



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Davide Porcellato NMBU

***Bacillus weihenstephanesis* samkulturert med *Pseudomonas* spp. og *Paenibacillus lactis* i kjølelagret melk: Vekst og produksjon av kvalitetsforringede komponenter**

Maiken Jeanette Larsen

Matvitenskap
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet som en avsluttende del av mastergradstudiet matvitenskap ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven er en liten del av prosjektet: Bakteriefloreaen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom. Prosjektet er et samarbeidsprosjekt mellom veterinærhøyskolen og NMBU Ås.

Først og fremst ønsker jeg å takke hovedveileder Davide Porcellato for god veiledning og tilstedeværelse under arbeidet med oppgaven, og biveileder Marina Elisabeth Aspholm for innspill og hjelp med skriveprosessen. Jeg ønsker også å takke Ahmed Abdelghani, Kari Olsen og May Helene Aalberg for deres uvurderlige hjelp på laboratoriet. Deres gode humør og endeløse kaffekopper. Dere har bidratt til trivsel og hygge i lange dager med laboratoriearbeid. Jeg ønsker også å takke Marte Monshaugen og Stine Therese Aanrud for hjelp med overbringning av bakterieisolater, prøvemateriale og utføring av cereulid analyser.

En stor takk til Tine SA for finansiering. Uten den økonomiske støtten hadde det ikke vært mulig å gjennomføre oppgaven.

Til slutt vil jeg takke min samboer Lloyd og datter Sigrid for tålmodighet og støtte under studietiden min, og spesielt under arbeidet med masteroppgaven. Dere er fantastiske!



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Ås, 15.08.2018

Maiken Jeanette Larsen

Sammendrag

Sammensetningen av den psykotrofe bakteriefloraen i melk endres over tid og påvirkes blant annet av årstid, kjøletemperatur og tidspunkt i holdbarhetsperioden. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke hvordan *Bacillus weihenstephanensis* i samkultur med *Pseudomonas* spp. og *Paenibacillus lactis* i melk, påvirker uttrykking av kvalitetsforringende komponenter ved ulike temperaturer. Hovedfokus var proteolytisk aktivitet, men det ble også undersøkt om samkultivering hadde en innvirkning på vekst hos bakterier samkultivert sammenlignet med enkeltkultur. og *Bacillus weihenstephanensis* produksjon av det emetiske toksinet cereulid.

UHT-melk ble inokulert med *Bacillus weihenstephanensis* i samkultur med *Pseudomonas* spp. og *Paenibacillus lactis*. Inokulert melk ble lagret ved to ulike temperaturer: 8- og 15°C gjennom tre replikat. Det ble tatt ut mikrobielle og kjemiske prøver ved dag 1, 2 og 5 for melk lagret ved 15°C, og ved dag 2, 4, 7 og 14 for melk lagret ved 8°C. Prøvene ble analysert for bakterievekst, peptid- og proteinnedbrytning, pH-verdi, kvantifisering av karbohydrater og organiske syrer samt deteksjon og kvantifisering av cereulid.

Resultatene viste at vekst av *Pseudomonas* dominerte i samtlige melkeprøver, ved siste uttak. Da *Pseudomonas* var samkultivert med *Bacillus weihenstephanensis* MC67 ved 8°C, førte dette til lavere vekst av *Bacillus weihenstephanensis* MC67.

Sammenlignet med total bakteriekonsentrasjon i samkulturer ble det ikke avdekket vesentlig høyere proteolytisk aktivitet.

Pseudomonas dominerer i melk gjennom kjølelagring og kan hemme veksten av andre psykotrofe bakterier. Melken i dette forsøket ble inokulert med like mengder bakterier ved start. Slik er det derimot ikke naturlig i melk. Forslag til videre forskning omhandlende samkultivering kan være å inokulere med ulike mengdeforhold av bakterier. Siden melken kjølelagres ved 4°C, kunne det vært hensiktsmessig å utføre lignende forsøk ved denne temperaturen, med bakterier som kan vokse ved 4°C

Abstract

The composition of the psychotrophic bacterial flora in milk, changes over time and is influenced by factors like season, cold storage temperature and storage time. The purpose of this study was to investigate how *Bacillus weihenstephanensis* in co-culture with *Pseudomonas* spp. and *Paenibacillus lactis* in milk, affects the expression of spoilage components under growth of cold storage. The main focus was proteolytic activity, but it was also investigated whether co-cultivation had an effect on *Bacillus weihenstephanensis* production of the emetic toxin cereulide.

UHT milk was inoculated with *Bacillus weihenstephanensis* in co-culture with *Pseudomonas* spp. and *Paenibacillus lactis*. Inoculated milk was stored at two different temperatures: 8- and 15 °C through three replicates. Microbial and chemical samples were taken on day 1, 2 and 5 for milk stored at 15°C and at day 2, 4, 7 and 14 for milk stored at 8°C. Samples were analyzed for bacterial growth, peptide and protein degradation, pH, quantification of carbohydrates and organic acids, as well as detection and quantification of cereulide.

The results showed that growth of *Pseudomonas* dominated in all milk samples, at last withdrawal. When *Pseudomonas* was co-cultivated with *Bacillus weihenstephanensis* MC67 at 8°C, this resulted in lower growth of *Bacillus weihenstephanensis* MC67.

Compared with total bacterial concentration in co-cultures, significantly higher proteolytic activity was not detected.

Pseudomonas dominates milk through cold storage and can inhibit the growth of other psychotrophic bacteria. The milk in this experiment was inoculated with equal amounts of bacteria at the start. However, it is not like that in the natural environment in milk. Suggestions for further research on co-cultivation may be to inoculate with different amounts of bacteria. Since the milk was cooled at 4°C, it could be expedient to perform similar experiments at this temperature, with bacteria that can grow at 4°C

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	1
SAMMENDRAG	2
1.0 INNLEDNING	6
1.1 MELKENS SAMMENSETNING	6
1.1.1 Melkeproteiner	7
1.1.2 Melkefett	8
1.1.3 Melkesukker.....	8
1.2 KONTAMINERINGSKILDER	8
1.3 MELK SOM SUBSTRAT FOR MIKROORGANISMER	9
1.4 KVALITETSFORRINGENDE KOMPONENTER I MELK	11
1.5 PSYKOTROFE BAKTERIER I MELK	13
1.5.1 <i>Pseudomonas</i>	14
1.5.2 <i>Bacillus cereus</i>	14
1.5.3 <i>Paenibacillus</i>	15
1.6 VARMEBEHANDLIG AV MELK.....	16
1.7 SPOREDANNENDE BAKTERIER I MELK	17
1.8 EUS RETNINGSLINJER FOR HYGIENE I MEIERIINDUSTRIEN	18
1.9 HENSIKT.....	19
2.0 MATERIALER OG METODER	20
2.1 BAKTERIESTAMMER.....	20
2.1.1 <i>Rendyrking av bakteriekulturer</i>	20
2.1.2 <i>Nedfrysing av bakteriekulturer</i>	21
2.2 GENOTYPISK IDENTIFISERING VED SEKVENSERING.....	22
2.2.1 <i>Isolering av genomisk DNA</i>	22
2.2.2 <i>Valg av primer og tillaging av mastermix</i>	22
2.2.3 <i>Agarosegelelektroferese</i>	24
2.2.4 <i>Rensing av PCR-produkt og sekvensering</i>	25
2.3 INNLEDENDE VEKSTFORSØK	26
2.3.1 <i>Forberedelse til vekstforsøk</i>	26
2.3.2 <i>Podning til vekstforsøk</i>	26
2.3.3 <i>Uttak</i>	27
2.4 SAMKULTIVERING	29
2.4.1 <i>Forberedelse til vekstforsøk</i>	29
2.4.2 <i>Podning til vekstforsøk</i>	30
2.4.3 <i>Uttak</i>	30
2.5 KJEMISKE ANALYSER	31
2.5.1 <i>Kvantifisering av organiske syrer og karbohydrater i melk ved High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	31
2.5.2 <i>Peptid- og proteinnedbrytning ved kappillærelektroferese</i>	32
2.5.3 <i>Deteksjon av cereulid</i>	33
3.0 RESULTATER	34
3.1 GENOTYPISK IDENTIFISERING	34
3.2 BAKTERIEVEKST VED PLATETELLING.....	34
3.3 VEKSTFORSØK.....	36
3.3.1 <i>Vekstforsøk 15 °C</i>	36
3.3.2 <i>Vekstforsøk ved 8°C</i>	39
3.4 PEPTID- OG PROTEINNEDBRYTNING	43
3.5 SENSORISK ANALYSE	48

3.6 KARBOHYDRAT OG ORGANISKE SYRER	49
3.7 PH.....	54
3.8 CEREULID.....	55
4.0 DISKUSJON.....	56
4.1. VEKSTFORSØK.....	56
4.2 PEPTID OG PROTEINNEDBRYTNING.....	59
4.3 KVANTIFISERING AV KARBOHYDRAT OG ORGANISKE SYRER.....	63
4.4 PRODUKSJON AV CEREULID	64
4.5 OPPSUMMERING OG VIDERE FORSKNING	66
REFERANSER	67

Vedlegg på USB: 5 stk.

1. LC/MS; Prøveopparbeiding og metode for kvantifisering av cereulid
2. Rådata for vekstforsøk
3. HPLC; rådata for kvantifisering av karbohydrat og organiske syrer
4. CE; rådata for prosentvis nedbrytning av kasein
5. Rådata for analyse av cereulidkonsentrasjon

1.0 Innledning

1.1 Melkens sammensetning

Melk sekreses fra melkekjertler hos pattedyr med formål om å gi næring til avkommet (Adams & Moss, 2008). Melkens sammensetning av vann, fett, proteiner, laktose, vitaminer og mineraler gir avkommet fullverdig næring den første levetiden. Innholdet av makro- og mikronæringsstoffer i melk varierer mellom ulike pattedyr og arter. Hovedkomponenten i melk er vann. Det resterende innholdet betegnes som tørrstoff. Ku-melk består typisk av; 4% fett, 3,3% proteiner og 4,6% laktose, men sammensetningen varierer (Walstra, Wouters & Geurts, 2006). Sammensetningen varierer hovedsakelig med genetiske faktorer, men faktorer som årstid, laktasjonsfase, stadium i melkingen, intervall mellom melking, fôr og kuas helsetilstand påvirker også sammensetningen. For eksempel har melken hos Jersey kua et høyere innhold av fett (5,1%) og proteiner (3,8%) mens melk fra Short horn kua inneholder 3,6% fett og 4,9% protein (Adams & Moss, 2008). Typisk sammensetning av kumelk er presentert i tabell 1.1 (Walstra et al., 2006).

Tabell 1.1. Omtrentlig sammensetning i melk (Walstra et al., 2006).

Komponenter i melk	Innhold (% w/w)	Variasjonsbredde* (% w/w)
Vann	87,10	85,30 – 88,70
Protein	3,30	2,30 – 4,40
Kasein	2,60	1,70 - 3,50
Fett	4,00	2,50 - 5,50
Karbohydrat	4,60	3,80 – 5,30
Mineraler	0,70	0,57 – 0,83
Organiske syrer	0,170	0,12 – 0,21

* Variasjonsbredden overskrides sjelden (ca. 1 - 2% av alle prøver) i melk fra individuelle friske kuer.

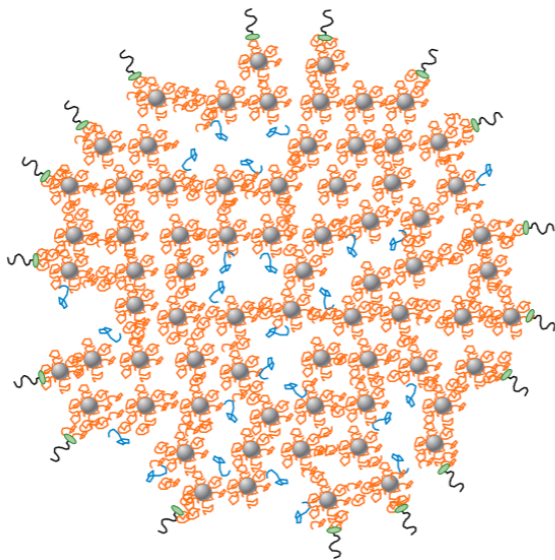
Kumelkens innhold av protein består av ca. 80% kasein og 20% myseprotein (Walstra et al., 2006). Kasein er utgjør de fire proteinfragmentene α_{S1} -, α_{S2} -, β - og κ -kasein med mengdeforholdet 4-1-4-1. Serumprotein er globulære proteiner som inkluderer myseproteinene β -lactoglobulin og α -lactalbumin, immunoglobulin og serum albumin.

Laktose er hovedkarbohydratet i melk og er et disakkarid bestående av glukose og galaktose. Innholdet av mineraler varierer mye men de viktigste mineralene i melk er kalium, natrium, kalsium, magnesium og fosfat. Av organiske syrer er citrat hovedkomponenten. I tillegg kan

melken inneholde små mengder andre organiske syrer. Innholdet av disse organiske syrene kan øke som et resultat av bakteriers metabolisme. Eksempel på slike organiske syrer er sporstoff av melkesyre eller pyrodruesyre. I melk opptrer organiske syrer som ioner eller salter.

1.1.1 Melkeproteiner

Hoveddelen av proteiner i kumelk er kaseiner som utgjør som nevnt 80% av det totale proteininnholdet (Walstra et al., 2006). Kaseinene er utstrakte peptidkjeder med manglende sekundærstruktur. Derfor denaturerer ikke kaseiner ved varmebehandling. I melk opptrer kaseiner som kaseinmiceller hvor α_{S1} -, α_{S2} -, β - og κ -kasein sammen med vann og kalsiumfosfat utgjør strukturen (Daglish & Corredig, 2012). Kaseinmicellen holdes sammen av hydrofobe bindinger og kryssbindinger mellom peptidgrupper som inkorporerer nanoklusterer av kalsiumfosfat. Overflaten dekket av κ -kasein. Figur 1.1 viser modellen av den hårete kaseinmicellen illustrert av Daglish & Corredig (2012).



Figur 1.1. Illustrasjon av kaseinmicellen. Nanoklusterer av kalsium fosfat (grå sirkler) binder og holder sammen α_{S1} -, α_{S2} - og β -kasein (orange). Noe β -kasein (blått) er temperaturavhengig og hydrofobisk bundet. Para-kasein (grønt) og κ -kasein omslutter overflaten hvor κ -kasein vender sin hydrofile C-terminale ende ut mot myseserum (Daglish & Corredig, 2012).

På grunn av oppbygningen med serin-fosfatbindinger er kaseinene negativt ladet (Walstra et al., 2006). Når de hydrofobe proteinene opptrer som kaseinmiceller i kumelk vil overflaten være dekket av κ -kasein, som vender sin C-terminale ende ut mot myseserum (Daglish & Corredig, 2012). Dette gjør at kaseinmicellen får en hydrofil, negativt ladet overflate. Kaseinmicellene vil da holde en viss avstand fra hverandre og unngå aggregering. Dette gjør kaseinmicellen løselig i myseserum og κ -kasein øker stabiliteten i kaseinmicellen. I motsetning til kaseinene

har myseproteiner en globulær struktur. Myseprotein i melk er β -lactoglobulin og α -lactalbumin (Walstra et al., 2006). Myseproteinene er kompakt foldete, hydrofobe peptidkjeder. På grunn av sekundærstrukturen denaturerer myseproteiner ved varmebehandling.

1.1.2 Melkefett

Melk er en olje-i-vann-emulsjon hvor melkefettet er fordelt i serum som fettglobuler (Bylund, 1995). Melkefettet består hovedsakelig av triglycerid som danner fettglobuler med di- og monoglycerider, fettsyrer, steroler, karotenoider, fettløselige vitaminer (vitamin A, D, E og K) og vann. Fettglobulene har en diameter på 0,1-20 μm hvor gjennomsnittsstørrelsen er 3-4 μm . I tillegg til å være de største partiklene i melk er fettglobulene også de letteste. Dette gjør at fett har en tendens til å legge seg på overflaten av melken og danne et fløtelag om uhomogenisert melk får stå en stund i spann etter melking.

1.1.3 Melkesukker

Disakkaridet laktose, er satt sammen av monomerene D-glukose og D-galaktose som utgjør karbohydratet i melk (Walstra et al., 2006). Laktose syntetiseres i golgivesikler i lakterende celler. Myseprotein α -lactalbumin er involvert i denne syntesen. D-glukose og D-galaktose er linket sammen mellom aldehydgruppen til galaktose og C-4 gruppen til glukose gjennom en β -1-4-glykosid binding. Laktose kan ikke tas opp i blodet og β -1-4-glykosid bindingen må spaltes av enzymet laktase før monomerene kan tas opp i blodet hos mennesker. Laktose er en viktig energikilde til avkommet til pattedyr og disakkaridet bidrar også til søt smak på melken.

1.2 Kontamineringskilder

Når melken sekreseres inne i juret er den tilnærmet steril. Under og etter melking er det derimot en rekke kontamineringskilder for mikroorganismer til melk (Adams & Moss, 2010). Bakterier utenpå juret kan invadere spenen. Under melking kan bakteriene komme i kontakt med melken og dermed kontaminere melken. Aseptisk melket melk fra friske kuer inneholder typisk mindre $10^2 - 10^3$ kolonidannende enheter (KDE) per mL melk. På grunn av melks høye vannaktivitet, moderate pH og høye næringsinnhold, er det nærmest umulig å unngå kontaminering av bakterier. Ved sykdom hos kua som ved mastitt, øker bakterietallet betraktelig. Mastittmelk kan inneholde mer enn 10^8 KDE/mL melk. Ved slike tilfeller er makroskopiske endringer visuelle i melken. Kuas miljø er også en viktig kontamineringskilde. Generelt er dette et større problem om vinteren når kua står inne i fjøset under fuktige forhold, sammenlignet med om sommeren,

når kua gresser utendørs. Andre kontamineringskilder er luft, fôr og personell på gården som er i kontakt med kua og melken. En annet viktig kontaminasjonskilde er melkeutstyret. Ved dårlige vaskerutiner av melkeutstyr kan det dannes biofilm. Biofilmer er svært vanskelig å eliminere og er en viktig kontamineringskilde for melk. Daglig vasking og desinfisering av melkeutstyret, i tillegg til hurtig nedkjøling av melken, er de viktigste faktorene for å oppnå god bakteriell kvalitet av melk.

1.3 Melk som substrat for mikroorganismer

Melkens innhold av makro- og mikronæringsstoffer samt den høye vannaktiviteten og moderate pH, gjør den til en gunstig næringskilde for både for pattedyr og mikroorganismer (Walstra et al., 2006 & Adams & Moss, 2010). Mikroorganismer som vokser i melk kan være mugg, gjær og bakterier, hvor bakterier er de viktigste. Bakterievekst i melk er forbundet med kvalitetsforringelse. Melkekvaliteten måles ved bakterietall i melken og melk av god kvalitet skal inneholde mindre enn 100.000 bakterier/mL melk (totaltall) (Gopal et al., 2015). Melk er et gunstig vekstsubstrat for mange bakterier. Derfor er rå melkens mikrobielle flora kompleks og svært variabel. Den mikrobielle sammensetningen i rå melk endres med årstidene (Doyle, Gleeson, O'Toole & Cotter, 2017). Grunnen til denne sesongavhengige variasjoner er at kua eksponeres for ulike miljøer. Vår og sommer gresser kua utendørs, mens den om sommeren står innendørs. Dette har en direkte påvirkning på den mikrobielle sammensetningen i rå melk. Antall og type bakterie, samt naturlig inhiberende systemer i melken påvirker kvalitet og holdbarhet av melk (Adams & Moss, 2010). Disse faktorene i tillegg til lagringstid og temperatur av melken påvirker bakterieveksten (O'Connell et al., 2016, Muir, Kelly & Phillips, 1978).

Høyt antall bakterier i rå melk senker holdbarheten av pasteurisert melk og er assosiert med kvalitetsforringing (Barbano & Santos, 2006). Når melk blir forringet endres dens karakteristiske smak, lukt og utseende, slik at den ikke lenger er akseptbar for konsum (Adams & Moss, 2010). Slike endringer kan føre til lukt og smaksfeil, såkalte kvalitetsfeil.

Bitter smak i melk kommer som en følge av dannelsen av bitre peptider forårsaket av proteinaser fra *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia* og *Bacillus* arter (Jos & Huis in't Veld, 1996). Harsk smak er ofte forbundet med lipolytisk bakteriell aktivitet. Når fett er bundet til glycerol er de nøytrale på smak, men når triglycerider angripes av lipaser, dannes frie fettsyrer. Disse gir besk og harsk lukt og smak på melken (Chen et al., 2003). Søtkoagulering er en annen type kvalitetsforringelse forårsaket av bakterier. Bakterier som forårsaker søtkoagulering produserer

enzymmer som degraderer κ -kasein og koagulerer melken uten å senke pH (Gopal et al., 2015). Vanlige eksempler på slike bakterier i *Bacillus* spp. og *Bacillus cereus*.

Selv om melk er et rikt næringsmiddel for mange bakterier kan ikke alle bakterier nyttiggjøre seg av næringsstoffene eller vokse i melk (Walstra et al., 2006). Noen bakterier kan ikke hydrolysere β -1-4-glykosid binding i laktose og kan dermed ikke benytte melkesukker som energikilde. Andre bakterier er avhengig av frie aminosyrer som nitrogenkilde, noe det finnes lite av i melk. Slike bakterier kan nyttiggjøre seg av frie aminosyrer først om andre bakterier har brutt ned proteiner i melken. Andre forhold i melk som kan gjøre det vanskelig for bakterier og vokse er det lave innholdet av jern, noe som er essensielt for vekst av noen bakterier. Oksygentrykket i melk gjør også at anaerobe bakterier ikke vil vokse i melk.

I tillegg til disse faktorene inneholder melken flere antimikrobielle stoffer. Eksempel på antimikrobielle stoffer i melk er lysozym, lactoferrin, lactoperoksidase og immunoglobulin. Enzymet lysozym katalyserer hydrolyse av glykosidbindingene i peptidoglykanlaget på bakteriens cellemembran. Dette fører til at cellen lyses. Effekten av lysozym er størst hos Gram-positive bakterier som har sitt peptidoglykanlag eksponert på celleoverflaten. Gram-negative bakterier er mer resistent mot enzymet på grunn av deres beskyttende yttermembran. Om yttermembranen er skadet kan også Gram-negative bakterier degraderes av lysozymer (Ellison 3rd & Giehl, 1991). Lactoferrin hindrer mikrobiologisk vekst ved å binde jern (Adams & Moss, 2010). Dette gjør jern utilgjengelig for bakterier som er avhengig av mineralet for å kunne vokse og uttrykke deres virulensfaktorer men på grunn av melkens naturlige lave innhold av jern har ikke denne mekanismen noen stor betydning (Walstra et al., 2006). Lactoferrin kan også hindre mikrobiologisk vekst ved å binde seg til lipoteichonsyre eller teikoidsyre på cellemembranen hos Gram-positive bakterier og lipopolysakkarider på cellemembranen hos Gram-negative bakterier (González-Chávez, Arévalo-Gallegos & Rascón-Cruz, 2009). Bindingen og påvirkningen av lactoferrin på cellemembranen gjør at lysozymer kommer til peptidoglykanlaget og dermed kan katalysere lysering av Gram-negative bakterier (Ellison 3rd & Giehl, 1991). Ved tilstedeværelse av hydrogenperoksid kan enzymet lactoperoksidase katalysere hydrogenperoksid oksidasjon av thiocyanat (Adams & Moss, 2010). Reaksjonen genererer oksidasjonsprodukter som hypothiocyanat, som kan hemme Gram-positive bakterier og eliminere Gram-negative bakterier. Ved å modifisere bakterienes cellemembran kan de antimikrobielle komponentene som produseres i melk redusere bakterievekst og eliminere bakterier. Konsentrasjonen av disse komponentene i kumelk er så lav at effekten på holdbarhet av melk og mikrobiell trygghet er liten i forhold til andre melkebehandlingsmetoder.

Melkebehandlingsmetoder som varmebehandling og kjølelagring er de viktigste faktorene for å øke holdbarheten av melk og melkeprodukter, samt sikre økonomisk produksjon og ivareta folkehelsen.

1.4 Kvalitetsforringende komponenter i melk

Bakterier i upasteurisert melk kan påvirke holdbarheten og kvaliteten av pasteurisert melk (Adams & Moss, 2010). Termotolerante bakterier som *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* og *Streptococcus* samt sporer fra *Clostridium* og *Bacillus* kan overleve pasteurisering. Mange psykotrofe bakterier har evne til å produsere varmeresistente enzymer (Samaržija et al., 2012). Etter pasteurisering eller sterilisering kan 30- og 100% av enzymene fortsatt være aktive. I meieriindustrien er enzymer dannet av *Pseudomonas* spp. og *Bacillus* spp. de viktigste. Enzymene er hydrolytiske og kan bryte ned fett, proteiner og lecitin i melk.

Proteinaser i melk kan både være naturlig forekommende i melken eller dannes av bakterier. Proteinaser hydroliserer og destabiliserer kaseinmicellen og fører til koagulering og geldannelse av melk. Dette gir redusert osteutbytte ved ysting og reduserer også holdbarheten av konsummelk. Proteinaser som virker innad i polypeptidkjedene blir generelt klassifisert i fire subgrupper, basert på deres virkningsmekanisme (Chen, Daniel & Coolbear, 2003). Den første subgruppen er serin proteinaser, som plasmin (EC 3.4.21.7) fra storfeplasma og subtilisin (EC 3.4.21.62) fra *B. licheniformis* og *B. subtilis*. Den andre subgruppen er cystein proteinaser som for eksempel cathepsin B (EC 3.4.22.1) fra storfemilt. Den tredje subgruppen er asparaginsyre proteinaser som for eksempel cathepsin D (EC 3.4.23.5) fra storfemilt og den fjerde subgruppen inkluderer metallo-proteinaser som thermolysin (EC 3.4.24.27) fra *B. thermoproteolyticus* subsp. *rokko*.

Psykotrofe bakterier produserer proteinaser sent i den eksponentielle fasen eller i den stasjonære fasen. De fleste *Pseudomonas* stammene produserer kun en type proteinase; en sink metallo-proteinase. De fleste proteinasene fra psykotrofe bakterier bryter ned kasein fremfor myseprotein i melk. Av kaseinene er β - og κ -kasein mer utsatt for hydrolyse enn α_{S1} - og α_{S2} -kaseinene. I tillegg til økt mengde ikke-protein nitrogen (NPN), kan proteolytisk aktivitet også føre til dannelse av para- κ -kasein noe som gir kaseinmicellen flere ustabile punkter. Dette vil føre til koagulering og gel-dannelse av melken (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Det kan også dannes partikler i melken.

Hydrolyse av proteiner i melk forårsaket av psykotrofe bakterier påvirker også smakskomponenter. Smaken har vært beskrevet som bitter, fruktig, uren, gjærakig og metallisk (Samaržija et al., 2012).

Bitter smak dannes som nevnt ved bakteriell proteolytisk nedbrytning av kasein og lalalbumin i melk (Jos & Huis in't Veld, 1996). Bitter peptider dannes vanligvis fra kaseiner hvor α_{S1} -kasein er hovedkilden (Leimieux & Simard, 1992). Noen egenskaper ved peptider som skaper bitter smak er grad av hydrofobisitet, enkle aminosyrer i amino enden og tilstedeværelse av prolin i peptidet. Proteinaser fra psykotrofe bakterier, utgjør derfor en viktig faktor ved kvalitetsforringing av melk. Selv om bakteriene er inaktivert etter pasteurisering, er proteinaser, i likhet med lipaser, svært varmeresistente.

Lipaser er carboxylestaser som hydrolyserer acylglyceroler (Chen et al., 2003). Lipaser deles inn i tre grupper basert på deres substratspesifitet. Substratspesifiteten kan være fettsyreposisjon, kjedelengde på fettsyren og stereospesifitet. Den første gruppen er lipaser som ikke er spesifikke. Disse lipasene vil fullstendig hydrolysere triglycerid til frie fettsyrer og glycerol. Den andre gruppen er 1,3-spesifikk. Det vil si at lipasene har en spesifitet for fettsyrer i 1 og 3 posisjon på triglyceridet. Men 2-monoacylglycerol er kjemisk ustabil og fettsyrer i 2-posisjon kan lett hydrolyseres. Dermed kan tilstedeværelse av 1,3-spesifikke lipaser føre til full hydrolyse av triglycerider til frie fettsyrer og glycerol. Den tredje gruppen har en preferanse for spesifikke fettsyrer. Ingen bakteriell lipase har blitt klassifisert i den tredje gruppen. Psykotrofe bakterier produserer lipaser sent i den eksponentielle fasen og tidlig i stasjonærfasen. Hydrolyse av triacylglyceroler i melk forårsaket av psykotrofe bakterier, påvirker smak i melk. Dette kan gi besk, harsk og såpeaktig smak. (Samaržija et al., 2012). Usmaken kan komme som følge av frigjøring av kort-kjedede fettsyrer som; smørsyre ($C_{4:0}$), kaproinsyre ($C_{6:0}$), og kaprylsyre ($C_{8:0}$). Såpeaktig smak kan komme av medium kjedede fettsyrer som caprinsyre ($C_{10:0}$) og laurinsyre ($C_{12:0}$). Langkjedede fettsyrer som myristinsyre ($C_{14:0}$), palmitinsyre ($C_{16:0}$) og stearinsyre ($C_{18:0}$) bidrar lite til smak. Frie fettsyrer er også forløpere til andre smakskomponenter som; acetoacetat, β -keto syrer, metylketoner, estere og laktoner. I tillegg til dette vil også mettede korte fettsyrer, utsatt for oksidasjon, føre til dannelse av ketoner og aldehyder som gir metallisk smak i melken.

1.5 Psykotrofe bakterier i melk

Innføringen av obligatorisk nedkjøling og kjølelagring av rå melk på 1950-tallet førte til vesentlig forbedring av den mikrobiologiske kvaliteten på melken (Samaržija, Zamberlin & Pogačić, 2012). Syrning av rå melk som et resultat av vekst av melkesyrebakterier og andre mesofile bakterier, har nærmest opphørt. I Norge distribueres TINE melk med ubrutt kjølekjedetemperatur mellom 0 og 4°C (TINE, u.d.). Kjølelagringen har skapt et selektivt miljø for psykotrofe bakterier ved at Gram-positive mesofile aerobe bakterier ble erstattet med Gram-negative og Gram-positive psykotrofe bakterier. Psykotrofe mikroorganismer har en optimumtemperatur for vekst ved 25 - 30°C, men de kan også vokse ved 35°C og ned til -5 °C (Adams & Moss, 2008). Dette endret den naturlige mikrofloraen i melk og på grunn av praksisen med ubrutt kjølekjede av melk gjennom verdikjeden dominerer nå psykotrofe bakterier mikrofloraen. I melk som er produsert under dårlige hygieniske forhold eller ved sykdom hos kua, er det større andel psykotrofe bakterier. I slik melk kan psykotrofe bakterier utgjøre over 90% av det totale bakterietallet. Psykotrofe bakterier i melk som kan vokse ved temperaturer mellom 0 og 7°C er *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* og *Flavobacterium*. *Pseudomonas* spp. er de vanligst forekommende Gram-negative bakteriene isolert fra rå melk (Sørhaug & Stepaniak, 1997, Samaržija et al., 2012). Vanlige Gram-positive arter i rå melk er *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium* og *Paenibacillus*. Av disse er *Bacillus* arter de vanligst forekommende. Med unntak av *Arthobacter* og *Lactobacillus* tilhører de Gram-positive artene, gruppen termoresistente psykotrofe bakterier. Noen arter av *Bacillus* spp. kan overleve pasteurisering og de er dermed de vanligst forekommende bakterieartene i pasteurisert melk.

Psykotrofe bakterier kan selv ved lave temperaturer produsere varmeresistente ekstracellulære og/eller intracellulære hydrolytiske enzymer (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Etter pasteurisering kan også germinisering av sporer og etterfølgende bakterievekst eller rekontaminering med bakterier skape kvalitetsforringing. Siden det oppstår kvalitetsfeil på melken som følge av varmeresistente enzymer sekrrert fra psykotrofe bakterier, må det primære være å sørge for et lavt innhold av psykotrofe bakterier i rå melk.

1.5.1 *Pseudomonas*

Pseudomonas er en psykotrof, gram negativ stav som utgjør ca. 10% av den totale mikrofloraen i fersk melk (Sørhaug & Stepaniak, 1997). *Pseudomonas* spp. er den viktigste psykotrofe kvalitetsforringende bakteriene i melk. Yuan et. al (2017) analyserte 16 rå melk prøver fra ulike kinesiske gårder. De fant i sine prøver at *Pseudomonas fluorescens* var den dominerende stammen etterfulgt av *Pseudomonas fragi* og *Pseudomonas psychrophilia*. *Pseudomonas* spp. elimineres ved pasteurisering. Men på grunn av den lave generasjonstiden til *Pseudomonas* spp. ved 4°C, kan bakteriene produsere nok termotolerante ekstracellulære proteinaser til å fullstendig hydrolysere kaseinet tilstede i melken, til løselige peptider (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Slekten er også kjent for å være lipolytisk. *Pseudomonas* er ikke resistent mot varmebehandling, men proteinaser, lipaser og fosfolipaser er varmeresistente. Varmeresistente enzymer sekrrert fra *Pseudomonas* spp. i rå melk kan dermed påvirke holdbarheten på UTH melk selv om bakteriene er inaktivert (Stoeckel et. al. 2016).

1.5.2 *Bacillus cereus*

Bacillus spp. er Gram-positive, stavformede, aerobe sporedannere og de kan være kontaminanter både i fersk og varmebehandlet melk (Bartoszewicz, Hansen & Swiecicka, 2008). *Bacillus cereus* er tilstede nesten overalt i naturen. Den finnes i store mengde i jord og i voksende planter. Derfor spres denne bakterien lett til all slags mat (Arnesen, Fagerlund & Granum, 2008). *Bacillus cereus* gruppen inkluderer syv nært beslektede arter: *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* og *Bacillus weihenstephanesis* (Soufiane & Côté, 2013). *Bacillus cereus* sporer overlever pasteurisering og etter sporegerminering kan de sekrrere varmeresistente ekstracellulære proteaser, lipaser og fosfolipaser (Sørhaug & Stepaniak, 1997). *Bacillus cereus* kan i tillegg til å være kvalitetsforringer i melk være patogen for mennesker. *Bacillus cereus* kan produsere enterotoxiner som kan forårsake to ulike typer matforgiftning hos mennesker; en emetisk typer og en diare type (Arnesen, et al., 2008). Den emetiske forgiftningen er forårsaket av toksinet cereulid. Cereulid er svært resistent mot varmebehandling, har høy stabilitet og resistent mot lav pH og proteokytiske enzymer (Arnesen et al., 2008). Hvis cereulid er dannet i matvaren vil det ikke destrueres ved oppvarming under matlaging eller av fordøyelsesenzymer ved konsum. Cereulid er et lite ring-formet peptid som forårsaker oppkast. I følge Arnesen et al., produseres cereulid ved slutten av den logaritmiske

fasen (log-fasen) ved bakterievekst og produksjonen er størst ved starten av den stasjonære fase (Arnesen et al., 2006). Det er ikke bestemt hvilken mengde bakterier det kreves for å forårsake symptomer av oppkast typen. Det har vært tilfeller med cereulid forgiftning hvor bakterieantallet har vært $10^3 - 10^{10}$ bakterier per gram matvare. I de fleste tilfeller kreves det minst 10^5 per gram matvare for at det skal dannes tilstrekkelig mengde cereulid, som kan gi symptomer. I følge Granum & Lund (1997), inntreer cereulid forgiftning oftest ved inntak av matvarer med mellom 10^5 og 10^8 gram bakterier per gram matvare. Symptomene ved cereulid forgiftning er kvalme, oppkast og magesmerter som ofte kan vare i 12-24 timer (Adams & Moss, 2010).

Diaré typen er forårsaket av tre enterotoksiner; haemolysin BL (HBL), nonhaemolytisk enterotoksin (Nhe) og cytotoxin K (CYTK) som dannes i tynntarmen hos mennesker ved konsum av bakterier eller sporer (Arnesen et al., 2008). Den infektive dosen er $10^5 - 10^7$ og symptomene i form av magesmerter og vandig diare varer ofte i 12-24 timer (Granum & Lund, 1997). (Adams & Moss, 2010).

1.5.3 *Paenibacillus*

Paenibacillus er en Gram-positiv, aerob eller fakultativ aerob, sporedannende, stavformet bakterie. *Paenibacillus* arter har blitt isolert fra jord, planter, vann, syke insekt larver og silo for og er kontaminanter i mange typer mat (Grady et al., 2016). På grunn av evnen til å danne sporer kan kontaminering av *Paenibacillus* spp. til mat skape problemer i matindustrien. Sporer fra *Paenibacillus* er ikke dominerende i mikrofloraen til melk, men de er varmeresistente og noen av dem kan overleve temperaturer over 120°C (Scheldeman et al., 2004). Etter spore germinering kan *Paenibacillus* spp. forårsake kvalitetsproblemer i melk ettersom de produserer hydrolytiske enzymer. Noen arter har svært høy proteolytisk aktivitet (Hang et al., 2016). Noen arter er også lipolytiske (Trmčić, Martin, Boor & Wiedmann, 2015).

Paenibacillus spp. er svært viktige kvalitetsforringere i langtidsholdbar UHT-melk (Júnior, Alcântara & Beloti, 2016). *Paenibacillus lactis* er isolert fra rå melk, UHT-melk og fra mange ulike prosesslinjer i meierier (Scheldeman et al., 2004).

1.6 Varmebehandling av melk

Som tidligere nevnt er varmebehandling i tillegg til kjølelagring den viktigste faktoren for å øke holdbarheten av melk og melkeprodukter. Ulike kategorier av varmebehandling av melk er: terminisering, «lav temperatur lang tid» (LTLT) pasteurisering, «høy temperatur kort tid» (HTST) pasteurisering, indirekte og direkte ultra høy temperatur (UHT) behandling og sterilisering (Bylund, 1995). De ulike typene varmebehandling varierer i henhold til temperatur og tider og en oversikt av de ulike prosessene er presentert i tabell 1.2.

Tabell. 1.2. Oversikt over temperaturer og tider som benyttes til ulike typer varmebehandling av melk (Bylund, 1995, Walstra, 2006).

Varmebehandling	Temperatur (°C)	Holdetid
Terminisering	63 - 65	15 sekunder
LTLT pasteurisering	63	30 minutter
HTST pasteurisering	72 - 75	15 - 20 sekunder
Høy pasteurisering	85	20 sekunder
UHT direkte	125 - 138	2 - 4 sekunder
UHT indirekte	135 - 140	2 - 4 sekunder
Sterilisering	115 - 120	20 - 30 minutter

Hensikten med terminisering er å eliminere bakterier, spesielt psykotrofe bakterier (Walstra et al, 2006). Dette for å unngå at de psykotrofe bakteriene produserer varmeresistente lipase og proteinaser. Foruten å eliminere bakterier og delvis inaktivere noen enzymer, forårsaker terminiseringen kun små endringer i melken. Pasteurisering av rå melk ble innført for over 100 år siden og har siden redusert insidensen av matforgiftning relatert til melk og melkeprodukter, (Lucey, 2015). Hensikten med Pasteurisering ble opprinnelig innført for å eliminere den patogene bakterien *Mycobacterium tuberculosis*, som forårsaker tuberkulose.

«Høy temperatur kort tid» pasteurisering er den vanligste formen for varmebehandling av rå melk i Norge. Pasteurisering dreper all mugg og gjær, reduserer det totale antallet bakterier tilstede i melken, men det vil ikke fjerne alle bakterier (Walstra et al., 2006). Dessuten vil ikke sporer eller varmestabile toksiner fjernes (Claeys et. al, 2013) og varmeresistente enzymer vil ikke inaktiveres. Enzymet alkalisk fosfatase vil derimot inaktiveres (Walstra, 2006). Alkalisk fosfatase er mer varmeresistent enn de fleste bakterier (Fadiloglu, Erkmen & Sekeroglu, 2004).

Inaktivering av dette enzymet er derfor en god indikator på at pasteuriseringen har vært tilstrekkelig. Dette undersøkes ved gjennomføring av en alkaline fosfatase test.

Ved høypasteurisering vil aktiviteten til enzymet lactoperoksidase inaktiveres (Walstra, 2006). Omtrent alle vegetative mikroorganismer drepes, og mange enzymer inaktiveres. Men noen proteinaser og lipaser kan fortsatt være aktive og høypasteuriseringen dreper ikke sporer. Myseproteiner denaturer og frigjøring av svovelkomponenter gir melken kokt smak.

Ved sterilisering og UHT behandling er hensikten å drepe alle mikroorganismer og sporer. Enzymer fra melk vil inaktiveres, men ikke alle proteinaser og lipaser fra bakterier vil inaktiveres. Andre metoder for å redusere bakterieinnholdet i melk er baktofugering og mikrofiltrering, som også kan redusere innholdet av sporer (Bylund, 1995).

1.7 Sporedannende bakterier i melk

Gram-positive psykotrofe sporedannende bakterier kan overleve varmebehandling som HTST og LTLT pasteurisering (Ranieri et al., 2012). De kan i tillegg under ugunstige forhold, hvor tilgangen på næring er liten, danne endosporer (sporer) (Borch-Pedersen et al., 2016). Prosessen hvor bakterien danner sporer kalles sporulering (Tronsmo, 2016). Ved sporulering deler bakterien seg asymmetrisk og gir opphav til to genetisk identiske datterceller som gjennomgår ulike skjebner (Tan & Ramamurthi, 2014). Sporuleringen tar flere timer og initieres ved mangel på essensielle næringsstoff som karbon eller nitrogen (Tronsmo, 2016). Første trinn i sporuleringen er at kromosomet kopieres. Det dannes en spore septum som isolerer det nye kromosomet og cytoplasma. Ved dannelse av en for-spore vil spore septum som består av en dobbeltmembran, omslutte kromosomet og cytoplasma. Det dannes et tykt peptidoglykanlag mellom membranene og et tykt proteinlag på utsiden av membranen. Den opprinnelige bakterien degenereres og sporen frigis til miljøet.

Fra miljøet kan sporer kontaminere melken. En viktig kontamineringskilde er sporer fra jord og gress som kommer i kontakt med spenen til kua (Christiansson, Bertilsson & Svensson, 1999, Arnesen et al., 2008). Dette er spesielt viktig i sommerhalvåret når kua gresser ute. Sporer er resistent mot varme, stråling, kjemikalier og uttørking (Borch-Pedersen et al., 2016). I sporeform beskyttes bakterien mot slike ytre faktorer og den er heller ikke metabolsk aktiv (Setlow, 1994). Den verken krever eller produserer ATP og den er heller ikke avhengig av vann eller næringsstoff. Dette gjør at sporene kan overleve i svært lang tid (Tronsmo, 2016). Sporen inneholder kun DNA, små mengder RNA, ribosomer, enzymer og faktorer som er avgjørende for at sporen kan germinisere. Sporene kan aktiveres ved varmeindusering og germinisere ved

tilstedeværelse av visse næringsstoff (Borch-Pedersen et al., 2016). I melk kan sporen aktiveres under varmebehandling (Ranieri et al., 2012). Dette gir opphav til en vegetativ bakterie som under gunstige forhold kan vokse i melk. Siden sporen kan overleve varmebehandling og psykotrofe bakterier kan vokse under kjøletemperaturer, er psykotrofe sporedannere viktige kvalitetsforringende bakterier i pasteurisert melk. De mest fremtredende psykotrofe sporedannende bakteriene i melk er *Bacillus* spp. og *Paenibacillus* spp (Ranieri et al., 2012). Tidlig i holdbarhetsperioden er *Bacillus* spp. den dominante bakterien i HTST pasteurisert melk, sett bort i fra postpasteurisert kontaminering. Under kjølelagring ved endt holdbarhetsperiode blir *Paenibacillus* spp. mer dominant i mikrofloraen. Dette gjør *Paenibacillus* spp. til en viktig kvalitetsforringer i langtidsholdbar melk (Júnior, Alcântara & Beloti, 2016).

1.8 EUs retningslinjer for hygiene i meieriindustrien

De nasjonale retningslinjer for hygiene i meieriindustrien gjelder hele verdikjeden fra melk på gårdstank til levering til kunde (Mattilsynet, 2017). Verdikjeden inkluderer henting, inntransport og produksjon av meieriprodukter. Formålet med retningslinjene er å gi en oversikt over hvordan regelverket som omhandler god hygienisk praksis i meieriindustrien skal forstås og brukes. Melkeforskriften omhandler produksjon og frambud av rå melk, varmebehandlet melk og melkebaserte produkter. Forskriften har hjemmel i EØS-regelverket og skal sikre produksjon av helsemessig trygge melkeprodukter av høy kvalitet. En rekke faktorer bidrar til dette. Varmebehandling av melk er prosesser hvor formålet er å forbedre melkens mikrobiologiske tilstand ved å redusere innholdet av vegetative sykdomsfremkallende bakterier (Bylund, 1995). Dette sikrer produksjon av helsemessig trygg melk samt øker holdbarheten av produktet. En uavbrutt kjølekjede og hensiktsmessig emballasje hindrer oppvekst og kontaminering av mikroorganismer til produktet.

En av de store utfordringene i meieriindustrien er bakteriell kvalitetsforringelse av melk. Dette fører til direkte økonomiske tap på grunn av nedgradering av melk med utilstrekkelig kvalitet. I Norge nedgraderes nesten 1,7% av melken som produseres på grunn av dette (Mellegård, 2015). Kvalitetsfeil kan også gi sekundære økonomiske tap, ved brutt tillitt hos forbrukeren. Når tilliten først er brutt kan det ta lang tid å bygge den opp igjen. Det er derfor svært viktig med riktig håndtering av melk.

1.9 Hensikt

På grunn av den rike og varierte mikrofloraen i melk er det elementært å undersøke hvordan bakteriene påvirker hverandre. Det er gjort en rekke vekstforsøk som omhandler enkeltkulturer av bakterier inokulert i melk. Det er per i dag begrenset kunnskap om hvordan samkulturer med kvalitetsforringende bakterier påvirker holdbarheten og kvaliteten av melk. Ved å benytte samkulturer kan en studere naturlige interaksjoner mellom bakteriene (Goers, et al., 2014).

På grunn av rå melk sin komplekse bakterieflora, er det derfor av interesse å undersøke hvordan samkulturer av vanlig forekommende psykotrofe bakterier vokser i, og påvirker kvaliteten av melk.

Hovedmålet med denne oppgaven er å undersøke hvordan *Bacillus weihenstephanensis* i samkultur med *Pseudomonas* spp. og *Paenibacillus lactis* i melk, ved ulike kjøletemperaturer, påvirker uttrykkning av kvalitetsforringende komponenter. Det ble besluttet å benytte 8- og 15°C som lagringstemperatur. tillegg sett på vekst og produksjon av det emetiske toksinet cereulid.

Det var flere årsaker til at det ikke ble benyttet 4°C som lagringstemperatur. Tidligere lignende masteroppgaver utført av Bækkelund (2016) og Hole (2017) viste at *Bacillus* spp. og *Pseudomonas* spp. hadde liten vekst og lav metabolisme ved 4°C. Siden fokuset i denne oppgaven var kvalitetsforringing og det var ønskelig å inokulere melken med lav bakteriekonsentrasjon ved start var det sannsynlig at det ville forekomme lite kvalitetsforringing ved denne temperaturen. En annen årsak var at det var ønskelig å undersøke mulig virkelige forhold hos forbruker. For det første kan temperaturen i private kjøleskap være ustabil, eller være innstilt på en høyere temperatur enn 4°C. For det andre kan konsum melken utsettes for kontinuerlig svingninger i temperatur. For eksempel kan uttak fra kjøleskap til frokostbord føre til at melken oppbevares i romtemperatur i forbindelse med måltider, før den settes tilbake til kjølelagring.

2.0 Materialer og metoder

Stammer av *Bacillus* ble samkulturert med stammer av *Pseudomonas* og *Paenibacillus* i langtidsholdbar UHT-lettmelk (1,2% fett). Vekstforsøk ble utført ved 8- og 15°C og uttrykk av kvalitetsforringende komponenter ble undersøkt ved å analysere proteinnedbrytning, produksjon av organiske syrer og endring i pH-verdier i melken. Det ble også undersøkt om *Bacillus* stammene produserte det emetiske toksinet cereulid vekst.

2.1 Bakteriestammer

Tre *Pseudomonas* stammer, fire *Bacillus* stammer og en *Paenibacillus lactis* stamme ble brukt i forsøkene. Stammene var tidligere isolert og hadde ulik bakgrunn.

Pseudomonas spp. ble isolert fra 7 dager gammel kjølelagret rå melk fra TINE meieriet Kalbakken. Stammene ble dyrket opp i forbindelse med en tidligere masteroppgave (Bækkelund, 2016).

I foreksperimentet ble det benyttet to *Bacillus cereus sensu lato* stammer og i hovedforsøket ble det benyttet to stammer *Bacillus weihenstephanensis* hvor den ene var isolert fra rå melk og den andre var isolert fra fløte. *Bacillus* stammene var isolert fra melk i prosjektet; Bakteriefloreaen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom (prosjektnummer 244149). *Paenibacillus lactis* var isolert fra rå melk og var bestilt fra Belgian Coordinated Collections of Microorganisms.

2.1.1 Rendyrking av bakteriekulturer

Bakteriene ble rendyrket ved å stryke ut en podenål bakteriekultur til petriskål. Det ble benyttet PCA-agar («Plate count agar», Merck, Darmstadt, Germany) og BHI-agar («Brain heart infusion agar», Merck, Darmstadt, Germany) for rendyrking av *Pseudomonas*, og blodagar (Merck, Darmstadt, Germany) og BHI-agar for rendyrking av *Paenibacillus* og *Bacillus cereus*. Etter inkubasjon ved 30°C i 24 timer, ble bakterier fra en koloni strøket over på ny petriskål med samme type næringsagar og inkubert ved 30°C i 24 timer. Totalt ble dette gjort tre ganger.

2.1.2 Nedfrysing av bakteriekulturer

Etter rendyrking ble bakterier fra en koloni podet over til 5 mL BHI-buljong (Merck, Darmstadt, Germany) i belcorør. Etter inkubasjon ved 30°C i 24 timer, ble rørene visuelt undersøkt for bakterievekst. Rør med turbid vekstmedia ble ristet i 30 sekunder i en Grant Bio PV-1 Vortex Mixer (Grant, Cambridge, England). Deretter ble 800 µL av bakteriesuspensjonen pipettert til kryorør. Kryorørene ble sentrifugert ved 3000 runder per minutt (rpm) i 5 minutt i en Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble helt av og pelleten ble resuspendert i 800 µL BHI-buljong (Merck). Det ble tilsatt 800 µL 30% glycerol til kryorørene. Kryorørene ble ristet i vortex mixer (Grant) i 30 sekunder, før de ble fryst ved -20°C.

2.2 Genotypisk identifisering ved sekvensering

For å konfirmere at bakteriestammene var riktig identifisert, ble det utført 16s sekvensering.

2.2.1 Isolering av genomisk DNA

For isolering av genomisk DNA ble det benyttet nedfrosne rene bakteriekulturer. Bakteriekulturene ble tint i romtemperatur og en podeskje ble overført til 5 mL BHI medium (Merck) i reagensrør. Rørene ble inkubert ved 30°C i 24 timer. Ved påvist bakterievekst ble rørene mikset i 30 sekunder med vortex mixer (Grant). Det ble overført 1 mL av prøvene med automatpipette til hvert sitt kryorør. Prøvene ble sentrifugert i Eppendorf centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 14.000xg i 3 minutter. Supernatanten ble helt av og pelleten ble løst opp i 1 mL milliQ vann. Etter tre runder med sentrifugering og resuspending av pelleten ble pelleten oppløst i 100 µL milliQ-vann. Prøvene ble deretter kokt i 10 minutter i en Thermolyne STBRON Type 16500 tørrkoker.

For å fragmentere DNAet i bakteriecellene ble det tilsatt ca. 100 µg syrevaskede glasskuler (≤ 106 µm) (Sigma-Aldrich, USA). Prøvene ble ristet i vortex-genie 2 (Grant, Cambridge, England) med 24 tube Adapter (Grant, Cambridge, England) på full styrke i 5 minutter. Deretter ble prøvene lett sentrifugert i en Eppendorf 5415D sentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland).

2.2.2 Valg av primer og tillaging av mastermix

DNA-polymerase er avhengig av en primer ved start av DNA syntese. Primeren definerer startpunktet for initiering av DNA syntese. Oversikt over primere benyttet til forsøket er presentert i tabell 2.0. Reagenser som inngikk i amplifiseringen ble laget til i en mastermix. Mengdeforholdene var i henhold til tabell 2.1. Iproof DNA polymerase ble tilsatt til slutt på grunn av rask degradering ved romtemperatur. Det ble tilsatt 47 µl mastermix og 3 µl templat-DNA, til hvert PCR-rør. PCR prøvene ble plassert i C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA) og PCR-program ble kjørt etter betingelser illustrert i tabell 2.2.

Tabell 2.0: Oversikt over valgte primere, hvilke deler av bakterienes genom som skulle amplifiseres og primerenes målsekvens.

Primer	Amplifiseringsmål	Sekvens (5´-3´)
1406 (forward)	16S rRNA – 23S rRNA	TGY ACA CAC CGC CCG T
1F (forward)	16S rRNA	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G
23Sr (reverse)	16S rRNA - 23S rRNA	GGG TTB CCC CAT TCR G
PsEG790R (reverse)	rpoD	CGG TTG ATK TCC TTG A
PsEG30F (forward)	rpoD	ATY GAA ATC GCC AAR CG

Det ble benyttet en forward primer og en reverse primer til hver bakterie, som definerer størrelsen på PCR-produktet. Primerene ble valgt på bakgrunn av tidligere identifisering av slekt.

Tabell 2.1: Konsentrasjon og volum av reagenser benyttet i PCR amplifisering.

Reagens	Initial konsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum tilsatt (µl)
Iproof HF buffer	5x	1x	10
dNTPs	10 mM	5 mM	1
Forward primer	5 µM	0,25 µM	2,5
Reverse primer	5 µM	0,25 µM	2,5
dH₂O			29,25
Iproof DNA polymerase	2 U/µl	0,02 U/µl	0,5*
Templat-DNA	5-100 ng/µl	0,3 – 6 ng/µl	3**
BSA			1,25

*Iproof DNA polymerase ble holdt på is og tilsatt mastermiksen til slutt

**Templat-DNA ble tilsatt hvert rør

Tabell 2.2. Temperatur, tid og antall repetisjoner benyttet i PCR-program.

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (sekunder)	Repetisjoner
Initial denaturering	98	30	1
Denaturering	98	10	35
Hybridisering	55	30	
Polymerisering	72	40	
Siste polymerisering	72	600	1
Hold	4	Evig	

2.2.3 Agarosegelelektroferese

For å bekrefte vellykket amplifisering, ble PCR-produktet separert ved hjelp av agarosegelelektroferese. Det ble lagd en 1% agarosegel i henhold tabell 2.3 og til støpeformens størrelse.

Tabell 2.3. Blandingsforhold for tillaging av 1% agarosegel.

Komponenter	Volum
SeaKem LE Agarose-pulver	0,5 g
1xTAE	50 ml
Gel Green nucleic Acid stain	2 µl

Agarose-pulver (SeaKem® LE Agarose Lonza, Rockland, USA) og 1xTAE (Merck) ble tilsatt i en 500 mL glassflaske med lokk. Løsningen ble ristet for hånd før den ble kokt i mikrobølgeovn med delvis åpent lokk, til pulveret var oppløst i væsken. Løsningen ble avkjølt til ca. 60°C og tilsatt Gel green nucleic acid stain (Biotium, Fremont, USA). Agaroseløsningen ble deretter støpt i en 15x7 cm støpeform med brønn-kammer og dekket med 1x TAE buffer. PCR-produkt, appliseringsbuffer og milliQ-vann ble tilsatt og blandet i mikroplatebrønner (Greiner bio-one). Mengdeforholdet var i henhold til tabell 2.4.

Tabell 2.4. Mengdeforhold av komponentene benyttet til preparert PCR-løsning.

Komponenter	Mengde (µL)	Produsent
PCR-produkt	3	
Appliseringsbuffer	1,5	GelPilot DNA Loading Dye
Milli-Q vann	6	

Det ble applisert 9 μ L prøve fra mikroplatebrønn til hver brønn på gel. For å kontrollere molekylstørrelsen i PCR-produktet ble 6 μ L Quick-Load 1 kb DNA ladder (England BioLabs Inc., USA) tilsatt den første brønnen. Gelelektroferesen ble kjørt i et elektroferesekar ved 80V (PowerPac 300, BioRad, Hercules, CA, USA) i 50 minutter. Gelen ble deretter undersøkt ved bruk av UV-lys.

2.2.4 Rensing av PCR-produkt og sekvensering

Sekvensering ble utført av GATC Biotech AG, et eksternt firma i Tyskland. Før PCR-produktet kunne sendes ble det rensed med GenElute™ PCR Clean-UP Kit (Sigma-Aldrich). Rensingen av PCR-produktet ble utført i henhold til protokoll fra Sigma-Aldrich. Etter rensing ble DNA-konsentrasjonen målt med et Qbit 2.0 fluorometer (Invitrogen). Det ble tillaget standarder og PCR-produkt ble tilsatt buffer og reagens i henhold til Invitrogens protokoll. Renset PCR-produkt ble sendt i egne 1,5 mL LIGHtrun-rør med forhåndsbestilte strekkoder, etter instruksjoner fra GATC Biotech. Det ble sendt to rør for hvert PCR-produkt, et rør med hver av primerne som var benyttet i amplifiseringen. Resultatene fra sekvenseringen ble bearbeidet i dataprogrammet Bio Edit Sequence Alignment Editor, versjon 7.2.5 (Hall, 1999). Begge contigsekvensene ble trimmet, ved å fjerne sekvenser med dårlig kvalitet i begynnelsen og slutten av de sekvenserte DNA fragmentene. Det ble gjort et BLAST-søk hvor sekvensene ble sammenliknet med sekvenser fra andre tidligere sekvenserte bakterier i en nukleotiddatabase.

2.3 Innledende vekstforsøk

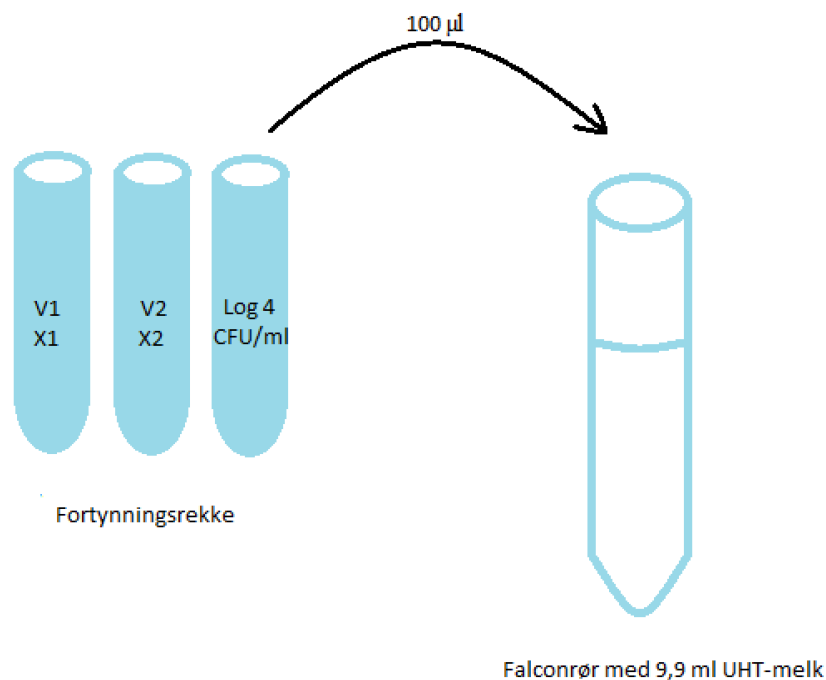
Det ble bestemt at startkonsentrasjonen skulle være log 2 KDE/mL melk. Det innledende vekstforsøket ble utført for å avgjøre hvilke temperaturer, og hvor hyppige uttak det skulle benyttes i hovedforsøket.

2.3.1 Forberedelse til vekstforsøk

Frosne bakteriekulturer ble tint i romtemperatur og det ble gjort plateutstryk på blod-, BHI- og PCA-agar (Merck) før inkubering ved 30°C i 24-26 timer. Etter bakterievekst ble bakterier fra en koloni podet over til 5 mL BHI-buljong (Merck) i 10 mL reagensrør og inkubert ved 30°C i 24 timer. Etter 24 timer ble rørene visuelt undersøkt for bakterievekst. Celletallet i bakteriekulturen måtte fastsettes for å kunne oppnå ønsket startkonsentrasjon i melken. Det ble laget en fortynningsrekke av bakteriekulturen med fortynningsvann (1/4 ringers løsning). Fortynningene -3, -4, -5, -6, -7 og -8 ble spredt ut på agarskåler. Siden bakteriestammene skulle podes i melk som samkulturer, ble det også undersøkt om de ulike stammene kunne dyrkes sammen på agarskål uten å hemme hverandres vekst. Fortynningene -3, -4, -5, -6, -7 og -8 av *Bacillus* og *Pseudomonas* samt *Bacillus* og *Paenibacillus* ble spredt ut på agarskåler sammen. Bakteriekulturene ble oppbevart i kjøleskap (4°C) for kuldetilpasning og agarskålene ble inkubert ved 30°C i 24-48 timer. Etter at bakteriene hadde dannet kolonier på agarskålene, ble antall kolonier telt og multiplisert med fortynningsfaktoren for fastsetting av celletallet. Resultatene fra de to plateutspredningene ble sammenlignet.

2.3.2 Poding til vekstforsøk

Det ble tilsatt 9,9 mL UHT-lettmelk med glasspipette til 56 sterile 15 mL plastrør (Fisher scientific). Et plastrør for hvert uttak. For å oppnå startkonsentrasjonen log 2 KDE/mL melk, ble det laget en fortynningsrekke av bakteriekulturen til ca. log 4 KDE/mL var oppnådd. Deretter ble falconrørene med melk tilsatt 100 µL bakteriekultur av log 4 KDE/mL fortynning med en automatpipette. Illustrasjon av fremgangsmåten er presentert i figur 2.1.



Figur 2.1. Fremgangsmåte ved poding av bakteriekultur til melk. Bakteriekultur ble fortynnet i fortynningsvann frem til oppnådd bakteriekonsentrasjon log 4 KDE/mL. Det ble overført 100 µl av gitt bakteriekonsentrasjon til 9,9 ml UHT-melk.

Hver bakteriestamme ble tilsatt i fire rør for hver temperatur, totalt åtte rør. Rørene ble godt ristet før fire rør med hver bakteriestamme ble inkubert ved de bestemte temperaturene. Dette ble gjort for hver av de seks bakteriestammene.

2.3.3 Uttak

Det ble tatt nullprøver av inokulert melk, samt negativ kontroll. Dette ble gjort for å sikre at melken ble inokulert med riktig bakteriekonsentrasjon. Det ble deretter tatt ut prøver i henhold til uttaksplan presentert i tabell 2.5.

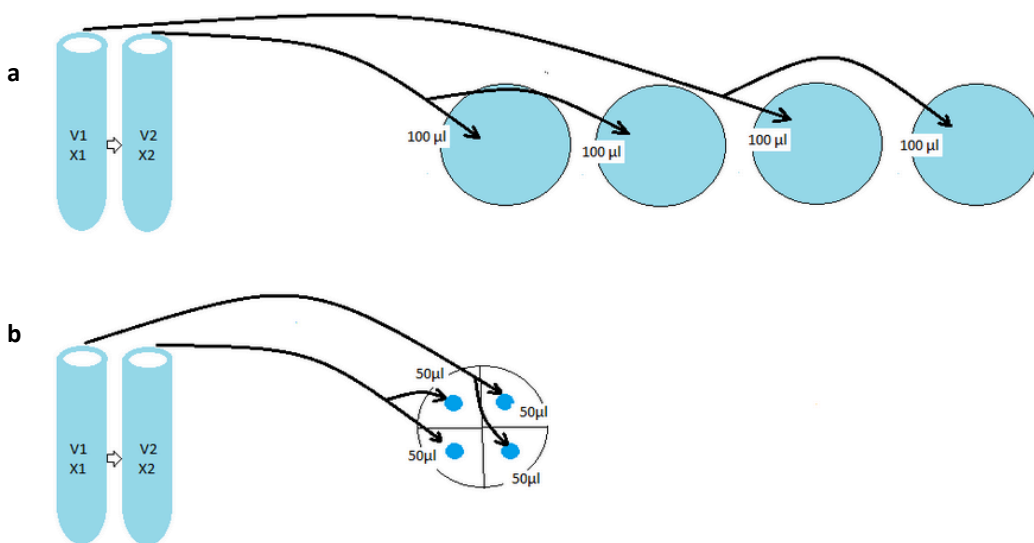
Tabell 2.5. Uttaksplan for mikrobielle prøver.

Temperatur	Dag*					
	1	2	3	4	5	14
8°C		X		X		X
15°C	X	X			X	

*1 dag = 24 t ± 20 minutter.

Prøvene ble sensorisk undersøkt og godt ristet direkte etter uttak fra inkuberingsskap. Deretter ble det laget en fortynningsrekke og prøvene ble platespredt på agarskåler. Det ble pipettert 100 μ L prøve til agarskål. Prøven ble spredt ut med en steril drigalski spatel. Det ble gjort to paralleller for hver fortynning.

Den samme fortynningsrekken ble benyttet til å bestemme celletall ved bruk av drop plate teknikk. Agarskålen ble delt inn i fire ruter og 50 μ L av hver fortynning ble pipettert til hver rute, i paralleller. Illustrasjon av fremgangsmåten ved vanlig platespredning og drop plate teknikk er presentert i figur 2.2.



Figur 2.2. Platespredning og drop plate teknikk. (a) 100 μ L fortynnet bakteriekultur ble overført i agarskål og spredt ut med steril drigalski spatel. Prøvene ble sådd ut i paralleller og det ble brukt to agarskåler for hver fortynning. (b) 50 μ L fortynnet bakteriekultur ble overført som dråpe til rute på agarskål. Prøvene ble sådd ut i paralleller og det ble brukt en halv agarskål for hver fortynning.

Prøvene ble fullstendig tørket inn i agaren før skålene ble inkubert ved 30°C i 24-48 timer. Etter at cellene hadde dannet kolonier på agarskålene ble koloniene telt og multiplisert med mengde og fortynningsfaktor. Resultatene fra vanlig platespredning og drop plate teknikk ble sammenlignet.

2.4 Samkultivering

Utvalget til hovedforsøket ble bestemt på bakgrunn av resultater fra innledende forsøk og at det var ønskelig med størst mulig diversitet i prøvene. Oversikt over antall prøver og samkultivering er illustrert i tabell 2.6. *Bacillus* og *Pseudomonas* stammene er nummererte 1 og 2.

Tabell 2.6: Oversikt over bakterier og kombinasjoner som ble benyttet i samkultiveringsforsøkene

	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Paenibacillus</i> <i>lactis</i> LMG21940
<i>Bacillus</i> <i>weihenstephanensis</i> MC67	X	X	X
<i>Bacillus</i> <i>weihenstephanensis</i> 324	X	X	X

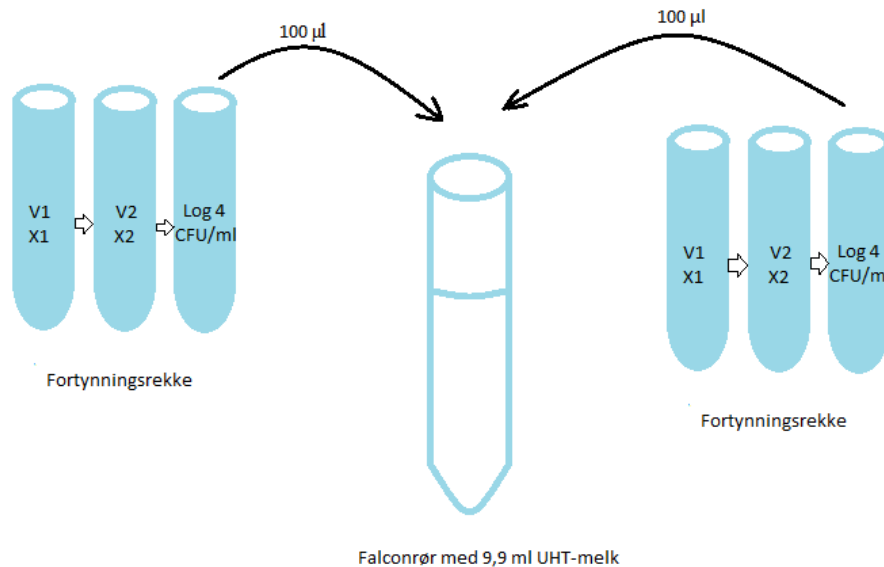
Alle kombinasjoner av *Bacillus weihenstephanensis* sammen med *Pseudomonas* og *Paenibacillus* benyttet (Tabell 2.6). For å ha et sammenligningsgrunnlag ble også bakteriene inokulert alene i melk. Samkultiveringsforsøkene ble utført i tripletter og metodebeskrivelsen er for et gjentak.

2.4.1 Forberedelse til vekstforsøk

Frosne bakteriekulturer ble tint i romtemperatur og det ble gjort plateutstryk på blod-, og BHI-agar (Merck) før inkubering ved 30°C i 24-26 timer. Bakterier fra en koloni ble deretter podet over til 5 mL BHI-medium (Merk) i 10 mL reagensrør og inkubert ved 30°C i 24 timer. Etter 24 timer ble rørene visuelt undersøkt for bakterievekst. Det ble bestemt at startkonsentrasjonen av bakteriekultur i melk skulle være log 2 KDE/mL. Som for det innledende vekstforsøket måtte celledetallet i bakteriekulturen fastsettes for å oppnå riktig starkonsentrasjon. Se avsnitt 2.3.1 for metodebeskrivelse.

2.4.2 Poding til vekstforsøk

Det ble tilsatt 9,9 mL UHT-lettmelk med glasspipette til 108 sterile 15 mL plastrør (Fisher scientific) Plastrørene med melk, ble podet med 100 μ L fortynnet kultur med en bakterietetthet på log 4 KDE/mL. Samkulturene ble podet med 100 μ L fortynnet kultur med bakterietetthet log 4 KDE/mL for hver av bakteriestammene, i henhold til tabell 2.6. Fremgangsmåten er illustrert i figur 2.2.



Figur 2.2. Fremgangsmåte ved poding for samkultur i melk. Bakteriekulturene ble fortynnet i ringers løsning til en bakterietetthet på log 4 KDE/ml. For hver stamme ble det overført 100 μ L av gitt bakteriekonsentrasjon til 9,9 ml UHT-melk.

Direkte etter poding ble rørene godt ristet i en vortex mixer (Grant) og plassert i inkubatorskap ved 8- og 15°C.

2.4.3 Uttak

Det ble tatt nullprøver av inokulert melk, samt fra negativ kontroll. Dette ble gjort for å forsikre at melken ble inokulert med riktig bakteriekonsentrasjon. Det ble deretter tatt ut prøver i henhold til uttaksplan presentert i tabell 2.7.

Tabell 2.7. Uttaksplan for mikrobielle og kjemiske analyser i samkultiveringsforsøk.

Temperatur	Dag*								
	0	1	2	3	4	5	6	7	14
8°C	X		X		X			X	X

15°C	X	X	X			X			
------	---	---	---	--	--	---	--	--	--

*1 dag = 24 t ± 20 minutter.

De mikrobiologiske prøvene ble i hovedsak sådd ut på BHI-agar (Merck) ved bruk av drop plate teknikk. Siden celletallet for *Paenibacillus* ikke kunne fastsettes ved drop plate teknikk, ble det benyttet vanlig platespreding for disse prøvene. Det ble også benyttet blodagar siden det var lettere å skille *Paenibacillus* fra *Bacillus* ved utsåing på blodagar, sammenlignet med BHI-agar. Direkte etter uttak til mikrobiologiske prøver ble gjenværende prøvemateriale fryst ned til -20°C, for senere opparbeiding av prøver til kjemiske analyser.

2.5 Kjemiske analyser

2.5.1 Kvantifisering av organiske syrer og karbohydrater i melk ved High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Melkeprøvene ble analysert for innhold av organiske syrer og karbohydrater ved high performance liquid chromatography (HPLC), en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011) med noen modifikasjoner. Fryste melkeprøver ble tint i vannbad og ristet for hånd før analyse. Det ble veid opp 1 g melkeprøver til et 10 ml belcorør. Det ble tilsatt 2,5 mL ionebyttet vann, 200 µL 0,5 molar (M) svovelsyre (Merck, Tyskland) og 8,0 mL acetonitril (Merck). Prøvene ble ristet for hånd før de ble satt i en Multiflora RS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 minutter. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 3500 rpm i 15 minutter i en Kubota 2000 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan). Supernatanten ble tilført HPLC-rør ved bruk av en 10 mL sprøyte. Dette ble gjort i avtrekksskap. Det ble satt på en sprøytespiss til sprøyten og ca. 3 mL supernatant ble trekt opp. Sprøytespissen ble fjernet og det ble satt på et 0,2 mm PTFE Membran filter (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) før sprøytespissen igjen ble satt på sprøyte med filter. Filteret ble skylt gjennom ved å presse ca. 1 mL supernatant gjennom filteret over i en spesialavfallsbøtte. Deretter ble supernatanten sprøytet gjennom filteret og nålen i HPLC-rør. Filter og sprøytespiss ble fjernet og resten av supernatanten ble kastet i spesialavfallsbøtte. Sprøyten ble skylt med acetonitril og tømt fullstendig mellom hver prøve.

Analysen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), bestående av pumpe (Agilent Technologies), autosampler (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV detektor (Agilent

Technologies), og RI-detektor (Agilent Technologies). Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies). En volum på 25 µL av prøven ble injisert og separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For beskyttelse av kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories). Kolonnetemperatur var satt til 32 °C. Den mobile fasen som ble benyttet var 5 mM H₂SO₄ (Merck), med en hastighet på 0.4 mL/min.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var maltose, fruktose, laktose, glukose og galaktose (Merck) og av organiske syrer ble sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyroglutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsninger. Karbohydratene og eddiksyre ble detektert ved hjelp av en RI-detektor, mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en DAD-UV detektor.

2.5.2 Peptid- og proteinnedbrytning ved kappillærelektroforese

Nedbrytning av protein og peptider i melkeprøver ble analysert ved kapillærelektroforese, en metode beskrevet av Heck et al. (2008) og Mestawet et al. (2014) med noen modifikasjoner. Fryste melkeprøver ble tint i vannbad før analyse. Prøvebuffer ble preparert ved å tilsette 39,3 mg dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 5 mL prøvebuffer. Melkeprøvene ble godt ristet før 300 µL melk og 1,2 mL prøvebuffer ble blandet i eppendorfrør. Eppendorfrørene ble ristet 4-5 ganger før de ble satt til inkubering en time i romtemperatur. Prøvene ble sentrifugert i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 13000 x g i to minutter for å felle ut fett. Prøver uten fett, ble sugd opp med en 2 ml steril engangssprøyte (Becton Dickson S. A., Madrid, Spania) med 0,8x40 mm kanyle (Becton Dickson S. A., Fraga, Spania). Prøvene ble deretter filtrert gjennom 0,2 µL cellulosefilter (VWR international, USA) til nye eppendorfrør. For kjøring av kapillærelektroforese ble 50 µL prøvemateriale overført til 250 µL ampuller (Agilent Technologies, USA).

Kapillærelektroforesen ble kjørt i Agilent G1600 AX (Agilent Technologies) med programvaren 3D CE ChemStation (Agilent Technologies, Tyskland). Kaseinseparasjon ble utført som beskrevet av Heck et al. (2008). Prøvene ble kjørt i sekvenser på 30 prøver og hver

prøve tok 78 minutter. Ved første kjøring og etter hver fjerde prøve ble kapillæret skylt med 0,1 M NaOH i 5 minutter og kjørebuffer i 20 minutter. Det ble også skylt med kjørebuffer i 5 minutter før hver prøve. Prøvemateriale ble injisert ved anoden ved 34,5 mbar i 20 sekunder. UV-deteksjon av peptider og proteiner ble utført ved 214 nm (Mestawer et al. 2014).

2.5.3 Deteksjon av cereulid

Kvantifisering av cereulidkonsentrasjon ble analysert ved bruk av kromatografi masse spektrofotometri (LC/MS). Alle prøvene skulle vurderes i henhold til forventet cereulidkonsentrasjon i prøven. Det ble først vurdert at alle prøvene skulle analyseres med hensyn til lav konsentrasjon. Det viste seg at noen av prøvene hadde høyere cereulidkonsentrasjon enn forventet. Disse prøvene ble i tillegg analysert med hensyn til høy konsentrasjon.

Opparbeiding av prøver, samt kjøring av analyse ble utført eksternt av overingeniør ved NMBU, Adamstuen. Metoden er utviklet ved Norges veterinærhøgskole ble utført i henhold til M-KL-35. (Vedlegg 1.)

3.0 Resultater

3.1 Genotypisk indentifisering

Ved analyse av gelelektroferesen ble båndstørrelsen på gelen sammenlignet med forventet størrelse, avhengig av hvilken bakterie og størrelsen av genomet det var forventet å finne.

Resultatene fra sekvensering og bearbeiding i BioEdit bekreftet at bakterien bestilt fra Belgian Coordinated Collections of Microorganisms mest sannsynlig er *Paenibacillus lactis* (99%).

Dette ble bekreftet ved bruk av 1F (forward) primer og 23Sr (reverse) primer hvor målet var å amplifisere henholdsvis 16S rRNA og 16S rRNA-23S rRNA. Bakterien blir derfor videre navngitt som *Paenibacillus lactis* LMG21904 i henhold til vedlegg fra Belgian Coordinated collections of mikroorganismers.

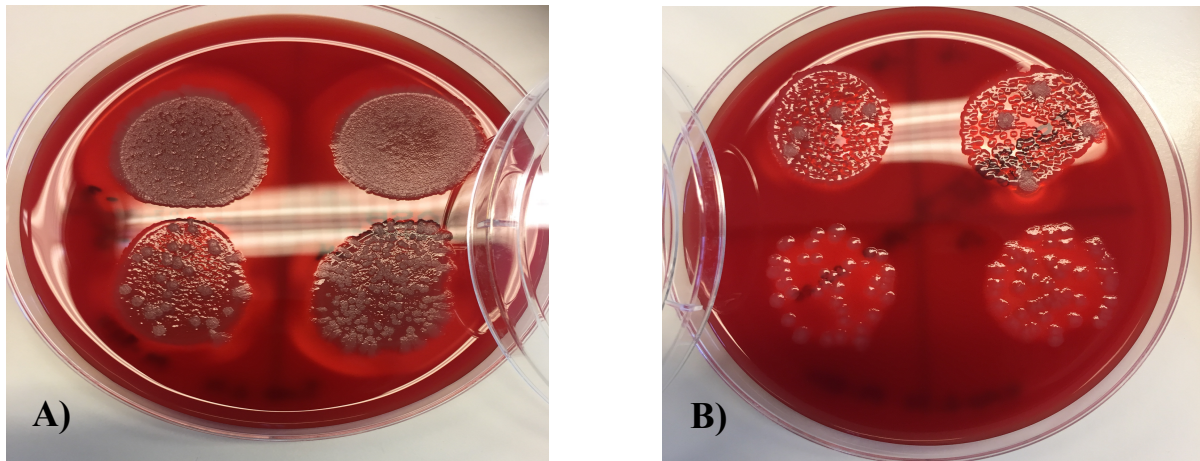
Begge stammene som ble isolert ved en tidligere masteroppgave (Bækkelund, 2016) ble identifisert som *Pseudomonas*. Det ble benyttet PsEG30F (forward) primer og PsEG790R (reverse) primer. Stammen kalt *Pseudomonas* 15 av Bækkelund, ble identifisert som *Pseudomonas fluorescens* (100% identisk, E-verdi=0). Den andre *Pseudomonas* stammen ble foreslått identifisert som *Pseudomonas* sp. Irchel (99% identisk, E-verdi=0), hvor deler av RpoD genotipe ble identifisert. Denne stammen hadde også 96% identitet med deler av RpoD genotipe til *Pseudomonas trivialis*. Det kan dermed ikke med sikkerhet bekreftes hvilken stamme dette er. Denne stammen vil videre bli navngitt som *Pseudomonas* sp.

Det ble også bekreftet at *Bacillus* stammene benyttet i hovedforsøket tilhørte stammen *Bacillus weihenstephanensis*. Det ble benyttet 1406 (forward) primer og 23Sr (reverse) primer. Bakteriene vil videre bli navngitt *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Bacillus weihenstephanensis* 324, slik som de var merket ved ankomst til NMBU.

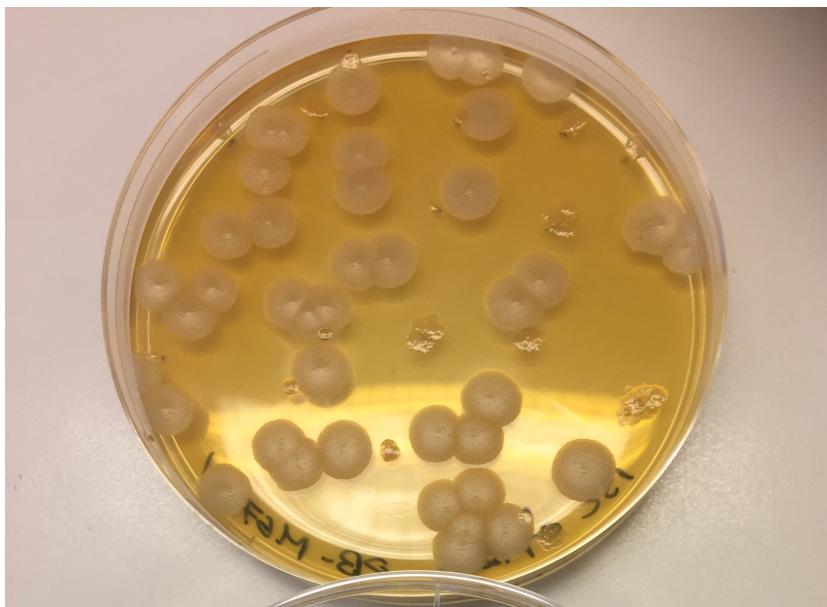
3.2 Bakterievekst ved platetelling

Veksten av *Pseudomonas* var generelt raskere og høyere enn veksten av *Bacillus* stammene i melk. Ved å benytte flere ulike fortyninger av melkeprøvene kunne likevel «drop plate teknikk» benyttes for bestemmelse av bakterievekst (figur 3.0-3.1). *Paenibacillus lactis* krevde lengere inkubasjonstid enn *Pseudomonas* og *Bacillus* (minst 48 timer). *P. lactis* dannet ved lengere inkubasjon av agarskålene, bevegelige mikrokolonier spredt langs overflaten av agaren. Veksten av bevegelige mikrokolonier av *P. lactis* var uberegnelig. Agarskålen kunne se negativ ut etter 24-48 timer inkubering for så å være overgrodd etter videre inkubering over natten. Dette gjorde «drop plate teknikk» uegnet for bestemmelse av bakterievekst og det var også

vanskelig å bestemme celletall ved vanlig plateutstryk. Figur 3.0 og 3.1 viser hvordan bakteriene kunne differensieres ved bruk av «drop plate teknikk». Figur 3.2 viser hvordan *Paenibacillus lactis* og *Bacillus weihenstephanensis* MC67 kunne differensieres på BHI-agar (Merck).



Figur 3.1. A) Resultater fra «drop plate teknikk» for samkultur av *Bacillus weihenstephanensis* og *Pseudomonas* sp. Runde gråe kolonier er *B. weihenstephanensis*, mens blanke, små runde kolonier er *Pseudomonas* sp. Dråpe nede til venstre viser tellbar fortynning av *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. har for lav fortynning, og er ikke tellbar. B) Resultater fra «drop plate teknikk» for samkultur av *Bacillus weihenstephanensis* og *Pseudomonas* sp. Runde gråe kolonier er *B. weihenstephanensis*, mens blanke, små runde kolonier er *Pseudomonas* sp. Dråper øverst til høyre og venstre viser for høy fortynning fortynning av *Bacillus* sp. Og for lav fortynning av *Pseudomonas* sp. (paralleller). Dråper nederst til høyre og venstre viser to pararelle, tellbare fortynninger av *Pseudomonas* sp.



Figur 3.2. Fenotypisk differensiering av *Paenibacillus lactis* (ugjevne, gjennomsiktige, runde kolonier) og *Bacillus weihenstephanensis* MC67 (store runde kolonier) på BHI-agar (Merck).

3.3 Vekstforsøk

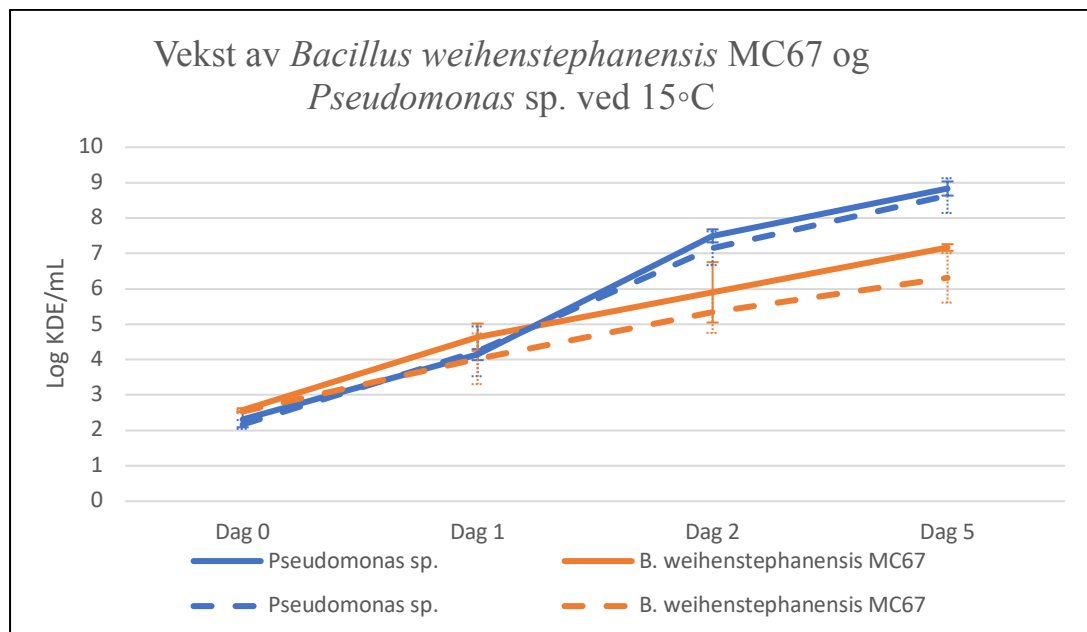
Resultatene er illustrert ved linjediagram hvor hel trukket linje viser vekst av stammer fra enkeltkultivering, mens stiplet linje viser vekst av stammer fra samkultiveringsforsøk.

Bakteriekonsentrasjonen ble beregnet ved gjennomsnitt av parallellene gjennom tre replikat. Det er beregnet gjennomsnittlig log KDE/mL av tre gjentak. Standardavviket er beregnet og er illustrert med feilfelt i linjediagram. Vekstkurvene er presentert i figur 3.3 – 3.14.

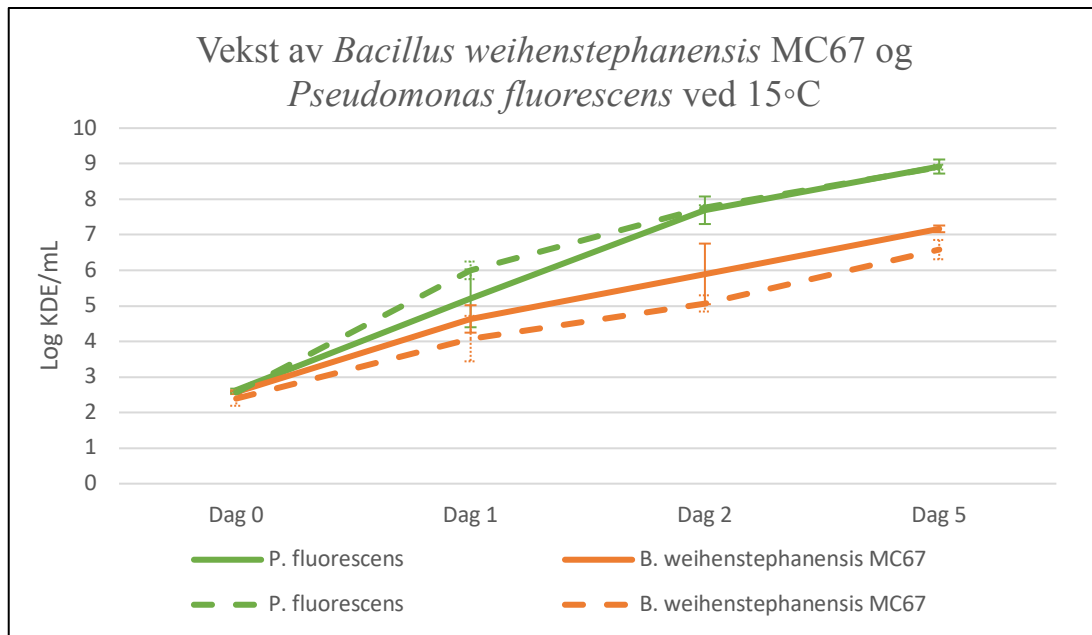
3.3.1 Vekstforsøk 15°C

Ved 15°C viste samtlige prøver høyere og raskere vekst av *Pseudomonas* sammenlignet med *Bacillus weihenstephanensis* og *Paenibacillus lactis*. Forskjellen var størst i prøver med *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Paenibacillus lactis* ved dag 2 og 5. Ved dag 5 var det også stor forskjell i vekst av *Paenibacillus lactis* i samkultur, sammenlignet med enkeltkultur. Disse resultatene har høyt standardavvik og det var stor varians mellom de tre gjentakene.

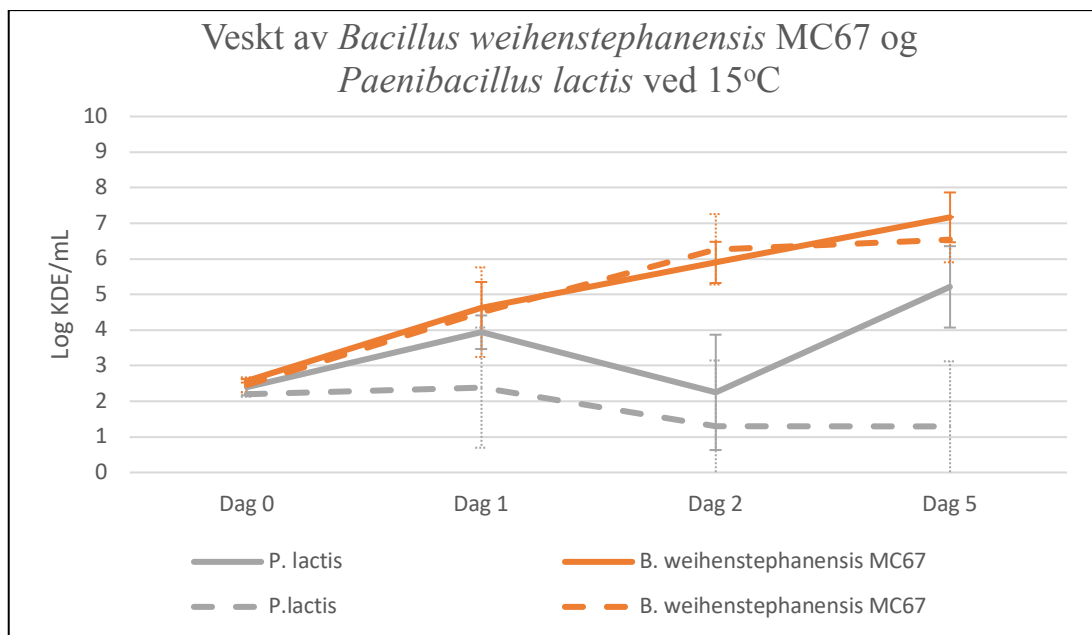
Bacillus weihenstephanensis hadde en noe lavere vekst da de var samkulturert med *Pseudomonas* sammenlignet med i enkeltkultur. Forskjellen var større for *Bacillus weihenstephanensis* MC67 enn *Bacillus weihenstephanensis* 324. Bakterievekst for melk inkubert ved 15°C er presentert i figur 3.3-3.8.



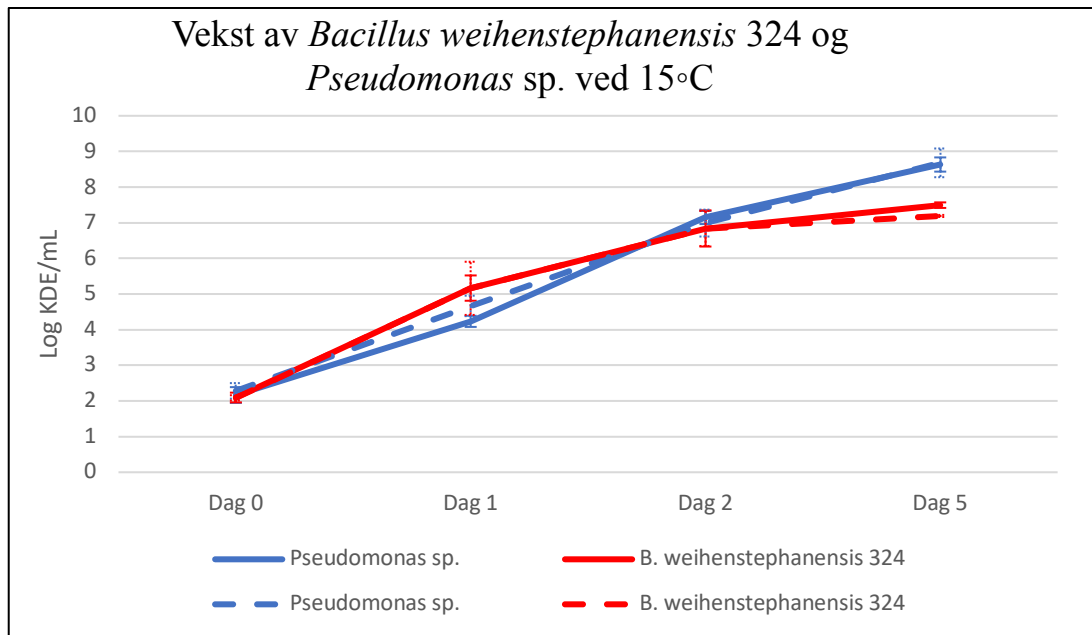
Figur 3.3. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Pseudomonas* spp. i UHT-melk inkubert ved 15 °C.



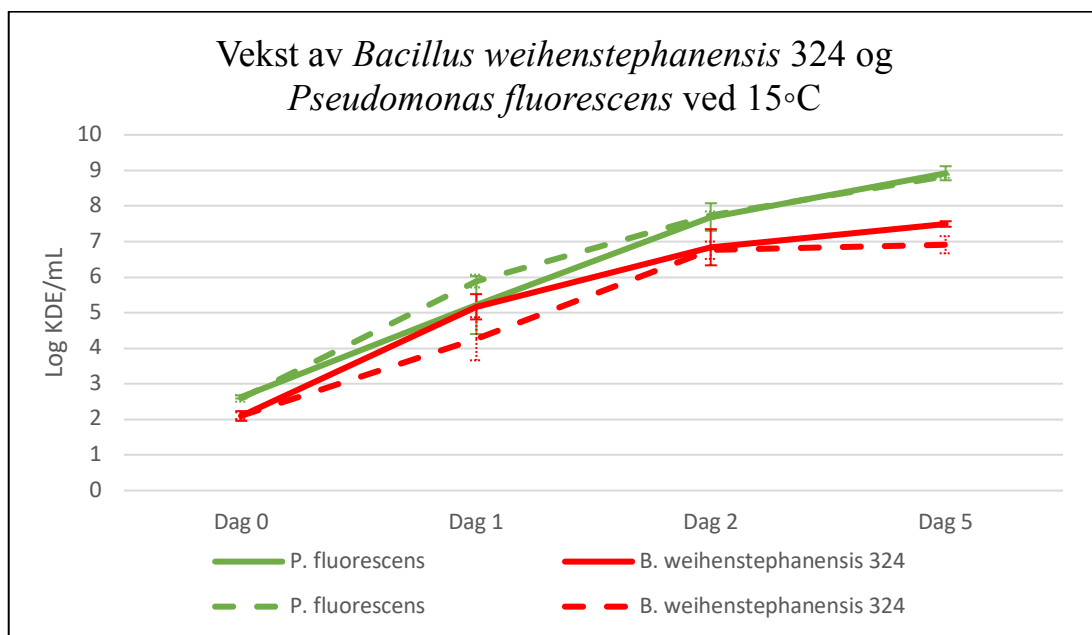
Figur 3.4. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Pseudomonas fluorescens* i UHT-melk inkubert ved 15°C.



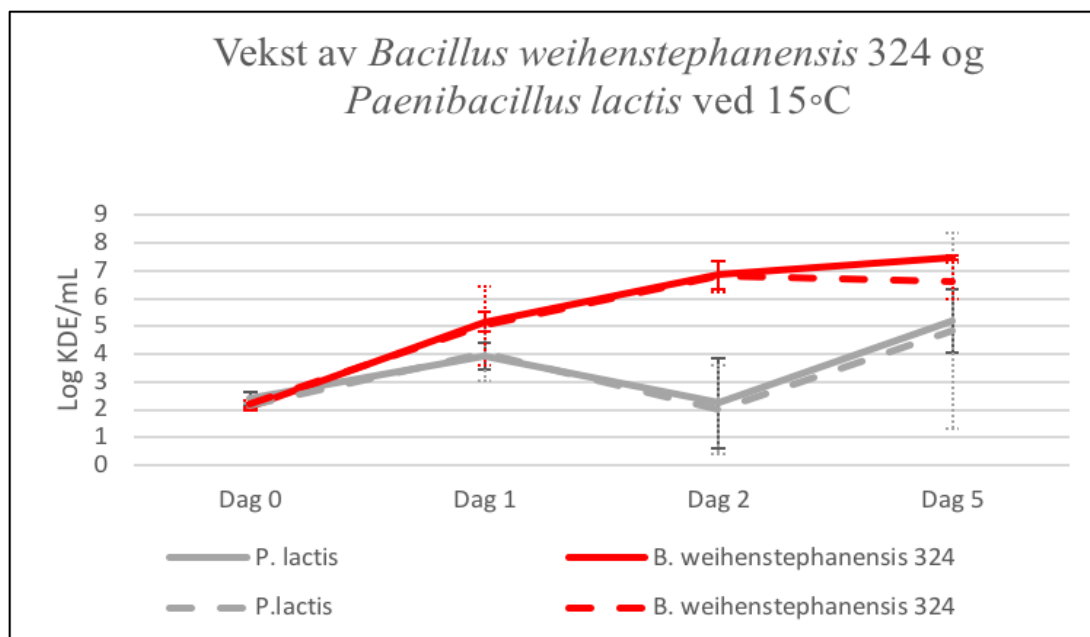
Figur 3.5. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Paenibacillus lactis* i UHT-melk inkubert ved 15°C.



Figur 3.6. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* 324 og *Pseudomonas* spp. i UHT-melk inkubert ved 15°C.



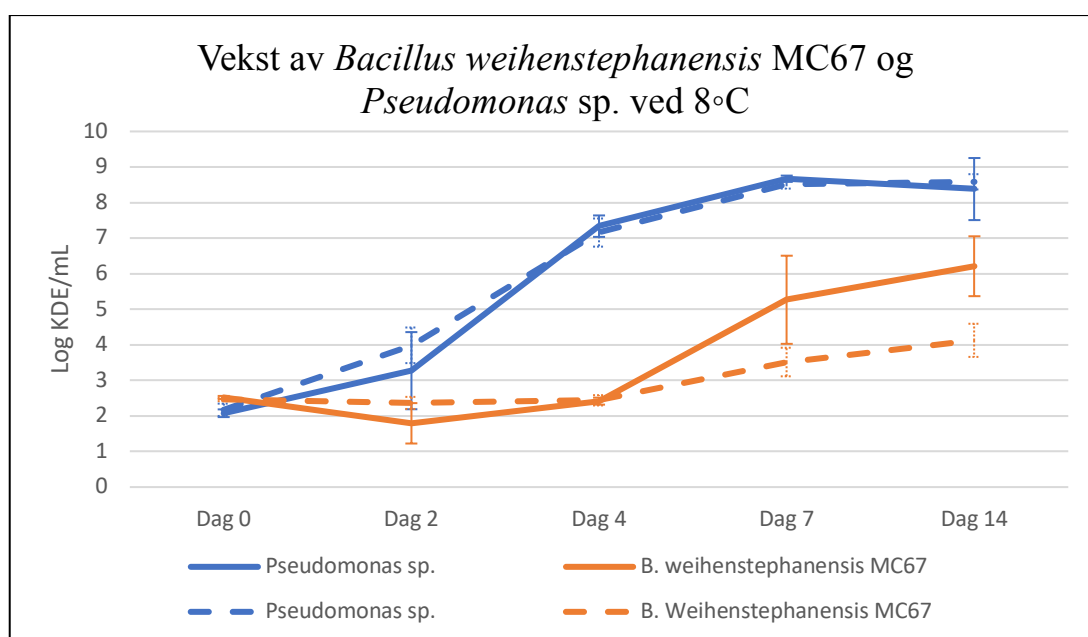
Figur 3.7. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* 324 og *Pseudomonas fluorescens* i UHT-melk inkubert ved 15°C.



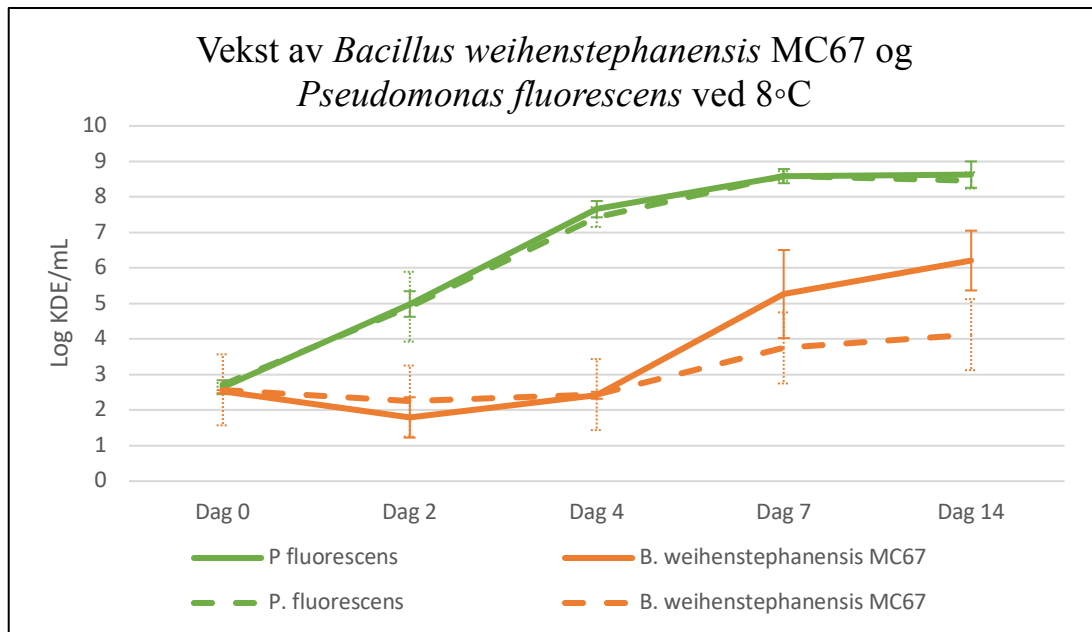
Figur 3.8. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* 324 og *Paenibacillus lactis* i UHT-melk inkubert ved 15°C.

3.3.2 Vekstforsøk ved 8°C

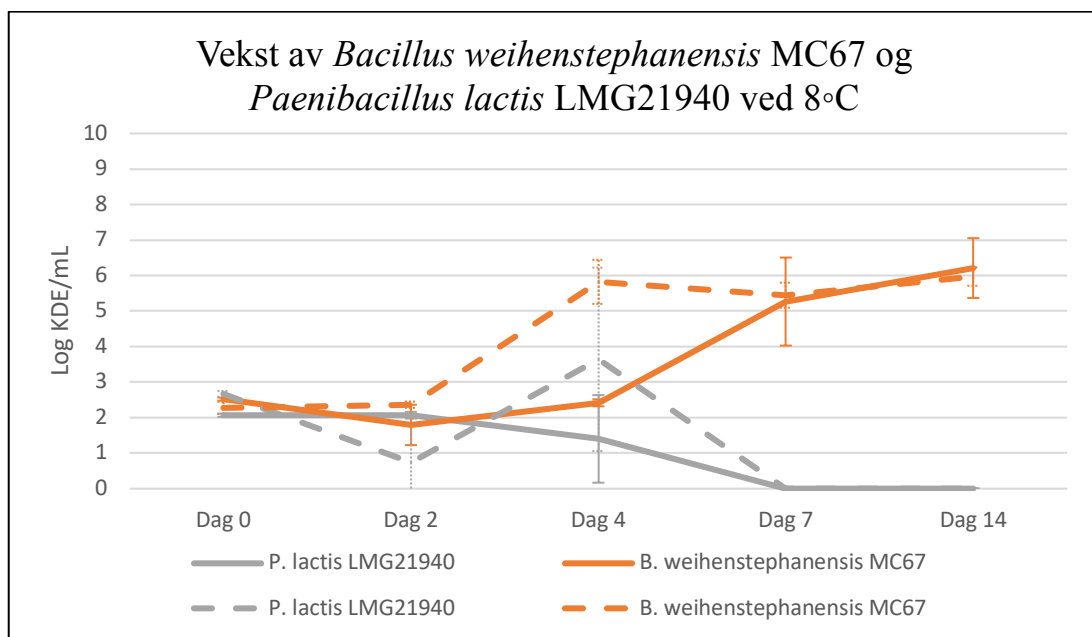
Resultater fra vekstforsøk utført ved 8°C viser at *Pseudomonas* vokser relativt likt uavhengig av om de var kultivert alene eller sammen med *Bacillus* stammer. Dette gjelder også for *Bacillus weihenstephanensis* 324. *Bacillus weihenstephanensis* MC67 hadde derimot en noe lavere vekst ved dag 7 og 14 da stammen ble samkultiver med *Pseudomonas*. *Bacillus* har lengere lag-fase enn *Pseudomonas*. Dette gjelder både i enkeltkultur og samkultur.



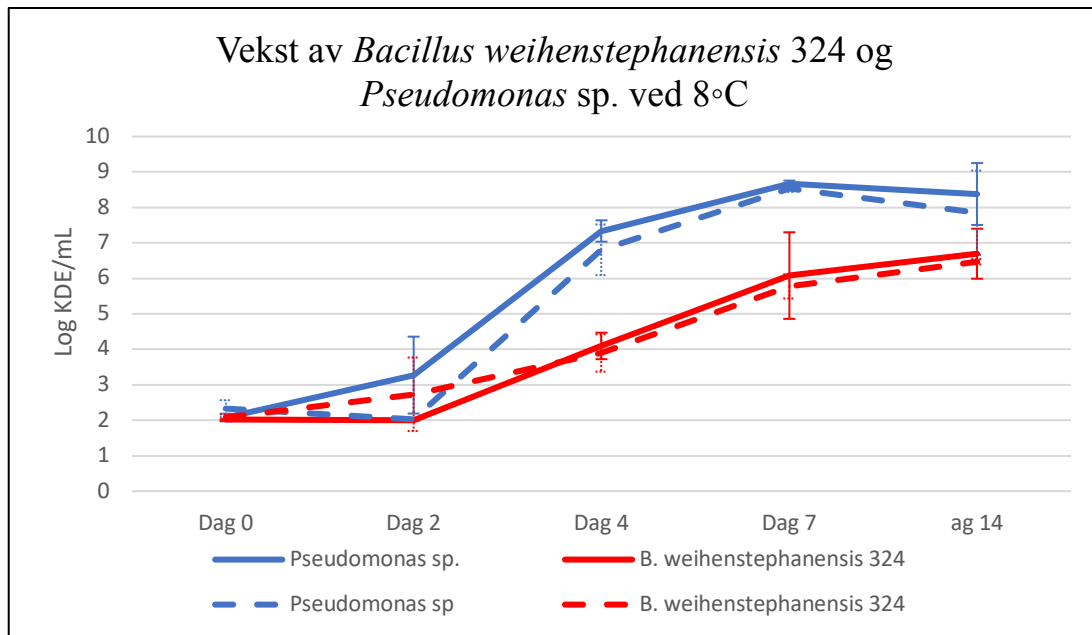
Figur 3.9. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Pseudomonas* spp. i UHT-melk inkubert ved 8°C.



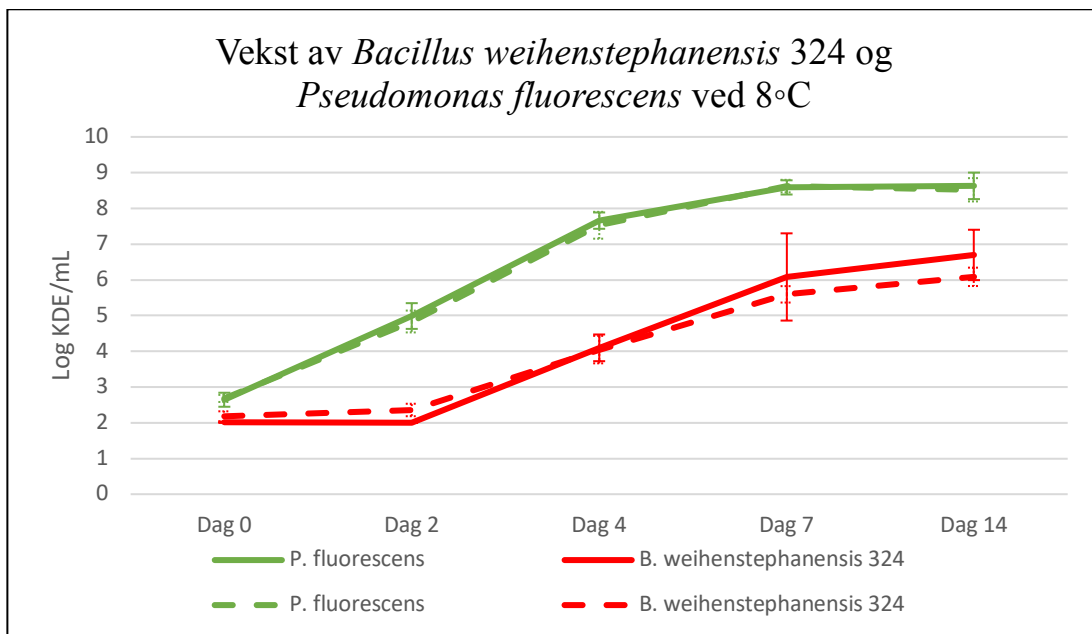
Figur 3.10. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Pseudomonas fluorescens* i UHT-melk inkubert ved 8°C.



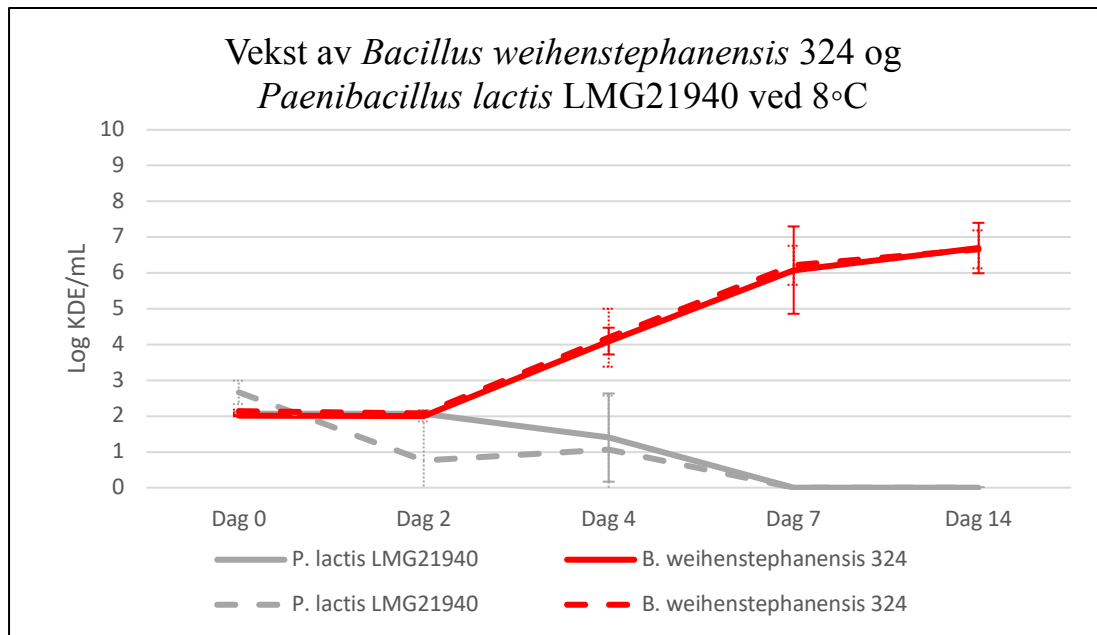
Figur 3.11. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Paenibacillus lactis* LMG21940 i UHT-melk inkubert ved 8°C.



Figur 3.12. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* 324 og *Pseudomonas* spp. i UHT-melk inkubert ved 8°C.



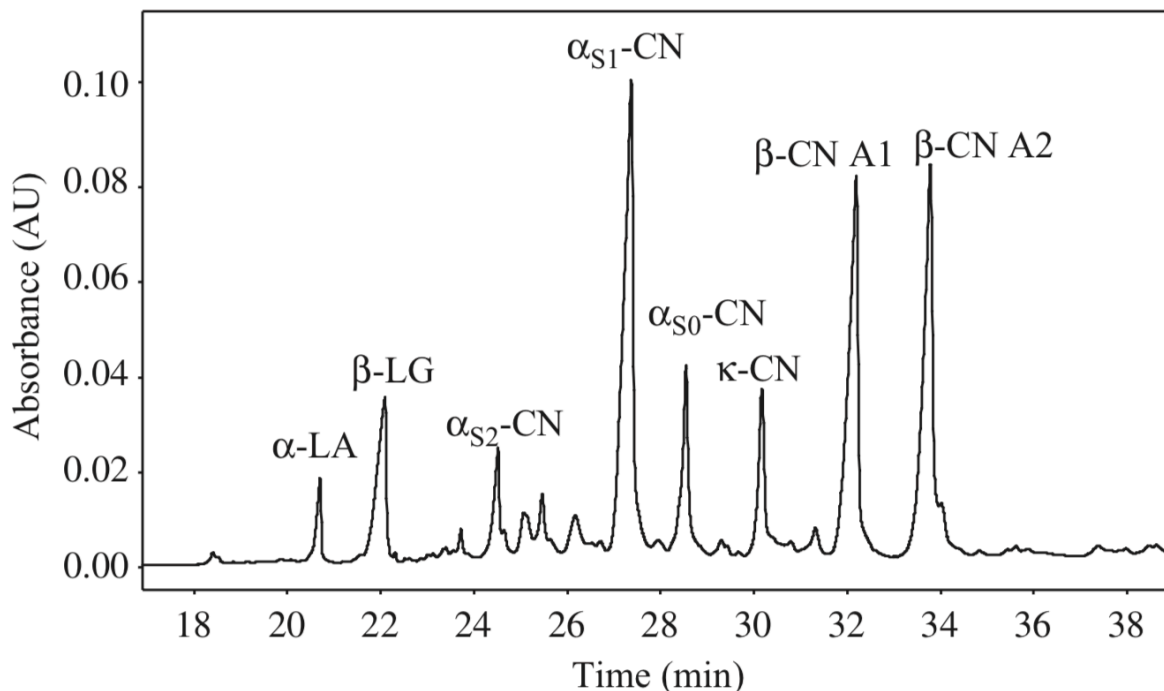
Figur 3.13. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* 324 og *Pseudomonas fluorescens* i UHT-melk inkubert ved 8°C.



Figur 3.14. Vekst av *Bacillus weihenstephanensis* 324 og *Paenibacillus lactis* LMG21940 i UHT-melk inkubert ved 8°C.

3.4 Peptid- og proteinnedbrytning

Peptid- og proteinnedbrytning som følge av proteolytiske enzymer ble analysert ved bruk av kapillærelektroferese. Det ble generert et elektroferogram for hver prøve. Melkeproteinene α -lactalbumin (α -LA), β -lactoglobulin (β -LG), α_{S2} -kasein (α_{S2} -CN), α_{S1} -kasein (α_{S1} -CN), α_{S0} -kasein (α_{S0} -CN), β -kasein A1- (β -CN A1), β -kasein A2 (β -CN A2) og κ -kasein (κ -CN) ble gjenkjent ved å sammenligne topper i kapillærelektroferogram med topper identifisert av Heck et al. (2006) (Figur 3.15).



Figur 3.15. Identifisering av α -lactalbumin (α -LA), β -lactoglobulin (β -LG), α_{S2} -kasein (α_{S2} -CN), α_{S1} -kasein (α_{S1} -CN), α_{S0} -kasein (α_{S0} -CN), κ -kasein (κ -CN), β -kasein A1 (β -CN A1) og β -kasein A2 (β -CN A2) i rå kumelk, ved bruk av kapillær zone elektroferese (Heck et al., 2006)

Ved visuell analyse av kapillærelektroferogramene ble det bestemt å analysere nedbrytning av α_{S1} -CN, α_{S0} -CN, β -CN A1, β -CN A2 og κ -CN siden proteinnedbrytningen så ut til å være størst i disse proteinene.

Toppene i kapillærelektroferogramene ble integrert og arealet av de integrerte toppene av de utvalgte proteinene ble beregnet. Den prosentvise endringen i areal fra dag 0 til dag 1, 2 og 5 for melk inkubert ved 15°C, og fra dag 0 til dag 2, 4, 7 og 14 for melk inkubert ved 8°C ble beregnet. Det ble deretter beregnet gjennomsnitt og standardavvik for resultatene fra tre gjentak. Resultatene er presentert i tabell 3.1-3.4.

Tabell 3.1. Prosentvis nedbrytning av kasein i UHT-melk inokulert med enkelt stammer. Resultatene er fra melk inkubert ved 15 °C. Resultatene er gjennomsnitt fra tre gjentak og standardavvik er oppgitt i parantes.

Prosentvis kaseinnedbrytning ved 15°C						
	α_{S1} -kasein	α_{S0} -kasein	β -kasein A1	β -kasein A2	κ -kasein	Antall topper (n)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67						
Dag 0	100	100	100	100	100	29,67 (0,94)
Dag 1	103,1 (0,07)	103,72 (0,06)	99,66 (0,11)	102,12 (0,07)	103,55 (0,08)	30,33 (0,47)
Dag 2	100,02 (0,11)	127,38 (0,32)	69,14 (0,17)	68,31 (0,16)	53,53 (0,14)	40,33 (3,86)
Dag 5	81,84 (0,04)	49,89 (0,03)	19,41 (0,02)	18,67 (0,02)	16,4 (0,01)	52,67 (2,05)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324						
Dag 0	100	100	100	100	100	30,67 (1,25)
Dag 1	112,45 (0,14)	112,76 (0,13)	110,92 (0,11)	110,61 (0,09)	110,16 (0,12)	33 (3,27)
Dag 2	93,62 (0,01)	109,84 (0,28)	35,91 (0,15)	33,5 (0,16)	24,91 (0,06)	49,33 (8,26)
Dag 5	75,67 (0,14)	67,84 (0,17)	12,67 (0,05)	8,84 (0,4)	5,7 (0,05)	63,67 (6,13)
<i>Pseudomonas</i> spp.						
Dag 0	100	100	100	100	100	33,33 (2,62)
Dag 1	97,06 (0,05)	96,93 (0,05)	96,45 (0,05)	97,14 (0,05)	98,2 (0,05)	31,67 (0,47)
Dag 2	97,83 (0,03)	109,49 (0,06)	84,96 (0,1)	76,49 (0,12)	68,11 (0,17)	38,00 (3,27)
Dag 5	70,01 (0,16)	89,52 (0,19)	24,37 (0,13)	18,26 (0,06)	19,78 (0,13)	61,67 (1,89)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						
Dag 0	100	100	100	100	100	31 (0,82)
Dag 1	93,68 (0,02)	93,94 (0,02)	90,6 (0,08)	94,84 (0,03)	93,39 (0,02)	30,33 (0,47)
Dag 2	81,29 (0,19)	92,99 (0,17)	63,74 (0,29)	58,06 (0,29)	40,39 (0,31)	39,33 (4,64)
Dag 5	60,76 (0,07)	79,11 (0,06)	8,49 (0,08)	15,66 (0,02)	17,96 (0,1)	60,33 (4,03)
<i>Paenibacillus lactis</i> LMG21940						
Dag 0	100	100	100	100	100	30 (2,16)
Dag 1	97,4 (0,03)	99,11 (0,06)	95,69 (0,03)	95,94 (0,04)	96,87 (0,04)	29 (1,63)
Dag 2	93,05 (0,07)	95,17 (0,09)	91,65 (0,08)	92,29 (0,08)	97,09 (0,07)	28,67 (1,25)
Dag 5	93,29 (0,15)	90,36 (0,12)	88,91 (0,08)	94,41 (0,14)	93,73 (0,12)	30,33 (1,7)

Tabell 3.2. Prosentvis nedbrytning av kasein i UHT-melk inokulert med stammer i samkultur. Resultatene er fra melk inkubert ved 15 °C. Resultatene er gjennomsnitt fra tre gjentak og standardavvik er oppgitt i parantes.

Prosentvis kaseinnedbrytning ved 15°C						
	α _{s1} -kasein (%)	α _{s0} -kasein (%)	β -A1- kasein (%)	β -A2- kasein (%)	κ -kasein (%)	Antall topper (n)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67 og <i>Pseudomonas</i> spp.						
Dag 0	100	100	100	100	100	28,67 (0,94)
Dag 1	107,58 (0,09)	107,86 (0,09)	106,27 (0,08)	104,96 (0,07)	105,41 (0,04)	33,33 (2,36)
Dag 2	100,5 (0,06)	127,04 (0,16)	63,96 (0,16)	61,21 (0,16)	45,92 (0,13)	40 (2,83)
Dag 5	81,97 (0,25)	126,6 (0,41)	20 (0,03)	18,41 (0,04)	27,39 (0,04)	62 (4,24)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67 og <i>Pseudomonas fluorescens</i>						
Dag 0	100	100	100	100	100	33 (5,89)
Dag 1	100,76 (0,09)	102,66 (0,15)	102,5 (0,07)	100,08 (0,1)	105,91 (0,2)	30 (2,16)
Dag 2	92,83 (0,1)	125,76 (0,14)	47,68 (0,16)	41,5 (0,18)	26,71 (0,16)	48 (5,35)
Dag 5	69,81 (0,14)	79,67 (0,18)	22,94 (0,02)	13,66 (0,04)	22,52 (0,11)	64,67 (2,49)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324 og <i>Pseudomonas</i> sp.						
Dag 0	100	100	100	100	100	29,33 (0,47)
Dag 1	96,81 (0,02)	96,45 (0,03)	95,82 (0,04)	95,41 (0,04)	96,41 (0,06)	30,67 (1,89)
Dag 2	85,22* (0,06)	97,7* (0,26)	22,09* (0,11)	21,08* (0,1)	12,9* (0,13)	53,5* (9,5)
Dag 5	62,9* (0,11)	52,26* (0,12)	9,05* (0,04)	10,28* (0,01)	0* (0)	67,5* (6,5)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324 og <i>Pseudomonas fluorescens</i>						
Dag 0	100	100	100	100	100	33 (5,89)
Dag 1	95,01 (0,06)	97,74 (0,05)	101,56 (0,06)	99,16 (0,07)	97,01 (0,07)	30 (2,16)
Dag 2	75* (0,12)	104,84* (0,23)	31,59* (0,08)	29,05* (0,1)	16,64* (0,01)	45* (4)
Dag 5	64,01 (0,05)	51,43 (0,07)	16,4 (0,02)	11,7 (0,01)	0 (0)	64,67 (2,49)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67 og <i>Paenibacillus lactis</i> LMG21940						
Dag 0	100	100	100	100	100	27,67 (1,7)
Dag 1	101,89 (0,04)	101,7 (0,09)	100,95 (0,02)	101,32 (0,02)	99,56 (0,03)	28,33 (2,49)
Dag 2	106,3 (0,07)	123,74 (0,1)	80,43 (0,03)	78,79 (0,02)	59,93 (0,02)	38 (2,16)
Dag 5	64,31 (0,02)	63,47 (0,03)	12,53 (0,01)	20,05 (0,01)	0 (0)	68 (4,97)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324 og <i>Paenibacillus lactis</i> LMG21940						
Dag 0	100	100	100	100	100	27,67 (1,25)
Dag 1	100,13 (0,03)	98,04 (0,06)	102,71 (0,03)	101,98 (0,03)	101,92 (0,03)	29 (4,32)
Dag 2	88,75 (0,03)	119,49 (0,02)	35,33 (0,03)	37,75 (0,02)	21,15 (0,15)	38,67 (2,87)
Dag 5	59,98 (0,06)	55,56 (0,07)	8,63 (0,04)	6,71 (0,03)	0 (0)	67 (2,94)

*Gjennomsnitt av to gjentak, data fra et gjentak mangler.

Ved 8°C bryter *Bacillus weihenstephanensis* 324 effektivt ned κ -kasein og ved dag 14 gjenstår kun 1,21% av κ -kasein. *Bacillus weihenstephanensis* 324 er signifikant mer effektiv enn *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Paenibacillus lactis* LMG21904 (P-verdi <0,05). Det er derimot ingen signifikant forskjell mellom enkeltkultur og samkultur av *Bacillus weihenstephanensis* 324 ved nedbrytning av κ -kasein.

Bacillus weihenstephanensis MC67 ikke like effektiv til å bryte ned κ -kasein. Begge *Pseudomonas* stammene bryter ned mer κ -kasein enn *Bacillus weihenstephanensis* MC67 (P-verdi <0,05) *Bacillus weihenstephanensis* MC67 bryter ned mer enn *Paenibacillus lactis*

LMG21940 (P-verdi <0,05). I samkultur med *Pseudomonas* stammene er nedbryningen også større ved enkeltkultur av *Bacillus weihenstephanensis* MC67 (P-verdi < 0,05).

Tabell 3.3. Prosentvis nedbrytning av kasein i UHT-melk inokulert med enkelt stammer. Resultatene er fra melk inkubert ved 8°C. Resultatene er gjennomsnitt fra tre gjentak og standardavvik er oppgitt i parentes.

Prosentvis kaseinnedbrytning ved 8°C						
	α _{S1} -kasein (%)	α _{SO} -kasein (%)	β -A1-kasein (%)	β -A2-kasein (%)	κ-kasein (%)	Antall topper (n)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67						
Dag 0	100	100	100	100	100	34,33 (2,62)
Dag 2	102,56 (0,11)	105,74 (0,15)	98,88 (0,06)	103,02 (0,10)	106,78 (0,17)	34,33 (0,94)
Dag 4	93,84 (0,00)	95,99 (0,02)	92,51 (0,01)	93,80 (0,02)	94,44 (0,02)	31,67 (1,25)
Dag 7	94,08 (0,05)	104,29 (0,10)	79,41 (0,21)	80,15 (0,21)	79,04 (0,26)	38,67 (7,41)
Dag 14	87,53 (0,02)	99,47 (0,12)	73,19 (0,02)	72,88 (0,03)	64,69 (0,06)	41,33 (2,05)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324						
Dag 0	100	100	100	100	100	32,67 (1,89)
Dag 2	102,48 (0,02)	106,42 (0,07)	102,97 (0,02)	100,73 (0,01)	100,71 (0,01)	34,67 (2,49)
Dag 4	99,13 (0,02)	105,18 (0,08)	101,62 (0,05)	99,39 (0,04)	96,60 (0,05)	34,67 (3,3)
Dag 7	98,88 (0,04)	133,25 (0,11)	49,69 (0,13)	50,35 (0,13)	38,70 (0,13)	42,67 (6,13)
Dag 14	74,44 (0,13)	69,43 (0,19)	10,56 (0,05)	6,71 (0,03)	1,21 (0,02)	67,33 (11,09)
<i>Pseudomonas</i> sp.						
Dag 0	100	100	100	100	100	32,67 (0,94)
Dag 2	103,81 (0,01)	106,70 (0,04)	109,19 (0,13)	102,42 (0,04)	104,72 (0,03)	31,33 (1,89)
Dag 4	101,18 (0,04)	107,21 (0,09)	106,92 (0,09)	100,91 (0,05)	104,15 (0,08)	33,67 (3,86)
Dag 7	103,19 (0,16)	133,44 (0,21)	46,97 (0,11)	29,12 (0,08)	40,28 (0,12)	62 (11,58)
Dag 14	33,06 (0,09)	66,25 (0,13)	9,24 (0,01)	5,18 (0,004)	15,54 (0,04)	84,67 (5,73)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						
Dag 0	100	100	100	100	100	33,00 (0,82)
Dag 2	101,50 (0,07)	98,94 (0,07)	96,39 (0,06)	96,95 (0,06)	99,19 (0,08)	33,00 (2,83)
Dag 4	101,25 (0,12)	106,62 (0,21)	87,78 (0,07)	84,91 (0,11)	83,78 (0,12)	37,33 (2,05)
Dag 7	73,10 (0,10)	90,11 (0,14)	18,21 (0,08)	14,40 (0,05)	16,48 (0,01)	65,33 (5,44)
Dag 14	29,31 (0,14)	46,59 (0,11)	9,04 (0,04)	5,67 (0,01)	16,10 (0,06)	76,33 (6,6)
<i>Paenibacillus lactis</i> LMG21940						
Dag 0	100	100	100	100	100	30,33 (1,89)
Dag 2	98,06 (0,07)	97,28 (0,09)	95,15 (0,05)	100,00 (0,03)	101,60 (0,03)	32,00 (1,63)
Dag 4	97,07 (0,03)	93,86 (0,08)	97,47 (0,03)	99,07 (0,01)	99,63 (0,02)	30,67 (0,94)
Dag 7	97,40 (0,04)	86,31 (0,14)	89,58 (0,09)	95,22 (0,01)	99,13 (0,03)	31,67 (1,25)
Dag 14	98,07 (0,07)	98,91 (0,08)	96,59 (0,03)	98,69 (0,06)	103,54 (0,06)	31,33 (1,70)

Tabell 3.4. Prosentvis nedbrytning av kasein i UHT-melk inokulert med stammer i samkultur. Resultatene er fra melk inkubert ved 8 °C. Resultatene er gjennomsnitt fra tre gjentak og standardavvik er oppgitt i parentes.

Prosentvis kaseinnedbrytning ved 8°C						
	α_{S1} -kasein (%)	α_{S0} -kasein (%)	β -A1-kasein (%)	β -A2-kasein (%)	κ -kasein (%)	Antall topper (n)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67 og <i>Pseudomonas</i> sp.						
Dag 0	100	100	100	100	100	35,00 (7,79)
Dag 2	92,00 (0,20)	92,14 (0,20)	91,64 (0,21)	92,08 (0,19)	92,44 (0,20)	31,67 (1,70)
Dag 4	88,70 (0,10)	87,84 (0,10)	89,12 (0,11)	89,02 (0,10)	89,85 (0,11)	33,33 (3,40)
Dag 7	76,77 (0,05)	91,11 (0,05)	38,76 (0,11)	29,80 (0,12)	35,64 (0,08)	54,00 (0,00)
Dag 14	41,34 (0,14)	60,25 (0,15)	14,12 (0,06)	14,12 (0,06)	14,16 (0,04)	72,67 (6,65)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67 og <i>Pseudomonas fluorescens</i>						
Dag 0	100	100	100	100	100	35,67 (5,19)
Dag 2	98,28 (0,10)	96,63 (0,10)	93,12 (0,04)	99,92 (0,09)	101,70 (0,07)	35,00 (5,66)
Dag 4	88,57 (0,16)	90,34 (0,18)	68,13 (0,09)	57,30 (0,20)	48,66 (0,25)	39,67 (6,60)
Dag 7	83,31 (0,10)	107,15 (0,18)	22,47 (0,06)	16,87 (0,02)	22,82 (0,01)	58,67 (5,19)
Dag 14	38,33 (0,16)	61,19 (0,14)	11,24 (0,02)	8,76 (0,03)	8,91 (0,02)	47,67 (19,33)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324 og <i>Pseudomonas</i> sp.						
Dag 0	100	100	100	100	100	31,33 (2,05)
Dag 2	99,87 (0,05)	102,23 (0,11)	98,70 (0,04)	99,31 (0,04)	100,31 (0,02)	31,67 (2,62)
Dag 4	98,42 (0,05)	101,71 (0,09)	96,75 (0,06)	96,35 (0,06)	97,75 (0,05)	32,33 (2,36)
Dag 7	84,53 (0,08)	105,44 (0,12)	44,10 (0,16)	34,35 (0,13)	39,05 (0,11)	47,33 (1,7)
Dag 14	60,36 (0,05)	86,32 (0,14)	17,77 (0,01)	8,97 (0,01)	29,22 (0,13)	65 (7,12)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324 og <i>Pseudomonas fluorescens</i>						
Dag 0	100	100	100	100	100	33,00 (2,45)
Dag 2	99,75 (0,02)	101,94 (0,02)	98,91 (0,07)	98,05 (0,05)	99,91 (0,07)	33,00 (2,45)
Dag 4	87,75 (0,14)	95,44 (0,19)	77,21 (0,09)	75,16 (0,08)	71,46 (0,10)	34,33 (2,87)
Dag 7	67,78 (0,09)	79,62 (0,07)	26,13 (0,03)	16,82 (0,07)	19,19 (0,04)	58,33 (7,59)
Dag 14	36,89 (0,06)	49,90 (0,10)	12,87 (0,03)	6,54 (0,01)	7,34 (0,05)	70,67 (0,47)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67 og <i>Paenibacillus lactis</i> LMG21940						
Dag 0	100	100	100	100	100	29,33 (1,25)
Dag 2	104,68 (0,05)	104,62 (0,04)	103,59 (0,02)	103,64 (0,02)	105,85 (0,04)	30,67 (0,94)
Dag 4	101,13 (0,00)	99,70 (0,02)	98,28 (0,04)	100,15 (0,02)	101,12 (0,02)	34,33 (6,34)
Dag 7	96,20 (0,02)	95,49 (0,05)	96,09 (0,02)	95,69 (0,01)	94,74 (0,01)	30,67 (1,25)
Dag 14	99,81 (0,05)	115,75 (0,06)	78,54 (0,03)	79,43 (0,04)	67,15 (0,04)	39,67 (0,47)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 324 og <i>Paenibacillus lactis</i> LMG21940						
Dag 0	100	100	100	100	100	29,67 (0,47)
Dag 2	102,52 (0,02)	113,96 (0,18)	100,55 (0,01)	102,93 (0,01)	95,05 (0,1)	28,67 (1,25)
Dag 4	97,20 (0,01)	97,02 (0,01)	97,02 (0,01)	96,58 (0,02)	97,84 (0,01)	28,67 (1,7)
Dag 7	102,80 (0,09)	125,13 (0,13)	61,77 (0,04)	62,34 (0,04)	50,33 (0,04)	40,67 (3,86)
Dag 14	77,63 (0,05)	74,99 (0,04)	10,64 (0,02)	4,86 (0,02)	14,58 (0,09)	69,67 (2,05)

Bacillus bryter ned mer av κ -kasein sammenlignet med *Pseudomonas* og *Paenibacillus*. Allerede ved dag to har *Bacillus weihenstephanensis* MC67 degradert nesten halvparten av K-kasein. Ved dag fem gjenstår 18,67%. *Bacillus weihenstephanensis* 324 degraderer ytterligere mer k-kasein. Ved dag to gjenstår 24,91% og ved dag 5 kun 5,7%.

Pseudomonas fluorescens og *Pseudomonas* sp. degraderer k-kasein til henholdsvis 17,96% og 19,78% ved dag 5. Det er lite degradering av k-kasein i melk inokulert med *Paenibacillus lactis*.

3.5 Sensorisk analyse

Den negative kontrollen var homogen, uten spesiell lukt ved begge temperaturer, gjennom hele forsøket.

Melkeprøver inkubert ved 15°C hadde merkbare endringer allerede ved dag 2. Ingen av melkeprøvene luktet ubehagelig eller sterkt, men melk inokulert med *Bacillus weihenstephanensis* 324 hadde begynt å klumpe seg. Ved dag 5 hadde alle melkeprøver inokulert med bakterier koagulert. Alle melkeprøver inokulert med *Pseudomonas* hadde et gult fettlag ved overflaten av melken, mens melkeprøver hvor *Bacillus weihenstephanensis* var inokulert alene hadde små klumper.

Ved 8°C tok det lengere tid før melken hadde sensoriske endringer. Ved dag 7 var melk inokulert med *Pseudomonas* sp. fortsatt homogen, med antydning av søt lukt. Melk inokulert med *Pseudomonas fluorescens* hadde derimot koagulert og hadde mest sannsynlig ikke blitt konsumert av forbruker. Melk inokulert med *B. weihenstephanensis* var fortsatt flytende men hadde noen små klumper som ble synlig etter risting av melkeprøvene. Melk inokulert med *B. weihenstephanensis* 324 har litt kraftigere lukt enn melk inokulert med *B. weihenstephanensis*

3.6 Karbohydrat og organiske syrer

Kvantifiseringen av karbohydrat og organiske syrer ble analysert ved bruk av HPLC. Det ble først kjørt et gjentak, med alle uttaksdager i henhold til tabell 2.7. Resultatene fra det første gjentakets viste liten endring av innholdet av karbohydrat og organiske syrer. Det ble dermed besluttet å kjøre startprøver og siste uttaksdag for de resterende to gjentakene.

Resultatene viste svært liten endring av laktose, sitronsyre og orotic syre. Det ble ikke detektert glukose i noen av prøvene.

Tabell 3.5. Forkortelser benyttet i resultater av kvantifiseringen av karbohydrater og organiske syrer.

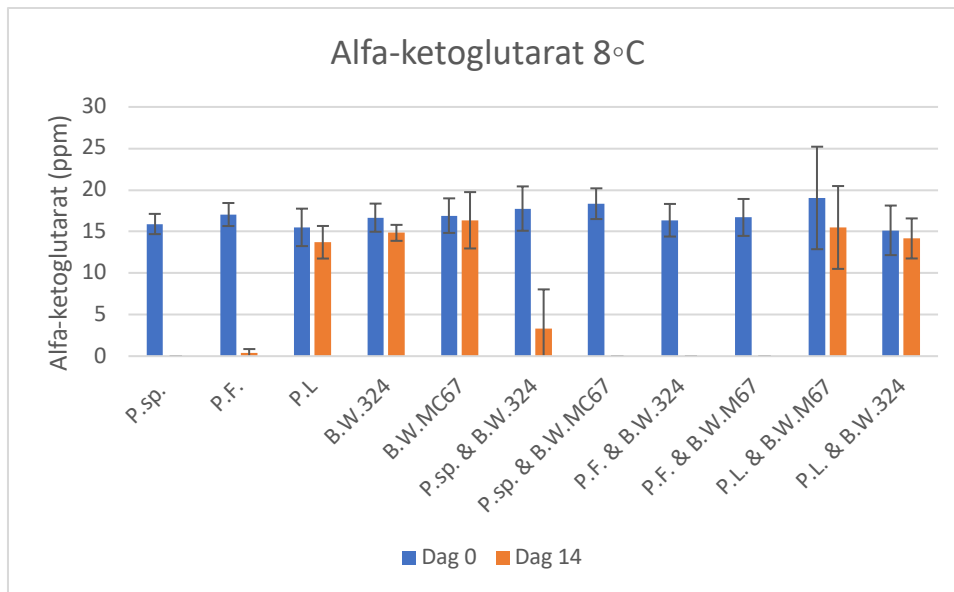
Slekt og art	Forkortelse
<i>Pseudomonas</i> sp.	P. sp.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P.F
<i>Paenibacillus lactis</i>	P.L
<i>Bacillus weihenstephanesis</i> 324	B.W.324
<i>Bacillus weihenstephanesis</i> MC67	B.W.MC67
Negativ kontroll*	Neg.

*Inkubert ved samme temperatur og tid som inokulerte melkeprøver

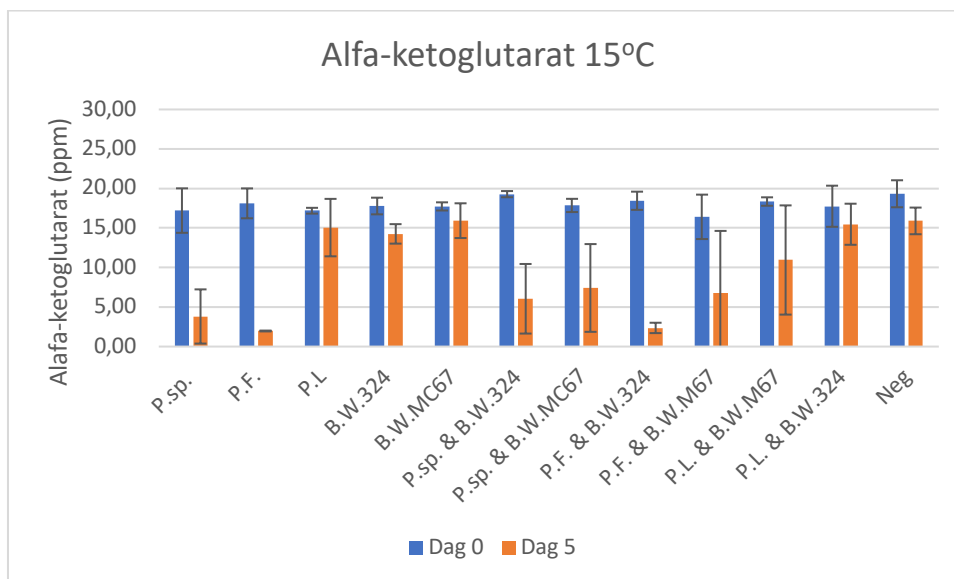
Resultatene er gjennomsnitt av tre gjentak ved dag 0 og dag 5 for prøver inkubert ved 15°C, og dag 0 og dag 14 for prøver inkubert ved 8°C. Standardavvik er illustrert ved feilfelt.

Ved 8°C hadde samtlige prøver en reduksjon av innholdet av alfa-ketoglutarat fra dag 0 til dag 14. Det ble ikke detektert alfa-ketoglutarat i prøver inokulert med *Pseudomonas fluorescens*.

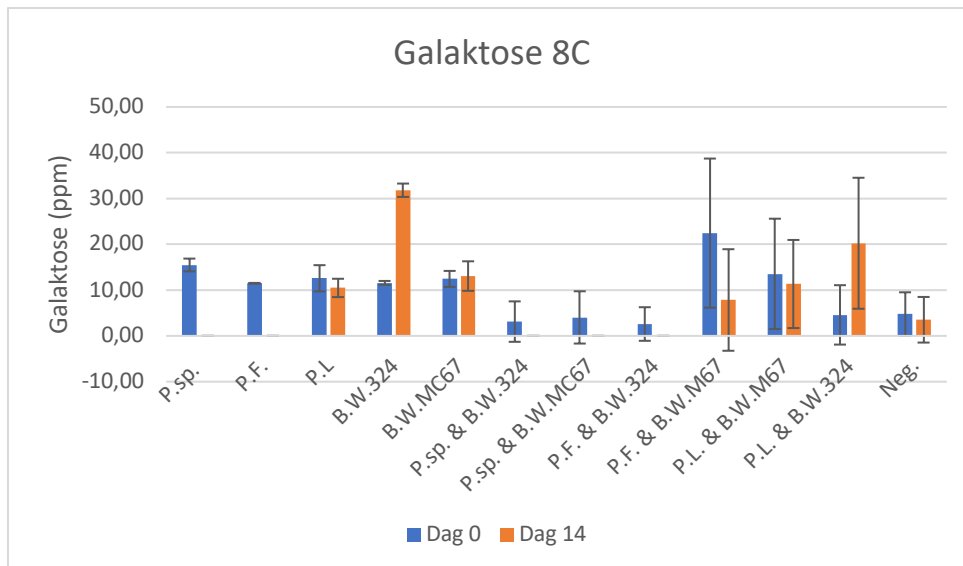
Ved 15°C hadde samtlige prøver en reduksjon av innholdet av alfa-ketoglutarat fra dag 0 til dag fem. Ved begge temperaturer var reduksjonen størst i melk inokulert med *Pseudomonas* spp. Resultatene er presentert i figur 3.15-3.16.



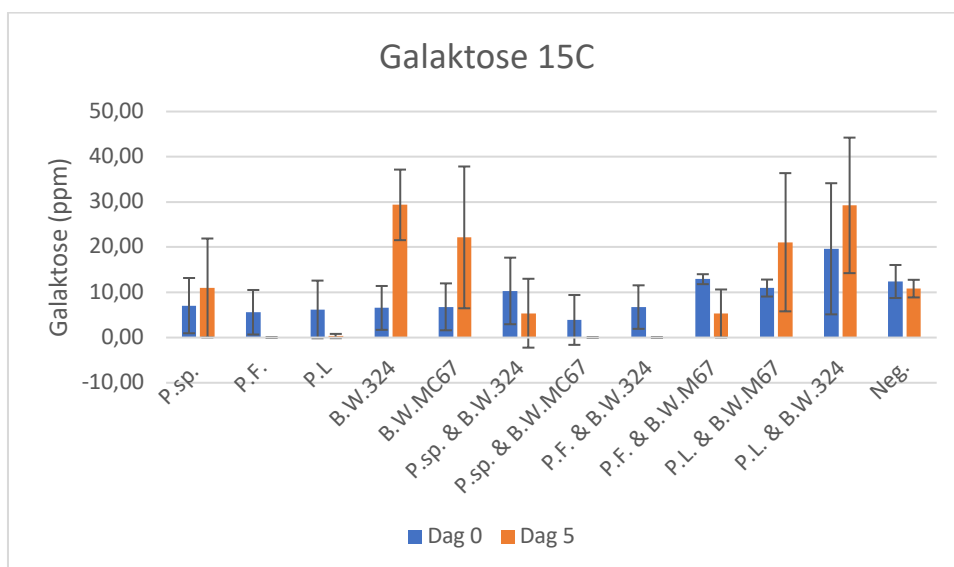
Figur 3.15. Reduksjon av alfa-ketoglutarat i melk inkubert ved 8°C i 14 dager. Standardavvik er illustrert med feilfelt.



Figur 3.16. Reduksjon av alfa-ketoglutarat i melk inkubert ved 15°C i fem dager. Standardavvik er illustrert med feilfelt.

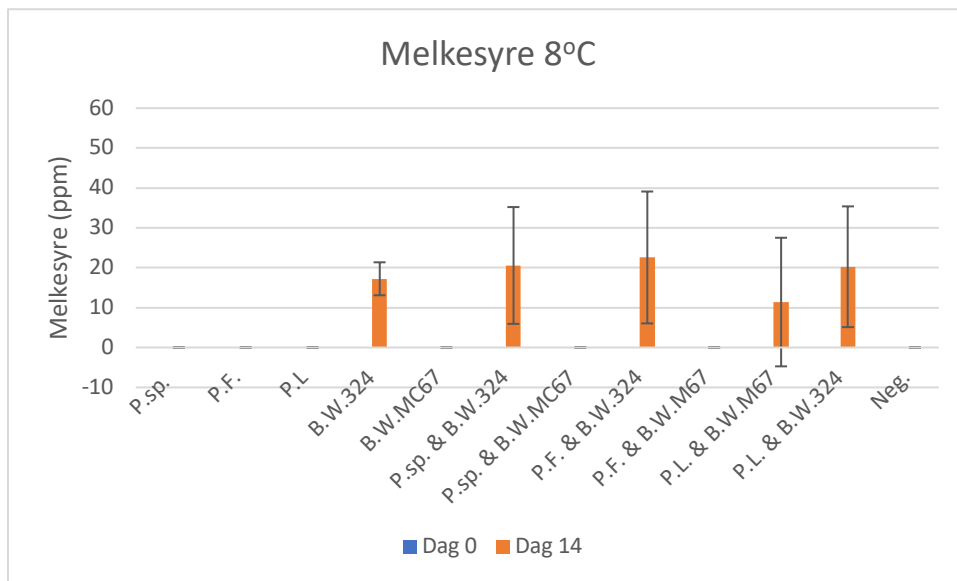


Figur 3.17. Innhold av galaktose i melk inkubert ved 8°C i 14 dager. Innholdet av melkesyre er oppgitt som parts per million (ppm). Standardavvik er illustrert med feilfelt.

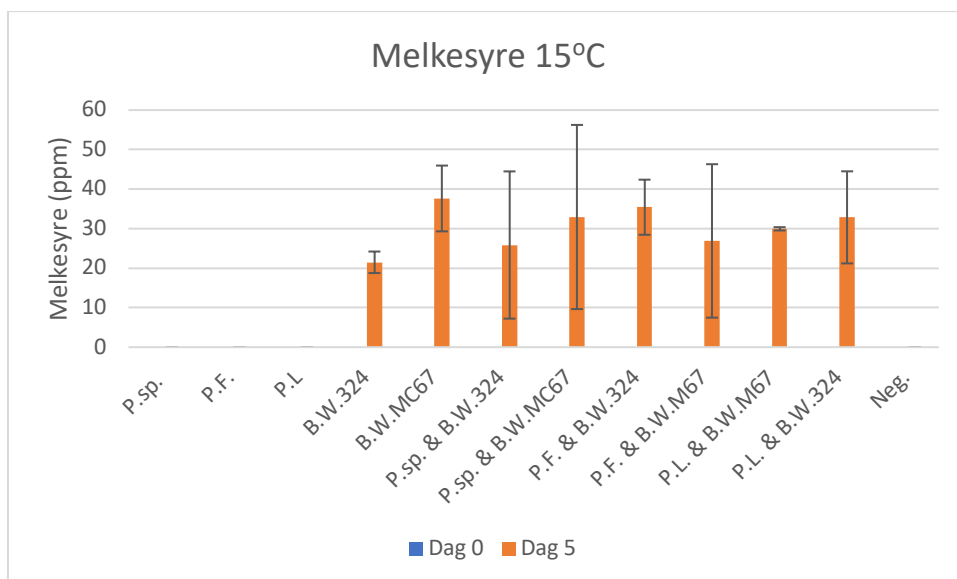


Figur 3.18. Innhold av melkesyre i melk inkubert ved 15°C i fem dager. Innholdet av melkesyre er oppgitt som parts per million (ppm). Standardavvik er illustrert med feilfelt.

Det ble ikke detektert melkesyre i noen av melkeprøvene ved dag 0. Ved 8°C ble det ved dag 14 detektert melkesyre i melkeprøver inokulert med *Bacillus weihenstephanensis* 324 og for *Bacillus weihenstephanensis* MC67. I samkultur med *Paenibacillus lactis*. Det ble ikke detektert melkesyre for noen av *Pseudomonas* artene. Ved 15°C ble det detektert melkesyre i samtlige melkeprøver inokulert med *Bacillus weihenstephanensis* stammer. Det ser ikke ut til at samkultivering hadde noen effekt på dannelse av melkesyre. Ved dag 5 (15°C) var det dannet mer melkesyre enn ved dag 14 (8°C). Resultatene for melkesyreinnhold er presentert i figur 3.19 og 3.20.

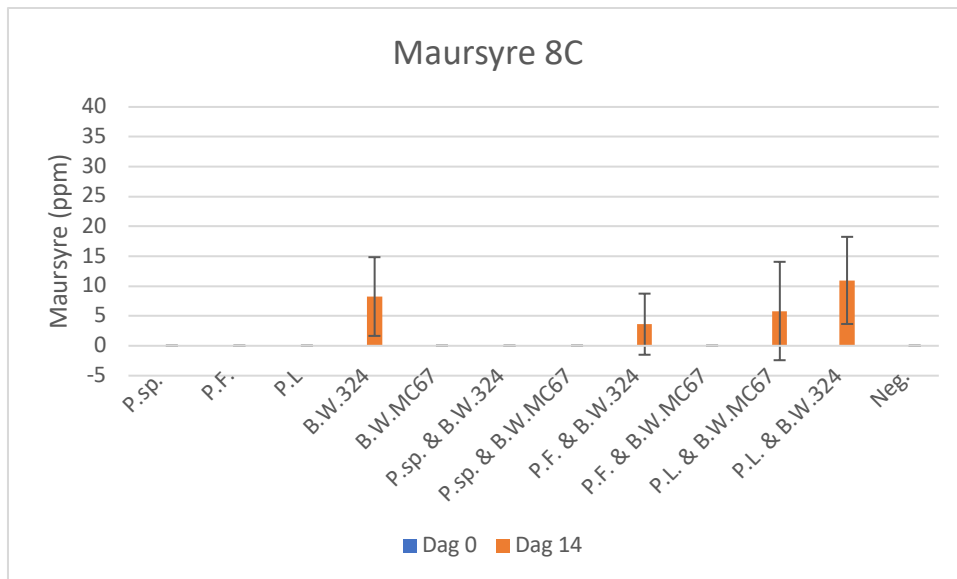


Figur 3.19. Innhold av melkesyre i melk inkubert ved 8°C i 14 dager. Innholdet av melkesyre er oppgitt som parts per million (ppm). Standardavvik er illustrert med feilfelt.

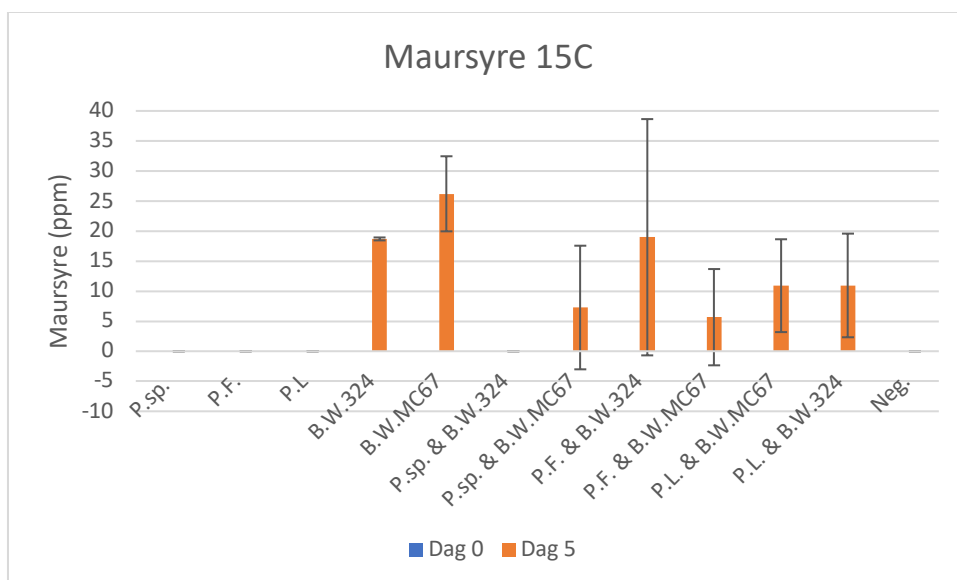


Figur 3.20. Innhold av melkesyre i melk inkubert ved 15°C i fem dager. Innholdet av melkesyre er oppgitt som parts per million (ppm). Standardavvik er illustrert med feilfelt.

Det ble ikke detektert mausyre ved start (dag 0). Ved siste uttaksdag var det derimot maursyre i melk inokulert med *Bacillus weihenstephanensis* 324 ved begge temperaturer. I samkultur med *Pseudomonas* sp. er det derimot ingen maursyre. Innholdet av maursyre ser ut til å være større ved dag 5 (15°C) enn ved dag 14 (8°C). Resultatene er presentert i figur 3.21 og 3.22.



Figur 3.21. Innhold av maursyre i melk inkubert ved 8°C i 14 dager. Innholdet av melkesyre er oppgitt som parts per million (ppm). Standardavvik er illustrert med feilfelt.



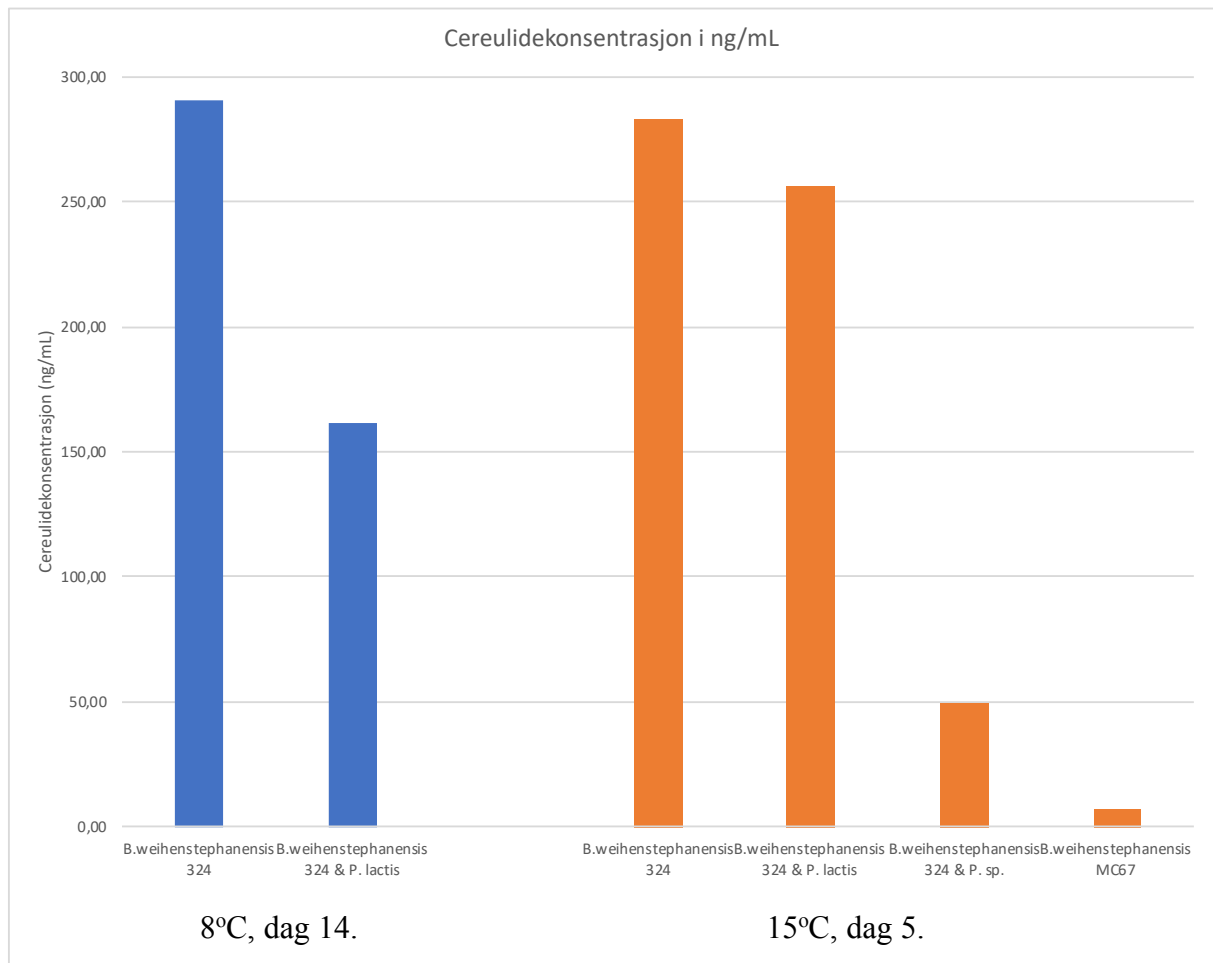
Figur 3.22. Innhold av maursyre i melk inkubert ved 15°C i fem dager. Innholdet av melkesyre er oppgitt som parts per million (ppm). Standardavvik er illustrert med feilfelt.

3.7 pH

Det var svært liten nedgang i pH i melk inkubert ved både 8- og 15°C. pH var stort sett 6,70 ved start og noen av prøvene hadde litt lavere pH-verdi ved 6,6- 6,55. Det var svært liten reduksjon i pH gjennom inkubasjonstiden. Prøver som sank mest i pH var melk inokulert med *Bacillus weihenstephanensis* 324. Her var den laveste verdien 6,46.

3.8 Cereulid

Alle prøver fra siste uttaksdag (tabell 2.7) i et gjentak, ble analysert for innhold av cereulid. Alle prøver ble først analysert for lavt konsentrasjonsområde (25-100 ng/mL). Fire av prøvene viste konsentrasjoner over 100 ng/mL, og ble derfor i tillegg analysert for høyt konsentrasjonsområde (25-5000 ng/mL). Det kunne ikke detekteres cereulid i de fleste prøvene, men seks av prøvene inneholdt cereulid. Resultater er presentert i figur 3.23.



Figur 3.23. Cereulidkonsentrasjon i UHT-melk inkubert ved 8°C i 14 dager og 15°C i fem dager.

Bacillus weihenstephanensis 324 alene og i samkultur med *Paenibacillus lactis* LMG21940 viste positive resultater ved analyse av cereulid. Cereulidkonsentrasjonen var størst da *B. weihenstephanensis* 324 var kultivert alene i melk, og konsentrasjonen var ved 8- og 15°C, henholdsvis 290,21- og 282,74 ng/mL melk ved siste uttaksdag. *Bacillus weihenstephanensis* 324 i samkultur med *Pseudomonas* sp. gav også positive resultater ved cereulidanalyse, men konsentrasjonen var lavere (49,81 ng/mL). *Bacillus weihenstephanensis* MC67 produserte også cereulid ved 15°C og konsentrasjonen var 7,46 ng/mL.

4.0 Diskusjon

4.1. Vekstforsøk

Melkens nøytrale pH og sammensetning av vann, fett, proteiner, laktose, vitaminer og mineraler, gjør den til en gunstig næringskilde for et stort mangfold av bakterier (Quigley et al., 2013). Rå melk har en kompleks og variert mikrobiota, hvor bakteriene konkurrerer om plass og næringsstoff (Ouertani et al., 2018, Quigley et al., 2013). Den komplekse mikrofloraen inkluderer mange ulike bakterier med ulike egenskaper. Noen bakterier kan føre til matbårne sykdommer slik som *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Brucella* og *Shigella* spp. samt *Escherichia coli* og *Bacillus cereus*. Andre bakterier hevdes å være helsefremmende slik som probiotiske melkesyrebakterier. Andre melkesyrebakterier som hyppig forekommer i rå melk er *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus Leuconostoc* og *Enterococcus* spp. Melkesyrebakterier senker melkens pH ved å produsere melkesyre (Adams & Moss, 2010). Siden melk koagulerer når pH-verdien når 4,6, var dette tidligere et kvalitetsproblem i melk og melkeprodukter. I dag utnyttes dette teknologisk ved produksjon av fermenterte melkeprodukt som yoghurt og rømme. Etter obligatorisk kjølelagring av rå melk ble innført, har syring av melk forårsaket av melkesyrebakterier og andre mesofile bakterier nærmest opphørt (Samaržija, Zamberlin & Pogačić, 2012). I dag er det psykotrofe bakterier som dominerer mikrofloraen i rå melk og det er ulike faktorer som påvirker sammensetningen.

Hygieniske forhold under melkingen, overflaten på melkeutstyret, hvor hurtig melken kjøles ned og årstid er faktorer som bestemmer hvilke bakterier som dominerer i rå melk. Melkens mikroflora endres også etter ved lagring og sammensetningen utvikler seg forskjellig ved ulike lagringstemperaturer.

På grunn av melkens komplekse og diverse mikrobiota er det elementært å avdekke eventuelle samarbeid eller konkurranse mellom vanlig forekommende psykotrofe bakterier. I dette forsøket ble *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Bacillus weihenstephanensis* 324 samkuturert med *Pseudomonas* sp. *Pseudomonas fluorescens* og *Paenibacillus lactis* LMG21940 i UHT-melk. Det ble benyttet to inkuberingstemperaturer; 8- og 15°C. I samtlige prøver var *Pseudomonas* spp. dominerende ved siste uttaksdag.

Psykotrofe *Pseudomonas* spp. utgjør ca. 10% av mikrofloraen i fersk rå melk (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Ved kjølelagring av melk har *Pseudomonas* evne til å vokse fra andre bakterier i melk og de kan etter kjølelagring av rå melk, utgjøre mellom 70- og 90% av mikrofloraen. Porcellato et al. (2017) sine funn indikerte at *Bacillus* og *Pseudomonas* spp. var

dominerende i fersk melk, avhengig av årstid. Under lagring ved 8°C dominerte *Bacillus* spp. ved slutten av holdbarhetstiden. Raneri et al., (2012) fant i sine forsøk at *Paenibacillus* spp. dominerte i kjølelagret melk ved slutten av holdbarhetstiden. Alle disse funnene sier noe om hvor variabel mikrofloraen i melk er. Disse tre bakteriene er vanlig forekommende psykotrofe kvalitetsforringere i melk og ulike faktorer påvirker deres dominans i mikrofloraen. Det kan være mange forhold som påvirker veksten og i dette forsøket ble bakteriekonsentrasjonen påvirket var både temperatur, tid og samkultivering (*Bacillus weihenstephanensis* MC67). Ved samkultivering tilføres det hverken ny næring eller fjerning av avfallsstoffer. Dette kan være begrensende for veksten.

Paenibacillus spp. er vanlig forekommende i jord og har vært isolert fra rå melk, pasteurisert melk, meierier og området på gården (Raneri et al., 2012). I følge Raneri, et al., er *Paenibacillus* spp. sammen med *Bacillus* spp. den vanligste sporeformende bakterien isolert fra melk. *Paenibacillus* spp. utgjør vanligvis en liten del av mikrofloraen i fersk rå melk og nylig pasteurisert melk, hvor vanligvis *Bacillus* spp. dominerer. Utover holdbarhetsperioden utgjør derimot *Paenibacillus* spp. en større del av mikrofloraen. I 10 dager gammel kjølelagret pasteurisert melk kan *Paenibacillus* spp. utgjøre hele 95% av den totale mikroflora. Disse funnene samsvarer med Huck et al. (2007) sine funn som viser at sporer fra *Paenibacillus* spp. er det viktigste bidraget til kvalitetsforringing og nedsatt holdbarhet av langtidsholdbar melk. Dette gjør at *Paenibacillus* kan utgjøre mellom 60-70% av mikrofloraen ved endt holdbarhet. Porcellato et al., fant også at *Paenibacillus* utgjorde en større andel av mikrofloraen ved slutten av holdbarhetstiden. Den forsinkede veksten av *Paenibacillus* i melk kan forklares ved at melken hovedsakelig kontamineres av sporer (Raneri et al., 2012). Germineringen av sporene tar vanligvis 17-21 dager, og det vil derfor gi *Paenibacillus* en forsinket vekst i melk (Grady et al., 2016)

I dette forsøket var det stor usikkerhet knyttet til resultatene av veksten til *Paenibacillus lactis* LMG21940. Bakterien hadde en uforutsigbar vekst og det var nødvendig å benytte mange ulike fortyninger av melkeprøvene ved utplating. I tillegg ble det i løpet av svært kort tid med inkubering dannet overvekst av mikrokolonier på agarskålene. Det faktum at *Paenibacillus* ofte forekommer i melk nært eller etter utløpsdato, kan i tillegg til germineringstid av sporer, indikere at bakterien muligens er avhengig av visse komponenter for å vokse, som ikke er til stede i fersk melk. En mulig hypotese er at den er avhengig av nedbrytningsprodukter i melken forårsaket av andre psykotrofe bakterier. Både *Pseudomonas* og *Bacillus* kan ha lipolytisk- og

proteolytisk aktivitet. De kan dermed bryte ned lipider og protein til andre peptider, aminosyrer, ammoniakk og fettsyrer som kan benyttes av andre bakterier. På den andre siden har *Paenibacillus* blitt beskrevet å være laktose positiv, samt ha evne til å sekretere hydrolytiske enzymer. I følge Sheldeman et. al (2004) er *Paenibacillus lactis* LMG21940 laktose positiv, vokser optimalt ved pH 7 og hydrolyserer ikke kasein. Optimumstemperaturen for vekst er mellom 30 og 40°C. Siden vekst av *Paenibacillus lactis* LMG21940 i dette vekstforsøket nærmest ikke eksisterte ved 8°C, kan det tenkes av temperaturen har vært for lav for denne stammen.

Ved 15°C var det derimot observert vekst i enkelte av melkeprøvene. *Paenibacillus lactis* viser et bestemt vekstmønster ved gjennomsnittsverdien av registrert vekst gjennom tre gjentak. Mengde kolonidannende enheter øker fra ca. log 2,5 KDE/mL melk ved inokulering (dag 0), til ca. log 4 KDE/mL ved dag 1. Deretter synker bakterietallet til litt lavere enn inokuleringskonsentrasjon ved dag 2. Deretter øker veksten til ca. log 5 KDE/mL ved siste uttaksdag. Den samme trenden gjelder for alle prøvene, foruten i samkultur med *Bacillus weihentephanensis* MC67. Selv om det var stor varians mellom de tre gjentakene viser resultatene en trend når det gjelder vekst av *Paenibacillus lactis* som kan settes i sammenheng med tidligere funn.

Når det gjelder eventuelle feilkilder ved rapportering av bakterievekst hos *Paenibacillus lactis* LMG21940 i dette forsøket, kan det være flere forskjellige. Siden *Paenibacillus* er en kjent sporedanner og veksten for arten i melk er satt i sammenheng med germiniseringstid av sporer, burde det vært undersøkt sporetall i bakteriekultur. Det kan også være andre faktorer i forbindelse med håndtering av bakterieisolat og kultur som kunne vært gjort annerledes.

4.2 Peptid og proteinnedbrytning

Innføringen av obligatorisk kjølelagring av melk, har ført til sjeldnere henting av melk fra gårdstank. Oppbevaringstiden av rå melk fra melking til varmebehandling har økt. Dette har ført til et selektivt miljø for psykotrofe bakterier (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Mange psykotrofe bakterier elimineres ved pasteurisering, men hydrolytiske enzymer produsert av slike bakterier kan fortsatt være aktive etter varmebehandling. Psykotrofe arter av *Bacillus*, *Pseudomonas* og *Paenibacillus* kan produsere slike hydrolytiske enzymer. *Bacillus* og *Paenibacillus* arter kan i tillegg danne sporer som kan overleve pasteurisering. Pasteurisingen kan også aktivere germinisering av sporer, slik at vegetative bakterier dannes, kan vokse og sekreere hydrolytiske enzymer i den kjølelagrede melken (Hang et al., 2016, Samaržija, 2012). Bakteriell proteolytisk nedbrytning av kasein, er en av de viktigste årsakene til nedsatt holdbarhet og kvalitetsforringing av melk. Søtkoagulering, bitterkoagulering og dannelse av bitre peptider er noen av kvalitetsfeilene som kan forekomme som når kaseiner i melk brytes ned (Jos & Huis in't Veld, 1996, Gopal et al., 2015).

Bacillus weihenstephanensis og *Pseudomonas* spp. inkludert i dette forsøket viste proteolytisk aktivitet ved både 8- og 15°C, ved at protein ble brutt ned. Det var spesielt β -CN A1, β -CN A2 og κ -CN som ble brutt ned. κ -CN dekker overflaten på kaseinmicellen og vender sin hydrofile, C-terminale ut om mysenserum (figur 1.1) (Daglish & Corredig, 2012). κ -CN er dermed mer utsatt for proteolyse enn de andre kaseiner som er inkorporert i kaseinmicellen. Ved proteolytisk nedbrytning av κ -CN, splittes glykomakropeptid fra κ -kasein slik at parakasein gjenstår på overflaten. Dette gir kaseinmicellene ustabile punkter og parakaseinmicellene vil aggregere ved å binde kalsium og danne et nettverk hvor fettglobuler og myse omslutes i porer som en gel (Walstra et al., 2006). Denne mekanismen utnyttes også ved osteproduksjon, hvor løpe tilsettes melken. Løpe består av de hydrolytiske enzymene kymosin og pepsin, som splitter glykomakropeptid fra κ -kasein. Mekanismen kalles søtkoagulering fordi melken koagulerer uten at pH senkes.

Når det gjelder β -CN er de hydrofobisk bundet inne i kaseinmicellen (figur 1.1). Men ved nedkjøling av melk, vil β -CN lekke ut av kaseinmicellen og ut i mysenserum (Daglish & Corredig, 2012). Når melken igjen varmes opp igjen vil β -CN gå tilbake inn i kaseinmicellen. UHT-melken benyttet i dette forsøket var kjølelagret, før forsøksstart. Dermed er det høyst sannsynlig av β -kasein har diassosiert fra kaseinmicellen til melkeserum. Dermed er β -kasein i disse melkeprøvene svært utsatt for proteolyse. Psykotrofe bakteriers preferanse for hydrolyse

av β -CN og κ -CN samsvarer med blant annet Gebre-Egziabher et. al. (1980) og Kumura et. al. (1998) sine funn som indikerer at psykotrofe *Pseudomonas* spp. foretrekker hydrolyse av κ -CN og β -CN.

I dette forsøket ser det ut som nedbrytningen av κ -CN hadde en sammenheng med sensoriske endringer i melken. Ved dag 7 (8°C) var melk inokulert med *Pseudomonas* sp. fortsatt homogen, med antydning av søt lukt. Her var κ -CN brutt ned til 40,28% av opprinnelig areal. Melk inokulert med *Pseudomonas fluorescens* hadde derimot koagulert og hadde mest sannsynlig ikke blitt konsumert av forbruker. Her var κ -CN brutt ned til 16,48% av opprinnelige areal. Melk inokulert med *B. weihenstephanensis* MC67 var fortsatt flytende ved dag 7 (8°C) men hadde noen små klumper som ble synlig etter risting av melkeprøvene. Dette gjaldt også for melk inokulert med *B. weihenstephanensis* 324, men her var det litt flere klumper og melken hadde noe kraftigere lukt. I disse melkeprøvene var κ -CN brutt ned til henholdsvis 79,04- og 38,70%. Større nedbrytning av κ -CN viste derfor større grad av koagulering og klumper i melk.

Nedbrytning av α_{S1} -CN var høyere for *Pseudomonas* stammene sammenlignet med *Bacillus weihenstephanensis*. Spesielt var forskjellen størst ved siste uttak av melk inkubert ved 8°C. Her gjenstod det kun 33,06- og 29,31% α_{S1} -CN i melk inokulert med henholdsvis *Pseudomonas* sp. og *Pseudomonas fluorescens*. Ved samme temperatur og uttaksdag gjenstod det 87,53- og 74,44% α_{S1} -CN i melk inokulert med *Bacillus weihenstephanensis* MC67 og *Bacillus weihenstephanensis* 324. Disse resultatene var interessante sammenlignet med nedbrytningen av κ -CN som hadde en større nedbrytning ved siste uttaksdag 15°C enn siste uttaksdag ved inkubering ved 8°C. Ett annet interessant funn var at når *Pseudomonas* stammene ble samkulturert ved 8°C var nedbrytningen av α_{S1} -CN lavere.

En typisk konsekvens av proteinnedbrytning forårsaket av *Pseudomonas fluorescens* er dannelsen av bitre peptider (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Leimieux & Simard (1992) hevder at bitre peptider dannes ved nedbrytning av kasein, hovedsakelig α_{S1} -CN. De beskriver også at egenskaper ved peptider som skaper bitter smak er grad av hydrofobisitet og enkle aminosyrer i amino enden. I tillegg inneholder α_{S1} -CN prolin, noe som også bidrar til bitter smak i peptider.

Pseudomonas arter produserer hovedsakelig sink-metalloproteinaser (Chen et al., 2003). Typisk er dette nøytrale proteinaser med optimum pH mellom 6,5-8. De er avhengig av zink i sitt aktive sete og stabiliseres av kalsium. *Bacillus* arter produserer også zink-metalloproteinaser, i tillegg til serin proteinaser (Hase & Finkelstein, 1993, Chen et al., 2003). Dette gir *Bacillus* artene større proteolytisk diversitet sammenlignet med *Pseudomonas* arter.

Bakterier inkludert i dette forsøket viste derimot en relativt lik preferanse for proteiner ved proteinnedbrytning. Ved 15°C er det ingen tydelige forskjeller mellom *Pseudomonas* spp. og *Bacillus weihenstephanensis* og deres evne til å bryte ned proteiner. Det er derfor vanskelig å trekke noen slutning vedrørende om samkultivering hadde noen effekt på enzymaktivitet og eventuelt hvilken bakterie som hadde redusert eller økt enzymaktivitet. Men selv om det totale bakterietallet var vesentlig høyere i melkeprøver inokulert med kun en bakterie art, var ikke nedbrytningen av kasein korrensponderende høyere. Nedbrytningen av kasein var noe høyere i samkultur, men mange av resultatene viste en ikke signifikante forskjeller mellom enkeltkultur og samkultur. Dette kan indikere at enzymaktiviteten i samkultur hemmes av andre bakterier, eller at enzymer mettes, eller mangel på nok sink til det aktive setet i sink-metalloproteinaser.

Tid var i denne oppgaven en faktor som påvirket nedbrytningen av kasein. For melk inkubert ved 15°C, startet proteinnedbrytningen ca. ved dag 2. I melk inkubert ved 8°C startet proteinnedbrytningen ca. ved dag 7. Dette kan ha en sammenheng med bakterieveksten og bakteriekonsentrasjonen i melken. Ved dag 2 (15°C) så det ut som at både *Bacillus* og *Pseudomonas* stammene var i sin log-fase. Ved dag 7 (8°C) så det ut til at *Bacillus* og *Pseudomonas* stammene er på slutten av sin log-fase. Ut ifra ulike akademiske kilder ser det ut til at det er en viss uenighet vedrørende når i vekstfasen psykotrofe bakterier produserer og skiller ut enzymer. Sørhaug & Stepaniak (1997) hevder at *Pseudomonas* spp. skilles ut ved slutten av stasjonærfasen, mens Rajmohan et al. (2002) fant at *Pseudomonas* sekreterer hydrolytiske enzymer i midten og i slutten av log-fasen. Det kan også være andre faktorer som regulerer enzymaktivitet, som for eksempel bakterietetthet og cellekommunikasjonsmekanismen quorum sensing.

Mange bakterier kommuniserer med hverandre ved bruk av quorum sensing (Miller & Bassler, 2001). Ved quorum sensing kan bakteriene synkront regulere gener i respons på bakterietettheten. Bakteriene produserer og sender ut kjemiske signalmolekyler (autoindusere) som andre bakterier oppfatter og responderer på. Når konsentrasjonen av autoindusere, og dermed også celletettheten, er høy nok vil bakteriene synkront skru på spesifikke gener. Noen av de fysiologiske aktivitetene som reguleres av quorum sensing er sporulering, symbiose, virulens, konkurranse, antibiotikaproduksjon og dannelse av biofilm. Enzymaktivitet kan også reguleres ved quorum sensing (Zhang & Dong, 2005).

Det kan tenkes at denne mekanismen også er aktiv i melk, siden de hydrolytiske enzymene sekreseres først når bakterietettheten er høy. Når celletettheten er lav vil enzymsekresjon fra bakteriene tilstede ikke være nok til å kunne hydrolysere melken. Med quorum sensing, blir det kommunisert mellom bakteriene når bakteriepopulasjonen er stor nok. Ved å skille ut autoindusere vil konsentrasjonen av signalmolekyler øke i takt med celletettheten. Når celletettheten blir høy nok vil bakteriene utrykke gener som koder for enzymene bakteriene kan sekresere. Enzymene vil syntetiseres og enzymaktiviteten starte. Både Gram-positive og Gram-negative bakterier benytter slik cellekommunikasjon (Miller & Bassler, 2001). Quorum sensing kan foregå mellom like og ulike arter av bakterier. *Pseudomonas* og *Bacillus* arter benytter slik cellekommunikasjon ved dannelse av biofilm (Rutherford & Bassler, 2012).

Toppene i kapillærelektroferogramene generert som resultater i denne oppgaven, ble skjønsmessig sammenlignet med tidligere identifiserte topper illustrert i kapillærelektroferogramet av Heck et. al. (2006). Ved høy grad av proteinnedbryning ble det produsert mange peptider og proteinfragment, samtidig som proteinene som skulle analyseres ble små ved slutten av inkuberingstiden. Dette gjorde det vanskelig å gjenkjenne proteinrestene, noe som kan ha ført til feilvurderinger ved analysearbeidet. Noen av resultatene viser også at kaseinene økte i størrelse, noe som er usannsynlig. Det kan dermed være noe usikkerhet knyttet til analysearbeidet og resultatene.

4.3 Kvantifisering av karbohydrat og organske syrer

Mange bakterier har metabolsk allsidighet, hvor de tilpasser seg miljøet ved å endre metabolismen (Tronsmo, 2016). *Bacillus weihenstephanensis* har fakultativ anaerob metabolisme (Lechner et al., 1998). Det vil si at de vokser ved tilstedeværelse av oksygen, men ved fravær av oksygen kan de gå over til anaerob metabolisme (Tronsmo, 2016). Ved anaerob metabolisme kan *Bacillus weihenstephanensis* produsere melkesyre ved nedbrytningen av pyruvat (Ramos, 2000). Dette kommer også frem av resultatene som kun viser innhold av melkesyre i melk inokulert med *Bacillus weihenstephanensis*. *Pseudomonas* spp. er aerobe og kan derfor ikke produsere melkesyre i melk. Ved analyse av melkesyre i dette forsøket så det ikke ut til at produksjonen av melkesyre ble påvirket av samkultivering. Mengden melkesyre produsert er svært lav og det er høyt standardavvik i verdiene. Dermed er det vanskelig å om metabolismen til *Bacillus weihenstephanensis* ble påvirket ved samkultivering. *Pseudomonas* spp. har aerob respirasjon hvor sitronsyresyklusen er sentral. α -ketoglutarat, fumarat, acetat og succinat er alle intermediære produkt i sitronsyresyklusen. Disse produktene vil degraderes og redannes kontinuerlig ved aerob respirasjon og selv om noen av produktene ikke ble detektert ved analysene betyr det ikke at *Pseudomonas* spp. ikke driver metabolisme, men at produktet ikke var tilstede akkurat da prøven ble tatt. Resultatene i dette forsøket viser derimot at α -ketoglutarat er lavere i prøver med *Pseudomonas* enn uten, noe som viser at *Pseudomonas* har drevet aerob respirasjon. I de samme prøvene ser en også at *Bacillus weihenstephanensis* har dannet galatose og melkesyre som følge av nedbrytningen av laktose. Det kan ikke vurderes hvor stor forskjellen er mellom enkeltkulturer og samkulturer, men både *Bacillus weihenstephanensis* og *Pseudomonas* spp. har drevet metabolisme i samkultur.

4.4 Produksjon av cereulid

Bacillus cereus sin evne til å produsere cytokinene Hbl, Nhe og CytK og det emetiske toksinet cereulid under vekst i matvarer, gjør bakterien til en viktig art relatert til matbåren sykdom (Arnesen et al., 2006).

Utbrudd av *Bacillus cereus* matbårne sykdommer har vært rapportert ved inntak av ris, pasta, krydder og fjærfe. Den emetiske forgiftningen har vært knyttet til inntak av stivelsesrike matvarer som ris, pasta, nudler og bakervarer mens diaretypen har vært knyttet til inntak av proteinrike matvarer, sauser, grønnsaker, pudding og melkeprodukter.

Mekanismene ved cereulid forgiftning er ikke helt avdekket, men det er antatt av den involverer en reseptor mediert mekanisme. Cereulid binder seg til en 5-HT₃ reseptor i duodenum. Dette stimulerer aksjonspotensiale gjennom vagusnerven noe som fører til oppkast. Denne redegjørelsen baserer seg på funn observert hos mus gjennom forsøk. Cereulid kan også føre til mer alvorlig forgiftning. Cereulid kan inhibere mitokondriene ved å inhibere fettsyresyntese. Dette har ført i leversvikt og det har vært dødsfall knyttet til slik matforgiftning. Folkehelseinstituttet ble i perioden 2006-2017 varslet om totalt 34 utbrudd av matbåren sykdom der toksiner fra *Bacillus cereus* var mistenkt årsak (Folkehelseinstituttet, 2015). Siden *Bacillus cereus* ikke er meldepliktig i Norge er det vanskelig å si noe om utbredelsen av denne typen matbåren sykdom i Norge.

Cereulid syntetiseres av cereulid syntetase via et ikke-ribosomal peptide syntetase kallt Ces (Marxen, 2015). Cereulid syntetase er en heterodimer, bestående av proteinene CesA og CesB (Alonzo, Magarvey & Schmeing, 2015). CesA og CesB består av moduler, hvor hver modul legger til en monomer på den voksende peptidkjeden som til slutt består av L-Val, L-HIV, D-Ala og D-HIC eller D-Hmp (Kroteń, Bartoszewicz & Świecicka, 2010). Peptidkjeden blir trimerisert og modent cereulid består av den trimeriserte peptidkjeden i ringform (Alonzo et al., 2015). Det er ikke fullstendig avdekket hvordan syntese av cereulid reguleres. Miljøfaktorer som tilgang på oksygen, pH, temperatur og tilstedeværelse av spesifikke aminosyrer har vært knyttet opp mot regulering av cereulidproduksjon.

I dette forsøket hadde temperaturen stor innvirkning på produksjon av cereulid. *Bacillus weihenstephanesis* 324 produserte 290,21 ng/mL cereulid ved dag 14 ved 8°C, og 282,74 ng/mL cereulid ved dag 5 ved 15°C. Produksjonen er altså raskere ved 15°C sammenlignet med ved 8°C. Dette kan ha en sammenheng med at veksthastigheten til *Bacillus weihenstephanesis* var høyere ved 15°C enn 8°C. I følge Arnesen et al., (2006) produseres cereulid ved slutten av log-

fasen og produksjonen er størst ved starten av stasjonær fasen. Mellom dag 2 og dag 5 hadde veksten av *Bacillus weihenstephanesis* 324 økt fra log 6,84 til 7,49 KDE/mL ved 15°C. Selv om det ikke ble tatt mikrobiologiske prøver ved dag 3 og 4 kan det antas at *Bacillus weihenstephanesis* 324 var i stasjonære-fasen ved dag 5. Mellom dag 7 og dag 14 hadde veksten av *Bacillus weihenstephanesis* 324 økt fra log 6,08 til 6,7 KDE/mL ved 8°C. Det er sannsynlig at også *Bacillus weihenstephanesis* 324 var i stasjonær fasen ved dag 14.

Ved 8°C dag 14 var bakterieveksten lavere enn ved dag 5 ved 15°C. Likevel var cereulidkonsentrasjonen høyere ved dag 5 i melk inkubert ved 15°C. Dette samsvarer med resultatene Finlay, Logan og Sutherland (2006) fikk da de observerte høyere *Bacillus cereus* produksjon av cereulid ved lavere temperaturer under vekst. I deres forskning var cereulidproduksjonen signifikant høyere ved 12-15°C enn ved 30°C under bakterievekst i skummet melk. Bakteriestammene i denne oppgaven ble kuldetilpasset i kjøleskap (4°C) før de ble inokulert i melk for vekstforsøk. Dette kan også ha påvirket cereulidproduksjonen (Thorsen et al., 2009).

Det ble detektert høye cereulidkonsentrasjoner i melkeprøver inokulert med *Bacillus weihenstephanesis* 324 ved både 8- og 15°C. Konsentrasjonen var vesentlig lavere i melkeprøver inokulert med den samme stammen og *Pseudomonas* sp. Det ble ikke detektert cereulid i andre melkeprøver med *Pseudomonas*. Som nevnt innledningsvis er cereulid et lite ringformet peptid. På grunn av *Pseudomonas* høye proteolytiske aktivitet kunne det tenkes at cereulid toksinet har blitt degradert av hydrolytiske proteinaser. På den andre siden har cereulid høy resistens mot proteolytiske enzymer. Det må dermed være andre årsaker til at produksjon av cereulid er svært lav eller ikke eksisterende når *Bacillus weihenstephanesis* 324 er samkultivert med *Pseudomonas*.

Som tidligere nevnt er det ikke fullstendig avdekket hvordan cereulid syntese reguleres. Siden ces-genene viser lav grad av heterogenitet, kan muligens cereulid produksjon være genregulert (Arnesen et al., 2008). Det er funnet at *Bacillus cereus* har en rekke quorum sensing systemer (Huillet & Gohar, 2016). Disse systemene regulerer sporulering, virulens og dannelsen av biofilm. Det er dermed sannsynlig at quorum sensing også er sentralt ved reguleringen av cereulid syntese.

4.5 Oppsummering og videre forskning

I denne studien viste resultatene at *Pseudomonas* spp. hadde høyere vekst enn *Bacillus weihenstephanesis* og *Paenibacillus lactis*. Forskjellen var størst ved den laveste lagringstemperaturen (8°C). Ved 8°C så det ut til at veksten til *Bacillus weihenstephanesis* MC67 ble hemmet ved samkultur med *Pseudomonas* spp. Eventuell hemming av proteolytisk aktivitet var vanskelig å analysere ved bruk av kapillærelektroferese. Siden bakteriene inkulvert i dette forsøket hadde preferanse for de samme kaseinene, kunne det ikke trekkes noen slutning om hvor vidt hvilken av bakteriene i samekultur som ble påvirket.

Melken i dette forsøket ble inokulert med like mengder bakterier ved start. Slik er det derimot ikke naturlig i melk. Forslag til videre forskning omhandlende samkultivering kan være å inokulere melk med ulike mengdeforhold av bakterier. For eksempel et lavere antall *Pseudomonas* spp. i forhold til *Bacillus* spp. Det kunne også vært hensiktsmessig å inkludere arter med ulik enzymaktivitet i samkultur. For eksempel en lipolytiskbakterie og en annen proteolytisk bakterie. På denne måten kunne eventuell hemming av enzymaktivitet lettere analyseres. Siden melken kjølelagres ved 4°C, kunne det også vært hensiktsmessig å utføre lignende forsøk ved lavere temperaturer enn benyttet i dette forsøket.

Referanser

- Adams, M. R. & Moss, M O. (2008). *Food microbiology*. Guildford, UK: RSC Publishing.
- Alonzo, D. A., Magarvey, N. A., Schmeing, M. T. (2015). Characterization of Cereulide Synthetase, a Toxin-Producing Macromolecular Machine. *PLOS ONE*. 10(16): e0128569.
- Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A., Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology reviews*. 32(4): 579-606.
- Barbano, D. M., Ma, Y., Santos, M. V. (2006). Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science*. 98: E15-E19.
- Bartoszewicz, M., Hansen, B. M., Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology*. 25(4): 588-596.
- Borch-Pedersen, K., Lindbäck, T., Madslie, E. H., Kidd, S. W., O'Sullivan, K., Granum, P. E., Aspholm, M. (2016). The Cooperative and Interdependent Roles of GerA, GerK, and Ynd in Germination of *Bacillus licheniformis* Spores. *Applied and environmental microbiology*. 82(14): 4279-4287.
- Buchanan, R. L., Bagi, L. K. (1998). Microbial competition: effect on *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 1 (5): 523-529.
- Bylund, G. (1995). *Dairy processing handbook*. Lund, Sverige: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Bækkelund, O. N. (2016). *Pseudomonas* isolert fra rå melk: Vekst og proteolytisk aktivitet i UHT-melk ved ulike temperaturer. NMBU, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.
- Capodifoglio, E., Vidal, A. M. C., Lima, J. A. S., Bortoletto, F., D'Abreu, L. F., Goncalves, A. C. S., Vaz, A. C. N., Balieiro, J. C., Netto, A. S. (2016). Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*. 99(7): 5214-5223.
- 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.
- 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): 1999.

Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food control*. 31(1): 251-262.

Dalgleish, D. G. (1998). Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities. *Journal of Dairy Science*. 81(11): 3013-3018.

Dalgleish, D. G., Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual review of food science and technology*. 3:449-67.

De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., Heyndrickx, M. (2011). Influence of Storage Conditions on the Growth of *Pseudomonas* Species in Refrigerated Raw Milk.

Dong, Y. H., Zhang, L. H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *The Journal of Microbiology*. 43: 101-109.

Doyle, C. J., Gleeson, D., O'Toole, P. W., Cotter, P. D. (2017). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Applied Environmental Microbiology*. 83(2): e02694-16.

Ellison 3rd, R. T., Giehl, T. J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of Clinical Investigation*. 88(4): 1080-1091.

Fadiloglu, S., Ekmen, O., Sekeroglu, G. (2004). Thermal and carbon dioxide inactivation of alkaline phosphatase in buffer and milk. *Food Technology and Biotechnology*. 42(1): 27-32.

Finlay, W. J., Logan, N. A., Sutherland, A. D. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Letters in applied microbiology*. 31(5): 385-389.

Folkehelseinstituttet. (2015). *Bacillus cereus* – infeksjoner – veileder for helsepresonell. Hentet fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/bacillus-cereus-matforgiftning/#forekomst-i-norge>

Gebre-Egziabher, A., Humbert, E. S., Blankenagel, G. (1980) Hydrolysis of Milk Proteins by Mikrobial Enzymes. *Journal of Food Protection*. 43 (9): 709-712.

Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial cell factories*. 15(1): 203.

Granum, P. E., Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*. 157(2): 223-228.

Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J.A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*. 21(9): 601-606.

- Goers, L., Freemont, P., Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*. 11(96): 20140065.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33(4): 301.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., Cotter, P. D. (2016). The Prevalence and control of Bacillus and Related Spore Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*. 6(308): 1418.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hang, F., Liu, P., Wang, Q., Han, J., Wu, Z., Gao, C., Liu, Z., Zhang, H., Chen, W. (2016). High Milk-Clotting Activity Expressed by the Newly Isolated *Paenibacillus* spp. Strain BD3526. *Molecules*. 21(1): 73.
- Häse, C. C., Finkelstein, R. A. (1993). Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiological Reviews*. 57(4): 823-837.
- Heck, J., Olieman, C., Schennink, A., Van Valenberg, H., Visker, M., Meuldijk, R. & Van Hooijdonk, A. (2008). Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*. 18(5): 548-555.
- Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11(2-3): 148-153.
- Huck, J. R., Hammond B. H., Murphy S. C., Woodcock N. H., Boor, K. J. (2007). Tracking Spore forming Bacterial Contaminants in Milk-Processing Systems. *Journal of Dairy Science*. 90(10): 4872-4883.
- Huillet, E., Tempelaars, M. H., Andre-Leroux, G., Wanapaisan, P., Bridoux, L., Makhzamin, S., Panbangred, W., Martin-Verstraete, I., Abee, T., Lereclus, D (2012). PlcRa, a New Quorum-Sensing Regulator from *Bacillus cereus*, Plays a Role in Oxidative Stress Responses and Cysteine Metabolism in Stationary Phase. *PLOS ONE*. 7(12): e51047.
- Júnior, J. C. R., Alcântara, B. K & Beloti, V. (2006). Spoilage potential of *Paenibacillus* sp. in Brazilian raw milk. *Ciência Rural, Santa Maria*. 46(4): 637-640.
- Kajimura, Y., Kaneda, M. (1997). Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 50(3): 220-228.

Kroteń M. A., Bartoszewicz, M., Świecicka, I. Cereulide and Valinomycin, Two Important Natural Dodecadeptideptides with Ionophoretic Activities. *Polish Journal of Microbiology*. 59(1): 3-10.

Kumura, H., Mikawa, K., Saito, Z. (1993). Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* no-33. *Journal of dairy research*. 60(2): 229-237.

Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Prüß, B. M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart G. S. A. B., Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. Is a new psychotolerant species in the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 1373-1382.

Legemiddelhåndboka.no : <http://m.legemiddelhandboka.no/generelle/31100>

Lucey, J. A. (2015). Raw Milk Consumption. Risks and Benefits. *Nutrition Today*. 50(4): 189-193

Marxen, S., Stark, T. D., Rüttschle, A., Lücking, G., Frenzel, E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Hofmann, T. (2015). Depsipeptide Intermediates Interrogate Proposed Biosynthesis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific Reports*. 5: 10637.

Mattilsynet (2017). Nasjonale retningslinjer for hygiene i meieriindustrien. Hentet fra: https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/melk_og_meieriprodukter/nasjonale_retningslinjer_for_hygiene_i_meieriindustrien.28840/binary/Nasjonale%20retningslinjer%20for%20hygiene%20i%20meieriindustrien.

Mellegård, H. (2015). Prosjektbeskrivelse: Bakteriefloaen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom. Hentet fra: <http://www.kore.no/bakteriefloaen-og-dens-dynamikk-i-norsk-melk-og-melkeprodukter-potensiale-for-forringelse-og-sykdom/>

Mestawet, T. A., Girma, A., Ådnøy, T., Devold, T. G., Narvhus, J. A. & Vegarud, G. E. (2014). New insights in goat breeds of Ethiopia: High content of α s1-CN and its association with coagulation properties, whey syneresis and micelle size. *Small Ruminant Research*. 119 (1-3): 146-155.

Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 55: 165-199.

Muir, D. D., Kelly, M. E., Phillips, J. D. (1978). The effect of storage temperature on bacterial growth and lipolysis in raw milk. *International Journal of Dairy Technology*. 31(4) 203-208.

Noble R. W., Waugh, D. F. (1965). Casein micelles. Formation and structure. 1. *Journal of the American Chemical Society*. 8(10): 2236-2245.

Noble R. W., Waugh, D. F. (1965). Casein micelles. Formation and structure. 2. *Journal of the American Chemical Society*. 87(10): 2246-2257.

O'Connell, A., Ruegg, P. L., Jordan, K., O'Brien, B., Gleeson, D. (2016). The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *American Dairy Science Association*. 99: 3367-3374.

Ouertani, A., Chaabouni, I., Mosbah, A., Long, J., Barkat, M., Mansuelle, P., Mghirbi, O., Najjari, A., Ouzari, H., Masmoudi, A. S., Maresca, M., Ortet, P., Gignes, D., Mabrouk, K., Cherif, A. (2018). Two New Secreted Proteases Generate a Casein-Derived Antimicrobial Peptide in *Bacillus cereus* Food Born Isolate Leading to Bacterial Competition in Milk. *Frontiers in Microbiology* 9: 1148.

Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 27(1): 201-212

Price, R. J., Lee, J. S. (1970). Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing *Lactobacilli*. *Journal of Milk and Food Technology*. 33(1): 13-18.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, P., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*. 37(5): 664-698.

Rajmohan, S., Dodd, C. E. R., Waites, W. M. (2002). Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*. 93(2): 205-213.

Ramos, H. C., Hoffman, T., Marino, M., Nedjari, H., Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., Jahn, D. (2000). Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. *Journal of Bacteriology*. 182 (11): 3072-3080.

Ranieri, M. L., Ivy, R. A., Mitchell, W. R., Call, E., Masiello, S. N., Wiedermann, M., Boor, K. J. (2012). Real-Time PCR Detection of *Paenibacillus* spp. in Raw Milk to Predict Shelf-Life Performance of Pasteurized Fluid Milk Products. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(16): 5855-5863.

Rutherford, S. T., Bassler, B. L. (2012). Bacterial Quorum sensing: Its role in Virulence and Possibilities for its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2(11): a012427.

Samaržija, D., Zamberlin, Š. & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2): 77-95

Scheldeman, P., Goossens K., Rodriguez-Diaz, M., Pil, A., Goris, J., Herman, L., De Vos, P., Logan, N.A., Heyndrickx, M. (2004). *Paenibacillus lactis* sp. Nov., isolated from raw and

heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 (3): 885-91.

Setlow, P. (1994). Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 76(23): 49-60.

Soufiane, B & Côté J-C. (2013). *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 341(2): 127-137.

Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Fischer, L., Hinrichs, J. (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*. 59: 20-28.

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.

Tan, I. S., Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*. 6(3): 212-225.

Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Granum, P. E., Rombouts, F. M. (1997). Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*. 34(3): 307-318.

Thorsen, L., Bjørn Budde, B., Henrichsen, L., Martinussen, T., Jakobsen, M. (2009). Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation condition. *International Journal of Food Microbiology*. 134(1-2): 133-139.

TINE. (u.d.). TINE distribusjonssalg. Hentet fra: <https://www.tine.no/tine-distribusjon>

Trmčić, A., Martin, N. H., Boor, M., Wiedmann, M. (2015). A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage. *Journal of Dairy Science*. 98(8): 5806-5817.

Trondsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. Universitetsforlaget, Oslo, Norge.

Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M & Geurts, T. J. (2006). *Dairy science and technology, Second edition*. Boca Raton, FL, USA.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2014). *Molecular biology of the gene*. USA: Person education.

Waugh, D. F., Creamer, L. K., Slattery, C. W. (1970) Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*. 9(4):786-795.

Wei, H. L., Zhang, L. Q. (2006). Quorum-sensing systems influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antoine van Leeuwenhoek*. 89(2): 267-280.

Yuan, L., Sadiq, F. A., Liu, T., Flint, S., Chen, J., Yang, H., Gu, J., Zhang, G., He, G. (2017). Psychotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk. *LWT-Food Science and Technology*. 84: 409-418.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway