
32	-	-	V	V	-	-	V	V	0,7	-	1,2	1,8
33	-	-	V	V	-	-	V	V	-	-	1,0	1,8
34	-	-	V	V	-	-	V	V	0,6	-	1,1	1,8
35	-	-	V	V	-	-	V	V	0,6	-	0,9	1,8
36	-	-	V	V	-	-	V	V	-	V	V	V
37	-	-	V	V	-	-	V	V	V	-	0,6	2,1
38	0,8	0,6	2,1	1,4	1,2	1,0	2,1	2,3		V	0,9	1,7
39	0,8	0,7	2,0	1,1	1,2	1,1	2,1	2,1	V	-	1,0	1,6
40	1,0	0,7	2,6	1,7	1,3	1,2	2,3	2,4	-	V	0,8	1,4
41	-	-	1,4	1,3	-	-	V	V	-	-	1,4	3,0
42	-	-	V	V	-	-	V	-	-	-	V	2,1
43	0,5	0,7	2,5	1,8	1,0	V	2,2	2,0	V	-	0,6	1,4
44	V	V	2,1	1,0	1,0	1,0	2,1	1,9	-	-	1,3	1,8
45	V	V	2,1	1,0	1,0	1,3	2,2	2,6	-	-	V	1,6
46	-	-	V	V	-	-	V	V	-	0,6	0,6	-
47	-	-	V	V	-	-	V	V	-	-	0,6	-
48	-	-	V	V	-	-	V	V	-	-	0,8	-
49	V	-	V	V	-	-	V	V	-	-	V	-
50	0,3	0,8	2,2	1,8	-	1,0	2,2	2,3	-	V	1,0	-
51	-	0,5	-	0,8	-	-	V	V	-	-	0,9	-
52	V	-	0,6	V	-	-	V	V	-	V	V	-
53	-	-	2,0	1,8	-	-	V	1,2	-	-	1,5	-
54	-	-	1,9	2,0	-	-	V	V	-	-	1,5	-
55	-	-	V	V	-	-	V	V	-	0,6	0,5	-

\*V betyr vekst men ikke sone, og - betyr ingen vekst.

Resultatene viste en varierende evne til å uttrykke enzymaktivitet avhengig av stamme og temperatur (**Tabell 3**). Stamme 1-20 av *B. cereus* viste ikke tegn til enzymaktivitet etter inkubasjon ved 4 °C, da stammene kun hadde vokst men ikke dannet soner. Etter inkubering ved 8 °C viste stamme 3-6 og 16-18 både proteolytisk og lecitinaseaktivitet, og i tillegg viste stamme 19-20 også proteolytisk aktivitet. Etter inkubering ved 22 og 30 °C viste stamme 1-20



enzymaktivitet både i form av proteolytisk og lecitinase aktivitet. For proteolyse var aktiviteten størst ved 22 °C, og mindre ved 30 °C, og for lecitinase aktivitet økte aktiviteten med høyere temperatur. Når det gjaldt lipolytisk aktivitet hadde stamme 1-20 utenom stamme 10 dannet soner ved 22 °C, og ved 30 °C hadde stamme 1-9 og stamme 20 aktivitet. I dette tilfellet var det dermed flere stammer som hadde lipolytisk aktivitet ved 22 °C enn det var ved 30 °C. Stamme 21-31 uttrykte proteolytisk aktivitet ved alle inkuberingstemperaturer, og aktiviteten var på sitt høyeste på 22°C, før den avtok etter inkubering ved 30 °C.

For lecitinase aktivitet hadde stammene 21-31 dannet soner, med unntak av stamme 25 ved 8°C, og stamme 31 ved 4 °C. Aktiviteten ble høyere med høyere temperatur.

Når det gjaldt lipolytisk aktivitet var det ingen aktivitet etter inkubering ved 4 og 8 °C, men ved 22 °C uttrykte stamme 21-31 aktivitet som ble høyere etter inkubering ved 30 °C, bortsett fra stamme 22, 30 og 31. De hadde kun vekst og men ingen dannelse av soner ved 30 °C.

*Bacillus licheniformis* viste ingen tegn til proteolytisk og lecitinaseaktivitet etter inkubering ved noen av inkuberingstemperaturene. Etter inkubering ved 22 og 30 °C hadde kolonier blitt dannet, men det var ingen soner og dermed ingen enzymaktivitet. Når det gjaldt lipolytisk aktivitet var denne varierende innenfor de ulike isolatene. Alle stammer bortsett fra 47, 48 og 55 hadde dannet soner etter inkubering ved 30 °C. Etter inkubering ved 22 °C hadde alle stammene bortsett fra stamme 42 dannet soner. For de stammene som hadde aktivitet både ved 22 og 30 °C var aktiviteten størst ved 30 °C. Kun stamme 55 hadde dannet sone etter inkubering ved 8°C. Stamme 32, 34 og 35 hadde også enzymaktivitet ved 4 °C.

For *K. Rhizophila* var det kun stamme 52 som uttrykte proteolytisk aktivitet etter inkubering ved 22 °C. De andre stammene hadde dannet kolonier, men det ble ikke observert sonedannelse uavhengig av temperatur. Stamme 53 og 54 av *B. amyloliquefaciens* hadde proteolytisk aktivitet etter inkubering ved 22 og 30 °C, og lipolytisk aktivitet ved 22 °C. Når det gjaldt lecitinaseaktivitet var det kun stamme 53 som uttrykte dette etter inkubering ved 30 °C. For *B. pumilus* ble det observert proteolytisk aktivitet etter inkubering ved 8 og 30 °C, og lipolytisk aktivitet etter inkubering ved 22 °C. *Bacillus subtilis* viste ingen tegn til lecitinase aktivitet, men etter inkubering ved 22 og 30 °C hadde stamme 41 proteolytisk og lipolytisk aktivitet. I tillegg hadde stamme 46 lipolytisk aktivitet etter inkubering ved 8 og 22 °C.

Stamme 44 og 45 av *B. mycooides* hadde ikke proteolytisk aktivitet etter inkubasjon ved 4 og 8 °C, utenom dette hadde alle stammene aktivitet ved begge temperaturene. Når det gjaldt lecitinase aktivitet hadde ikke stamme 43 aktivitet ved 8 °C, og stamme 50 hadde ikke aktivitet ved 4 °C, utenom dette hadde alle stammene aktivitet. Alle stammene hadde proteolytisk- og lecitinase aktivitet ved 22 og 30 °C, og aktiviteten var for proteolyse størst ved 22 °C, og for lecitinase størst ved 30 °C i de fleste tilfeller. Stamme 38-40, 43 og 44 hadde lipolytisk aktivitet ved 22 og 30 °C. Stamme 45 hadde kun lipolytisk aktivitet ved 30 °C, og stamme 50 hadde kun aktivitet ved 22 °C. Det var ingen aktivitet etter inkubering ved 4 og 8 °C.

De seks stammene som ble valgt ut av de totalt 55 til å undersøkes videre er nærmere presentert i **Tabell 4**. Videre i resultatdelen er det kun disse seks stammene som vil bli undersøkt.

**Tabell 4:** De seks stammene som ble benyttet videre i hovedforsøket samt deres bakgrunnsinformasjon. Stamme 1 og 2 er isolater fra Reinholdtsen (2015) og de siste fire er isolater fra prosjektet mellom TINE SA og NMBU. Parentes representerer alternative funn ved 16s rDNA sekvensering.

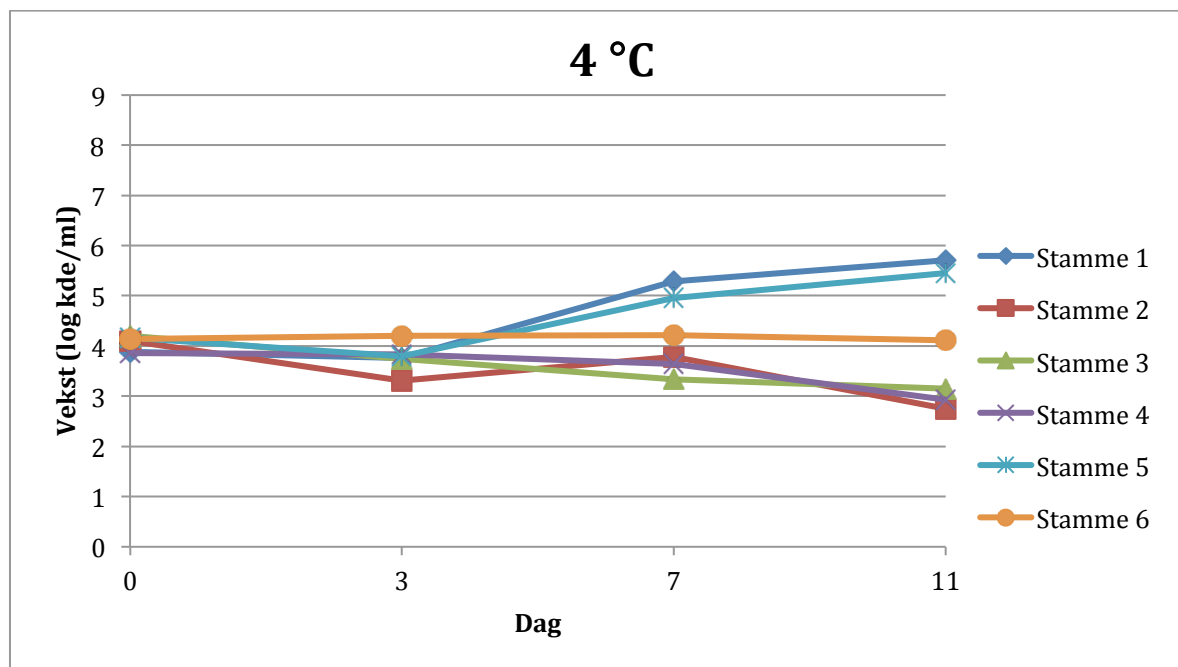
Stamme	Bakterie isolater	Meieri	Måned	Opprinnelse
Nr 40 (heretter 1)	<i>B. mycooides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> ), TR 143	B	August	Kartong lagret melk, Dag 13 temp 4 °C Kartong 1
Nr 32 (heretter 2)	<i>B. licheniformis</i> , TR 53	B	August	Silotank
Nr 2 (heretter 3)	<i>B. cereus</i> , B3	B	August	Balansetank Oppstart dag 1, Replikat: Silo C
Nr 18 (heretter 4)	<i>B. cereus</i> , B58	A	August	Kartong Dag 13 temp 4 °C, Replikat: kartong 3b
Nr 23 (heretter 5)	<i>B. cereus</i> , B83	B	August	Kartong Dag 13 temp 8 °C, Replikat: kartong 1B
Nr 29 (heretter 6)	<i>B. cereus</i> , B146	A	August	Kartong Dag 13 temp 8 °C, Replikat: kartong 2B

### 3.2 Hovedforsøk, vekstforsøk

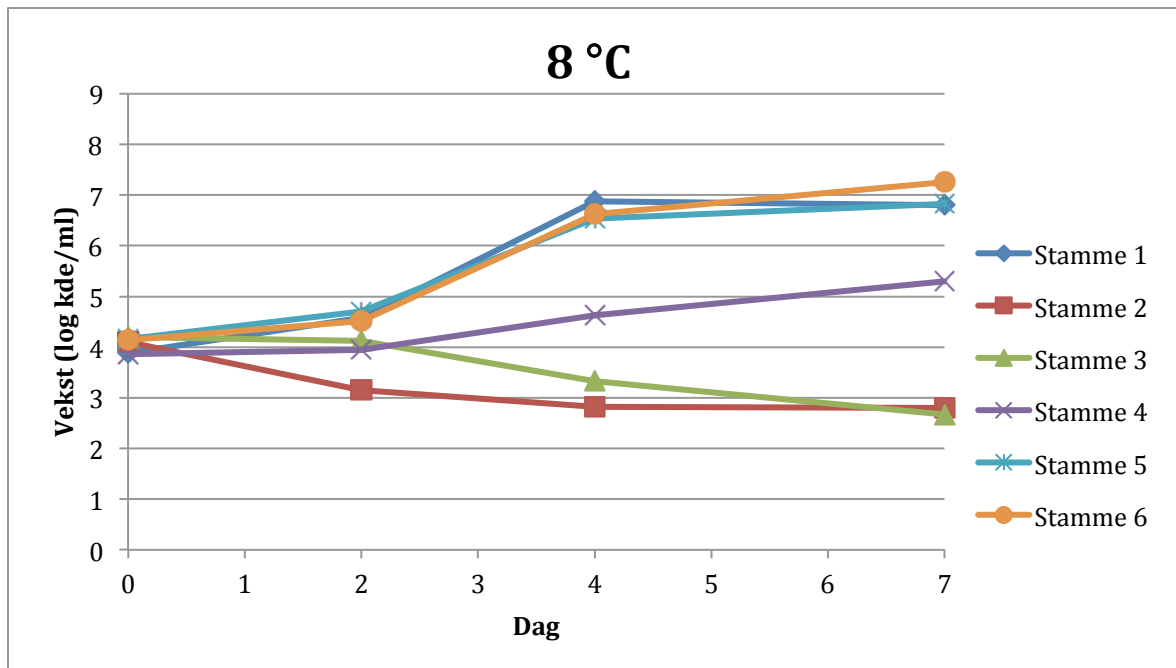
Som hovedforsøk ble det utført et vekstforsøk ved å inokulere de seks utvalgte stammene i langtidsholdbar UHT-melk som deretter ble inkubert ved tre ulike temperaturer. Stammene ble inkubert ved 4, 8 og 22 °C, og tidspunkt for prøveuttak var henholdsvis 3, 7 og 11 døgn etter inkubering ved 4 °C, 2, 4 og 7 døgn etter inkubering ved 8 °C og etter inkubering ved 22 °C var tidspunkt for prøveuttak etter 1, 2 og 3 døgn. Det ble i tillegg tatt ut 0-prøver rett etter inokulering med bakterier.

#### 3.2.1 Vekst av *Bacillus* i melk

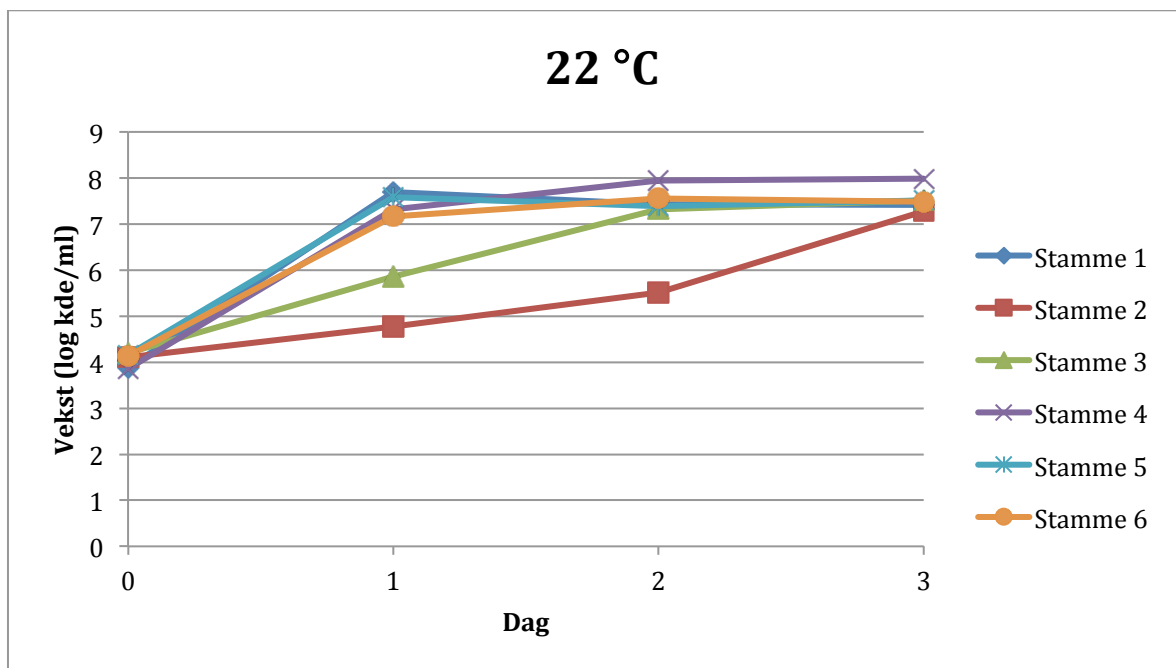
Fra agarskålene ble koloniene telt, og det ble beregnet en gjennomsnittlig bakteriekonsentrasjon fra de tre forsøkene som er presentert som vekstkurver i **Figur 2, 3** og **4**. Se vedlegg for rådata.



**Figur 2:** Bakterievekst ved 4 °C, oppgitt i log kde/ml. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 3 gjentak.



**Figur 3:** Bakterievekst ved 8 °C, oppgitt i log kde/ml. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 3 gjentak.



**Figur 4:** Bakterievekst ved 22 °C, oppgitt i log kde/ml. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 3 gjentak.

Stamme 1 og 5 økte i antall etter inkubering ved 4 °C (**Fig 2**). Stamme 1 og 5, hhv *B. mycoides* og *B. cereus* økte fra henholdsvis 3,9 og 4,2 log kde/ml i 0-prøven til 5,3 og 4,96 log kde/ml etter 7 døgn. Veksten økte ytterligere til henholdsvis 5,7 og 5,5 log kde/ml etter 11 døgn. Bakteriekonsentrasjonen for de andre stammene økte ikke etter 11 døgn inkubasjon ved 4 °C.

Ved 8 °C var det fortsatt stamme 1 og 5 som økte i bakteriekonsentrasjon etter inkubering og i tillegg økte stamme 6, også *B. cereus* ved denne temperaturen (**Fig 3**). Dette var tydelig allerede etter 2 døgn, da stamme 1, 5 og 6 økte fra hhv 3,9-4,2 log kde/ml i 0-prøven til 4,5-4,7 log kde/ml etter 2 døgn. Stamme 1 og 5 nådde tilsynelatende stasjonærfasen etter 4 døgn, og holdt en stabil verdi på 6,8-6,9 log kde/ml. Veksten til stamme 6 fortsatte å stige og etter 7 døgn med inkubering var log verdien 7,25 log kde/ml. Veksten for stamme 4 kom noe senere i gang og etter 4 døgn hadde bakteriekonsentrasjonen økt fra 3,9 i 0-prøven til 4,6 log kde/ml, denne verdien fortsatte å øke til 5,3 log kde/ml etter 7 døgn med inkubering. Stamme 2 og 3 viste ikke tegn til vekst ved 8 °C etter 7 dagers inkubering. I dette tilfellet gikk celledallet ned, og en årsak til dette kan være lysering av celler og celledrap.

Ved 22 °C (**Fig 4**) viste vekstkurven en økning av bakteriekonsentrasjon for samtlige stammer. Stamme 1, 4, 5 og 6, hhv *B. mycoides* og tre stammer av *B. cereus*, økte raskt i antall, og allerede etter 1 døgn hadde antall celler økt fra 3,9-4,2 log kde/ml i 0-prøven til 7,2-7,8 log kde/ml. Stamme 1, 5 og 6 nådde tilsynelatende stasjonærfasen allerede etter 1 døgn og stabiliserte seg ved 7,4-7,5 log kde/ml, men for stamme 4 økte mengden celler opp til 8,00 log kde/ml etter 3 døgn med inkubering. Veksten for stamme 2, *B. licheniformis*, og 3, *B. cereus* kom noe senere i gang, men etter 3 døgn med inkubering hadde antall celler økt til hhv 7,28 og 7,51 log kde/ml.

Oppsummert kan det sies at inokulert melk inkubert ved 22 °C var et svært godt miljø for vekst av de 6 utvalgte stammene da bakteriekonsentrasjonen økte fra 3,9-4,2 log kde/ml i 0-prøven til 7,3-8,0 etter 3 døgn. Bakteriekonsentrasjonen økte raskere for alle stammene etter inkubering ved 22 °C, noe som tilsier at forholdene under inkubering ved 22 °C var et bedre vekstmiljø enn under inkubering ved 4 og 8 °C. Etter inkubasjon ved 4 °C viste *B. mycoides* og en stamme av *B. cereus* en økning i vekst. Tilsvarende stammer, og en ytterligere stamme av *B. cereus* hadde og en økning i antall etter inkubasjon ved 8 °C. Stamme 3-6 var alle *B. cereus*, men de viste ulike egenskaper med hensyn til vekst. Veksten for stamme 3 og 4 av *B. cereus* kom noe senere i gang ved 8 °C enn den gjorde for stamme 5 og 6.

### 3.2.2 Antall sporer i melk

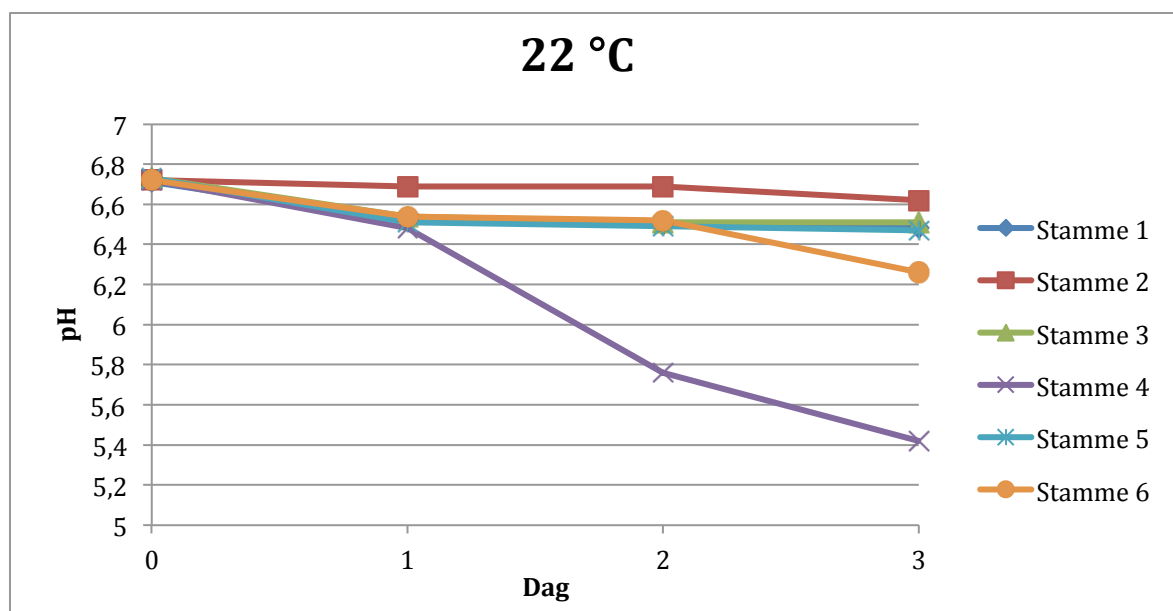
For å antallsbestemme sporer i melkeprøvene ved hvert uttak ble prøvene satt i et vannbad som holdt 72 °C i 5 min før de ble platespredd i duplikat på skåler med BHI-agar. Prøvene som ble inkubert ved 4 og 8 °C viste ikke særlig tegn til å danne sporer, og etter inkubering ved 22 °C var det tilsynelatende kun stamme 3 og 4 som dannet sporer. Dette kommer også frem i **fig 4** da det er observert en endring i vekstmønsteret til stammene. Dette kommer mest tydelig frem for stamme 3, og for stamme 4 er det kun en liten endring i vekstmønsteret etter 2 døgn. Etter 2 døgn med inkubering ved 22 °C hadde stamme 3 en sporekonsentrasjon på 4,5 log kde/ml, som økte til 5,2 log kde/ml etter 3 døgn med inkubering. På samme måte steg sporetallet til stamme 4 fra 3,5 log kde/ml etter 2 døgn til 3,7 log kde/ml etter 3 døgn med inkubering. Se vedlegg for rådata.

## 3.3 Kjemiske analyser

De kjemiske analysene: HSGC for kvantifisering av flyktige komponenter og HPLC til kvantifisering av organiske syrer, karbohydrater og frie aminosyrer, ble utført på alle 60 prøvene for hvert forsøk, 180 prøver totalt. For CE, kvantifisering av proteinnedbrytning ble de 60 prøvene fra første forsøk analysert, og deretter 0-prøvene fra forsøk 2, de siste uttakene for hver temperatur samt noen tidligere uttak for å se når en eventuell nedbrytning startet.

### 3.3.1 pH

Etter inkubering ved 4 og 8 °C var det svært små endringer i pH-verdi. pH-verdien etter inkubering ved 4 °C holdt en stabil verdi på 6,70 og etter inkubering ved 8 °C sank pH fra 6,70-6,60 for stamme 1, 5 og 6 mens de andre stammene holdt en stabil verdi på 6,70 gjennom hele inkuberingstiden. Resultatene for pH-endringen etter inkubering ved 22 °C er vist i **Figur 5**. Se vedlegg for rådata.



**Figur 5:** pH-utviklingen til de ulike stammene ved 22 °C fra 0 til 3 dager. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak.

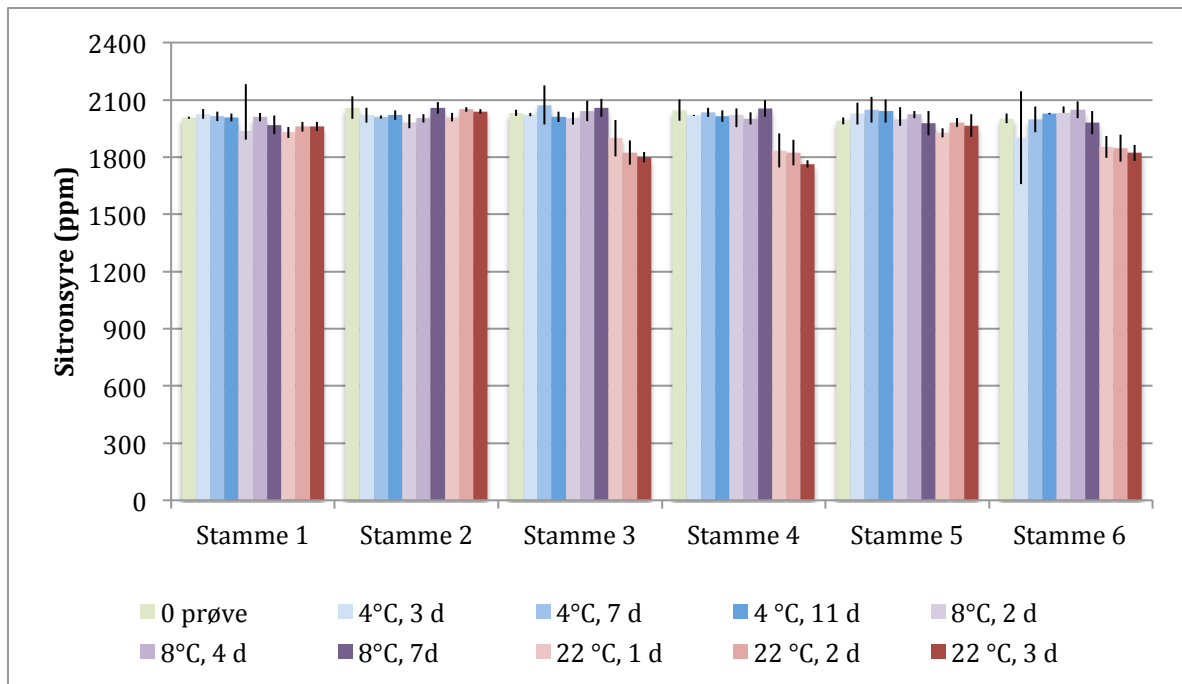
**Figur 5** viser at veksten til stamme 4 førte til den største endringen i pH. pH sank fra 6,70 i 0-prøven til 5,4 etter 3 døgn inkubering. Stamme 2 hadde ikke en stor endring, og pH endret seg fra 6,70-6,60. Stamme 1, 3, 5 og 6 gikk fra en pH verdi på 6,70 i 0-prøven til en pH verdi på 6,30-6,50 etter 3 døgn.

### 3.3.2 Organiske syrer og karbohydrater

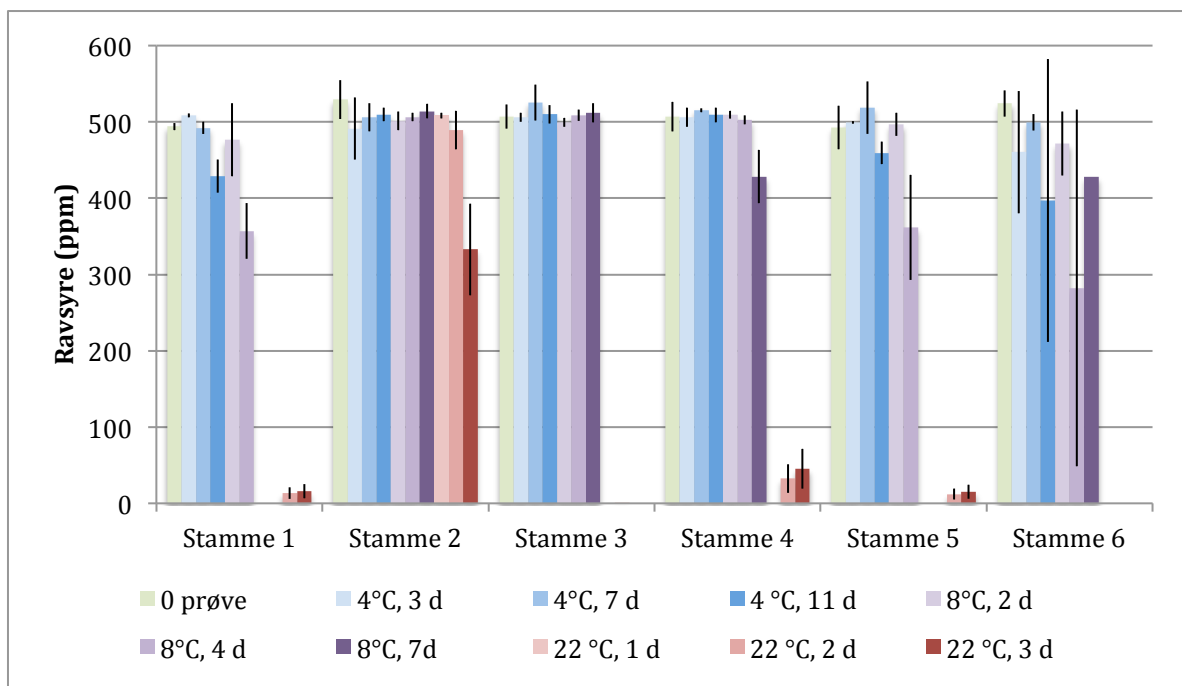
Innholdet av organiske syrer og karbohydrater ble analysert hos alle prøvene i de tre forsøkene og innholdet ble kvantifisert ved hjelp av HPLC. Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier.

#### 3.3.2.1 Organiske syrer

Resultatene for organiske syrer er vist i **Figur 6-10**. Standardavvik er illustrert i figurene. Se vedlegg for rådata.



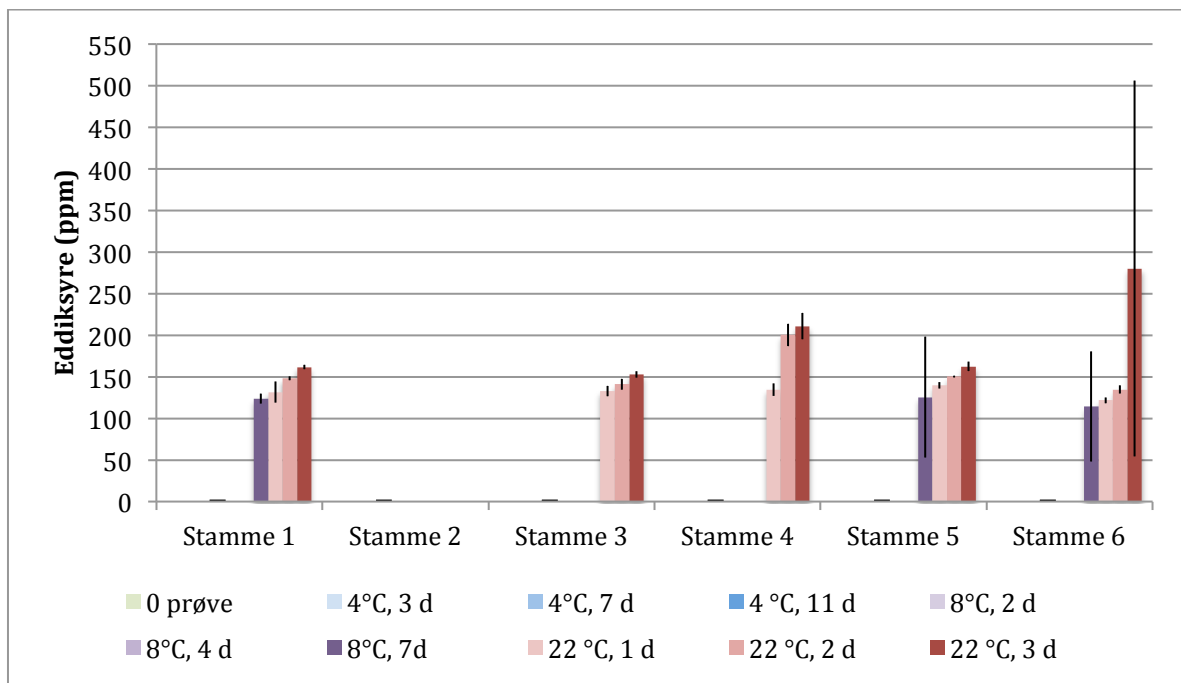
**Figur 6:** Resultat for sitronsyreutvikling oppgitt i ppm hos de forskjellige stammene ved ulike inkuberingstidspunkt og temperaturer. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak.



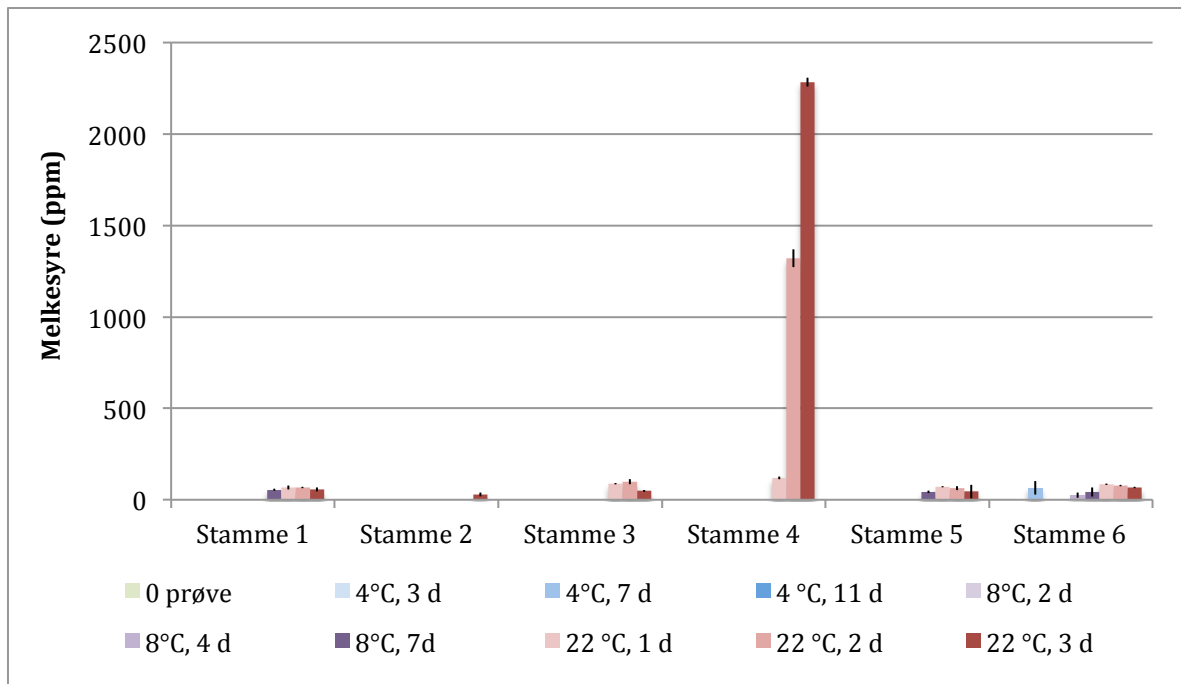
**Figur 7:** Resultat for ravsyreutvikling oppgitt i ppm hos de forskjellige stammene ved ulike inkuberingstidspunkt og temperaturer. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak.



Felles for sitronsyre og ravsyre i **Figur 6** og **7** var at det ble detektert cirka 2000 ppm sitronsyre og cirka 500 ppm ravsyre i alle 0-prøvene, og deretter ble det observert en reduksjon. Inkubasjon ved 4 og 8 °C hadde ingen stor effekt på innholdet av sitronsyre hos noen av de seks stammene. Når det gjelder stamme 3, 4 og 6 ble det observert en nedbrytning fra verdien detektert i 0-prøven etter inkubasjon ved 22 °C. Stamme 4 hadde den laveste verdien som ble detektert i dette forsøket med 1764 ppm sitronsyre etter 3 døgn inkubering ved 22 °C. Når det gjaldt ravsyre begynte mengden å avta med økende inkubasjonstemperatur og tid for de fleste av stammene. Etter inkubering ved 4 °C skjedde den største reduksjonen for stamme 1 og 5, og etter inkubering ved 8 °C var ravsyren fullstendig nedbrutt for tilsvarende stammer etter 7 døgn med inkubering. Det samme gjaldt stamme 1, 3, 4, 5 og 6 etter inkubering ved 22 °C allerede etter 1 døgn.

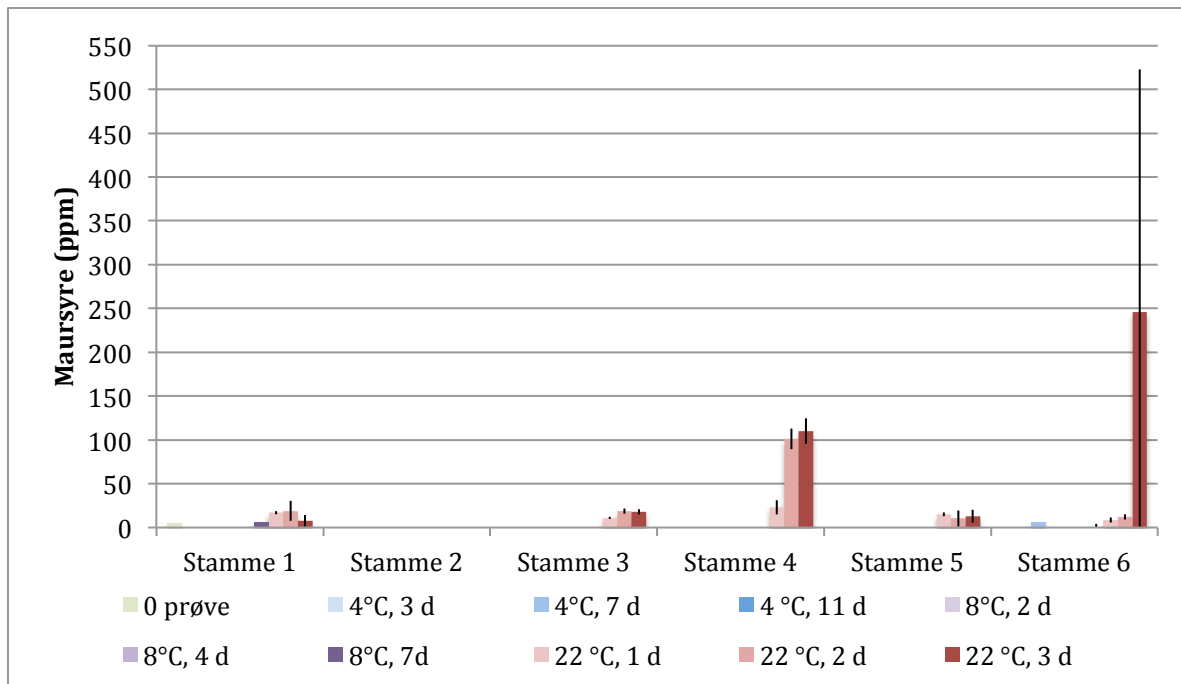


**Figur 8:** Resultat for eddiksyreproduksjon oppgitt i ppm hos de forskjellige stammene ved ulike inkuberingstidspunkt og temperaturer. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak.



**Figur 9:** Resultat for melkesyreproduksjon oppgitt i ppm hos de forskjellige stammene ved ulike inkuberingstidspunkt og temperaturer. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak, utenom 4 °C, 7 døgner for stamme 6, denne verdien er 1 gjentak.

Felles for eddiksyre og melkesyre (**Figur 8 og 9**) var at her var det syreproduksjon som ble målt og det ble observert en økning av begge syrene med økende temperatur og lengde på inkuberingen. Etter inkubering ved 22 °C ble det påvist eddiksyreproduksjon i området (150-280 ppm) etter 3 døgner inkubering for alle stammene utenom stamme 2, og etter inkubering ved 8 °C ble det kun påvist eddiksyreproduksjon ved siste uttak for stamme 6 (120 ppm), i tillegg til stamme 1 og 5 på 130 ppm ved 8 °C. Stamme 6 skilte seg ut med det høyeste innholdet på 280 ppm etter 3 døgner inkubasjon ved 22 °C, men her var standardavviket høyt som betyr at det er en viss usikkerhet knyttet til dette resultatet. Etter inkubering ved 4 °C ble det kun påvist melkesyreproduksjon for stamme 6 (65 ppm) etter 7 dagers inkubering. Derimot ble dette kun detektert ved 1 av de 3 gjentakene så det er noe usikkerhet rundt denne verdien. Etter inkubering ved 8 °C ble det påvist melkesyre etter 7 dager inkubering hos stamme 1 og stamme 5, henholdsvis 54 ppm og 42 ppm. Det ble detektert melkesyre hos alle stammene etter inkubering ved 22 °C, og spesielt stamme 4 skilte seg ut med en høy produksjon. Etter 1 døgner inkubering ble det detektert 118 ppm melkesyre, og denne mengden fortsatte å øke til 1321 ppm etter 2 døgner og 2283 ppm etter 3 døgner inkubering. Stamme 2 hadde det minste innholdet etter 3 døgner og ellers var mengden melkesyre ganske lik for stamme 1, 3, 5 og 6.



**Figur 10:** Resultat for maursyreproduksjon oppgitt i ppm hos de forskjellige stammene ved ulike inkuberingstidspunkt og temperaturer. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak.

Maursyre ble kun detektert i melken fra starten av for stamme 1 (**Fig 10**), og for stamme 2 ble det ikke detektert noe maursyre uavhengig av temperatur og lengde på inkuberingen.

Etter inkubering ved 4 °C ble det kun detektert maursyre etter 7 døgn for stamme 6, og etter inkubering ved 8 °C ble det kun detektert maursyre etter 7 døgn for stamme 1. Stamme 6 hadde det høyeste innholdet etter 3 dagers inkubering ved 22 °C på 245 ppm, men denne prøven hadde et høyt standardavvik, noe som igjen medfører en usikkerhet rundt dette resultatet. Stamme 4 hadde også et høyt innhold som økte fra 23 ppm etter 1 døgn, 101 ppm etter 2 døgn og 110 ppm etter 3 døgn inkubering.

Resterende organiske syrer som det ble analysert for viste små endringer. DL-pyroglutaminsyre ble ikke påvist hos noen av stammene ved de ulike temperatuere.

Resultatene for orotinsyre viste liten endring og prøvene hadde en mengde som varierte fra 69,9-82,1 ppm. Stamme 2 hadde etter 11 dagers inkubering ved 4 °C den laveste verdien på 56,2 ppm.

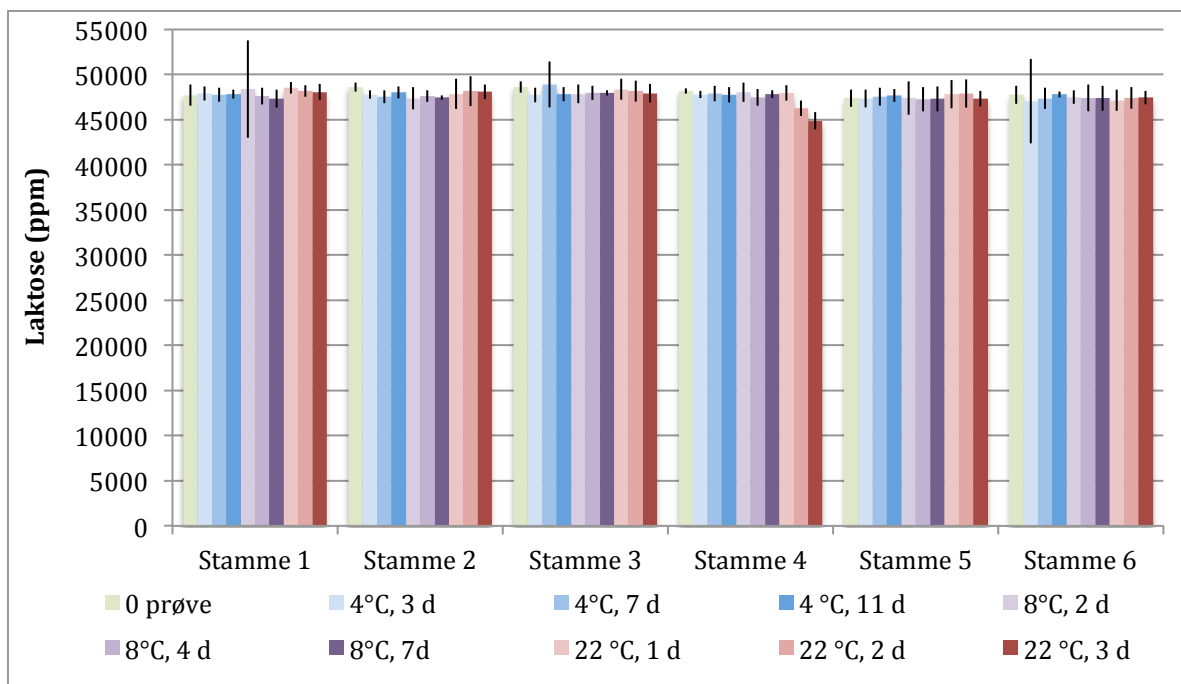
Pyrodruesyre ble i de fleste tilfeller ikke påvist, det var kun etter inkubering ved 22 °C det ble produsert små mengder. Stamme 4 produserte mellom 1,5-3,0 ppm pyrodruesyre etter både 1, 2 og 3 døgn med inkubering. Stamme 3 produserte 3,8 ppm etter et døgn i ett av de 3 forsøkene. Det ble og påvist 13,5 ppm hos stamme 6 etter 3 døgn med inkubering ved 22 °C,

men dette var også kun i ett forsøk. Etter 7 dagers inkubering ved 8 °C hadde stamme 1 i ett forsøk produsert 1,6 ppm pyrodruesyre.

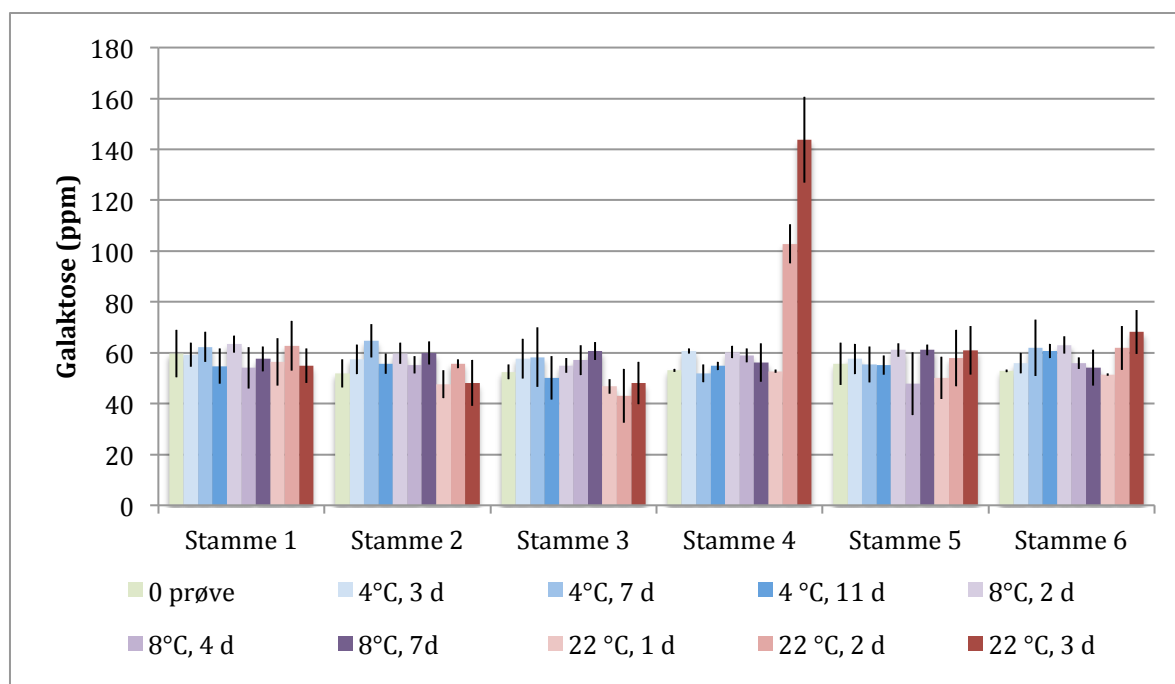
Resultatene for urinsyre viste svært små endringer, og innholdet varierte fra 16,5-21,9 ppm.

### 3.3.2.2. Karbohydrater

Resultatene for karbohydrater er presentert i **Figur 11** og **12**. Glukose ble ikke påvist for noen av stammene ved de ulike temperaturene. Standardavvik er illustrert i figurene. Se vedlegg for rådata.



**Figur 11:** Resultat for laktoseomsetning oppgitt i ppm hos de forskjellige stammene ved ulike inkuberingstidspunkt og temperaturer. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak.

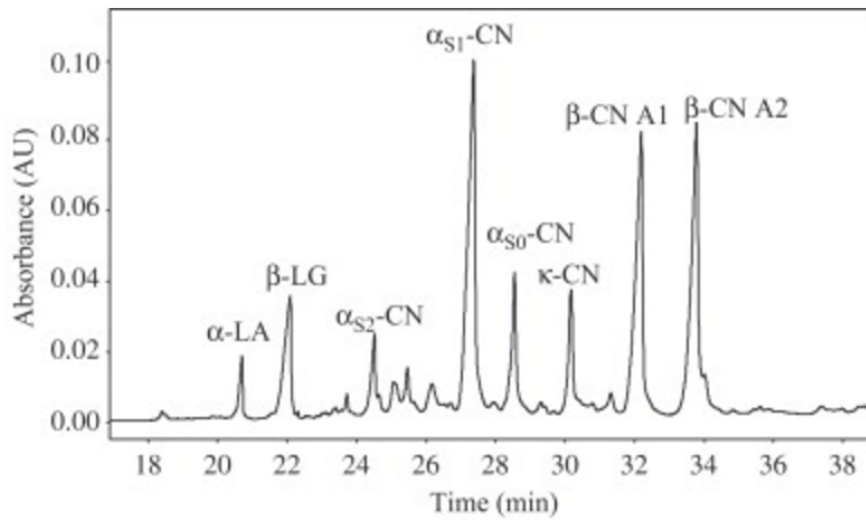


**Figur 12:** Resultat for galaktose oppgitt i ppm hos de forskjellige stammene ved ulike inkuberingstidspunkt og temperaturer. Resultatene er gjennomsnittverdier fra 3 gjentak.

Felles for laktose og galaktose (**Fig 11 og 12**) var liten innvirkning på mengden etter inkubering ved 4 og 8 °C. Etter inkubering ved 22 °C ble det observert en effekt for stamme 4, mengden laktose ble noe redusert og mengden galaktose økte. Det ble også observert en liten økning galaktose for stamme 5 og 6 etter 3 døgn med inkubasjon ved 22 °C, videre ble det ikke observert store endringer for de andre stammene.

### 3.3.3 Kapillærelektroforese

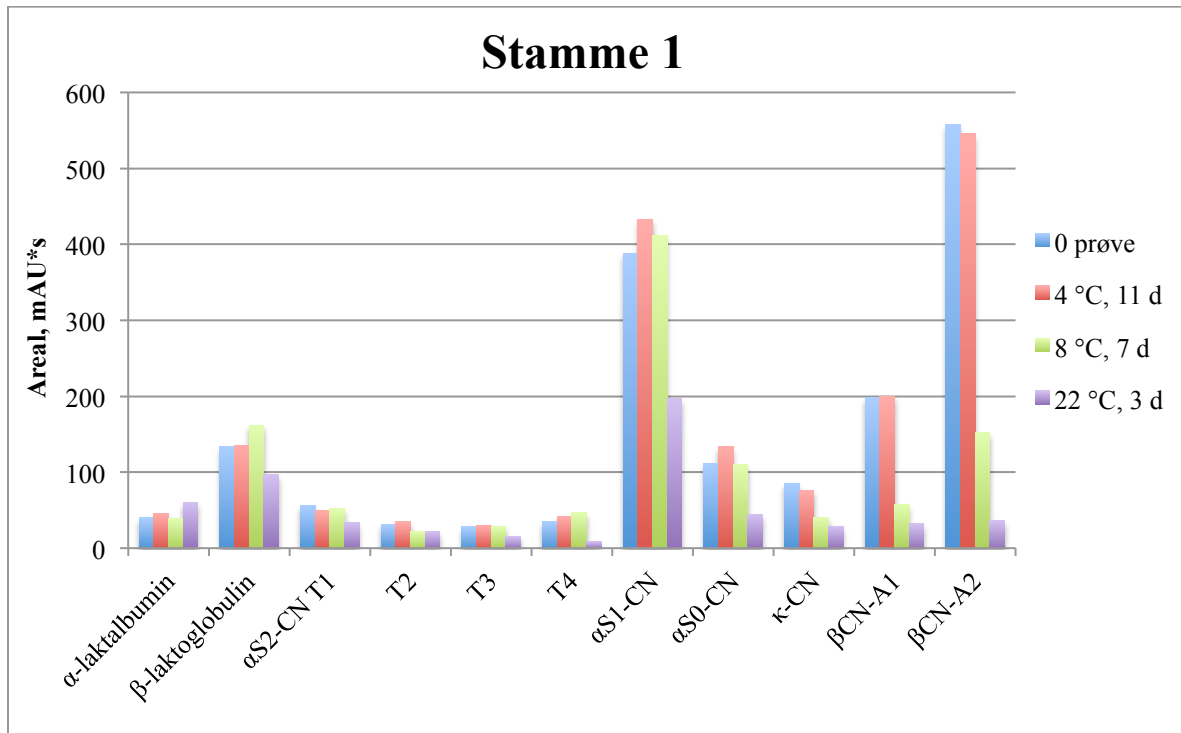
Ved hjelp av kapillærelektroforese ble proteinnedbrytning som følge av enzymatisk nedbrytning undersøkt. Prøver fra hele første forsøk og deler av forsøk 2 ble analysert. Det var ønskelig å avdekke om det skjedde en nedbrytning av de ulike melkeproteinene forårsaket av de seks stammene ved ulike temperaturer, og når en eventuell nedbrytning startet. De ulike toppene på kapillærelektroferogrammene ble integrert for å enklere kunne se om arealet på toppene hadde blitt redusert, og verdiene for hver stamme presenteres i stolpediagram. På kapillærelektroferogrammene er det zoomet inn på området av interesse, og x-aksen starter dermed ikke ved 0 minutter. Proteinene har blitt identifisert i henhold til toppene i **Figur 13**, og arealet på toppene skal gi en komparativ indikasjon av mengde av de ulike proteinene. Y-aksen viser absorbans, og mAU\*S indikerer milli absorbans enhet per sekund.



**Figur 13:** Kapillærelektroferogrammet for råmelk til ku (Heck et al. 2008). CN står for kasein. Fra venstre er myseprotein  $\alpha$ -laktalbumin og  $\beta$ -laktoglobulin illustrert, deretter kaseinfraksjonene  $\alpha_{S2}$ -,  $\alpha_{S1}$ - og  $\alpha_{S0}$ -kasein,  $\kappa$ -kasein, og  $\beta$ -kasein A1 og A2.  $\alpha_{S2}$ -kasein består av fire topper, og er merket som T1-T4 i stolpediagrammene.

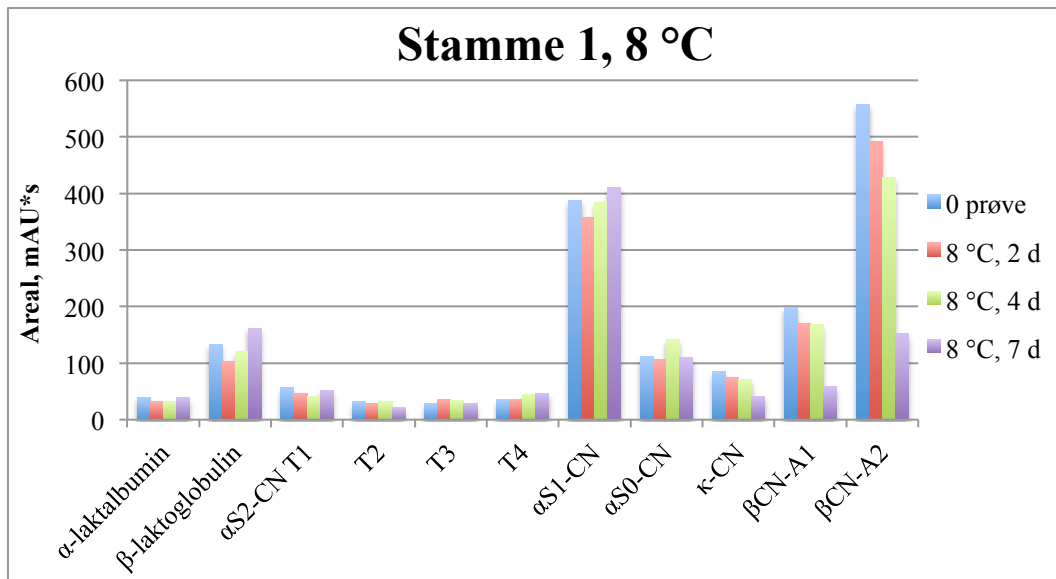
### 3.3.3.1 Stamme 1

Resultatene fra kapillærelektroforesen for stamme 1 er vist i **Figur 14-18**. For å se om det var ulik aktivitet ved de forskjellige temperaturene er resultatene sett opp mot hverandre. Se vedlegg for rådata.



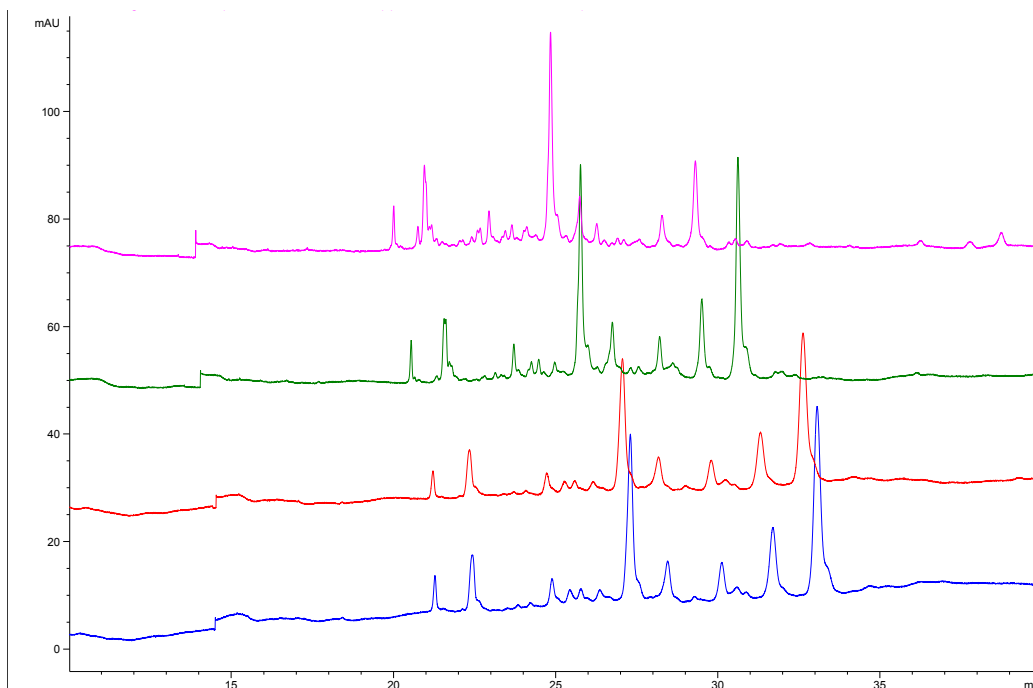
**Figur 14:** Integreert areal for hvert protein for stamme 1 fra 0-prøve og fra siste uttak ved hver temperatur. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 1. og 2. forsøk.

Resultatene fra stamme 1 (**Fig 14**) viste at det var liten aktivitet ved 4 og 8 °C, spesielt for myseproteinene. Etter inkubering i 7 døgn ved 8 °C var arealet for β-kasein A2 og α<sub>S1</sub>-kasein blitt betydelig redusert. Samtlige kaseiner ble nedbrutt etter inkubering ved 22 °C, spesielt α<sub>S1</sub>-kasein, β-kasein A1 og A2.



**Figur 15:** Integrert areal for hvert protein for stamme 1 fra 0-prøve til 7 dagers inkubering ved 8 °C. Resultatene for 2 døgn er basert på 1. gjentak, de andre verdiene er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

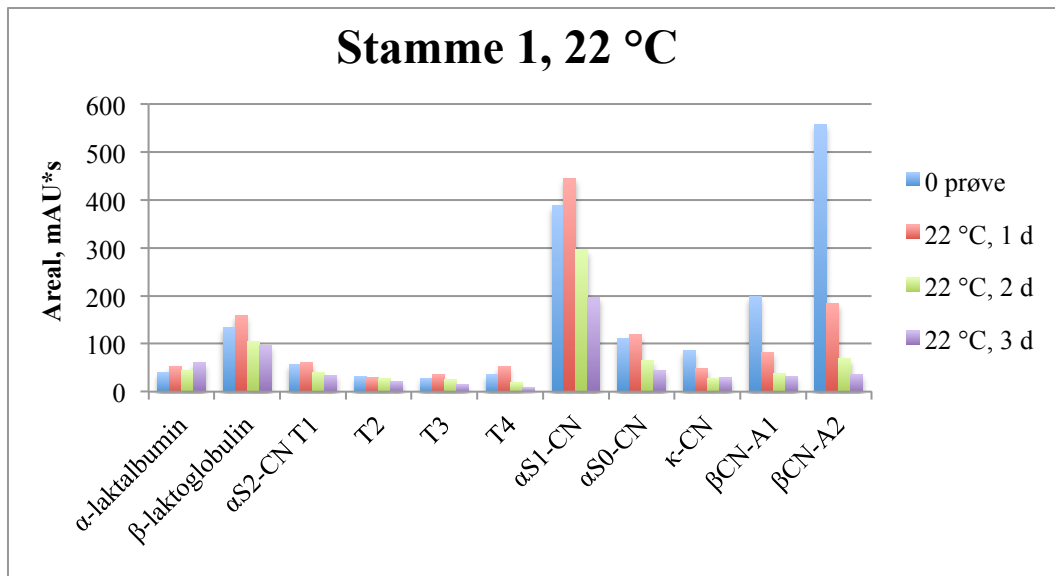
Resultatene i **Figur 15** for stamme 1 ved 8 °C viste at det skjedde tilsynelatende ingen nedbrytning av myseproteinene. For β-kasein A2 startet nedbrytningen etter 2 døgn, og etter 7 døgn ble kaseinene κ-kasein og β-kasein A1 påbegynt nedbrutt.



**Figur 16:** Kapillærelektroferogram for stamme 1 inkubert i UHT-melk ved 8 °C. Nederst vises 0-prøve, deretter 2, 4 og 7 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

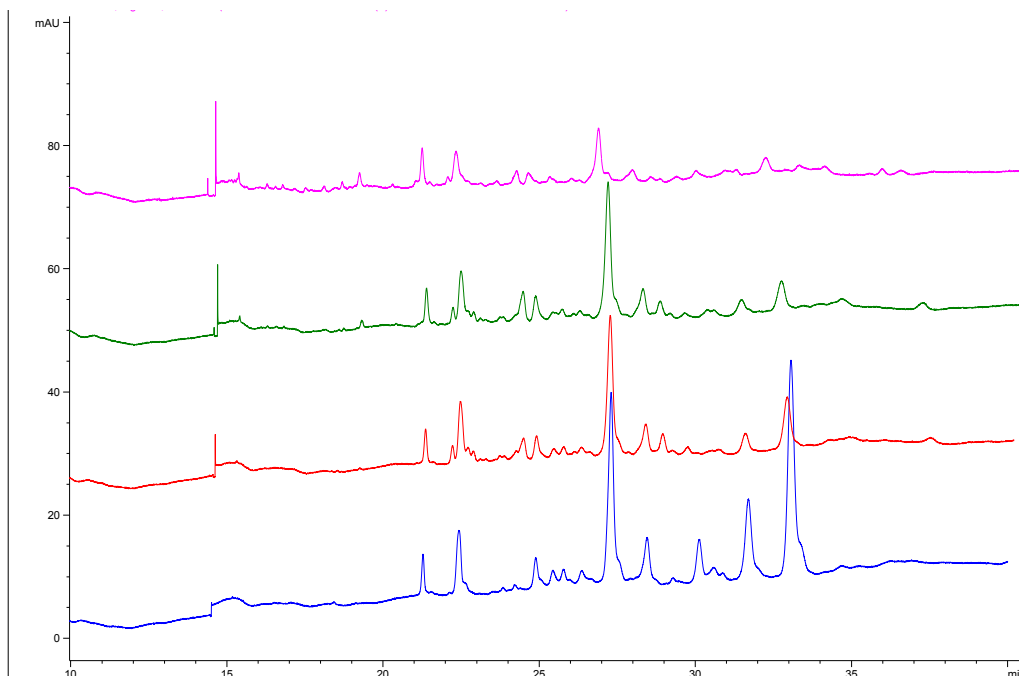
Nedbrytningen av β-kasein A2 er godt illustrert i kapillærelektroferogrammet i **Figur 16**.





**Figur 17:** Integrert areal for hvert protein for stamme 1 fra 0-prøve til 3 døgn inkubering i UHT-melk ved 22 °C. Resultatene er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

Resultatene i **Figur 17** for stamme 1 ved 22 °C viste at det skjedde en stor nedbrytning av kaseinene. For  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -kasein A1 og A2 startet nedbrytning allerede etter 1 døgn, men for  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\alpha_{S0}$ -kasein startet nedbrytningen etter 2 døgn. For myseproteinet  $\beta$ -laktoglobulin skjedde en svak nedbrytning, som var mest tydelig etter 3 døgn.

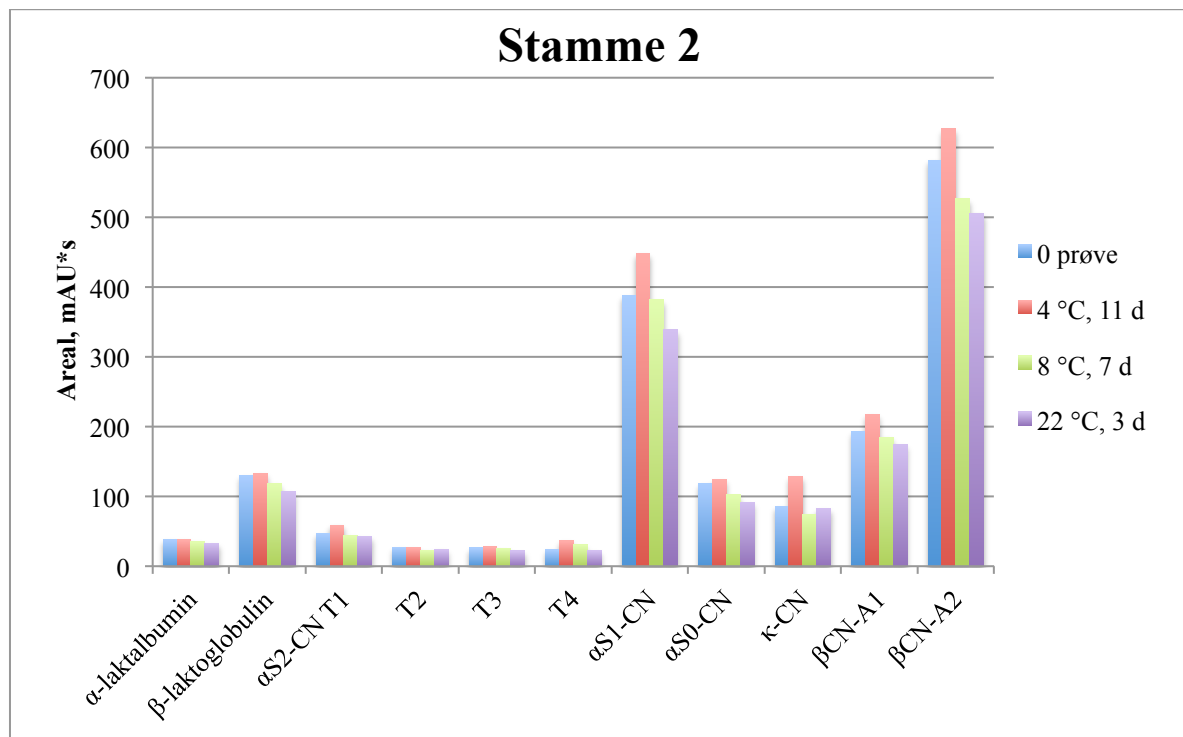


**Figur 18:** Kapillærelektroferogram for stamme 1 inkubert i UHT-melk ved 22 °C. Nederst vises 0-prøve, deretter 1, 2 og 3 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Nedbrytningen av kaseinene kommer godt frem i kapillærelektroferogrammet i **Figur 18**, da toppene har flatet ut etter 3 døgn med inkubering.

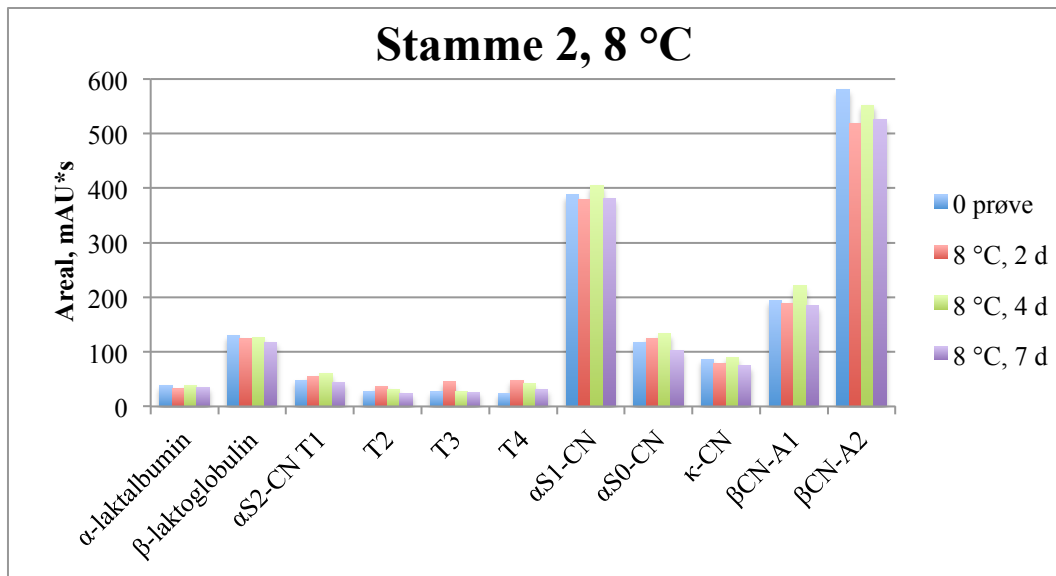
### 3.3.3.2 Stamme 2

Resultatene fra kapillærelektroforesen for stamme 2 er vist i **Figur 19-23**.



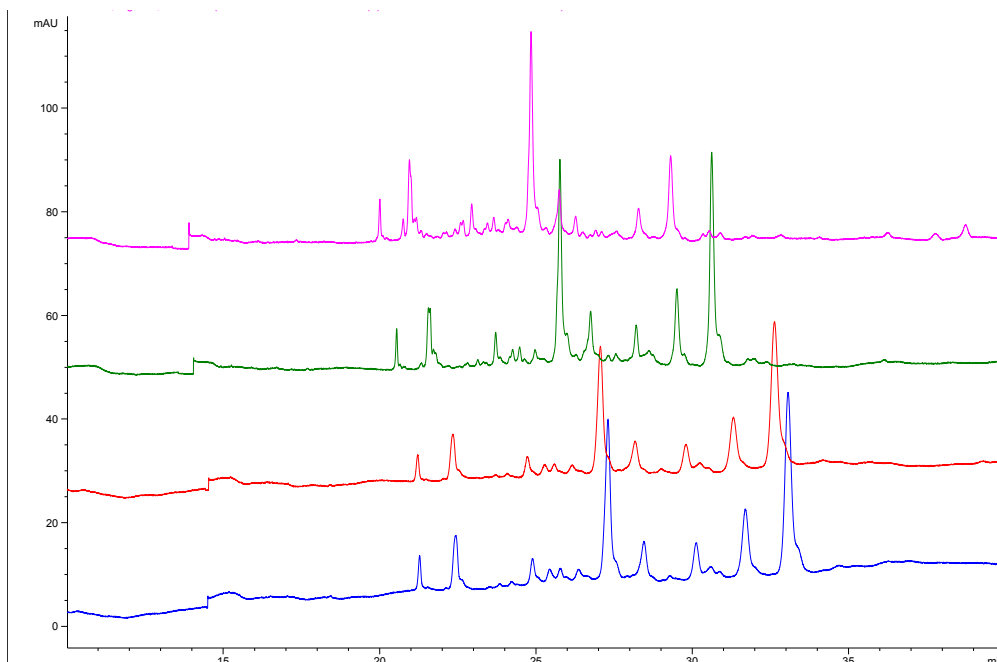
**Figur 19:** Integrert areal for hvert protein for stamme 2 fra 0-prøve, til siste uttak ved hver temperatur. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 1. og 2. forsøk.

Resultatene i **Figur 19** for stamme 2 viste ingen aktivitet etter 11 døgn inkubering ved 4 °C. Etter inkubering ved 8 °C hadde noen av kaseinene blitt nedbrutt etter 7 døgn, og det skjedde tilsynelatende ingen eller minimal nedbrytning av myseproteinene. Kaseinene  $\alpha$ S0-kasein,  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -kasein A1 viste en liten nedbrytning i forhold til innholdet i 0-prøven, men for  $\alpha$ S1-kasein og  $\beta$ -kasein A2 var det en mer tydelig nedbrytning.



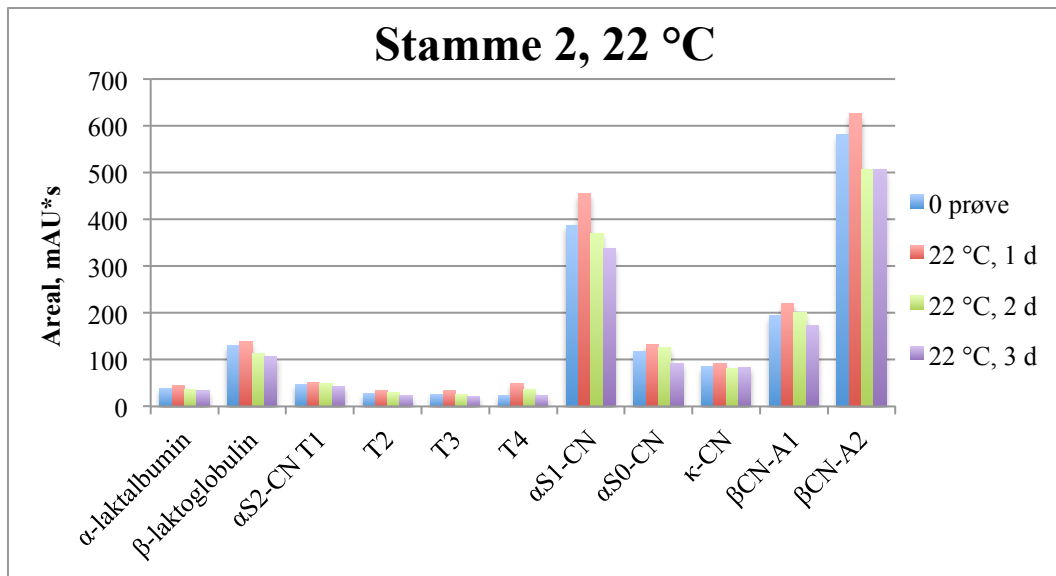
**Figur 20:** Integrert areal for hvert protein for stamme 2 fra 0-prøve til 7 døgn inkubering i UHT-melk ved 8 °C. Resultatene for 2 døgn er basert på 1 gjentak, de andre er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

Resultatene i **Figur 20** for stamme 2 etter inkubering ved 8 °C viste små tegn til nedbrytning. Myseproteinene holdt omtrent samme nivå og dette gjaldt også de fleste kaseinene. For β-kasein A2 skjedde det en liten nedbrytning fra et areal på 581,5 i 0-prøven til 526,5 etter 7 døgn.



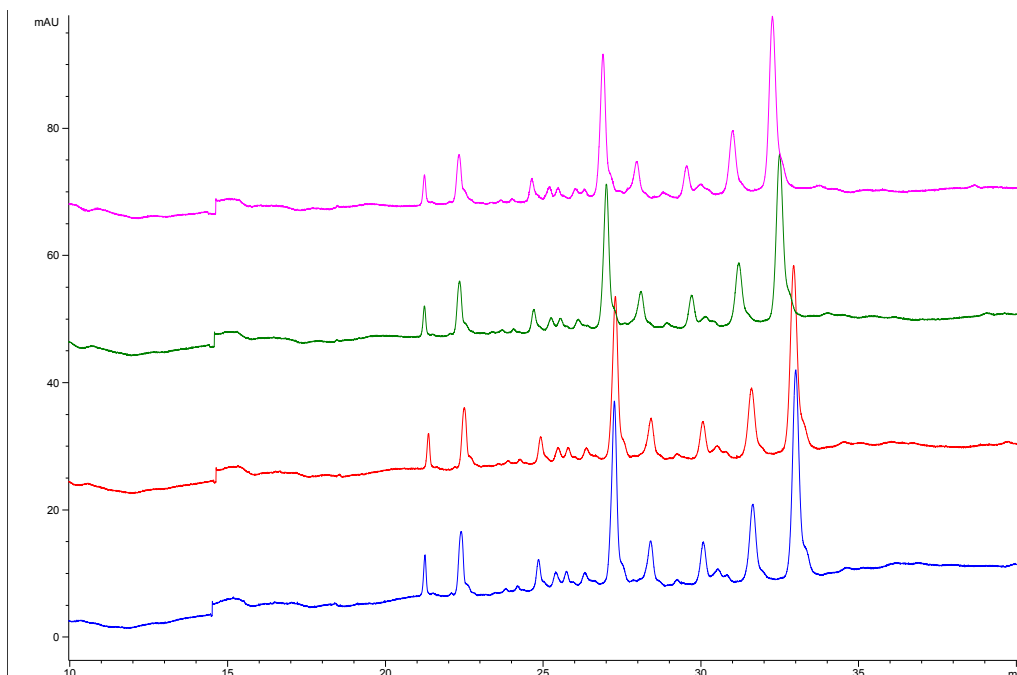
**Figur 21:** Kapillærelektroferogram for stamme 2 inkubert i UHT-melk ved 8 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 2, 4 og 7 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Kapillærelektroferogrammet i **Figur 21** viser en nedbrytning for β-kasein A2, noe som ikke kom like tydelig frem i figur 20.



**Figur 22:** Integrert areal for hvert protein for stamme 2 fra 0-prøve til 3 døgn inkubering i UHT-melk ved 22 °C. Resultatene er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

**Figur 22** viser tilsynelatende ingen nedbrytning av myseprotein for stamme 2 etter inkubering ved 22 °C. For kaseinene  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\beta$ -kasein A2 startet en nedbrytning etter 2 døgn og for  $\alpha_{S0}$ -kasein og  $\beta$ -kasein A1 startet nedbrytningen etter 3 døgn.  $\kappa$ -kasein holdt seg ganske stabil.

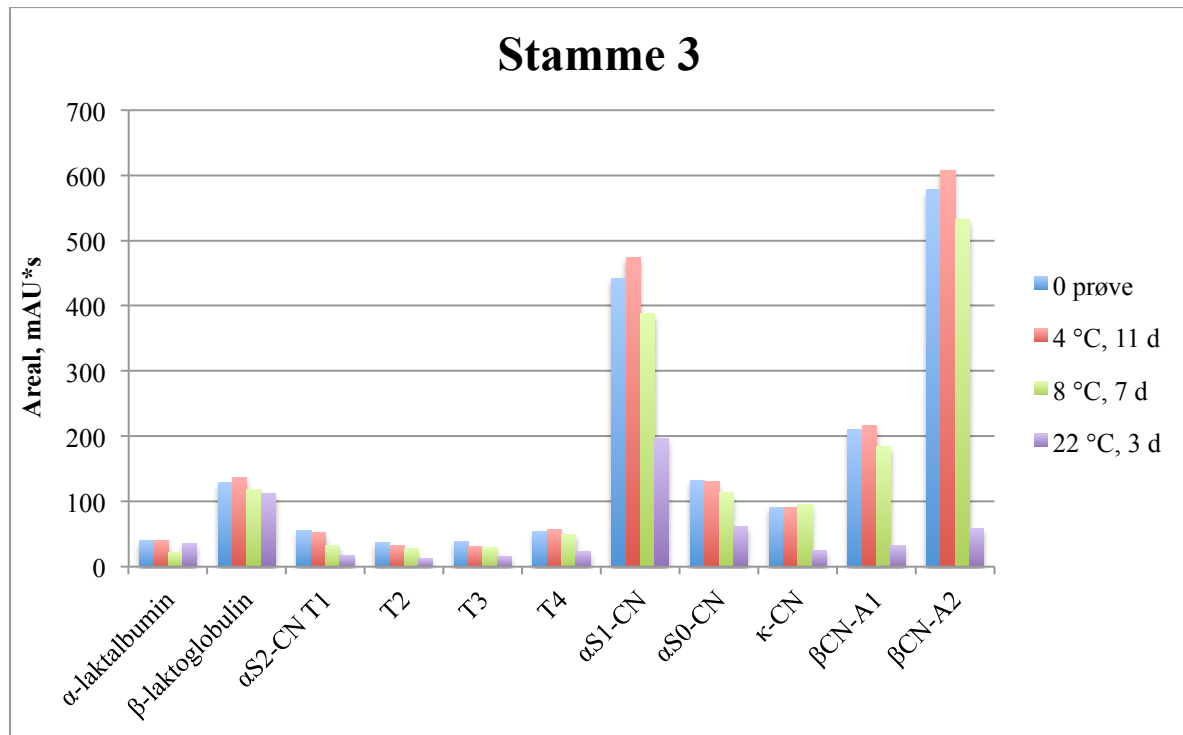


**Figur 23:** Kapillærelektroferogram for stamme 1 inkubert i UHT-melk ved 22 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 1, 2 og 3 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Resultatene i kapillærelektroferogrammet i **Figur 23** viser ingen tydelig nedbrytning.

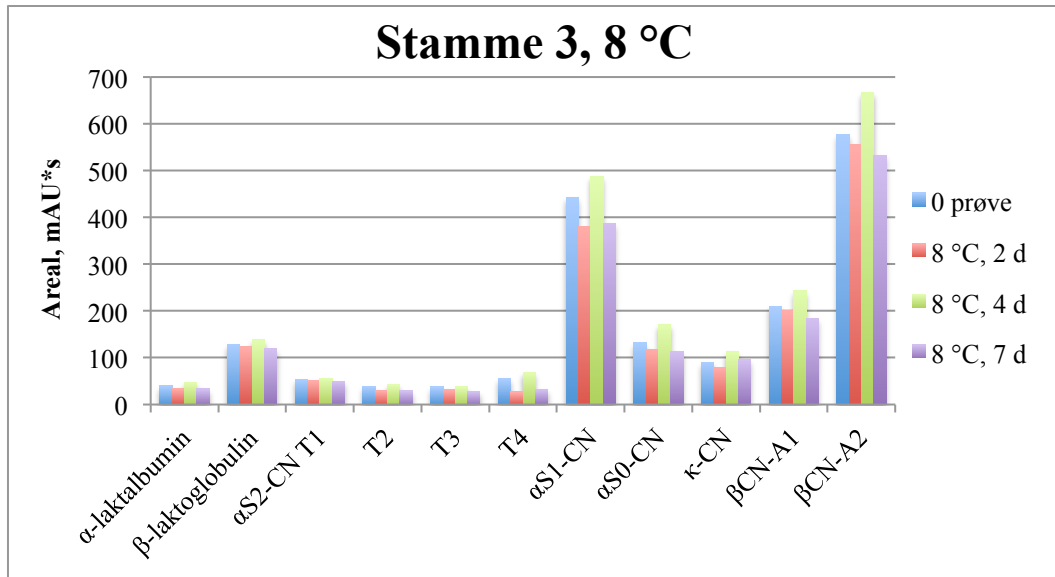
### 3.3.3.3 Stamme 3

Resultatene for stamme 3 er vist i **Figur 24-28**.



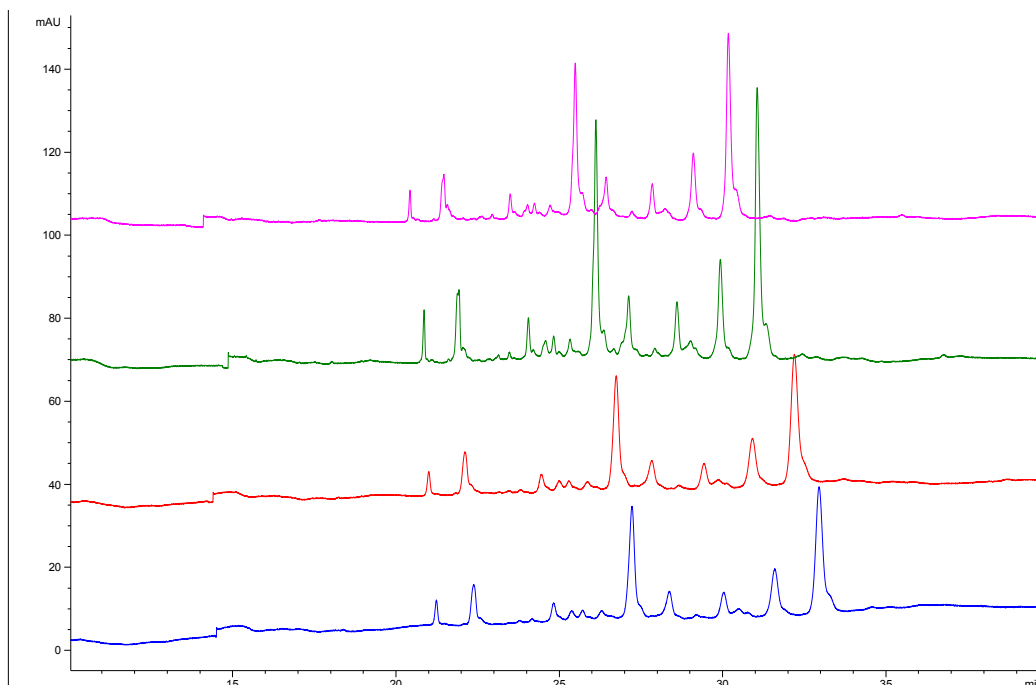
**Figur 24:** Integrert areal for hvert protein for stamme 3 fra 0-prøve, til siste uttak ved hver temperatur. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 1. og 2. forsøk.

Resultatene i **Figur 24** for stamme 3 viser en liten aktivitet etter inkubering ved 4 °C. Etter inkubering ved 8 °C skjedde en nedbrytning av kaseinene  $\alpha$ <sub>S1</sub>-kasein og  $\beta$ -kasein A2 etter 7 døgn med inkubering. Etter inkubering ved 22 °C hadde alle kaseinene blitt tydelig degradert, spesielt  $\alpha$ <sub>S1</sub>-kasein,  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -kasein A1 og A2.



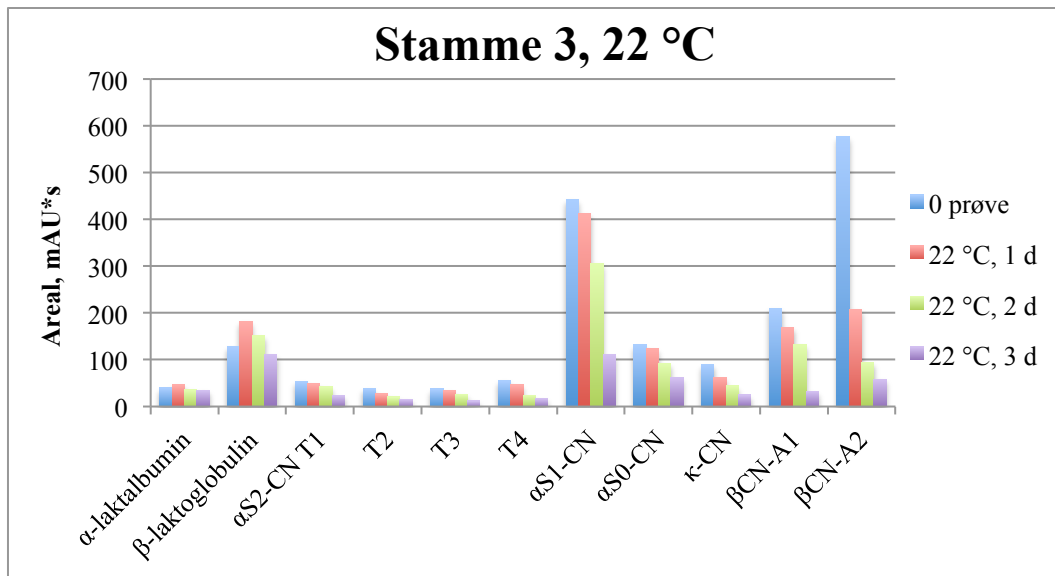
**Figur 25:** Integrert areal for hvert protein for stamme 3 fra 0-prøve til 7 døgn inkubering i UHT-melk ved 8 °C. Resultatene for 2 døgn er basert på 1 gjentak, de andre er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

For stamme 3 viser resultatene i **Figur 25** tilsynelatende ingen nedbrytning av myseproteinene etter inkubering ved 8 °C. Når det gjaldt kasein oppstod en nedbrytning etter 2 døgn, som ble mer tydelig etter 7 døgn. Det finnes ingen forklaring på hvorfor arealet ble større etter 4 døgn, men trenden indikerer at arealet ble mindre.



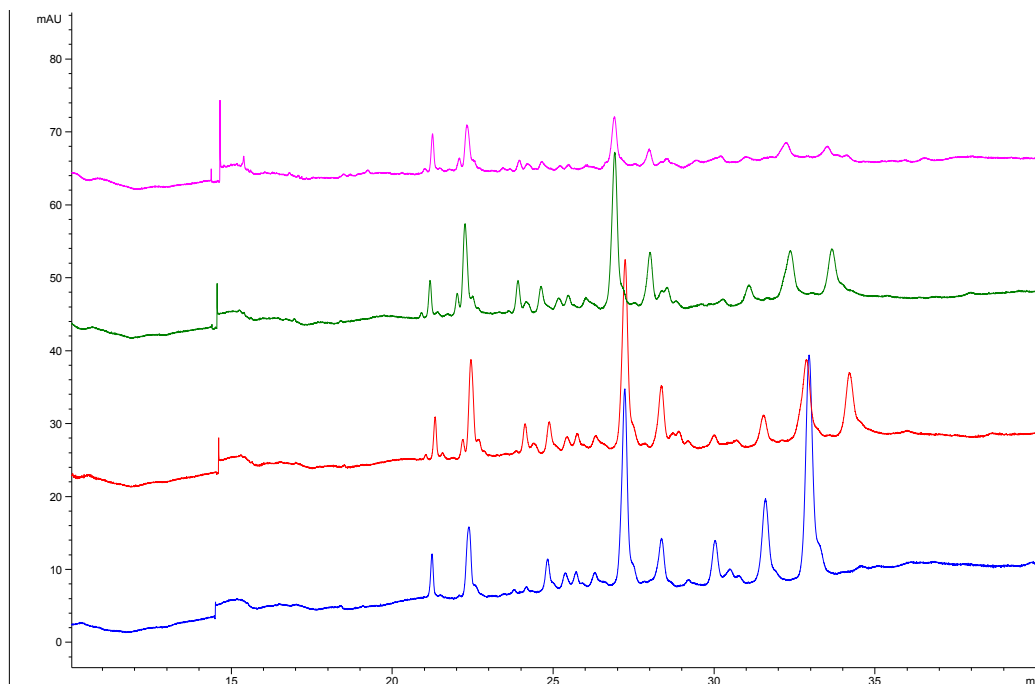
**Figur 26:** Kapillærelektroferogram for stamme 3 inkubert i UHT-melk ved 8 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 2, 4 og 7 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Kapillærelektroferogrammet (**Fig 26**) viser ingen tydelig nedbrytning av proteinene.



**Figur 27:** Integrert areal for hvert protein for stamme 3 fra 0-prøve til 3 døgn inkubering i UHT-melk ved 22 °C. Resultatene er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

Resultatene for stamme 3 i **Figur 27** viste en stor nedbrytning av alle kasein etter 3 døgn inkubering ved 22 °C. For β-kasein A2 var over halve arealet redusert allerede etter 1 døgn. For myseproteinene viste resultatene en svak nedbrytning.

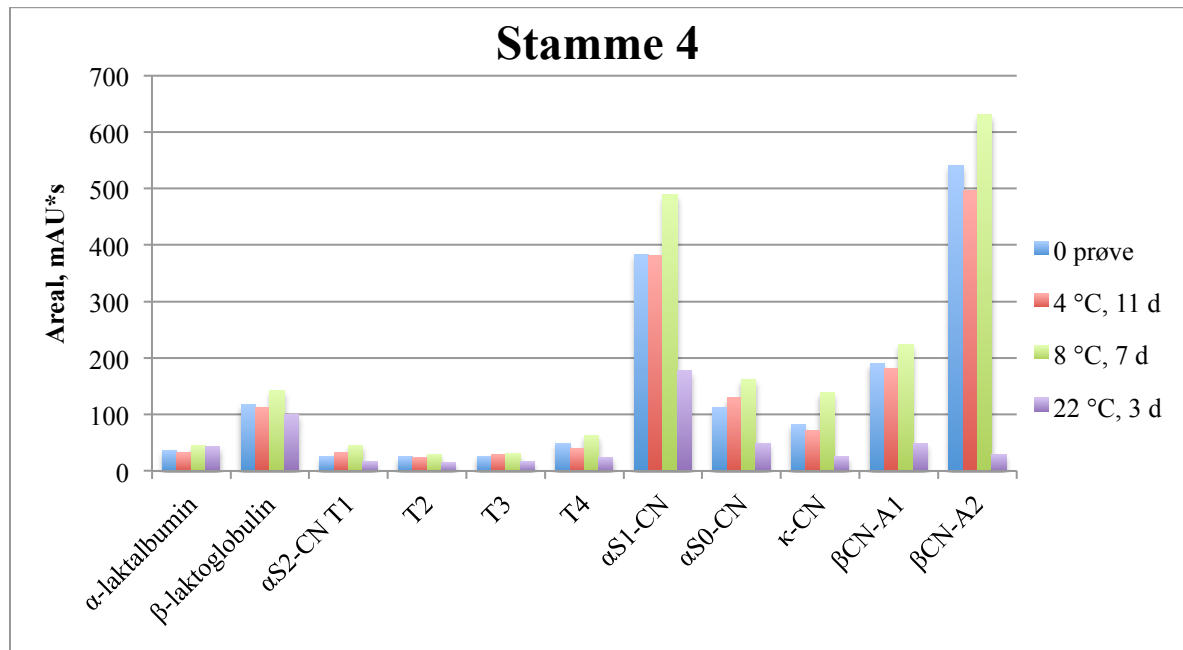


**Figur 28:** Kapillærelektroferogram for stamme 3 inkubert i UHT-melk ved 22 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 1, 2 og 3 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Resultatene i **Figur 28** illustrerer godt nedbrytningen av kasein da toppene er tydelig redusert etter 3 døgn ved inkubering.

### 3.3.3.4 Stamme 4

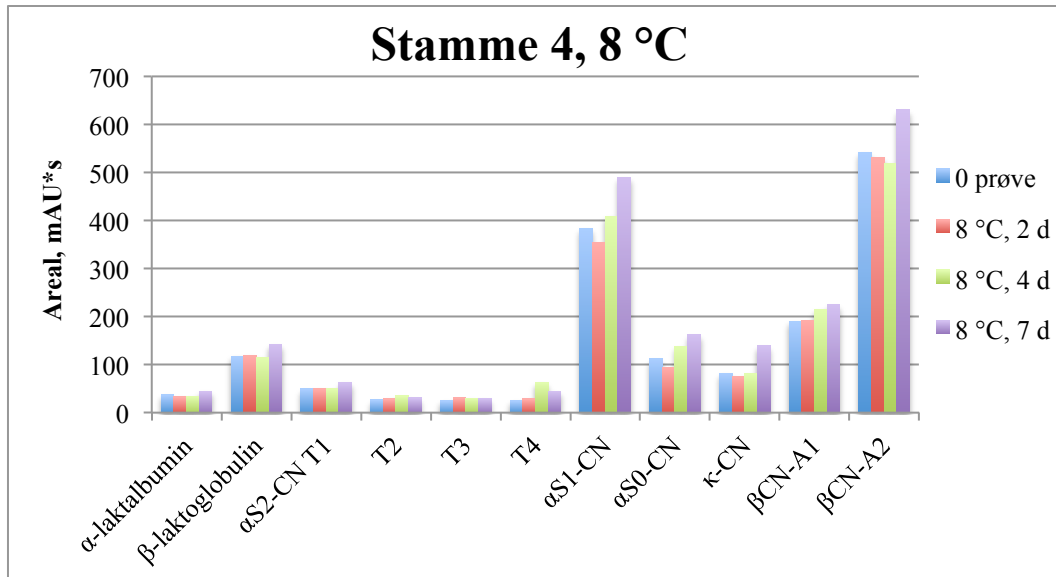
For stamme 4 er resultatene for analyse av proteinnedbrytning presentert i **Figur 29-33**.



**Figur 29:** Integrert areal for hvert protein for stamme 4 fra 0-prøven til siste uttak ved hver temperatur. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 1. og 2. forsøk.

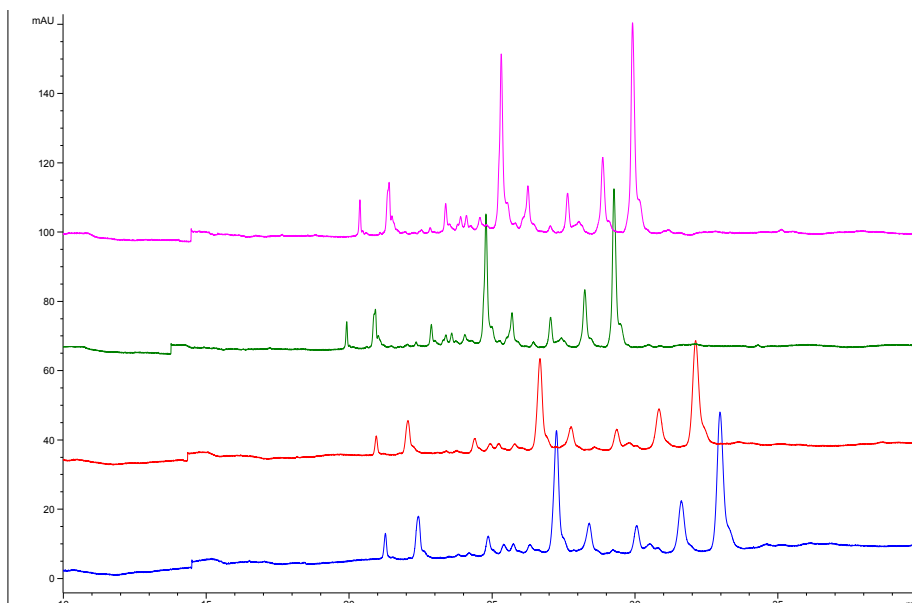
Når det gjelder stamme 4 viste **Figur 29** en liten effekt på myseproteinene. Når det gjaldt kaseinene etter inkubering ved 4 °C skjedde det en liten nedbrytning på β-kasein A2, og utenom dette ble ikke de andre kaseinene betydelig nedbrutt ved samme temperatur. Etter inkubering ved 8 °C kunne det se ut som at arealet ble større, men trendene viste at arealet går ned. Ved 22 °C har det skjedd en tydelig nedbrytning av kaseinene, spesielt for κ-kasein, β-kasein A1 og A2.





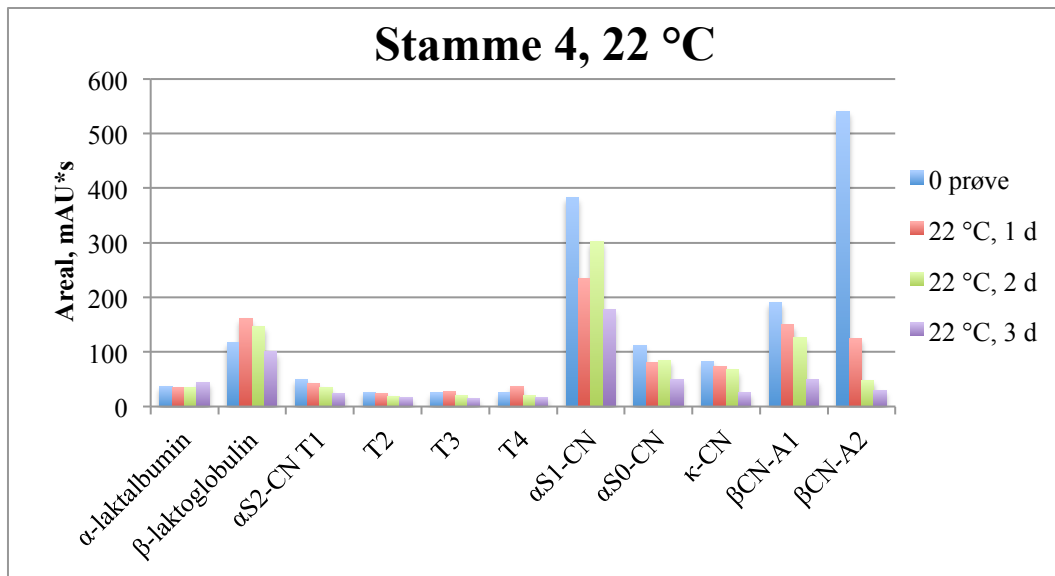
**Figur 30:** Integrert areal for hvert protein for stamme 4 fra 0-prøve til 7 døgn inkubering i UHT-melk ved 8 °C. Resultatene for 2 døgn er basert på 1 gjentak, de andre er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

**Figur 30** viser at myseproteinene i melken ikke ser ut til å ha blitt påvirket av stamme 4 under 8 °C inkubering. Det kan se ut som at arealet har blitt større for de fleste prøver etter 7 dager, men dette er noe usannsynlig og trenden viser at arealet har gått ned. Allerede etter 2 døgn med inkubering hadde  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S0}$ -kasein,  $\kappa$ -kasein og  $\beta$ -kasein A2 blitt påbegynt degradert. For  $\beta$ -kasein A2 fortsatte denne degraderingen etter 4 døgn, før den tilsynelatende gikk opp etter 7 døgn, noe som ikke er sannsynlig.



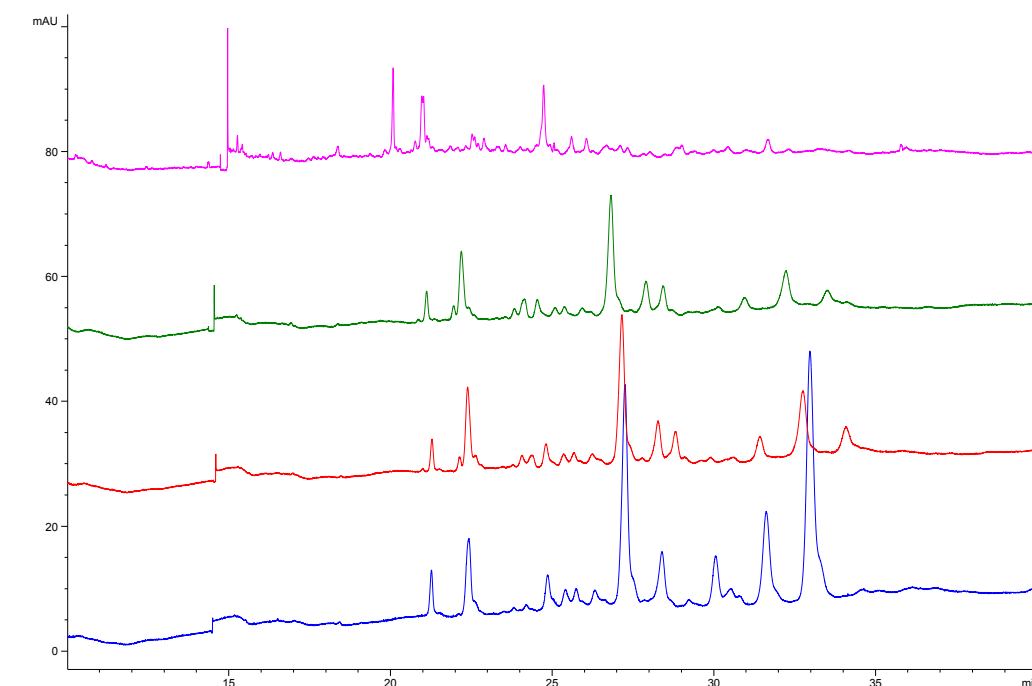
**Figur 31:** Kapillærelektroferogram for stamme 4 inkubert i UHT-melk ved 8 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 2, 4 og 7 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Resultatene i **Figur 31** viser ingen tydelig nedbrytning.



**Figur 32:** Integrert areal for hvert protein for stamme 4 fra 0-prøve til 3 døgn inkubering i UHT-melk ved 22 °C. Resultatene er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

**Figur 32** viser at kaseinene i UHT-melken ble nedbrutt noe som viser stor aktivitet under inkubering ved 22 °C. Nedbrytningen startet allerede etter 1 døgn, og spesielt tydelig for β-kasein A2 etter 3 døgn. Myseproteinene viste en veldig svak nedbrytning.

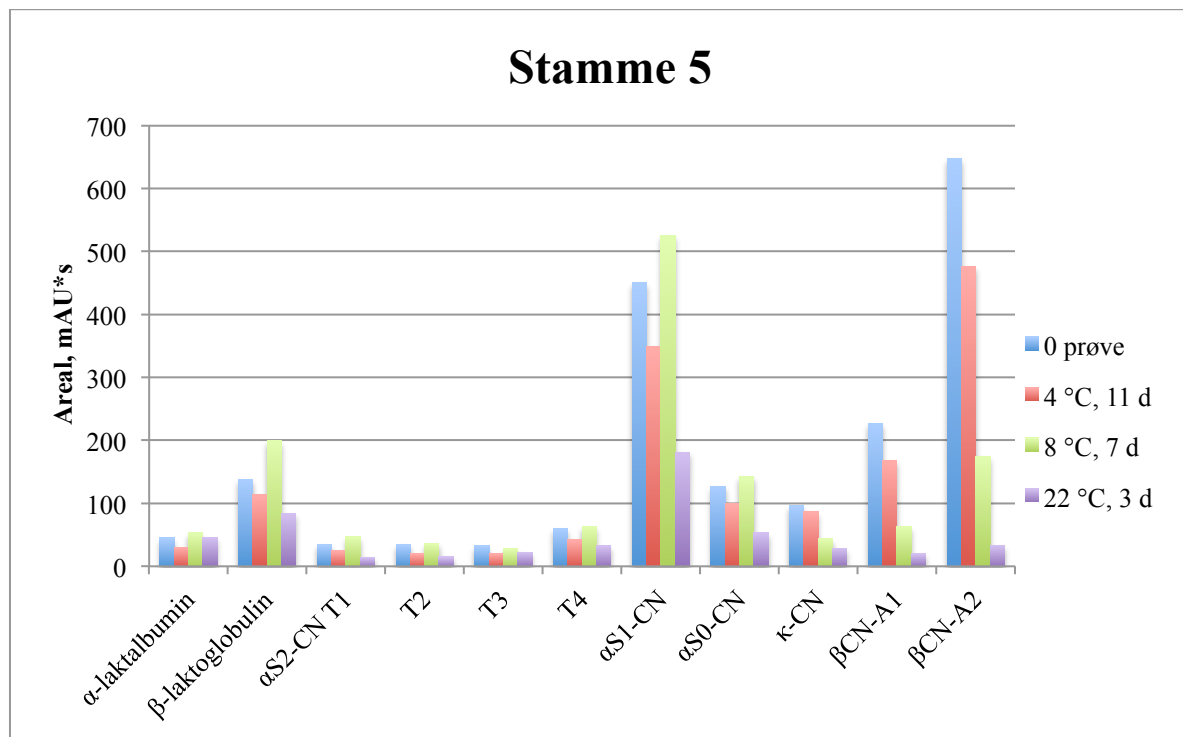


**Figur 33:** Kapillærelektroferogram for stamme 4 inkubert i UHT-melk ved 22 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 1, 2 og 3 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Kapillærelektroferogrammet (**Fig 33**) illustrer tydelig en nedbrytning da toppene ble redusert ved inkubering over tid.

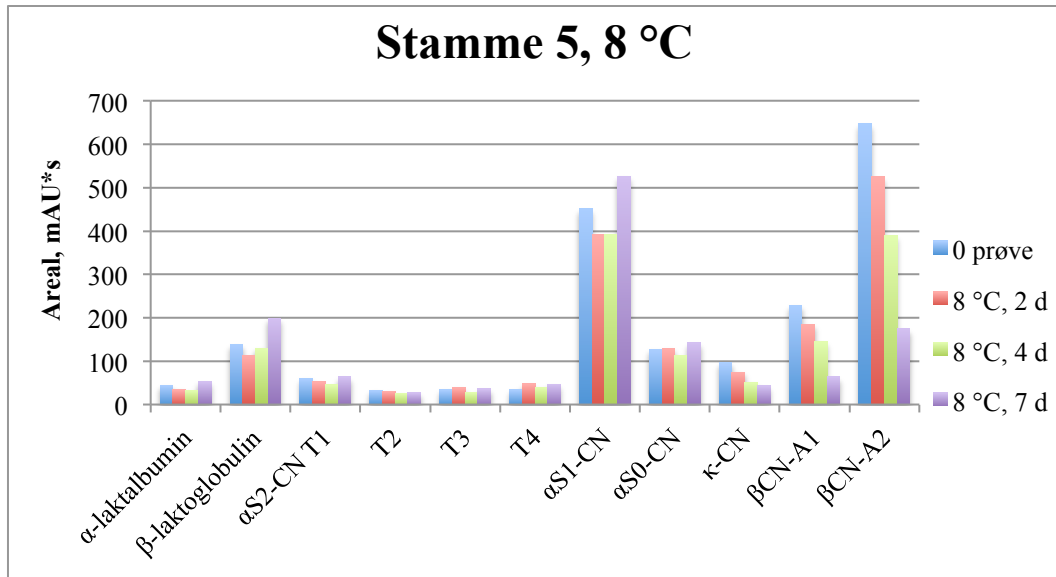
### 3.3.3.5 Stamme 5

Resultatene for proteinnedbrytning for stamme 5 er vist i **Figur 34-38**.



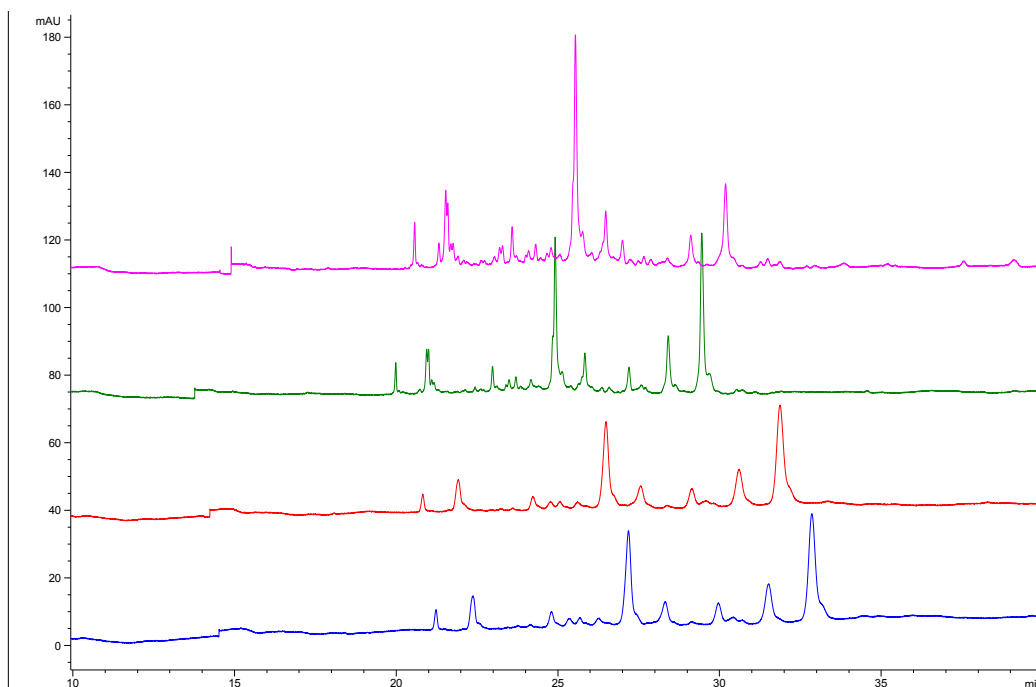
**Figur 34:** Integrert areal for hvert protein for stamme 5 fra 0-prøve til siste uttak ved hver temperatur. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 1. og 2. forsøk.

**Figur 34** illustrerer en nedbrytning av kaseinene etter 11 dagers inkubering ved 4 °C, spesielt for  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\beta$ -kasein A2. Etter inkubering i 7 dager ved 8 °C har  $\beta$ -kasein A2 blitt ytterligere redusert. Blant noen av resultatene fra 8 °C kan det se ut som at arealet ble større, dette er noe usannsynlig og trendene viser at arealet gikk ned. Samtlige kaseiner ble nedbrutt etter 3 døgn under inkubering ved 22 °C, og dette gjaldt spesielt for  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\beta$ -kasein A1 og A2.



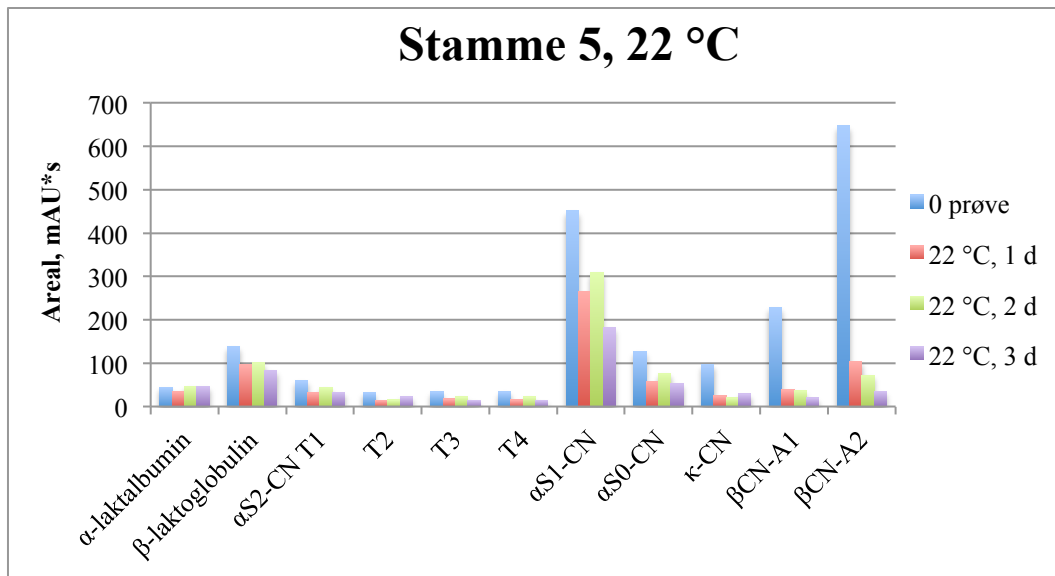
**Figur 35:** Integrert areal for hvert protein for stamme 5 fra 0-prøve til 7 døgn inkubering i UHT-melk ved 8 °C. Resultatene for 2 døgn er basert på 1 gjentak, de andre er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

Resultatene i **Figur 35** viste liten aktivitet når det gjaldt myseproteinene. Inkubering i 2 døgn hadde spesielt en effekt på kaseinene  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -kasein A1 og A2. De tre sistnevnte ble ytterligere nedbrutt etter 4 og 7 døgn inkubering.



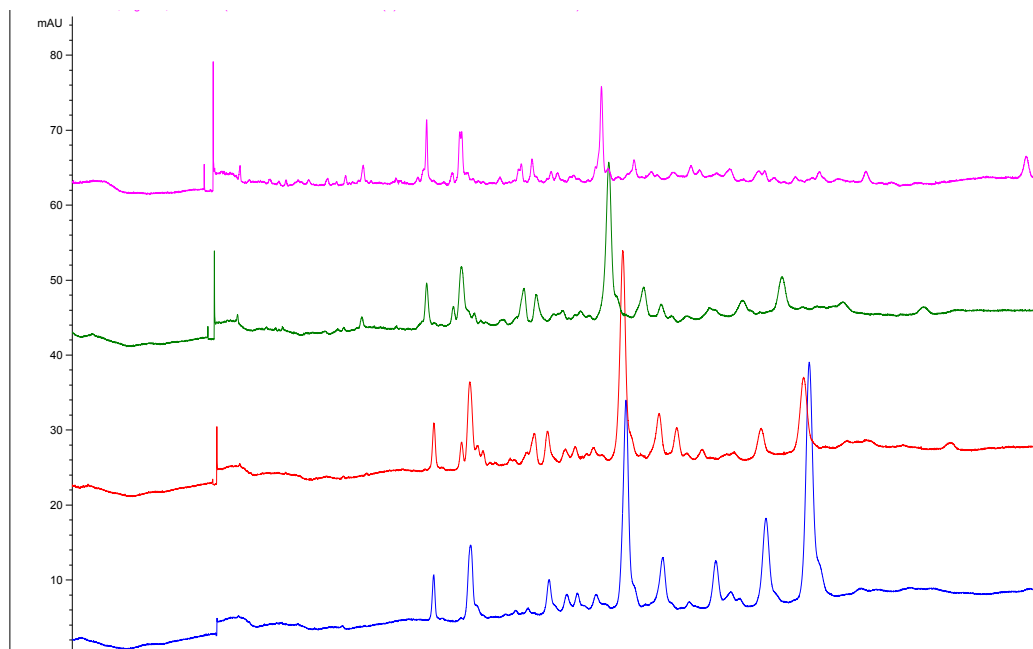
**Figur 36:** Kapillærelektroferogram for stamme 5 inkubert i UHT-melk ved 8 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 2, 4 og 7 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

**Figur 36** illustrerer en tydelig nedbrytning etter 7 døgn inkubering da toppene ble redusert.



**Figur 37:** Integrert areal for hvert protein for stamme 5 fra 0-prøve til 3 døgn inkubering i UHT-melk ved 22 °C. Resultatene er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

**Figur 37** viser en svak nedbrytning hos myseproteinene. Når det gjaldt kaseinene hadde samtlige blitt påbegynt degradert etter 1 døgn. Arealet for β-kasein A2 gikk fra 647,5 i 0-prøven til 104,5 etter 1 døgn. Den største degraderingen skjedde etter 1 døgn for alle kaseinene.

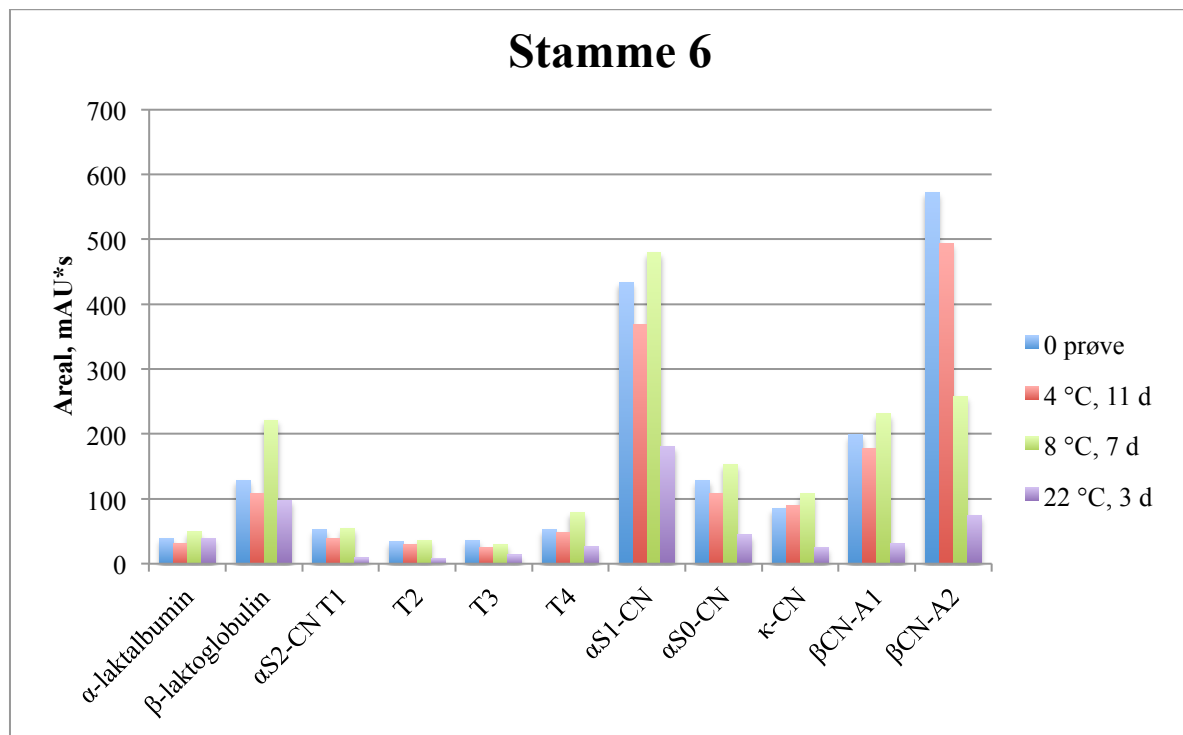


**Figur 38:** Kapillærelektroferogram for stamme 5 inkubert i UHT-melk ved 22 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 1, 2 og 3 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

I **Figur 38** kommer en nedbrytning tydelig frem da en gradvis redusering av toppene ble illustrert.

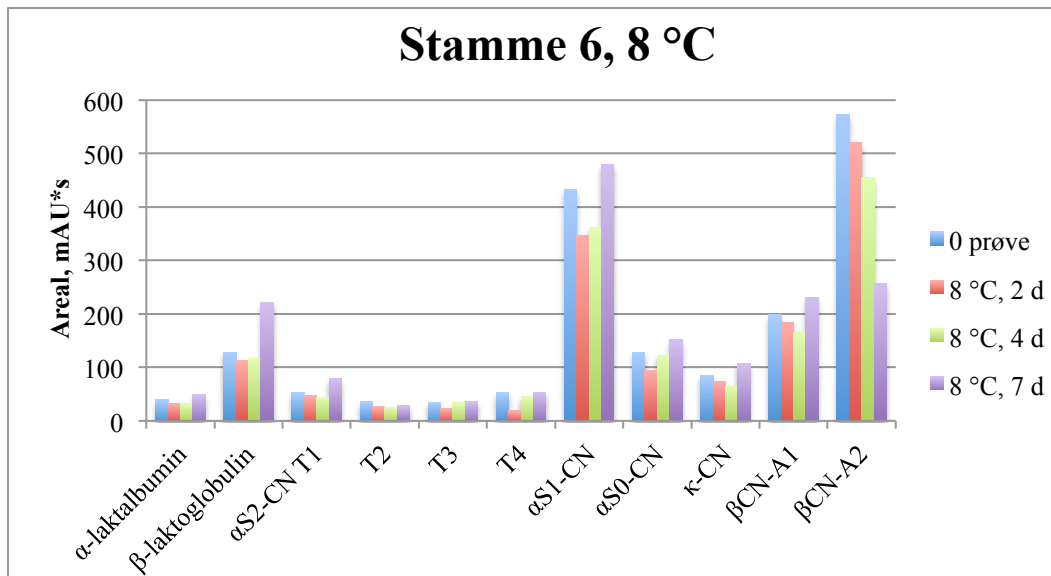
### 3.3.3.6 Stamme 6

Resultatene for proteinnedbrytning for stamme 6 er vist i **Figur 39-43**.



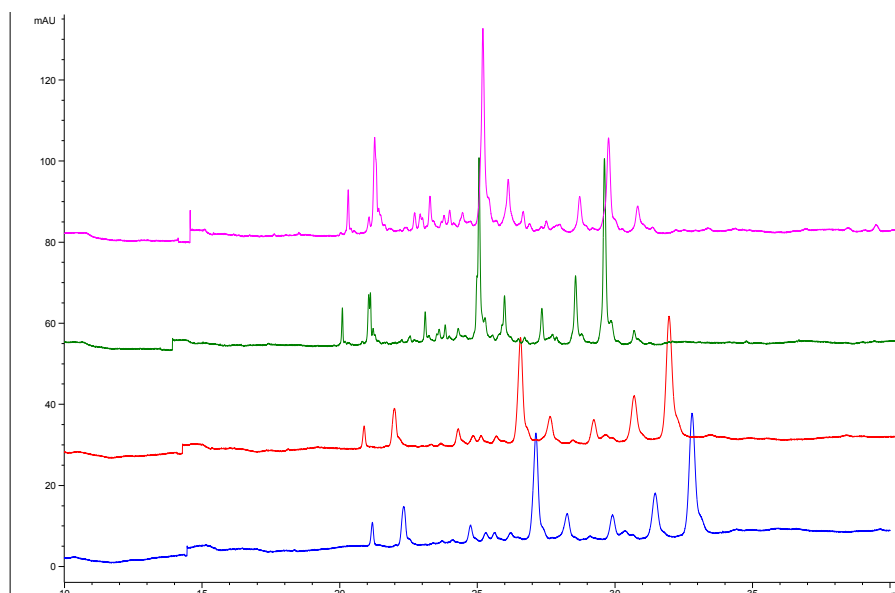
**Figur 39:** Integrert areal for hvert protein for stamme 6 fra 0-prøve til siste uttak ved hver temperatur. Resultatene er gjennomsnittsverdier fra 1. og 2. forsøk.

Resultatene i **Figur 39** viser at det under inkubering ved 4 °C skjedde en liten degradering av alle myseprotein og kasein, bortsett fra κ-kasein. Etter inkubering ved 8 °C ble det observert en betydelig økning i degradering, for eksempel var arealet for β-kasein A2 halvert etter 7 døgns inkubering. For noen av resultatene fra 8 °C kan det se ut som at arealet gikk opp, men trenden viser at arealet gikk ned. Etter inkubering ved 22 °C hadde alle kaseinene blitt redusert, spesielt κ-kasein, β-kasein A1 og A2.



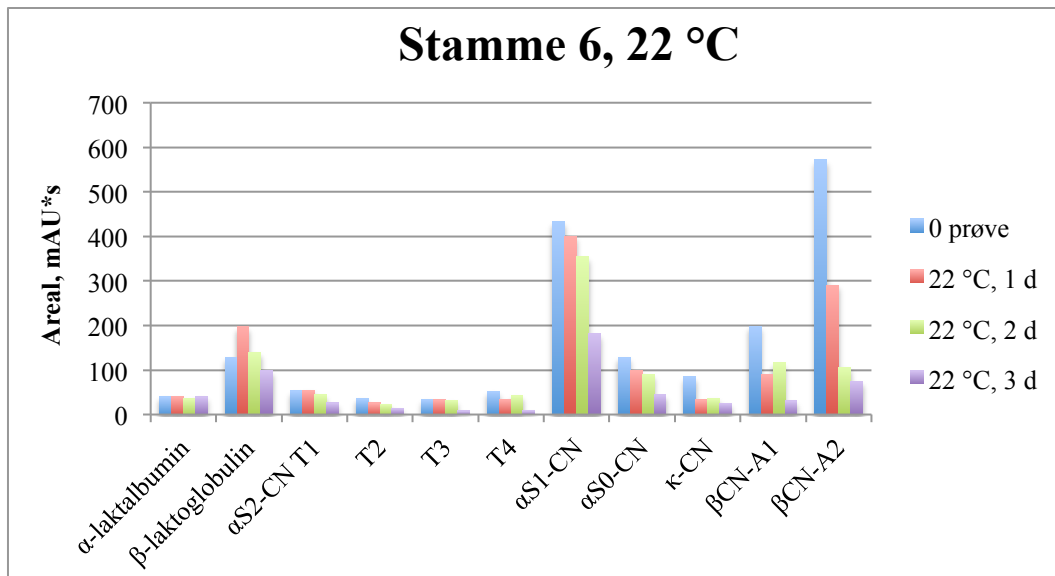
**Figur 40:** Integrrert areal for hvert protein for stamme 6 fra 0-prøve til 7 døgn inkubering i UHT-melk ved 8 °C. Resultatene for 2 døgn er basert på 1 gjentak, de andre er gjennomsnittsverdier for forsøk 1 og 2.

Stamme 6 i **Figur 40** hadde liten innvirkning på myseproteinene under inkubering ved 8 °C. Det kan se ut som at arealet steg etter 7 dager. Når det gjelder kaseinene hadde de blitt degradert allerede etter 2 døgn med inkubering. Etter 7 dager var det kun β-kasein A2 som ble ytterligere redusert.



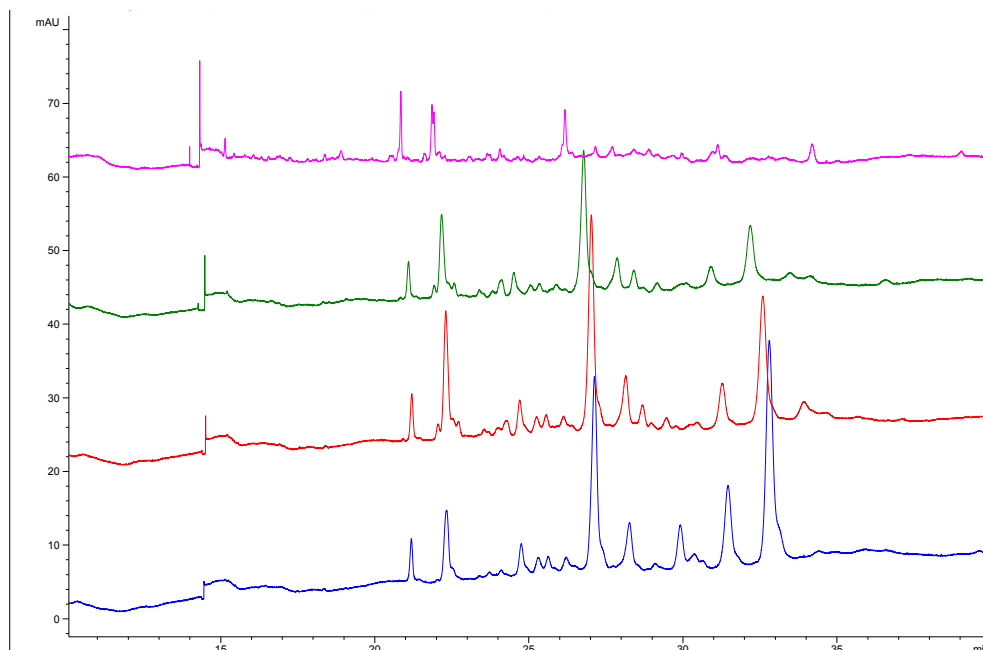
**Figur 41:** Kapillærelektroferogram for stamme 6 inkubert i UHT-melk ved 8 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 2, 4 og 7 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Resultatene i **Figur 41** illustrerer en reduksjon av toppene med lengde på inkubering.



**Figur 42:** Integrert areal for hvert protein for stamme 6 fra 0-prøve til 3 døgn inkubering i UHT-melk ved 22 °C. Resultatene for 1 døgn er basert på én verdi fra forsøk 1, de andre er gjennomsnittsverdier fra forsøk 1 og 2.

Når det gjaldt myseproteinene hadde stamme 6 i **Figur 42** liten innvirkning, men det ble observert en liten nedbrytning av β-laktoglobulin. Kaseinene derimot ble betydelig degradert av stamme 6. Nedbrytningen startet allerede etter 1 døgn, og arealet ble halvert for β-kasein A2 i løpet av det første døgnet. Etter 3 døgn var samtlige kasein redusert med over halve arealet.



**Figur 43:** Kapillærelektroferogram for stamme 6 inkubert i UHT-melk ved 22 °C. Nederst er 0-prøve, deretter 1, 2 og 3 døgn øverst. Resultatene er basert på én verdi fra første forsøk.

Resultatene i **Figur 43** viser en nedbrytning av samtlige kaseiner under inkuberingen.



### Oppsummering proteinnedbrytning:

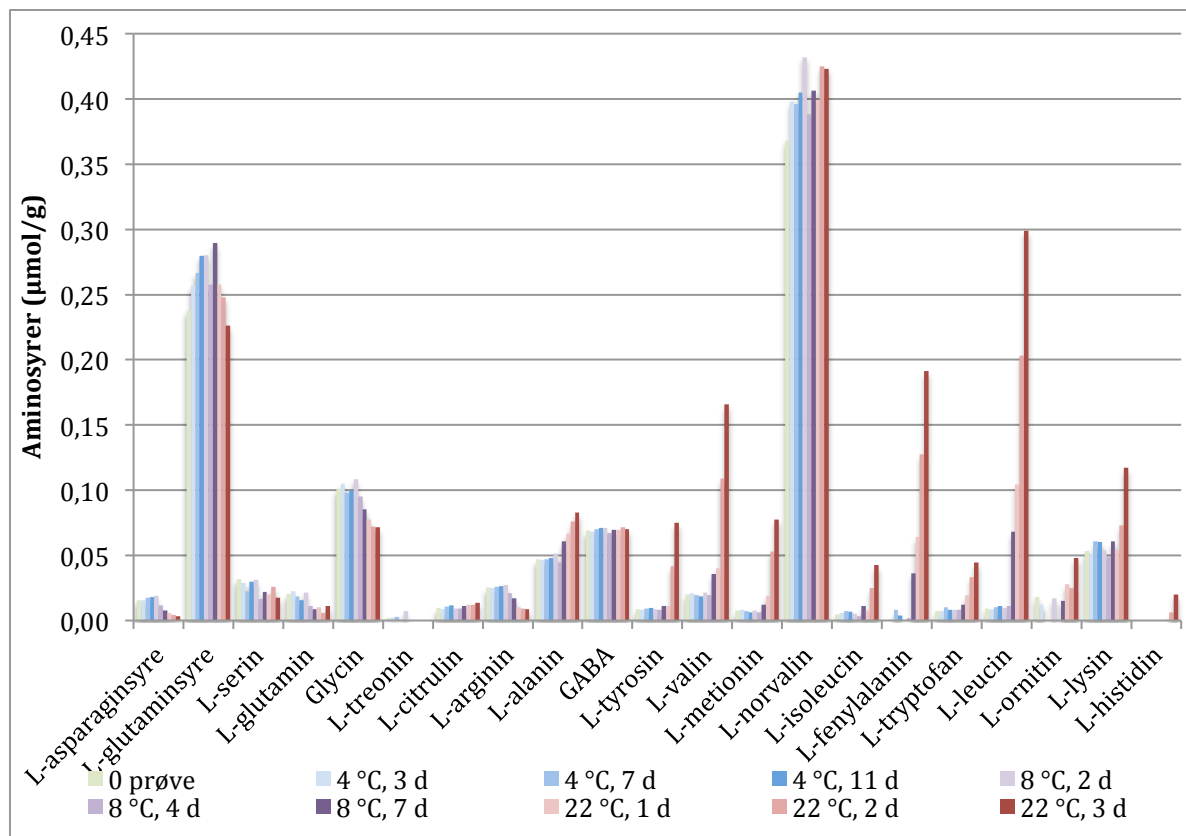
Det var omtrent ingen tegn til effekt etter inkubering ved 4 °C etter 11 dager. Etter inkubering ved 8 °C var effekten varierende i forhold til stamme og proteintype, og stamme 2 var mindre proteolytisk sammenlignet med de andre stammene. Det var generelt lite innvirkning på myseproteinene uavhengig av stamme og temperatur, og det var kaseinene som var mest utsatt. Spesielt  $\beta$ -kasein A2 ble mest angrepet, men også  $\beta$ -kasein A1 ble nedbrutt etter inkubering ved 22 °C.

Etter inkubering ved 8 °C hadde stamme 1 og 5 den største effekten på kaseinene  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -kasein A1 og A2, og i tillegg stamme 6 for  $\beta$ -kasein A2. Stamme 2, 3 og 4 hadde mindre effekt på kaseinene etter inkubering ved 8 °C. Det er vanskelig å si noe sikkert om  $\alpha_{S1}$ -kasein da arealet ble redusert etter 2 og 4 døgn for stamme 5 og 6, men etter 7 døgn var arealet større enn i utgangspunktet. Trenden viste likevel at arealet ble redusert.

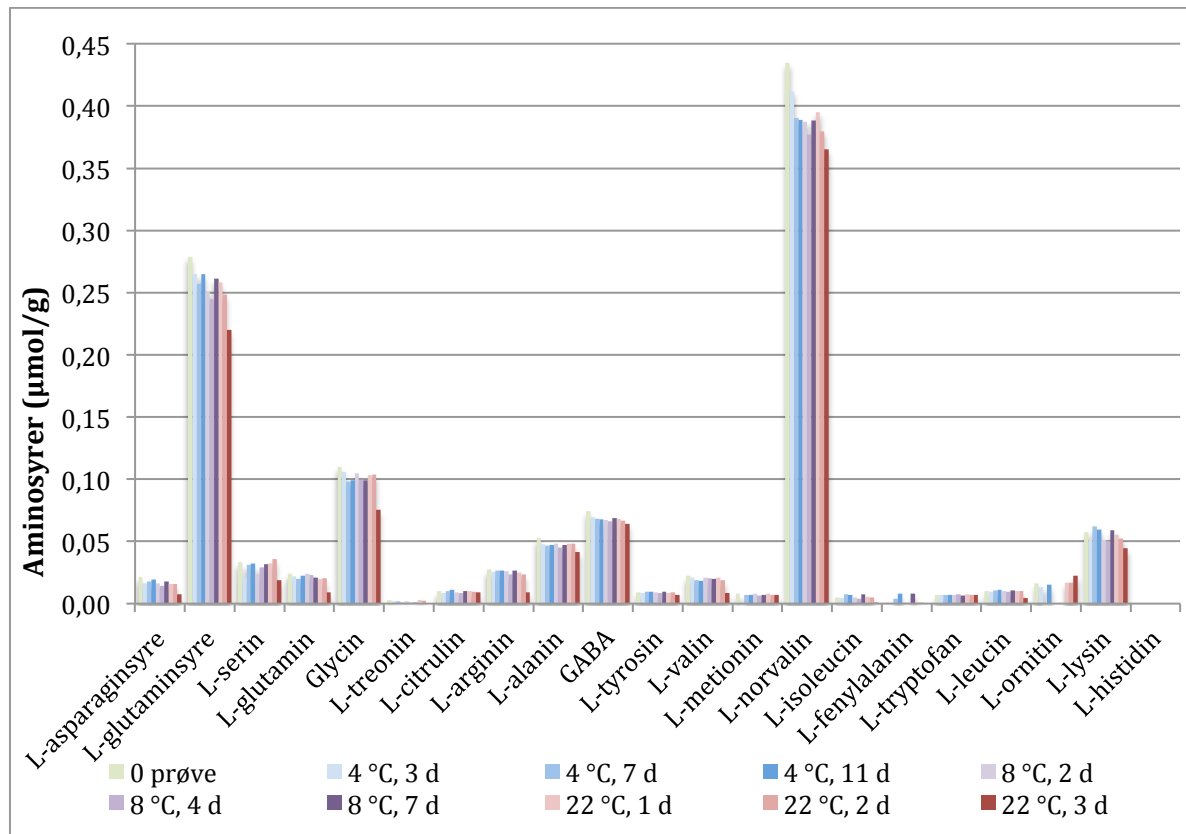
Etter inkubering ved 22 °C hadde spesielt stamme 1, 3, 4 og 5 stor innvirkning på kaseinene, og  $\beta$ -kasein A2 var nesten fullstendig degradert i disse tilfellene. Stamme 2 hadde liten innvirkning på kaseinene, og i de tilfellene kaseinene ble degradert hadde stamme 2 den minst tydelige effekten.

#### 3.3.4 Frie aminosyrer

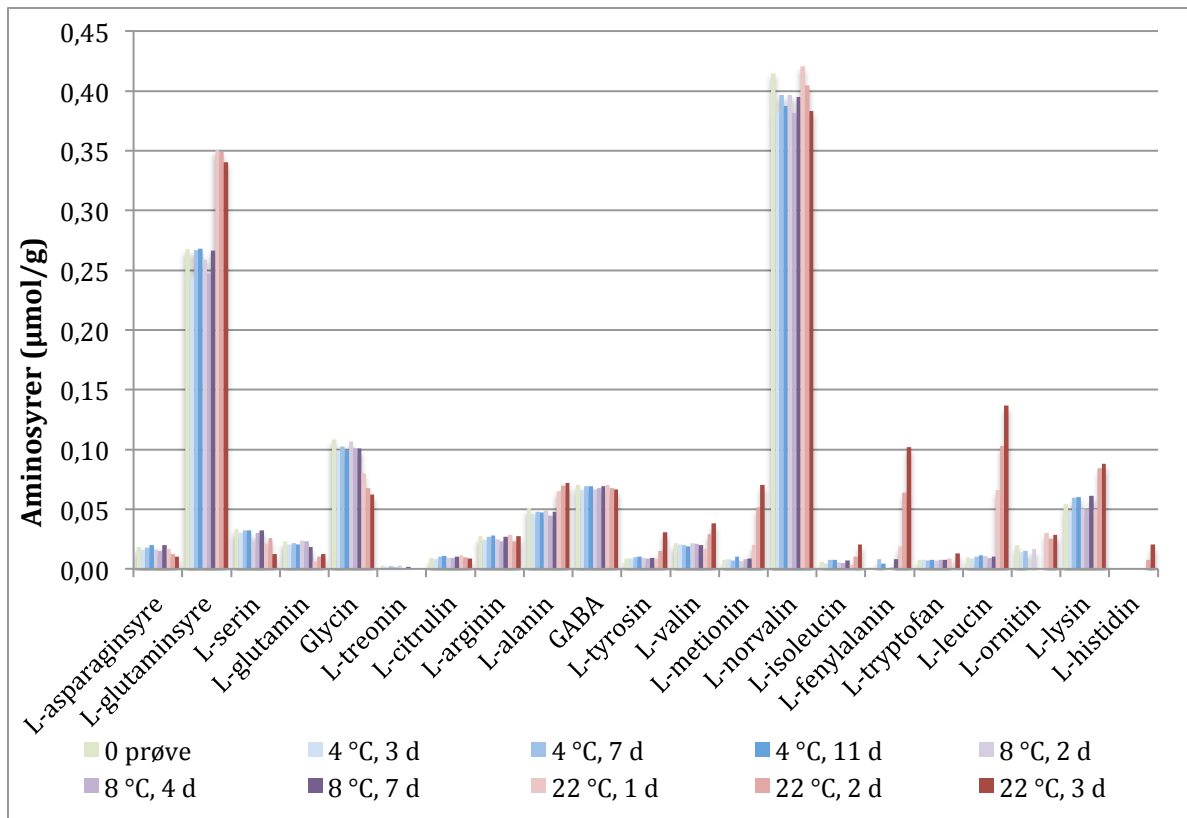
Innhold frie aminosyrer for de 6 stammene inkubert ved ulike temperaturer ble kvantifisert ved hjelp av HPLC. Resultatene for aminosyrene er vist i **Figur 44-49**, og de viser resultat for 21 aminosyrer. Aminosyren L-asparagine ikke ble påvist i noen av prøvene. Se vedlegg for rådata.



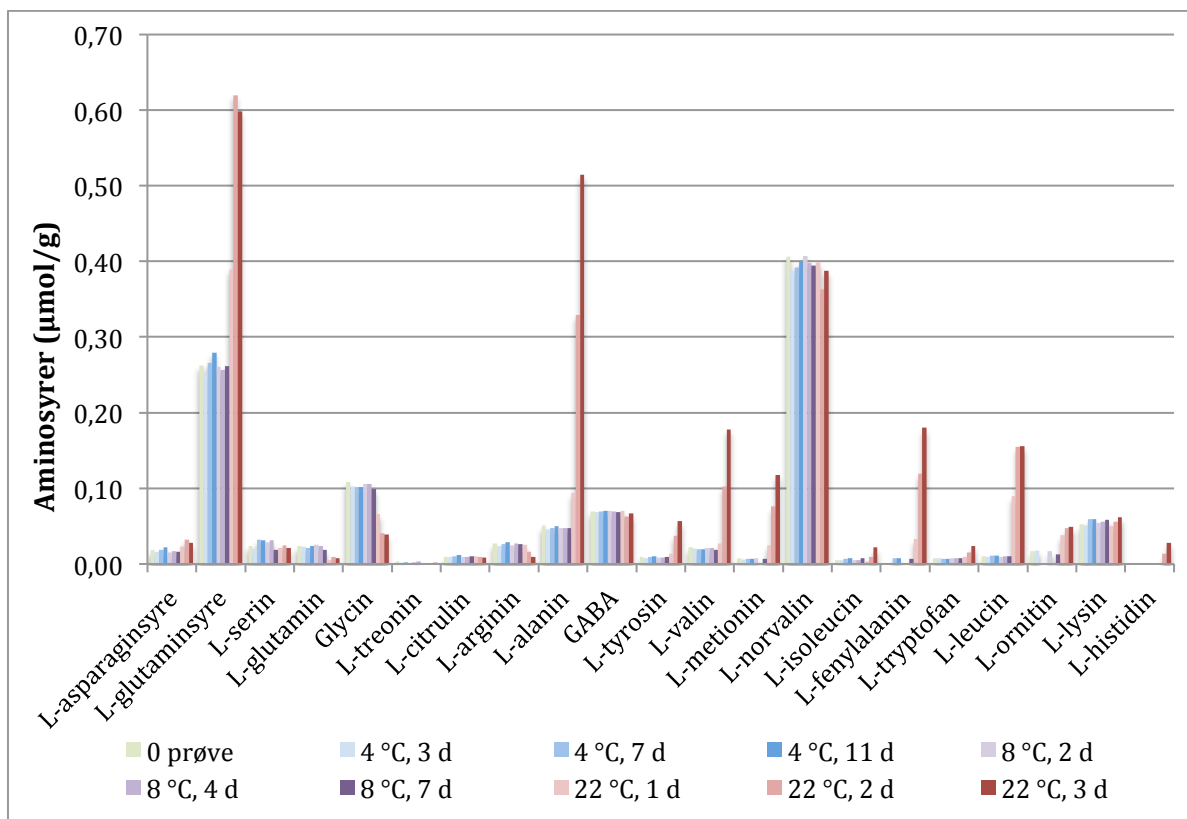
**Figur 44:** Utvikling av frie aminosyrer over tid ved de ulike temperatuere for stamme 1. Resultatene er gjennomsnitt av 3 gjentak.



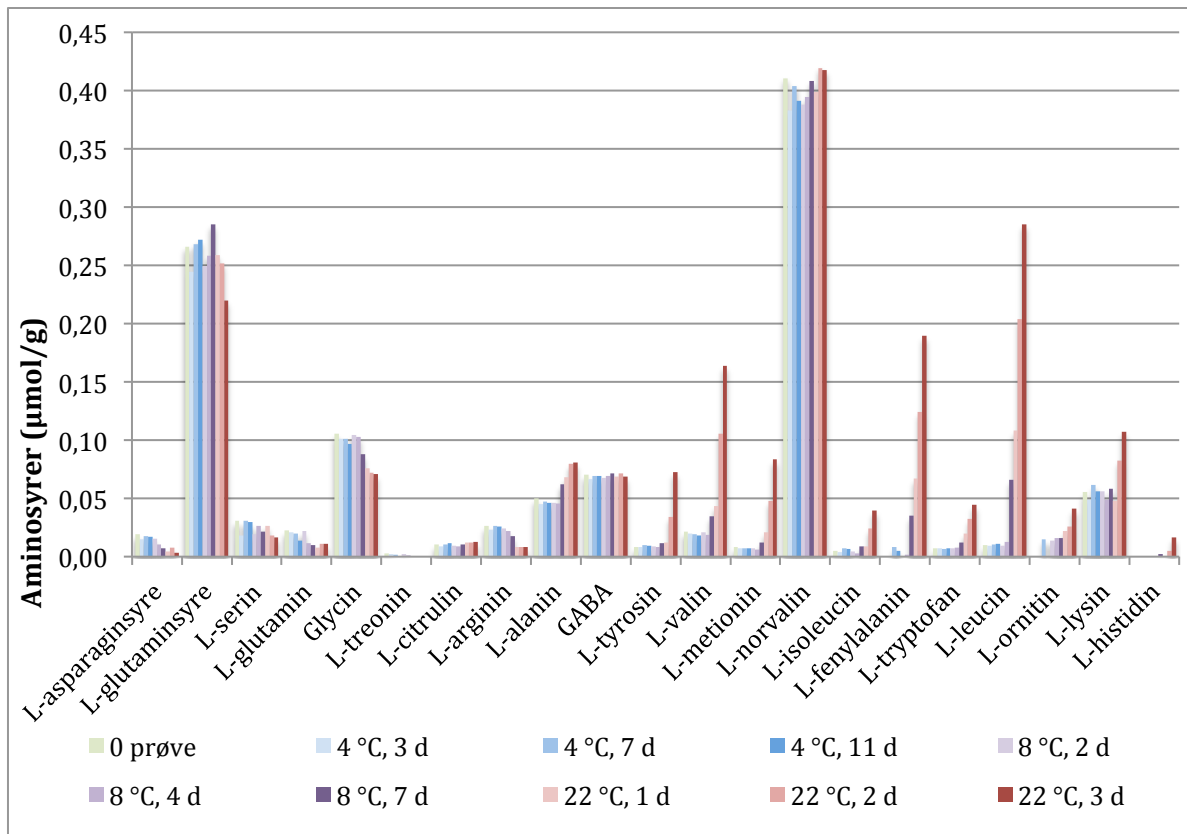
**Figur 45:** Utvikling av frie aminosyrer over tid ved de ulike temperatuere for stamme 2. Resultatene er gjennomsnitt av 3 gjentak.



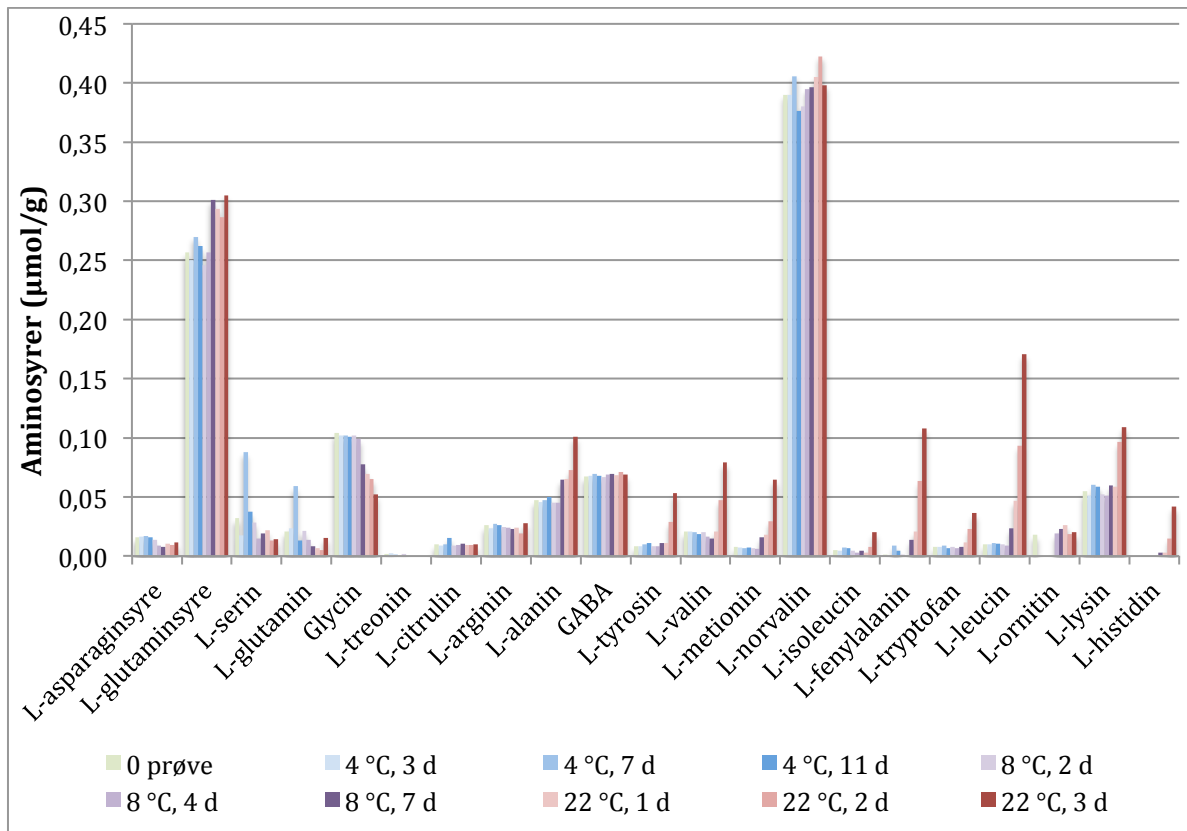
**Figur 46:** Utvikling av frie aminosyrer over tid ved de ulike temperatuere for stamme 3. Resultatene er gjennomsnitt av 3 gjentak.



**Figur 47:** Utvikling av frie aminosyrer over tid ved de ulike temperatuere for stamme 4. Resultatene er gjennomsnitt av 3 gjentak. Det gjøres oppmerksom på at y-aksen er noe høyere enn for de andre stammene.



**Figur 48:** Utvikling av frie aminosyrer over tid ved de ulike temperaturene for stamme 5. Resultatene er gjennomsnitt av 3 gjentak.



**Figur 49:** Utvikling av frie aminosyrer over tid ved de ulike temperaturene for stamme 6. Resultatene er gjennomsnitt av 3 gjentak.

Det var forskjeller på innhold av frie aminosyrer i prøvene avhengig av stamme, inkuberingstemperatur og tid. Stamme 1 (**Fig 44**) viste en økning i mengde frie aminosyre ved økende temperatur for aminosyrene L-leucin, L-fenylalanin og L-valin. I tillegg ble også nivået av aminosyrene L-tyrosin, L-metionin, L-isoleucin, L-tryptofan, og L-lysin målt til å være på det høyeste etter inkubering i 3 døgn ved 22 °C.

For aminosyrene L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-serin, L-glutamin, glycin, L-citrulin og L-arginin kan det se ut som at innholdet steg etter inkubering ved 4 og 8 °C, og deretter ble det observert en reduksjon etter inkubering ved 22 °C.

For stamme 2 i **Figur 45** ble det generelt ikke observert noen økning i mengde frie aminosyrer, men heller en reduksjon med høyere temperatur. For de aller fleste aminosyrene var 0-prøven den med høyest innhold, og deretter ble det observert en reduksjon.

Resultatene i **Figur 46** for stamme 3 viste et varierende innhold av frie aminosyrer. For aminosyrene L-glutaminsyre, L-tyrosin, L-valin, L-metionin, L-isoleucin, L-fenylalanin, L-leucin, L-lysin og L-histidin steg innholdet etter inkubering ved 22 °C. Det motsatte skjedde for L-serin, L-glutamin og glycin, da innholdet ble redusert etter inkubering ved 22 °C.

Stamme 4 i **Figur 47** viste store variasjoner i mengde aminosyrer avhengig av temperatur. Aminosyrene L-glutaminsyre, L-alanin, L-valin, L-fenylalanin og L-leucin skilte seg spesielt ut ved at innholdet steg betydelig etter inkubering ved 22 °C. For de andre aminosyrene var det ikke store påvirkninger av inkuberingstemperatur over tid.

Når det gjaldt stamme 5 i **Figur 48** var det noen aminosyrer som det ble produsert større mengder av med økende temperatur. Spesielt L-tyrosin, L-valin, L-metionin, L-fenylalanin og L-leucin skilte seg ut ved at innholdet var størst etter 3 døgn inkubering ved 22 °C. For aminosyrene L-asparaginsyre, L-glutamin, L-serin og glycin kan det tyde på at innholdet ble redusert ved høyere temperaturer, og i disse tilfellene ble det høyeste innholdet detektert i 0-prøven.

Den samme trenden gjaldt stamme 6 i **Figur 49** hvor innholdet av noen aminosyrer økte med økt temperatur. Spesielt aminosyrene L-glutaminsyre, L-alanin, L-tyrosin, L-fenylalanin og L-leucin økte etter inkubering ved 22 °C. For aminosyrene L-serin, L-glutamin og glycin ble innholdet redusert ved økende temperatur.

### 3.3.5 Flyktige komponenter

Innholdet av flyktige komponenter ble analysert hos alle prøvene for de tre gjentakene, 180 prøver totalt. Innholdet ble kvantifisert ved hjelp av HSGC og gjennomsnittsverdien for de tre gjentakene ble beregnet. Noen av resultatene viste generelt ingen endring eller svært lave

mengder detektert av de ulike stoffene det ble analysert for. Disse resultatene er ikke presentert i figurer men som tekst, og resultatene med større endringer er presentert i **Figur 50-52**. Standardavvik er illustrert i figurene. Se vedlegg for rådata.

3-methyl-1-butanol og 2-methyl-1-butanol ble ikke påvist i noen av prøvene.

Acetoin ble kun påvist for stamme 4 etter inkubasjon i 2 og 3 døgn ved 22 °C. Mengden detektert var henholdsvis 14,18 ppm og 38,79 ppm.

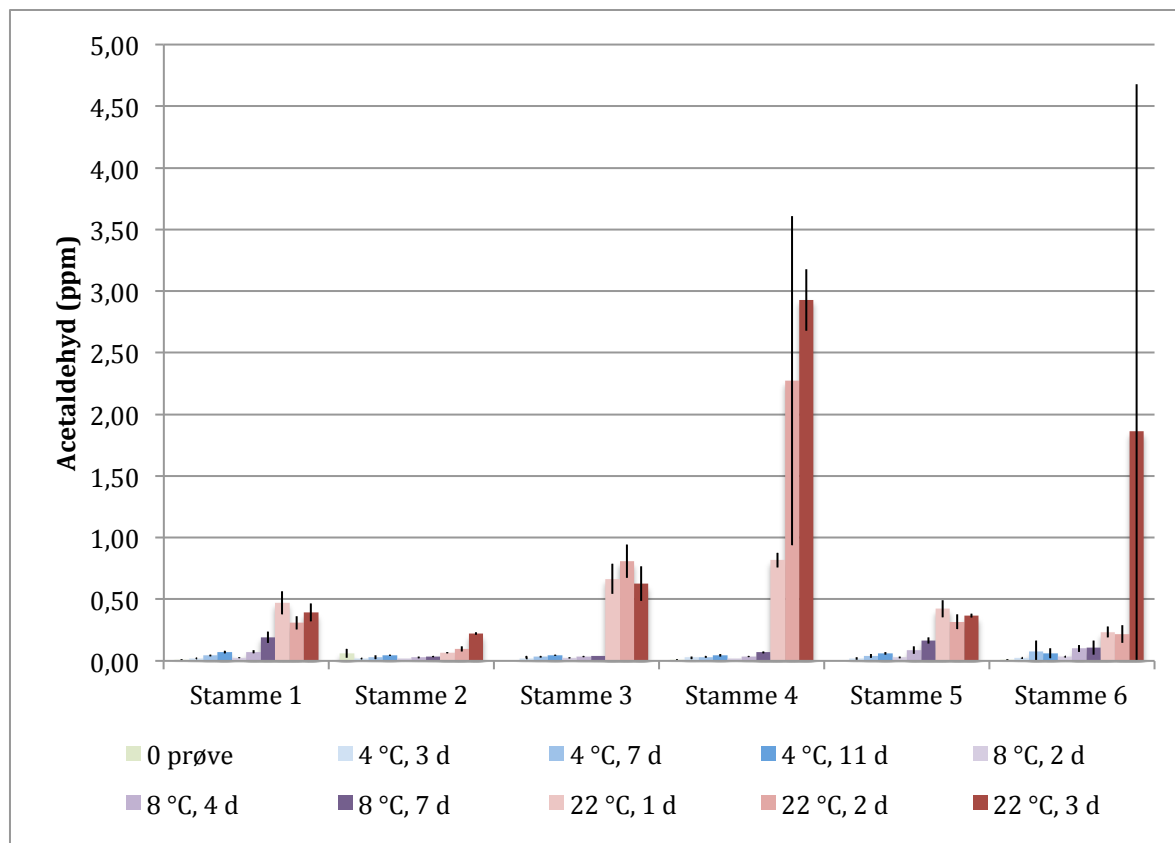
Diacetyl og 2-methyl-1-propanol ble kun detektert hos stamme 4 og 6. Diacetyl ble kun detektert i ett av de tre gjentakene, og i begge tilfellene ble det etter 3 døgns inkubering ved 22 °C detektert henholdsvis 0,11 og 0,15 ppm. Når det gjaldt 2-methyl-1-propanol ble det påvist på samme uttak, 3 døgns inkubering ved 22 °C.

Etylacetat ble kun detektert i ett av de tre gjentakene, og kun hos stamme 6. Det ble detektert 0,10 ppm etter 3 døgns inkubering ved 22 °C.

2-methyl-butanal ble detektert ved inkubering ved 8 og 22 °C for stamme 1, og for stamme 4, 5 og 6 etter inkubering ved 22 °C. 2-methyl-propanal ble detektert for alle stammene bortsett fra stamme 2, og det ble kun detektert etter inkubering ved 22 °C. For stamme 1, 5 og 6 ble det kun detektert etter 3 døgn med inkubering, men for stamme 3 ble det detektert etter 2 og 3 døgn, og ved hvert uttak for stamme 4. Mengden av disse stoffene var derimot veldig små og de er ikke kommentert videre.

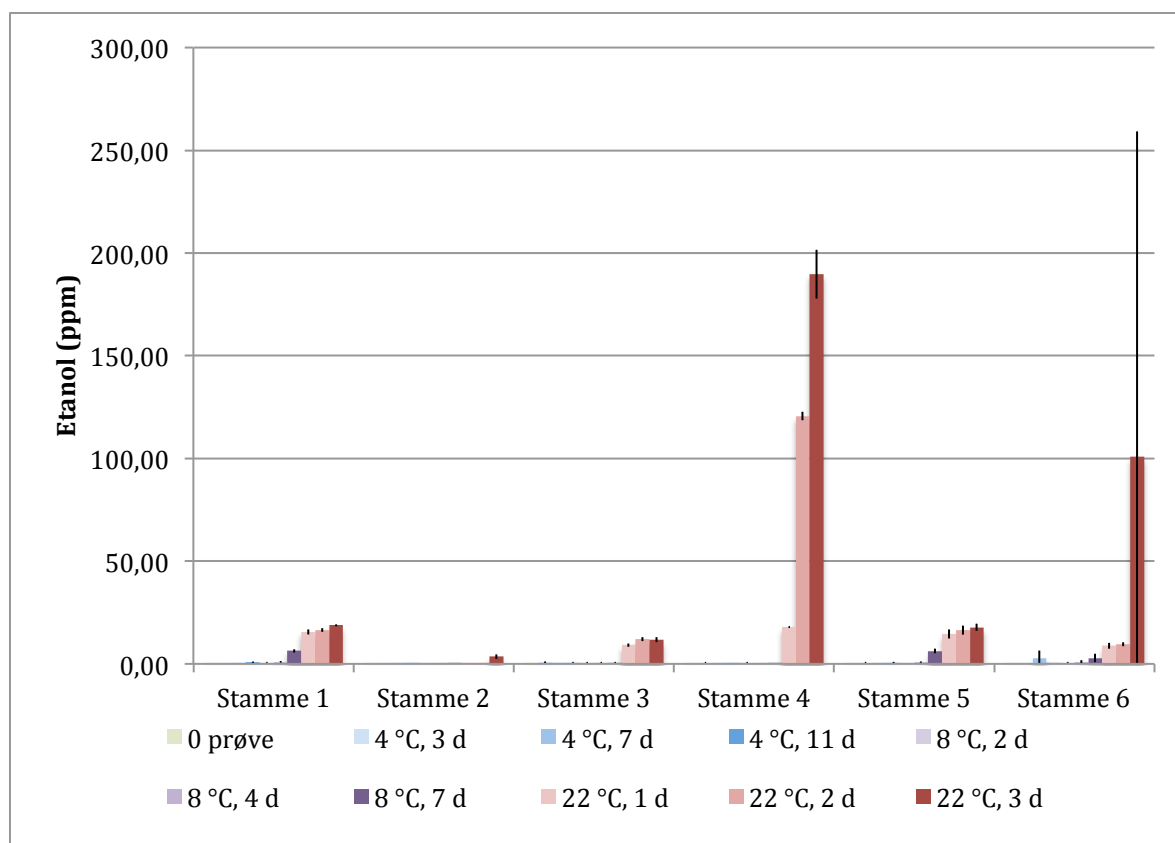
For 3-methyl-butanal ble det ikke detektert mengder større enn 0,01 ppm for noen av stammene ved de ulike temperaturer. For 2-butanon ble det detektert mengder mellom 0,05 – 0,08 ppm. Det høyeste innholdet av 2-butanol som ble detektert var 0,07 ppm.

For 2.3-pentadione var det høyeste innholdet som ble detektert 0,27 ppm. Dette var for stamme 2 etter 3 døgns inkubering ved 22 °C.



**Figur 50:** Utviklingen av acetaldehyd for alle stammer ved de ulike temperaturer over tid. Resultatene er gjennomsnittsverdier av 3 gjentak.

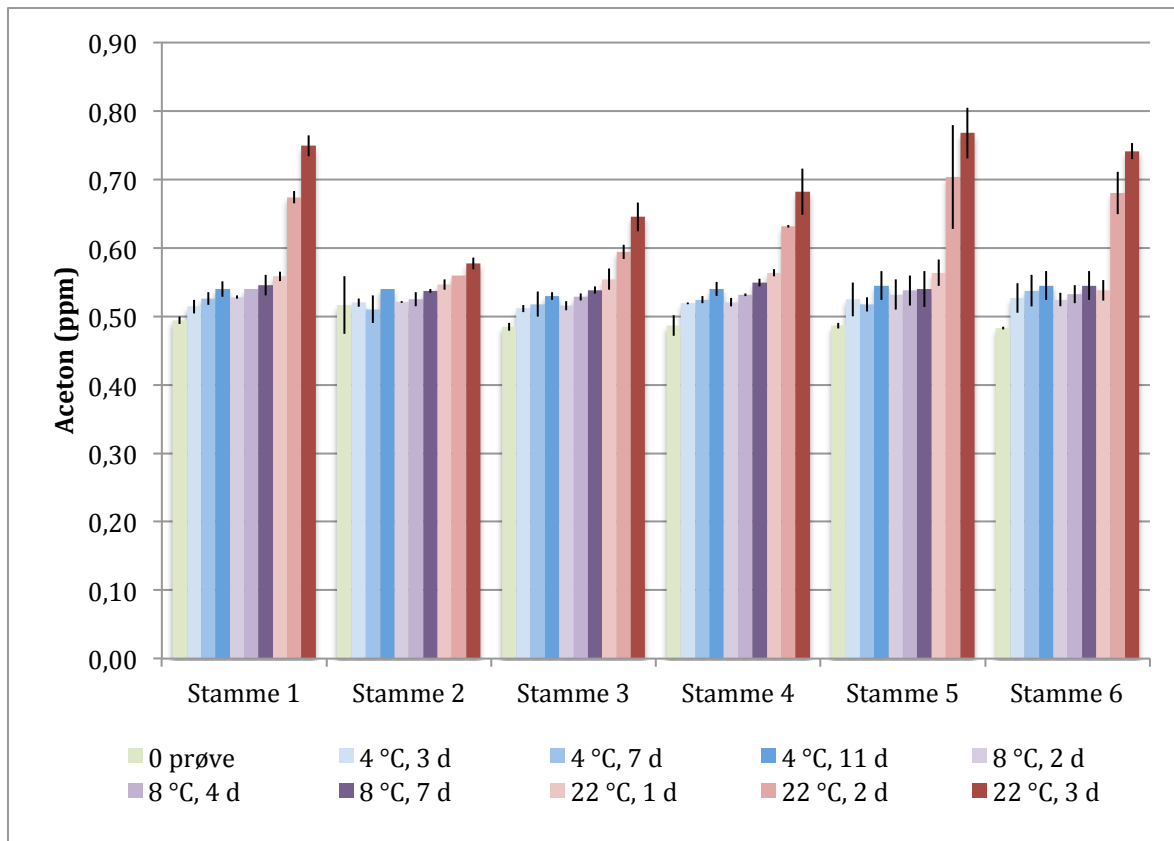
Resultatene i **Figur 50** viser at det var et varierende innhold av acetaldehyd for de ulike stammene etter inkubering over tid ved de ulike temperaturene. I 0-prøvene ble det kun detektert spor av acetaldehyd hos stamme 1, 2, 4 og 6. Innholdet steg med økende temperatur, og etter inkubering ved 22 °C skilte stamme 4 seg ut med det høyeste innhold av acetaldehyd på 2,9 ppm og deretter stamme 6 med 1,9 ppm. Disse resultatene hadde derimot høye standardavvik, spesielt sistnevnte, og det er dermed en viss usikkerhet rundt disse resultatene. Stamme 2 hadde det laveste innholdet av acetaldehyd etter 3 døgns inkubering ved 22 °C på 0,2 ppm.



**Figur 51:** Utviklingen av etanol for alle stammer ved de ulike temperaturer over tid. Resultatene er gjennomsnittsverdier av 3 gjentak.

Resultatene i **Figur 51** viser at det var et varierende innhold av etanol i prøvene for de ulike stammene inkubert ved ulik temperatur over tid. Det ble detektert etanol i alle prøvene, men de som var inkubert ved 4 og 8 °C viste lave verdier (<10 ppm). 0-prøvene hadde alle et innhold på rundt 0,5 ppm som steg til 0,7 ppm for det meste etter 4 °C, og deretter til 6,4 ppm på det meste etter inkubering ved 8 °C. Stamme 4 skilte seg ut med et høyt innhold etter 3 døgns inkubering ved 22 °C, men dette resultatet hadde et høyt standardavvik. Også stamme 6 hadde et høyt innhold av etanol sammenlignet med de andre stammene, og etter 3 døgn ble det detektert 100,8 ppm etanol. Stamme 2 hadde det laveste innholdet med etanol etter inkubering ved 22 °C.





**Figur 52:** Utviklingen av aceton for alle stammer ved de ulike temperaturer over tid. Resultatene er gjennomsnittsverdier av 3 gjentak.

Resultatene i **Figur 52** viser at innholdet aceton øker med stigende inkubasjonstemperatur og -tid. I 0-prøven ble det detektert et innhold mellom 0,48 ppm-0,52 ppm for alle stammene. Det var tilsynelatende ikke stor forskjell på inkubering ved 4 og 8 °C, men etter inkubering ved 22 °C økte innholdet. Det var ulike mengde produsert av de ulike stammene, og stamme 2 hadde det laveste innholdet etter 3 døgn med 0,6 ppm og deretter stamme 3 med 0,7 ppm. Stamme 5 hadde det høyeste innholdet på 0,7 ppm.

## 4.0 Diskusjon

Sporedannende bakterier, og noen Gram-positive bakterier er en utfordring for meieriindustrien da de kan kontaminere råmelk, overleve pasteurisering og etterhvert påvirke både kvaliteten på produktet og tryggheten. Også arter av den Gram-negative slekten *Pseudomonas* er en utfordring i meieriindustrien da de kan kontaminere melken etter pasteurisering og danne hydrolytiske enzymer på lik linje med *Bacillus* spp.

Varmebehandling kan inaktivere vegetative celler av *Bacillus* spp., men sporene er mer varmebestandige i tillegg til at de tåler godt vask og desinfeksjonsmidler. Når sporer blir varmeaktivert i egnet miljø kan de germinere og gi opphav til tette populasjoner av vegetative celler som kan produsere hydrolytiske enzymer og toksiner (Andersen Borge et al. 2001). I dette forsøket ble innledningsvis proteolytisk aktivitet, lipolytisk og lecitinase aktivitet undersøkt på et stort antall stammer av *Bacillus* spp. Deretter ble det fokusert på proteolytisk aktivitet hos et utvalg av seks stammer av *Bacillus* spp. Stamme 1 var *B. mycooides*, stamme 2 var *B. licheniformis* og stamme 3-6 var *B. cereus* isolert fra ulike kilder.

Disse enzymene i melk kan gi kvalitetsforringelse som endret smak, tekstur eller farge, noe som kan medføre økonomiske tap for meieriindustrien. De ulike stammene av *Bacillus* var isolert fra melk ved ulike trinn i prosessen fra to ulike TINE meierier. Stammene ble dyrket i UHT melk ved tre ulike temperaturer over tid, og det ble tatt ut prøver til analyse ved utvalgte tidspunkt. Ved hjelp av kjemiske analyser som kapillærelektroforese (CE), HPLC og HSGC ble metabolske endringer forårsaket av de hydrolytiske enzymer undersøkt.

I denne oppgaven var det ønskelig å se hvilke effekter temperatur og tid hadde på vekst av *Bacillus* i melken, og om det var forskjeller mellom stammene. Det var ønskelig å kunne si noe om melken ville bli påvirket ved 4 °C som er anbefalt kjøleskaptemperatur, 8 °C som skulle forestille brutt kjølekjede, eller et kjøleskap som har for høy temperatur eller ikke optimalt innstilt, og romtemperatur ute på benken ved 22 °C. Disse temperaturene ble derfor benyttet for å se på effekt av temperatur på ulike stammer over tid.

### 4.1 Analyse av enzymaktivitet ved diffusjonsanalyse, proteinnedbrytning og frie aminosyrer

Kapillærelektroforese er en kostbar og avansert metode, og det var av interesse å sammenligne resultatene med de fra diffusjonsanalysen, som er en enkel, rask og rimeligere metode, for å se i hvilken grad resultatene var like.

#### 4.1.1 Inkubasjon ved 4 °C

Ved innledende diffusjonsanalyse viste 11 av 31 stammer av *B. cereus* proteolytisk aktivitet etter 5 døgn inkubasjon ved 4 °C. To av disse stammene, stamme 5 og 6 ble undersøkt videre i hovedforsøket, og tilsvarende stammer viste også enzymaktivitet på kapillærelektroforese etter inkubasjon ved 4 °C. Stammene 3 og 4 viste ikke tegn til proteolytisk aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C verken på diffusjonsanalyse eller på kapillærelektroferogrammet. I et forsøk gjort av Lücking et al. (2013) ble det kun påvist proteolytisk aktivitet i 50 % av de isolerte *B. cereus* stammene. I nevnte forsøk var inkubasjonstemperaturen høyere med en temperatur på 30 °C, og dermed kan ikke disse resultatene sammenlignes direkte opp mot hverandre, men til sammen kan de gi en indikasjon på at ikke alle stammer av *B. cereus* har proteolytisk aktivitet. I et annet forsøk gjort av Janštová et al. (2004) ble proteolytisk aktivitet undersøkt ved å se på innhold av frie aminosyrer hos blant annet *B. cereus*. Etter inkubasjon ved 4 °C viste ingen av de fem *B. cereus* stammene proteolytisk aktivitet.

For *B. licheniformis* ble det ikke observert proteolytisk aktivitet på de ulike melkeproteinene, når arealet av de ulike toppene i CE ble sammenlignet, etter inkubasjon ved 4 °C. Dette var som forventet da ingen av stammene av denne arten viste tegn til proteolytisk aktivitet etter innledende diffusjonsanalyse ved samme temperatur. Dette stemmer overens med forsøk gjort av Janštová et al. (2004) hvor det heller ikke ble påvist noen tegn på proteinnedbrytning etter inkubering ved 4 °C for stammer av *B. licheniformis*. Ettersom at det ikke ble observert tegn til proteinnedbrytning hos *B. licheniformis* ble det heller ikke observert en stor effekt på mengde frie aminosyrer.

Når det gjaldt *B. mycoides* viste denne bakterien proteolytisk aktivitet hos 5 av 7 stammer under innledende forsøk ved 4 °C. Stamme 1 ble undersøkt videre i hovedforsøket og også her ble det observert proteolytisk aktivitet. Det lyktes ikke med å finne relevant litteratur om tilsvarende forsøk som inkluderte undersøkelse av *B. mycoides*. Det kan derimot tyde på at flere stammer av denne arten er i stand til å uttrykke proteolytisk aktivitet ved kjøleskapstemperatur, ettersom 5 av 7 stammer dannet soner ved diffusjonsanalysen etter inkubasjon ved 4 °C. Noen av stammene for *B. mycoides* og *B. cereus* viste tegn til proteinnedbrytning i hovedforsøket, og i disse tilfellene ble det også observert en liten økning i mengde frie aminosyrer. For *B. mycoides* kunne det se ut som at innholdet av aminosyrene L-glutaminsyre, L-citrulin, L-arginin og L-lysin økte noe etter inkubering ved 4 °C. Stamme 3

og 4 av *B. cereus* viste ingen stor effekt på proteinnedbrytning, men innholdet av aminosyren L-glutaminsyre økte likevel for de fire ulike stammene av *B. cereus*.

Etter inkubering i 11 dager ved 4 °C viste resultatene for kapillærelektroforese kun små tegn til effekt på proteinnedbrytning. Det var kun *B. mycooides* stamme 1, og stammene 5 og 6 av *B. cereus* som forårsaket noe nedbrytning, og denne nedbrytning ble observert både ved innledende diffusjonsanalysen og kapillærelektroforese. Under nedbrytningen var det spesielt  $\alpha_{S1}$ -kasein og  $\beta$ -kasein A2 som ble redusert, men også  $\kappa$ -kasein i mindre grad.

Myseproteinene viste liten endring. Stammene som uttrykte aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C kan bli ansett som psykrotrofe. I et forsøk gjort av Chen et al. (2003) ble det observert at proteinaser fra psykrotrofe *Pseudomonas* spp. angriper hovedsakelig kaseiner og at  $\beta$ - og  $\kappa$ -kasein er mer mottagelig for proteolytisk angrep enn  $\alpha$ -kaseinene. Det kan tyde på at *Bacillus* spp. har den samme preferansen for kaseiner da myseproteinene ikke ble spesielt angrepet av proteinaser.

Ti av 31 stammer av *B. cereus* viste lecitinase aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C, men *B. licheniformis* viste ingen tegn til lecitinase aktivitet. I et lignende forsøk gjort av Lücking et al. (2013) ble lecitinase aktivitet kun observert for *B. cereus* og ikke *B. licheniformis*, så dette var som forventet. Også et forsøk gjort av De Jonghe et al. (2010) fant tilstedeværelse av lecitinase aktivitet for over 70 % av *B. cereus* isolater, og over 70 % av *B. licheniformis* isolatene var negative for lecitinase aktivitet.

Forsøkene til Lücking et al. (2013) og De Jonghe et al. (2010) inkluderte ikke undersøkelse av *B. mycooides*, men i dette forsøket viste 6 av 7 *B. mycooides* stammer lecitinase aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C. Dette indikerer at flere stammer av denne arten er i stand til å uttrykke fosfolipolytisk aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C

Ingen av stammene av *B. cereus* eller *B. mycooides* viste tegn til lipolytisk aktivitet. Derimot viste 3 av 8 stammer av *B. licheniformis* lipolytisk aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C. Dette kan igjen knyttes opp mot forsøk gjort av Lücking et al. (2013), da lipolytisk aktivitet ble detektert i 28 % av isolatene av *B. licheniformis*, og under 15 % av isolatene av *B. cereus* viste aktivitet.

#### 4.1.2 Inkubering ved 8 °C

Etter inkubering ved 8 °C i 7 dager var effekten på proteinnedbrytningen, undersøkt ved hjelp av kapillærelektroforese varierende avhengig av stamme og proteintype. Det var generelt liten innvirkning på myseproteinene uavhengig av stamme og lengde på inkubasjonen.

Stamme 2, *B. licheniformis* var mindre proteolytisk enn de andre stammene og viste ingen tegn til proteolytisk aktivitet etter inkubasjon ved 8 °C, dermed ble det heller ikke observert en økning i mengde frie aminosyrer. For de aller fleste aminosyrer var 0-prøven den med høyest innhold, og deretter ble det observert en reduksjon. Dette kan indikere at stammene brukte de frie aminosyrene som var tilstede i melken i utgangspunktet.

I diffusjonsanalysen, viste stammer av *B. mycooides* proteolytisk aktivitet hos 5 av 7 stammer etter inkubasjon ved 8 °C og én av disse stammene, stamme 1, ble undersøkt videre i hovedforsøket. Ved analyse ved kapillærelektroforese ble det observert en betydelig nedbrytning av  $\kappa$ - og  $\beta$ -kasein som var tydelig allerede etter 4 dager med inkubasjon. Disse resultatene kan knyttes opp mot forsøk gjort av Chen et al. (2003) da det ble observert at proteinaser angriper kaseiner fremfor myseproteiner og at  $\kappa$ - og  $\beta$ -kasein er mer mottagelig for nedbrytning enn  $\alpha$ -kasein. Sett i betraktning av dette ble det også observert en økning i mengde aminosyre, og innholdet av aminosyrene L-glutaminsyre, L-alanin, L-valin, L-fenylalanin og L-leucin økte etter inkubasjon ved 8 °C.

Ved innledende diffusjonsanalyse viste 20 av 31 isolater av *B. cereus* proteolytisk aktivitet etter inkubasjon ved 8 °C, og 3 av disse stammene ble studert videre i hovedforsøket, stamme 4, 5 og 6. I tidsperioden avsatt dette forsøket lyktes det ikke i å finne litteratur om lignende forsøk utført ved 8 °C. Som tidligere nevnt ble det ikke observert proteolytisk aktivitet i forsøk gjort av Janštová et al. (2004) etter inkubasjon ved 4 °C. Derimot kan økningen av proteolytisk aktivitet ved økende temperatur under diffusjonsanalysen indikere at 8 °C er et bedre miljø for *B. cereus* å uttrykke enzymaktivitet i form av proteolyse. Etter inkubasjon ved 4 °C viste 11 av 31 stammer dannelse av soner og 20 av 31 dannet soner ved inkubasjon ved 8 °C.

I resultatene fra kapillærelektroforese ble det observert en proteinnedbrytning for *B. cereus* stamme 5 og 6, og det var spesielt  $\kappa$ - og  $\beta$ -kasein som ble angrepet. Stamme 5 av *B. cereus* og *B. mycooides*, stamme 1 viste ved kapillærelektroferogrammen den største effekten på kaseinene  $\kappa$ -kasein,  $\beta$ -kasein A1 og A2, og i tillegg stamme 6 for kaseinet  $\beta$ -kasein A2.

Der er også vanskelig å si noe sikkert for stamme 4 da resultatene tilsier at arealet hadde gått opp, noe som er usannsynlig. Det er flere feilkilder med denne analysen, og tilberedning av bufferløsning, pipettering, fortykning av prøvene og selve kapillærelektroforesen er noen av de. *Bacillus licheniformis*, stamme 2 og *B. cereus* stamme 3 og 4 viste mindre effekt på kaseinene etter inkubering ved 8 °C, og stamme 3 og 4 av *B. cereus* var mindre proteolytisk enn stamme 5 og 6 etter inkubasjon ved 8 °C. Når det gjaldt innholdet av frie aminosyrer hadde stamme 3-6 av *B. cereus* generelt liten effekt på innholdet, men for stamme 5 ble det observert en økning av aminosyrene L-fenylalanin og L-leucin. Stamme 3, 4 og 6 hadde en økning av aminosyren L-glutaminsyre.

#### 4.1.3 Inkubering ved 22 °C

Under diffusjonsanalysen ble prøvene inkubert ved 22 og 30 °C, men i hovedforsøket ble prøvene kun inkubert ved 22 °C. Dermed er det kun disse resultatene som kan sammenlignes med hverandre.

Alle stammene av *B. cereus* uttrykte enzymaktivitet i form av proteolyse etter inkubasjon ved 22 og 30 °C undersøkt ved diffusjonsanalyse. For proteolyse var enzymaktiviteten på sitt høyeste ved 22 °C, og den ble mindre etter inkubering ved 30 °C. I et forsøk gjort av De Jonghe et al. (2010) ble det utført en lignende undersøkelse av kvalitetsforringende potensiale blant flere ulike stammer. I forsøket ble det benyttet samme medie men med en høyere inkubasjonstemperatur på 37 °C, og da viste over 70 % av *B. cereus* isolatene proteolytisk aktivitet. I litteraturen blir det beskrevet av Samaržija et al. (2012) at *B. cereus* isolert fra melk uttrykker proteolytisk aktivitet i 40-84 % av tilfellene.

Spesielt stammene 3, 4 og 5 av *B. cereus*, men også stamme 6 hadde stor innvirkning på kaseinene på kapillærelektroferogrammene og  $\beta$ -kasein A2 var nesten fullstendig degradert i disse tilfellene. Stammene av *B. cereus* viste et varierende innhold av frie aminosyrer. Samtlige stammer av *B. cereus* viste en økning i mengde av den frie aminosyren tyrosin. Et forsøk gjort av Nabrdalik et al. (2010) forteller at en økning i konsentrasjon av den frie aminosyren tyrosin er et karakteristisk resultat av de proteolytiske endringene forårsaket av *B. cereus*. Dette blir også bekreftet av Janštová et al. (2004) og Chen et al. (2003) som videre beskriver at proteinaser produsert av mesofile og termofile bakterier er mer varmemestabile, og at nivået av tyrosin kan være en hjelpfull indikator på den generelle proteolyseaktiviteten i melk.

Alle 7 stammene av *B. mycooides* hadde proteolytisk aktivitet ved 22 og 30 °C under diffusjonsanalysen, og aktiviteten var størst ved 22 °C. I hovedforsøket hadde spesielt stamme 1, *B. mycooides* stor innvirkning på kaseinene etter inkubasjon ved 22 °C, og  $\beta$ -kasein A2 var nesten fullstendig degradert. De nevnte forsøkene utført av De Jonghe et al. (2010) og Lücking et al. (2013) inkluderte ikke undersøkelse av *B. mycooides*. Men på bakgrunn av at samtlige stammer viste proteolytisk aktivitet ved diffusjonsanalysen indikerer dette at også *B. mycooides* er sterk proteolytisk. På bakgrunn av den proteolytiske aktiviteten ble det også observert endringer i innholdet av frie aminosyrer. Resultatene for *B. mycooides* viste en økning i mengde frie aminosyre spesielt for L-valin, L-fenylalanin og L-leucin. I tillegg ble også nivået av aminosyrene L-tyrosin, L-metionin, L-isoleucin, L-tryptofan og L-leucin målt til å være høyest etter inkubering ved 22 °C. *Bacillus licheniformis* stammer viste ingen tegn til proteolyse ved hverken 22 eller 30 °C, og dermed ble det heller ikke observert en økning i mengde frie aminosyrer, men heller en reduksjon med høyere temperatur.

Når det gjaldt lipolytisk aktivitet ved 22 °C hadde 29 av 31 stammer av *B. cereus* dannet soner. Etter inkubering ved 30 °C hadde stamme 17 av 31 stammer dannet soner. I dette tilfellet var det dermed flere stammer som viste enzymaktivitet ved 22 °C enn det var ved 30 °C. I det tidligere nevnte forsøket av De Jonghe et al. (2010) viste over 70 % av *B. cereus* isolatene lipolytisk aktivitet. Det var dermed forventet at en stor andel av isolatene i dette forsøket ville vise lipolytisk aktivitet etter inkubasjon ved høyere temperaturer. Dette stemmer med litteraturen beskrevet av Samaržija et al. (2012) da det blir sagt at *B. cereus* isolert fra melk uttrykker lipolytisk aktivitet i 40-84 % av tilfellene.

Alle stammene av *B. mycooides* og *B. cereus* viste lecitinase aktivitet ved 22 og 30 °C og aktiviteten var noe større ved 30 °C i de fleste tilfeller, og dette kan sees i sammenheng med resultater fra forsøket gjort av De Jonghe et al. (2010) hvor over 70 % av *B. cereus* stammene viste lecitinase aktivitet. Videre beskriver Samaržija et al. (2012) at *B. cereus* uttrykker lecitinase aktivitet i 80 % av tilfellene.

*Bacillus licheniformis* viste ingen tegn til lecitinaseaktivitet ved 22 og 30 °C, noe som sammenfatter resultatene i forsøket gjort av De Jonghe et al. (2010) da det ikke ble detektert lecitinase aktivitet hos *B. licheniformis*.

I de aller fleste tilfeller, ved alle temperaturer, var det  $\kappa$ - og  $\beta$ -kasein som opplevde den største nedbrytningen som følge av proteolytisk aktivitet.  $\alpha$ -kasein hadde i de fleste tilfeller en

noe mindre nedbrytning enn de andre kaseinene, og myseproteinene var ikke betydelig nedbrutt. I forskning gjort av Janštová et al. (2004) ble det beskrevet at  $\alpha$ -kasein holdt seg stabil lengst sammenlignet med de andre kaseinene, og at tapet ved proteinnedbrytning er minimalt. Samtidig viste  $\alpha$ -laktalbumin og  $\beta$ -laktoglobulin ingen nedbrytning sammenlignet med fraksjoner av  $\kappa$ -kasein. Dette er også beskrevet av Samaržija et al. (2012) og Chen et al. (2003).

## 4.2 Vekstforsøk med *Bacillus* spp. i UHT-melk

Til vekstforsøket ble det valgt å benytte UHT-melk til å inokulere stammene i da denne blir ansett som et sterilt substrat uten andre bakterier og sporer som kunne forstyrre resultatene. UHT-melk var også egnet ut fra prosjektets fokus på proteolytisk aktivitet og det er et rimelig og enkelt vekstmedium å bruke.

### 4.2.1 Inkubasjon ved 4 og 8 °C

Etter inkubering ved 4 °C økte stamme 1 og 5 i antall og disse stammene var henholdsvis *B. mycooides* isolert fra lagret kartong ved 4 °C og *B. cereus* isolert fra lagret kartong ved 8 °C. Vekst i dette temperaturområdet var dermed forventet, og forventningen rundt dette ble bekreftet da litteraturen beskriver at *B. mycooides* kan vokse i temperaturområdet 5-37 °C (Corry et al. 2011; Patiño-Navarrete & Sanchis 2017). Videre blir det beskrevet av Brown (2000) at også noen stammer av *B. cereus* kan vokse ved 3-4 °C.

Under vekstforsøket ved inkubasjon ved 8 °C ble det observert en økning i vekst for stamme 1, 5 og 6. Stamme 6 var også *B. cereus* og både stamme 5 og 6 var isolert fra lagret kartong ved 8 °C og det var dermed forventet at stammene skulle vokse ved denne temperaturen. Disse resultatene kan sees i sammenheng med et lignende forsøk gjort av Andersen Borge et al. (2001) hvor 11 stammer av *B. cereus*, skulle undersøkes for hvorvidt de klarte å vokse og sporulere ved lave temperaturer. Åtte av de 11 stammene var isolert fra meieriprodukt. I forsøket ble prøvene inokulert med en høyere bakteriekonsentrasjon enn i dette forsøket, og flaskene ble inkubert med risting ved 4, 6 og 7 °C i opp mot 35 døgn. Etter inkubering i BHI-buljong hadde 1 av de 8 stammene vokst ved 4 °C, og 7 av 8 stammer vokste etter inkubasjon ved 7 °C. Resultatene i forsøket til Andersen Borge et al. (2001) viste at veksten var mye senere for de prøvene som ble inkubert uten risting, sammenlignet med de prøvene som ble ristet under inkubasjon ved 7 °C.

Fire av stammene benyttet i hovedforsøket var isolert fra 4 og 8 °C og blir dermed ansett som psykrotrofe. Det var derimot kun 3 av de som vokste ved stamme temperaturområdet under



hovedforsøket, og stamme 4 av *B. cereus* økte ikke i antall før inkubasjon ved 22 °C. De 3 stammene som vokste ved 4 og 8 °C var alle isolert i august. Studier gjort av André et al. (2017) bekrefter at det er psykrotrofe *Bacillus* spp. som dominerer på sommeren og høsten, og i vintersesongen er det størst forekomst av mesofile *Bacillus* spp.

Etter 11 døgn inkubering ved 4 °C, en periode som er tilsvarende holdbarhetstiden for melk produsert i Norge, hadde vekst av *Bacillus* økt fra 3,8-4,14 log kde/ml etter 0-døgn til 2,7-5,7 log kde/ml etter 11 døgns inkubasjon. På samme måte hadde antall celler etter inkubering ved 8 °C økt til 2,7-6,8 log kde/ml etter 4 døgn. Det er varierende hvilke mengde av *B. cereus* som skal til for å forårsake matforgiftning. For emetisk type er alt fra  $10^5$ - $10^8$  celler/g matvare beskrevet i litteraturen, og for diarésyndromet varierer infektiv dosen fra  $10^5$ - $10^7$  noe som tilsvarer cirka  $10^3$ - $10^5$  celler/g matvare (Granum 2015). Dette kan indikere at melk som etter pasteurisering inneholder rundt 4 log kde/ml av stamme 1 av *B. mycoides* og 5 av *B. cereus* kan forårsake en eventuell matforgiftning da celletallet etter 11 døgn var 5,5-5,7 log kde/g. Toksinet som forårsaker diarésyndromet er sensitiv mot varme, og det blir inaktivert etter varmebehandling ved 56 °C i 5 min. Det emetiske toksinet derimot er varmestabil og det kan overleve normal matlaging (Brown 2000).

Etter inkubering i 4 døgn ved 8 °C hadde bakteriekonsentrasjonen for stamme 1, 5 og 6 økt til området hvor den også kunne forårsake sykdom. En inkubasjonstemperatur ved 8 °C var valgt for å illustrere en brutt kjølekjede, og det er lite sannsynlig at melken holdes ved denne temperaturen i 4 dager. Derimot kan dette forkomme dersom kjøletank- eller kjøleskapttemperaturen er høyere enn anbefalt. Disse resultatene illustrer hvor viktig det er med ubrutt kjølekjede og opprettholdelse av tilstrekkelig lav temperatur ved kjølelagring. Walstra et al. (2005) beskriver at jo høyere antallet bakterier i råmelk er, jo flere bakterier vil overleve pasteuriseringen. Derfor er det viktig å holde temperaturen lav under hele prosessen fra melking til prosessering, og også etter pasteurisering.

Under hovedforsøket ved 4 °C ble det observert proteolytisk aktivitet ved kapillærelektroforese for stamme 1, 5 og 6. Stamme 6 av *B. cereus* viste ingen vekst under lagringsforsøket ved 4 °C, da vekstkurven illustrerte ingen økning i celletall. Dette indikerer at denne stammen av *B. cereus* var i stand til å uttrykke proteolytisk aktivitet ved 4 °C til tross for manglende vekst.

Ved undersøkelse av proteolytisk aktivitet ved kapillærelektroforese ved 8 °C var det de samme stammene som viste proteolytisk aktivitet. Dette indikerer at de nevnte stammene både økte i bakteriekonsentrasjon og var i stand til å uttrykke proteolytisk aktivitet etter inkubasjon ved 8 °C.

#### 4.2.2 Inkubasjon ved 22 °C

I vekstforsøket viste samtlige stammer økning i celletall etter inkubering ved 22 °C. Veksten til stamme 2 av *B. licheniformis* kom noe senere i gang enn for de andre stammene, til tross for at denne bakterien kunne vokse i temperaturområdet 10-40 °C (Granum 2015). Alle stammene hadde en startverdi på rundt 4 log kde/ml, som var bakteriekonsentrasjonen det ble inokulert med i utgangspunktet. Etter 3 døgn hadde samtlige stammer økt i antall til en bakteriekonsentrasjon tilsvarende 7,2-8 log kde/ml. Etter inkubasjon i 3 døgn var melken åpenbart forringet med geldannelse og vond lukt, og da er det lite sannsynlig at forbrukeren hadde konsumert melken.

Ved undersøkelse av proteolytisk aktivitet ved kapillærelektroforese ved 22 °C viste *B. mycooides* stamme 1 og stamme 3-6 av *B. cereus* proteolytisk aktivitet. Stamme 2, *B. licheniformis* derimot viste ikke tegn til proteolytisk aktivitet til tross for en økning i celletall gjennom inkubasjonsperioden.

I et forsøk gjort av De Jonghe et al. (2010) ble ulike isolater screenet for enzymaktivitet på lik måte som innledende diffusjonsanalyse i dette forsøket. Det ble deretter utført en kvantitativ måling av proteolytisk aktivitet hvor glycin-konsentrasjonen fungerte som en indikator på grad av aktivitet. Resultater med glycinmengder lavere enn 0,5 µmol/ml ble ansett som ikke proteolytiske aktivitet hos stammene og glycin-konsentrasjoner høyere enn 15 µmol/ml ble ansett som sterk proteolytisk aktivitet hos stammene. I det nevnte forsøket ble *B. cereus* vurdert som sterkt proteolytisk med et glycininnhold på 22 µmol/ml og *B. licheniformis* som mindre proteolytisk med et glycininnhold på mellom 1,8-2,2 µmol glycin/ml. Dette indikerer at det var svak proteolytisk aktivitet av *B. licheniformis* under forsøket. Dette kan knyttes opp mot observasjoner i denne oppgaven da ingen av de 9 stammene av *B. licheniformis* viste proteolytisk aktivitet under innledende diffusjonsanalyse uavhengig av temperatur.

Det ble observert svært små endringer i pH verdier ved inkubasjon ved 4 og 8 °C, og det var kun etter inkubasjon ved 22 °C at det ble observert endringer. Det var kun én *B. cereus* stamme som viste betydelig endring i pH gjennom inkubasjonsperioden og det var stamme 4

som viste den største endringen. Her ble det observert en endring i pH-verdi fra 6,70 til 5,4 etter 3 døgns inkubering. Denne pH nedgangen sammenfaller med økt melkesyreproduksjon.

Podematerialet i dette forsøket bestod av renkulturer av *Bacillus* arter, og dermed kan ikke nødvendigvis funnene i vekstforsøket relateres med faktiske forhold da en renkultur ikke er like komplekst sammensatt som den mikrofloraen man vanligvis kan finne i melk.

Når det gjelder antallsbestemmelse av sporene ble det oppdaget i ettertid at det ble benyttet feil metode. Metoden som ble brukt var 72 °C i 5 min, når det vanlige er 80 °C i 10 min. I tillegg ble prøvene fortynnet, noe som kan ha medført at de minste mengdene ikke ble detektert. Prøvene burde derimot ha blitt platespredd uten fortynning, da kunne det blitt enklere å si noe sikkert om antall sporer. Resultatene tilsier ikke at metoden gjorde at det ble mistet sporer på grunn av for høy temperatur, tvert imot ville denne metoden heller ha avdekket flere da temperaturer var lavere enn vanlig. Denne metoden kan tilsvare forholdene til lavpasteurisering, og ikke høy.

I et forsøk gjort av Andersen Borge et al. (2001) ble sistnevnte metode om varmebehandling ved 80 °C i 10 min for å bestemme antall sporer i et vekstforsøk med *B. cereus* benyttet. Prøvene hadde blitt inkubert ved 10 °C og selv om det ble observert vekst dannet ingen stammer sporer. Observasjonene i forsøket indikerte at vegetative celler ikke klarte å utvikle endosporer ved dette temperaturområdet. Dette stemte med resultatene i dette vekstforsøket da stammene ikke dannet sporer ved 4 og 8 °C, men kun etter inkubasjon ved 22 °C.

### **4.3 Flyktige komponenter, organiske syrer og karbohydrater**

Resultatene fra de kjemiske analysene viste noen endringer, noe som indikerer tilstedeværelse av metabolsk aktivitet i prøvene.

#### **4.3.1 Inkubasjon ved 4 og 8 °C**

Inkubasjon av stammene ved 4 og 8 °C viste ingen stor effekt på innholdet av sitronsyre da konsentrasjonen varierte fra rundt 2050 ppm til 1978 ppm gjennom hele inkubasjonsperioden. Det ble heller ikke observert noen stor innvirkning på innholdet av laktose og galaktose gjennom inkubasjonsperioden uavhengig av stamme, art og lengde på inkubasjon. Det ble ikke detektert eddiksyreproduksjon etter inkubasjon ved 4 °C, men etter inkubasjon ved 8 °C i 7 døgn ble det detektert eddiksyreproduksjon for stamme 1 av *B. mycoides*, og stamme 5 og 6 av *B. cereus* med en verdi mellom 120-130 ppm.

Resultatene etter inkubering av stammene ved 4 og 8 °C viste generelt ingen endring eller svært lave mengder av de flyktige komponentene det ble analysert for.

Når det gjaldt ravsyre avtok mengden noe med økende inkubasjonstemperatur og tid for de fleste av stammene. Etter inkubering ved 4 °C skjedde den største reduksjonen for stamme 1 og 6, hhv *B. mycoides* og *B. cereus* med en reduksjon fra ca 500 ppm til 400-420 ppm.

Stamme 1 og 5 økte i antall når det gjaldt bakterievekst etter inkubasjon ved 4 °C, og dermed viste disse to stammene både en økning i bakteriekonsentrasjon og en økning av metabolsk aktivitet med hensyn til ravsyreproduksjon. Etter inkubasjon ved 8 °C var ravsyren fullstendig nedbrutt for disse stammene, og de viste også økt vekst under vekstforsøket ved samme temperatur. Ravsyreutviklingen for stamme 6 etter inkubasjon ved 8 °C er det derimot vanskelig å si noe sikkert om da de resultatene viste et høyt standardavvik.

Melkesyre- og maursyreproduksjon ble kun detektert for én av de seks stammene etter inkubasjon ved 4 °C. Dette var *B. cereus* stamme 6 som produserte 6,6 ppm maursyre og 65 ppm melkesyre, men da sistnevnte verdi kun ble detektert i 1 av de 3 gjentakene er det noe usikkerhet rundt denne verdien. Fra vekstforsøk viste denne stammen ingen økning i celletall etter inkubering ved 4 °C. Dette kan tyde på at denne stammen av *B. cereus* hadde lav metabolsk aktivitet til tross for ingen økning i bakteriekonsentrasjon ved samme temperatur.

Stamme 1 og 5 viste både en økning av bakterievekst og metabolsk aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C. Til tross for ingen økning i celletall viste stamme 6 noe metabolsk aktivitet når det gjaldt melkesyre- og maursyreproduksjon ved samme temperatur.

*Bacillus mycoides*, stamme 1 og *B. cereus* stamme 5 og 6 produserte mellom 42-54 ppm melkesyre etter 7 døgns inkubering ved 8 °C, mens etter inkubasjon ved 8 °C var det kun stamme 1 som produserte maursyre, 6 ppm.

#### 4.3.2 Inkubasjon ved 22 °C

Stamme 3, 4 og 6, alle av arten *B. cereus* viste noe degradering av sitronsyre etter inkubasjon ved 22 °C. Stamme 4 hadde den laveste verdien som ble detektert i dette forsøket med 1764 ppm sitronsyre etter 3 døgns inkubering ved 22 °C. Etter inkubering ved 22 °C i 1 døgn var

ravsyren hos *B. cereus* stamme 3 og 6 fullstendig nedbrutt, mens stamme 1, 4 og 5, hhv *B. mycooides* og to *B. cereus* også viste stor nedbrytning av ravsyre.

Sitronsyre og ravsyre var tilstede i melken fra starten av. Dette er bekreftet av Walstra et al. (2005) som videre beskriver at 0,17 % av melken er organiske syrer, og at sitronsyre er den mest vanlige. Ved økende temperatur, og der hvor bakteriene viste en økning i vekst, avtok mengden av disse organiske syrene proporsjonalt med vekst og derved behov for økt næring.

Tre av 4 stammer av *B. cereus* degraderte sitronsyre etter inkubasjon ved 22 °C, og samtlige stammer av *B. cereus* degraderte ravsyre, i tillegg til *B. mycooides*. *Bacillus licheniformis* viste derimot kun en liten reduksjon av ravsyre, som først ble tydelig etter 3 døgn inkubasjon ved 22 °C.

Alle stammer bortsett fra *B. licheniformis* stamme 2, produserte eddiksyre og maursyre etter inkubering ved 22 °C. Stamme 6 og 4 av *B. cereus* viste mest eddiksyreproduksjon, og det var tilsvarende stammer som viste mest maursyreproduksjon også. Disse resultatene hadde derimot høye standardavvik. Når det gjelder melkesyre var det egentlig bare *B. cereus* stamme 4 som viste en betydelig melkesyreproduksjon med ca 2300 ppm, noe som sammenfaller med den observerte pH nedgangen for denne stammen. Dette bekreftes av Walstra et al. (2005) som videre beskriver at tilstedeværelse og aktivitet av melkesyrebakterier kan øke konsentrasjon av melkesyre. Resultatene oppnådd i denne studien kan indikere at *Bacillus* spp. har den samme effekten når det gjelder økning av konsentrasjon av melkesyre.

Innholdet av laktose og galaktose etter inkubering ved 22 °C varierte mellom stammene. Stamme 4 av *B. cereus* viste en nedbrytning av laktose fra et opprinnelig innhold på 48000 ppm til under 45000 ppm. For galaktose økte innholdet hos stamme 4 med lengde på inkuberingen, hvor startnivået var på rundt 50 ppm og sluttnivået var over 140 ppm etter 3 døgns inkubering. En årsak til dette kan være at når laktose spaltes til glukose og galaktose kan glukose raskt bli forbrukt, og dersom bakterien ikke kan omsette galaktose eller har nok glukose tilgjengelig kan galaktose hope seg opp.

Det lyktes ikke med å finne relevant litteratur om metabolisme av *Bacillus* spp. i melk under tidsperioden avsatt denne oppgaven. Generelt finnes det lite forsøk gjort på dette tidligere, og det er dermed vanskelig å si noe konkret om disse resultatene.

Det var kun etter inkubasjon ved 22 °C at det ble observert endringer hos de flyktige komponentene. Stamme 4 av *B. cereus* skilte seg ut i denne analysen, med større produksjon av acetaldehyd, etanol og acetoin enn de andre *B. cereus* stammene. Når det gjaldt acetone viste også *B. mycoides* stamme 1 og *B. cereus* stamme 5 og 6 et høyere innhold enn stamme 2, 3 og 4. Disse resultatene hadde derimot høyt standardavvik, og det er dermed vanskelig å si noe sikkert. *Bacillus licheniformis* viste den laveste produksjonen av flyktige komponenter.

#### 4.4 Sammenfatning av resultater

Samlet ga resultatene fra diffusjonsanalysen en god oversikt over evnen de ulike stammene hadde til å uttrykke enzymaktivitet av de ulike typene, og innenfor hver art kunne det også være ulikheter. Resultatene fra diffusjonsanalysen og kapillærelektroforesen viste en klar sammenheng, og resultatene fra diffusjonsanalysen kunne dermed fungere som en indikator på hvilke resultater man kunne forvente å se på kapillærelektroferogrammene. De ulike stammene av *Bacillus* spp. hadde ulike evner til å uttrykke proteolytisk aktivitet ved de forskjellige inkubasjonstemperaturene. Resultatene oppnådd ved hjelp av de kjemiske analysene viser at proteinaser også var aktive ved lave temperaturer som 4 °C, men ikke i like stor grad som ved 22 °C. Proteinnedbrytningen i kapillærelektroferogrammene var mest tydelig etter inkubering ved 8 og 22 °C, og mindre tydelig etter inkubasjon ved 4 °C.

Resultatene fra de frie aminosyrene var ikke like tydelige som resultatene fra kapillærelektroforese og diffusjonsanalysen. Dette kan indikere at økningen av frie aminosyrer tok noe lenger tid enn nedbrytningen av de store kaseinfraksjonene, som i noen tilfeller skjedde ganske raskt. Fersk melk inneholder kun små mengder aminosyrer, men når proteiner blir nedbrutt kan det oppstå en økning i mengde frie aminosyrer som bakteriene kan benytte som næring (Walstra et al. 2005).

Resultatene viste at *B. mycoides*, stamme 1 og to stammer av *B. cereus*, stamme 5 og 6 var i stand til å vokse ved 4 og 8 °C.

Temperatur var av stor betydning for den metabolske utviklingen i dette forsøket, og aktiviteten ble betydelig høyere ved økt temperatur. Likevel ble det observert noe aktivitet etter inkubasjon ved 4 og 8 °C, hvor spesielt førstnevnte temperaturområde kan knyttes opp mot anbefalt kjøletemperatur. Stamme 1 av *B. mycoides* og stamme 5 av *B. cereus* skilte seg ut i dette forsøket, og de andre stammene av *B. cereus* hadde ikke tilsvarende metabolsk aktivitet før ved høyere temperaturer. Stamme 5 ble opprinnelig isolert fra lagret melk

inkubert ved 8 °C, og den viste psykrotrofe egenskaper da den vokste ved 4 °C. Dette understøtter viktigheten av ubrutt kjølekjede og oppbevaring ved tilstrekkelig lav kjøletemperatur, optimalt under 4 °C.

Enkelte stoffer ble det ikke detektert spor av, og for noen prøver ble det ikke detektert endringer i innholdet. Dette betyr ikke nødvendigvis at det aktuelle stoffet var fraværende, og ikke ble produsert eller benyttet. Det kan være en indikasjon på at enkelte metabolske prosesser ikke inntraff.

#### 4.5 Oppsummering og konklusjon

Det innledende forsøket viste en stor variasjon i proteolytisk, lipolytisk og fosfolipolytisk aktivitet for de 55 ulike stammene ved ulike temperaturer og det var også variasjoner innenfor hver art. De 55 ulike stammene bestod av 31 stammer av arten *B. cereus*, 9 stammer av *B. licheniformis*, 7 stammer av *B. mycooides*, 2 stammer av *B. subtilis*, 3 stammer av *K. rhizophila*, og 1 stamme hver av *B. pumilus* og *B. amyloliquefaciens*.

*Bacillus mycooides* og en stamme av *B. cereus* var i stand til å vokse og uttrykke proteolytisk og lecitinase aktivitet etter inkubasjon ved 4 °C og i tillegg var én stamme av *B. cereus* også i stand til å uttrykke noe proteolytisk aktivitet ved samme temperatur til tross for manglende vekst. Det var generelt lav vekst, metabolsk aktivitet og proteinnedbryting med noen unntak etter inkubering ved 4 °C etter 11 dager. Disse effektene ble mer tydelige etter inkubasjon ved 8 og 22 °C.

*Bacillus licheniformis* viste seg å være mindre proteolytisk enn de andre stammene i dette forsøket, og den uttrykte generelt liten aktivitet både når det gjaldt vekst og metabolisme.

Resultatene i dette forsøket viste at dersom melken inneholdt en start bakteriekonsentrasjon på rundt 3,8-4,14 log kde/ml, kunne denne konsentrasjon gjennom 11 dager ved 4 °C til 5,45-5,7 log kde/ml., hvor 11 dager er melkens holdbarhetstid ved kjølelagring. Dette understreker viktigheten av å opprettholde en ubrutt kjølekjede frem til meieriet og under lagring før pasteurisering, og det er viktig å ta i bruk tiltak for å redusere kontaminering samt holde et stort fokus på hygiene og lav temperatur under hele prosessen. Ved å unngå temperaturøkning fra 4 til 8 °C vil veksten av *Bacillus* spp. begrenses. Dette kan redusere forekomsten av hydrolytiske enzymer, da *Bacillus* i de aller fleste tilfeller trengte bakterievekst for å uttrykke enzymaktivitet.

Samlet ga resultatene i denne masteroppgaven en oversikt over evnen de ulike artene, og også flere stammer innen hver art hadde til å uttrykke proteolytisk aktivitet i UHT-behandlet melk ved ulike temperaturer.

#### 4.6 Videre arbeid

Når det gjelder veien videre kunne det vært av interesse å undersøke den lipolytiske aktiviteten samt lecitinase aktiviteten for de seks stammene i mer detalj, da det kun ble fokusert på proteolytisk aktivitet i hovedforsøket. Den lipolytiske aktiviteten kunne blitt undersøkt ved hjelp av diverse fettsyre-analyser som forteller noe om innholdet av frie fettsyrer.

I denne masteroppgaven ble tre arter valgt ut til å undersøkes videre i et hovedforsøk, og disse artene var *B. mycoides*, *B. licheniformis* og *B. cereus*. Det kunne vært interessant å gjøre et tilsvarende forsøk på andre arter også, men også på flere stammer inne hver art. Det var kun én stamme hver av *B. mycoides* og *B. licheniformis* i dette forsøket og det er ikke nok grunnlag til å trekke bastante konklusjoner. Det kunne også vært interessant å undersøke veksten ved bruk av risting under inkuberingen, da dette har vist seg å utgjøre en forskjell på veksten rapportert i andre forsøk. Det kunne også vært interessant å undersøke bakterienes evne til å sporulere ved ulike temperaturer.

Ettersom at det er lite litteratur rundt metabolisme av *Bacillus* spp. i melk kunne dette vært interessant å undersøke dette videre.

Å utføre statistiske analyser på noen av resultatene kunne ha vært fordelaktig, men dette ble det ikke tid til i denne oppgaven da tiden var begrenset.





## 5.0 Referanser

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). Microbiology of Primary Food Commodities. I: *Food Microbiology*, s. 121-130. University of Surrey, Guildford, UK: RSC Publishing.
- Andersen Borge, G. I., Skeie, M., Sørhaug, T., Langsrud, T. & Granum, P. E. (2001). Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *International Journal of Food Microbiology*, 69 (3): 237-246.
- André, S., Vallaëys, T. & Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology*, 168 (4): 379-387.
- Brown, K. (2000). Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*, 56 (1): 158-171.
- Bütikofer, U. & Ardö, Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *International Dairy Federation*.
- 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.
- Chen, L., Coolbear, T. & Daniel, R. M. (2004). Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14 (6): 495-504.
- Christiansson, A., Bertilsson, J. & Svensson, B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of dairy science*, 82 (2): 305-314.
- Chu, H. (1949). The lecithinase of *Bacillus cereus* and its comparison with *Clostridium welchii*  $\alpha$ -toxin. *Microbiology*, 3 (2): 255-273.
- Corry, J. E., Curtis, G. D. & Baird, R. M. (2011). *Handbook of culture media for food and water microbiology*: Royal Society of Chemistry.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P. & Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136 (3): 318-325.
- de Santana, E. H. W., Beloti, V., Müller, E. E., de Aguiar Ferreira, M., de Moraes, L. B., Pereira, M. S. & Gusmão, V. V. (2004). Milk contamination in different points of the dairy process. ii) mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. *Semina: Ciências Agrárias*, 25 (4): 349-358.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning, smitte gjennom mat og vann* Cappelen Damm AS.
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21 (9): 601-606.

- Heck, J. M. L., Olieman, C., Schennink, A., van Valenberg, H. J. F., Visker, M. H. P. W., Meuldijk, R. C. R. & van Hooijdonk, A. C. M. (2008). Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 18 (5): 548-555.
- Janštová, B., Dračková, M. & Vorlová, L. (2004). Influence of *Bacillus* spp. enzymes on ultra high temperature-treated milk proteins. *Acta Veterinaria Brno*, 73 (3): 393-400.
- Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J. A. & Griffiths, M. W. (1998). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 43 (3): 159-171.
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J. & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166 (2): 270-279.
- Macfarlane, M. G. & Knight, B. (1941). The biochemistry of bacterial toxins: The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochemical Journal*, 35 (8-9): 884.
- Mattilsynet. (2012). *Bacillus cereus*. Tilgjengelig fra: [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/smitte\\_fra\\_mat\\_og\\_drikke/bakterier\\_i\\_mat\\_og\\_drikke/bacillus\\_cereus.2503](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/smitte_fra_mat_og_drikke/bakterier_i_mat_og_drikke/bacillus_cereus.2503) (lest 14.04).
- Mattilsynet. (2016 a). *Mikrobiologiske farer forbundet med melk og melkeprodukter*. Tilgjengelig fra: [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/produksjon\\_av\\_mat/melk\\_og\\_meieriprodukter/mikrobiologiske\\_farer\\_forbundet\\_med\\_melk\\_og\\_melkeprodukter.5103](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/melk_og_meieriprodukter/mikrobiologiske_farer_forbundet_med_melk_og_melkeprodukter.5103) (lest 13.04).
- Mattilsynet. (2016 b). *Rå melk bør varmebehandles*. Tilgjengelig fra: [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/produksjon\\_av\\_mat/melk\\_og\\_meieriprodukter/raa\\_melk\\_bor\\_varmebehandles.10218](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/melk_og_meieriprodukter/raa_melk_bor_varmebehandles.10218) (lest 09.05).
- Melk.no. (2016 a). *Tall og fakta* Tilgjengelig fra: <https://www.melk.no/Tall-og-fakta> (lest 04.04).
- Melk.no. (2016 b). *Kaseiner*. Tilgjengelig fra: <https://www.melk.no/Meierileksikon/Naeringsstoffer/Kaseiner> (lest 13.04).
- Mellegård, H. (2015). *Bakteriefloraen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom*. NMBU. Tilgjengelig fra: <https://www.nmbu.no/forskning/tema/mat/prosjekter/node/21222> (lest 20.03).
- Mestawet, T., Girma, A., Ådnøy, T., Devold, T., Narvhus, J. & Vegarud, G. (2014). New insights in goat breeds of Ethiopia: High content of  $\alpha$  s1-CN and its association with coagulation properties, whey syneresis and micelle size. *Small Ruminant Research*, 119 (1): 146-155.

- Moe, K. M., Porcellato, D. & Skeie, S. (2013). Metabolism of milk fat globule membrane components by nonstarter lactic acid bacteria isolated from cheese. *Journal of Dairy Science*, 96 (2): 727-39.
- Nabrdalik, M., Grata, K. & Latała, A. (2010). Proteolytic activity of *Bacillus cereus* strains. *Proceedings of ECOpole*, 4.
- Nakamura, L. & Jackson, M. (1995). Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45 (1): 46-49.
- Narvhus, J. A., Osteraas, K., Mutukumira, T. & Abrahamsen, R. K. (1998). Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 41 (1): 73-80.
- Patiño-Navarrete, R. & Sanchis, V. (2017). Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Research in Microbiology*, 168 (4): 309-318.
- Reinholdtsen, G. R. (2015). *Termoresistente bakterier i melk* NMBU, ÅS, IKBM. 57 s.
- Samaržija, D., Zamberlin, Š. & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62 (2): 77-95.
- Simões, M., Simões, L. C. & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (4): 573-583.
- 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.
- TINE. (u.å). *Råstofftilgang*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/markedsregulator/fakta-og-prognoser/melkeleveranser> (lest 4.04).
- Ulleberg, E. K. (u.å). *Melk inneholder proteiner av høy kvalitet*. Melk.no. Tilgjengelig fra: <https://www.melk.no/Kosthold-og-helse/Melk-og-helse/Melk-inneholder-proteiner-av-hoey-kvalitet> (lest 13.04).
- Univeristy of Guelph. (2017). *Caseins*. Tilgjengelig fra: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/caseins>.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. & Geurts, T. J. (2005). *Dairy science and technology*: CRC press.
- Wiedmann, M. & Zhang, W. (2011). Genomics of *Bacillus* species. I: *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens* s. 36: Springer.
- Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H. & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology*, 73 (5): 1481-1488.



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway