



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Bakterier fra juret til kyr– vekst og metabolisme i melk hos utvalgte isolater av melkesyrebakterier og patogener

Bacteria from bovine udder – growth and
metabolism in milk of selected isolates of lactic acid
bacteria and pathogens

Martine Hagenes

Matvitenskap – produksjon og utvikling av næringsmidler

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført våren 2019, og er skrevet ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven er en del av prosjekt «Jurfrisk», og alt laboratoriearbeid i forbindelse med oppgaven har blitt gjennomført hos NMBU sin forskningsgruppe for meieriteknologi og matkvalitet. Masteroppgaven er mitt avsluttende arbeid i min mastergrad i matvitenskap med retning produksjon og utvikling av næringsmidler. Oppgaven har gitt meg mye læringsutbytte, og gitt meg god innføring i planlegging og gjennomføring av et selvstendig forskningsarbeid.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder professor Judith Narvhus for god veiledning i forbindelse med både laboratoriearbeid og oppgaveskriving. Jeg ønsker også å takke mine biveiledere postdoktor Roger Meisdal og postdoktor Davide Porcellato for deltagelse på møter og gode tips underveis.

Når det gjelder den praktiske gjennomføringen av laboratoriearbeid vil jeg rette en spesiell takk til ingeniør May Aalberg, avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani og overingeniør Kari Olsen for god veiledning underveis, og ikke minst masse godt humør på laboratoriet.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Ås, 14. mai 2019

Martine Hagenes

Sammendrag

Det har lenge vært en oppfatning at juret hos friske kyr ikke innehar noen egen mikrobiota. For å undersøke dette ble det NFR-finansierte prosjektet «Jurfrisk» opprettet ved NMBU, og et av målene for prosjektet har vært å dyrke bakterier fra jurmikrobiota, og undersøke deres metabolisme i melk. I prosjekt «Jurfrisk» ble det isolert mange bakteriearter samt mange stammer innen samme art. I denne masteroppgaven ble utvalgte stammer av melkesyrebakterier og patogener assosiert med mastitt inokulert i melk, og produksjonen av metabolitter ble undersøkt ved benyttelse av kromatografiske teknikker i form av High Performance Liquid Chromatography og Headspace Gas Chromatography. I tillegg ble pH målt i melkeprøvene og sammenliknet med kontrollprøver med ren UHT-melk.

Bakteriene som ble undersøkt for produksjon av metabolitter var: *Lactococcus garvieae*, *Lc. lactis*, *Lc. raffinolactis*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus epidermidis*, *St. chromogenes* og *Streptococcus uberis*.

Resultatene viste at de beste syreprodusentene var en stamme av *Lc. lactis* og en stamme av *Lb. paracasei*. Produksjonen av aromakomponenter varierte mye mellom de ulike melkesyrebakteriene, og en del av resultatene kunne tilknyttes tidligere forskning. Bakterier assosiert med mastittinfeksjon vokste alle bra i melk ($\log 1-2 \text{ CFU ml}^{-1}$), men hadde generelt en lav produksjon av melkesyre og aromakomponenter. Dette tyder på at bakteriene benytter seg av aerob respirasjon fremfor fermentering ved vekst i melk. Noen av bakteriene hadde relativt høy produksjon av acetaldehyd, og dette kunne knyttes til tidligere forskning på stammene.

Denne masteroppgaven har vist at alle de undersøkte bakteriene vokste i melk i større eller mindre grad. For videre forskning vil det være interessant å undersøke metabolismen til flere stammer fra samme art for sammenlikning, samt benytte lenger inkuberingstid og flere inkuberingstemperaturer.

Abstract

For a long time, it has been a perception that the bovine udder does not contain its own microbiota. In order to investigate this, the NRF-funded project «Jurfrisk» was established at NMBU, and one of the aims was to cultivate bacteria from the bovine udder and study their metabolism in milk. In project «Jurfrisk», a lot of bacteria species as well as many strains from the same species, were isolated. In this master thesis, selected lactic acid bacteria and pathogens associated with mastitis, were inoculated in milk, and production of their metabolites were analysed by the use of the chromatographic methods High Performance Liquid Chromatography and Headspace Gas Chromatography. In addition, pH was measured in the samples of milk and compared with control samples of uninoculated milk.

The bacteria analysed for production of metabolites were: *Lactococcus garvieae*, *Lc. lactis*, *Lc. raffinolactis*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus epidermidis*, *St. chromogenes* and *Streptococcus uberis*.

The results showed that the best acid producers were one of the strains of *Lc. lactis* and a strain of *Lb. paracasei*. The production of aromatic components varied considerably between the different lactic acid bacteria, and these results could partly be explained by previous research. The bacteria associated with mastitis infection all grew very well in milk ($\log 1-2 \text{ CFU ml}^{-1}$), but had a generally low production of lactic acid and aromatic components. This indicates that the bacteria benefit from aerobic respiration above fermentation when grown in milk. Some of the bacteria had a relatively high production of acetaldehyde, and this was confirmed by previous studies.

This master thesis has shown that all the examined bacteria grew in milk to a greater or lesser extent. For further research it would be interesting to examine the metabolism of more strains from the same species, and include longer periods of incubation in milk and at several temperatures.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	iii
Abstract	v
1.0 Innledning	1
2.0 Litteratur	2
2.1 Melkens sammensetning	2
2.2 Melk som vekstmedium for bakterier	3
2.3 Melkesyrebakterier	4
2.3.1 Homofermentativ fermentering	5
2.3.2 Heterofermentativ fermentering	8
2.3.3 Sitratmetabolisme	9
2.3.4 Metabolisme av proteiner	11
2.3.5 Metabolisme av fett	15
2.4 Ønskede bakterier i melk	16
2.4.1 <i>Lactococcus</i> spp.	16
2.4.2 <i>Lactobacillus</i> spp.	17
2.5 Uønskede bakterier i melk	19
2.5.1 <i>Pediococcus</i> spp.	19
2.5.2 <i>Aerococcus</i> spp.	20
2.5.3 <i>Enterococcus</i> spp.	21
2.5.4 <i>Staphylococcus</i> spp.	22
2.5.5 <i>Streptococcus</i> spp.	23
2.6 Jurets anatomi	25
2.7 Mastitt	26
2.8 Jurets mikrobiota	30

3.0 Materialer og metoder -----	32
3.1 Innledende forsøk -----	32
3.1.1 Oppdyrking av stamme -----	32
3.1.2 Kontroll av renhet -----	34
3.1.3 Opparbeidelse av prøvemateriale -----	35
3.1.4 Undersøkelse av bakteriecelletall i nedfrosne kulturer -----	36
3.2 Hovedforsøk -----	36
3.2.1 Poding i melk -----	36
3.2.2 Analysering av metabolitter ved vekst i melk -----	37
3.2.2.1 HSGC -----	37
3.2.2.2 HPLC -----	38
3.2.2.3 pH -----	39
4.0 Resultater -----	40
4.1 Forforsøk -----	40
4.1.1 Vekst i buljong -----	40
4.1.2 Kontroll av renhet -----	41
4.1.3 Undersøkelse av celletall -----	41
4.2 Metabolisme i melk for utvalgte bakterier -----	42
4.2.1 Laktokokker -----	43
4.2.2 Laktobasiller -----	50
4.2.3 Potensielle mastittpatogener -----	57
5.0 Diskusjon -----	65
5.1 Forforsøk -----	65
5.2 Hovedforsøk -----	66
5.2.1 Ønskede bakterier i melk -----	66
5.2.1.1 Lactococcus spp. -----	66
5.2.1.2 Lactobacillus spp. -----	69

5.2.2 Potensielle mastittpatogener-----	71
5.2.2.1 Aerococcus viridans-----	71
5.2.2.2 Enterococcus faecalis -----	72
5.2.2.3 Pediococcus pentosaceus -----	73
5.2.2.4 Staphylococcus spp.-----	74
5.2.2.5 Streptococcus uberis -----	75
6.0 Konklusjon -----	77
7.0 Videre arbeid -----	78
8.0 Referanser -----	80
8.1 Tekst-----	80
8.2 Figurer -----	84

Rådata til for alle forsøk samt utregnede gjennomsnitt og standardavvik ligger vedlagt på minnepinne.

1.0 Innledning

Det har lenge vært en oppfatning at juret hos friske kyr er sterilt og ikke innehar noen egen mikrobiota. I de siste årene har det vært mye forskning på mikrobiota i nisjer av menneskekroppen som har vært oppfattet som sterile når individet er friskt. Forskningen viser nå at disse nisjene av menneskekroppen innehar en egen mikrobiota når individet er friskt. Dette gir grunnlag for å tro at det samme gjelder for dyr, og det er av spesiell interesse å undersøke om juret innehar en slik spesialisert mikrobiota hos friske kyr.

Når en ku infiseres med mastittbakterier blir den gjerne behandlet med antibiotika, men dersom juret innehar en egen mikrobiota, er et naturlig at denne også vil påvirkes av behandlingen. Spesialisert mikrobiota fungerer gjerne som en forsvarsmekanisme for kroppen, og når denne blir redusert av antibiotikabehandling, er det ikke usannsynlig at kua blir mer utsatt for sykdommer senere. Melk fra ku med mastitt kan ikke benyttes til matproduksjon både av matteknologiske grunner, redusert mattrygghet, samt mulig tilstedeværelse av antibiotika.

Prosjekt «Jurfrisk» er et forskningsprosjekt ved NMBU der det overordnede målet er å redusere bruk av antibiotika ved mastittinfeksjon, forbedre dyrevelferd, forbedre melkekvalitet og redusere tap av melk. Målene skal nås ved å øke kunnskapen om jurmikrobiota hos norske kyr. I prosjektet vil jurmikrobiota karakteriseres ved hjelp av de nyeste molekylære teknikkene. Foreløpig har det blitt funnet flere tusen stammer isolert fra 60 tilsynelatende friske kyr. Et av de underordnede målene i prosjektet er å dyrke bakterier isolert fra jurmikrobiota i melk og undersøke deres metabolisme. Undersøkelse av metabolismen til bakterier fra jurmikrobiota vil gi en innsikt i hvilke endringer som skjer i melk hos friske kyr. Melkesyrebakterier (MSB) isolert fra juret vil i tillegg fungere som en mulig kilde til nye starterkulturer for meieriprodukter.

Denne masteroppgaven er en del av prosjekt «Jurfrisk», og vil omhandle metabolisme i melk av utvalgte stammer fra jurmikrobiota. I utgangspunktet var det ønskelig å undersøke metabolismen til MSB, men da det ble isolert bare noen få stammer av MSB, ble det også valgt å inkludere et utvalg patogene bakterier og undersøke deres evne til å vokse i melk. For de patogene stammene ble det valgt ut de som hadde vært tilstede i et stort antall i opprinnelige prøver.

2.0 Litteratur

2.1 Melkens sammensetning

Melk kan defineres som sekresjonsproduktet fra melkekjertlene til pattedyr. Primært produseres melk som næringskilde til avkom, men mennesker benytter melk fra pattedyr som ku, buffalo, geit og sau til eget kosthold. Melk benyttes både som et rent produkt og som en ingrediens til meieriprodukter (Walstra et. al., 2016).

Melken er et flytende hvitt produkt sammensatt av vann, laktose, fett, proteiner, mineraler, organiske syrer og diverse sporstoffer. Den kjemiske sammensetningen av melken bestemmer i stor grad hvilke kjemiske reaksjoner som foregår i melken, næringsmessig verdi, smak og vekstvilkår for mikroorganismer. Laktose er et disakkarid satt sammen av glukose og galaktose, og står for hovedmengden av karbohydrater i melk. Fettet i melken består hovedsakelig av triglyserider, men også fosfolipider, kolesterol, monoglycider, diglycider og frie fettsyrer vil være tilstede i melk (Walstra et. al., 2016).

Melkens proteiner består av både kaseiner og myseproteiner, men kaseiner utgjør hovedvekten av proteinene og deles inn i α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein og κ -kasein. Myseproteiner utgjør omtrent en femtedel av proteinene i melk, og hovedproteinene for denne gruppen er β -lactoglobulin. Myseproteinene inkluderer også α -lactalbumin, serum albumin, immunoglobulin, proteose pepton og lactoferrin. De organiske syrene i melk er stort sett tilstede som ioner eller salter, og sitrat er et eksempel på dette. Melk inneholder i hovedsak mineralene kalium, natrium, kalsium, magnesium, klor og fosfat. Tabell 1 viser prosentvis gjennomsnittlig innhold av de ulike komponentene i melk (Walstra et. al., 2016).

Tabell 1: Sammensetning av melk (Walstra et. al., 2016).

Komponent	Gj. snitt. innhold (%)
Vann	87,1
Laktose	4,6
Fett	4,0
Protein	3,3
Kasein	2,6
Mineraler	0,7
Organiske syrer	0,17
Sporstoffer	0,15

Tabell 1 viser at utenom vann består melk i hovedsak av laktose, fett og protein.

2.2 Melk som vekstmedium for bakterier

Melk er et næringsmiddel som inneholder mye av de grunnleggende næringsstoffene for vekst, og det er derfor mange mikroorganismer som trives i melk. Melk har høy vannaktivitet og nøytral pH, hvilket gir et godt utgangspunkt for mange mikroorganismer. Det er veldig sjeldent at miljøet i melken er så dårlig at mikroorganismer dør. Likevel står laktose for hovedvekten av karbohydratene i melk, og ikke alle mikroorganismer har muligheten til å metabolisere laktose (Walstra et. al., 2016).

Enkelte enzymesystemer og immunoglobuliner kan ha en antibakteriell virkning, og dette vil også bidra til å hemme vekst av enkelte bakterier. Immunoglobuliner fungerer som antistoffer mot spesifikke antigener, og disse kan fungere mot spesifikke stammer melken ofte infiseres av. Det har blant annet blitt funnet slike antigener mot *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus* og *Lactococcus lactis*. Det finnes i tillegg ikke-spesifikke inhibitorer som lysozymer og lactoferrin. Lysozymer vil hydrolysere peptidoglukan i bakterienes cellevegg, mens lactoferrin gjør jern utilgjengelig for bakteriene ved å binde seg til jernioner. Den aller viktigste ikke-spesifikke inhibitoren i melk er nedbrytningsproduktene i enzymesystemet til lactoperoxidase. (Walstra et. al., 2016).

Når MSB vokser i melk vil de fleste ha evnen til å metabolisere laktose og produsere melkesyre. Melkesyre vil fungere som en inhibitor mot andre bakterier i melken ved å senke pH. I tillegg produserer enkelte MSB antimikrobielle komponenter. Nisin er et eksempel på dette og denne komponenten produseres av blant annet *Lc. lactis* (Walstra et. al., 2016).

Melk kan inneholde mye oksygen og vekstmiljøet er derfor ikke optimalt for obligat anaerobe bakterier. I tillegg inneholder melk lite jern, hvilket er essensielt for vekst for en rekke mikroorganismer. Mange bakterier vil bruke tid på å venne seg til miljøet i melken, og må omstille sitt enzymsystem for at det skal kunne benyttes til nedbrytning av næringsstoffer i melk. Lite vekst etter tilsetning av bakterier til melk trenger altså ikke å være et bevis på at de ikke vokser i melk (Walstra et. al., 2016).

2.3 Melkesyrebakterier

MSB er en gruppe bakterier som klarer å metabolisere karbohydrater til melkesyre. Navnet på gruppen relaterer ikke til en spesifikk fylogenetisk klasse av organismer, og fellestrekket mellom bakteriene er hovedsakelig metabolismen. MSB er Gram-positive, mikroaerofile, syretolerante, ikke-sporulerende og stort sett katalasenegative. Bakteriene forekommer som kokker eller staver. MSB har blitt isolert fra mange ulike habitater, blant annet planteprodukter, meieriprodukter, grønnsaker og i kjøtt. Det finnes også MSB i ulike nisjer av menneskekroppen og andre pattedyr, og dette inkluderer respirasjonssystemet, gastrointestinalveien, orale hulrom og vaginale hulrom (Sun et. al., 2014).

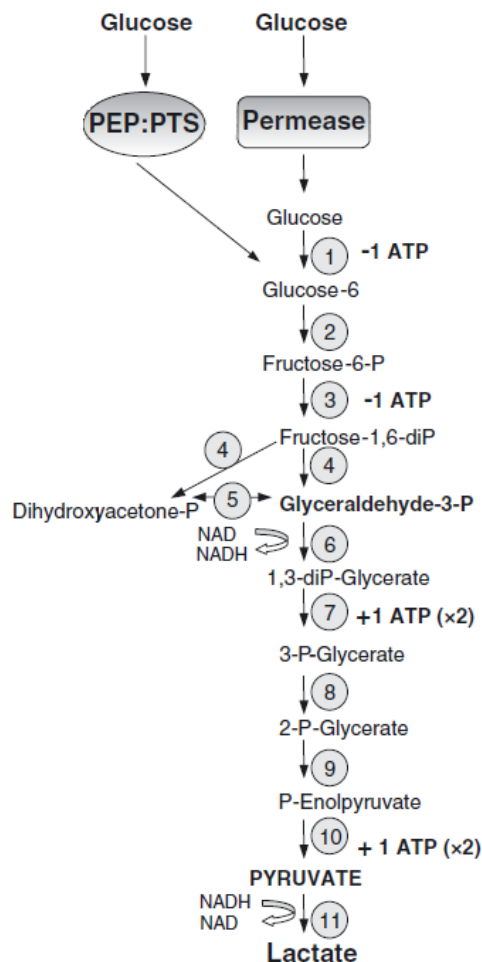
MSB benyttes mye til industrielle fermenteringsprosesser, og benyttes til produksjon av en rekke matvarer. I meieriindustrien benyttes de blant annet til industriell produksjon av yoghurt, kulturmilk, ost og rømme. Enkelte MSB som har blitt isolert fra gastrointestinalveien hos mennesker, sies å være probiotiske og ha en positiv innvirkning på menneskelig helse (Sun et. al., 2014)

Gruppen MSB består av omtrent 20 slekter, men fra et matteknologisk perspektiv regnes følgende MSB som de viktigste: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* og *Weisella*. *Bifidobacterium* er fenotypisk svært ulik mange MSB, men har mange liknende egenskaper som MSB, og blir derfor ofte sett på som en unik type MSB. Det er flere måter å klassifisere MSB, og det er ofte basert på

morfologi, glukosefermentering, toleranse mot sure og basiske miljøer, toleranse mot høye saltkonsentrasjoner, samt hvilke temperaturer stammene vokser ved (Axelsson, 2004).

2.3.1 Homofermentativ fermentering

Bakterier med homofermentativ metabolisme fermenterer sukker via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) veien, også kalt glykolyse. Glukose vil i løpet av EMP omdannes til pyruvat, som vil omdannes videre til melkesyre ved hjelp av enzymet laktat dehydrogenase (LDH). Stereospesifikke NAD-avhengige enzymer vil kunne produsere både L-melkesyre og D-melkesyre, og hvilken type som produseres vil variere mellom ulike bakterier. MSB som har en homofermentativ metabolisme er blant annet *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* og noen *Lactobacillus*. Enzymer til produksjon av både L- og D-isomeren av melkesyre blir ofte funnet i laktobasiller (Mayo, et. al., 2010). For nærmere beskrivelse av de ulike komponentene i EMP samt enzymer involvert henvises det til figur 1.



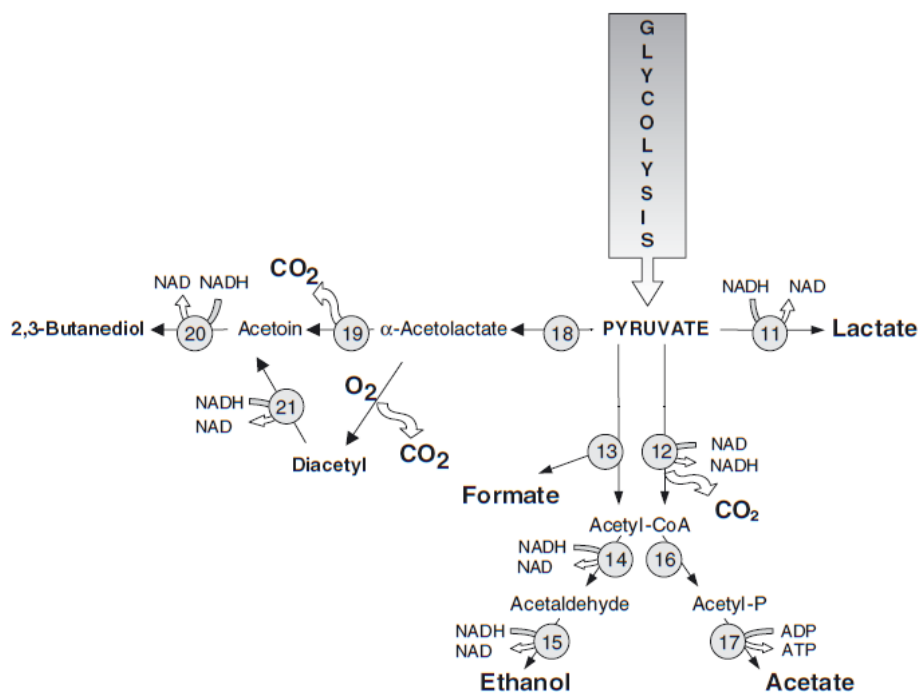
Figur 1. Homofermentativ metabolisme via EMP. Reaksjonene katalyseres av følgende enzymer: 1. GLK= glukokinase, 2. GPI= glukose-fosfat isomerase, 3. PFK= fosfofruktokinase, 4. FBPA= fruktose-bifosfat aldolase, 5. TPI= triose-fosfat isomerase, 6. GAPDH= gleceraldehyd-fosfat dehydrogenase. 7. PGK= fosfoglycerat kinase, 8. PMG= fosfoglycerat mutase, 9. ENO= enolase, 10. PK= pyruvat kinase, 11. LDH= laktat dehydrogenase (Mayo et. al., 2010).

I tilfeller der det er lite karbon tilstede eller overskudd av sukker med treg nedbrytning, vil den homofermentative metabolismen også kunne produsere flere produkter enn melkesyre. I denne typen homofermentering vil det i tillegg til melkesyre produseres maursyre, eddiksyre, etanol og/eller CO₂. Denne typen metabolisme hos homofermentative bakterier kalles blandet syremetabolisme og er en alternativ nedbrytning av pyruvat (Mayo et. al., 2010).

Det er fortsatt usikkerhet rundt hva som gjør at bakterier skifter over til blandet syremetabolisme, men det har blitt assosiert med den intracellulære konsentrasjonen av fruktose-1,6-bifosfat (FBP). FBP aktiverer både enzymene laktat dehydrogenase (LDH) og pyruvat kinase (PK) samt komponentene glyceralddehyd-3-fosfat (GAP) og dihydroxyaceton-fosfat (DHAP). Aktivering av disse komponentene og enzymene

medfører inaktivering av enzymet pyruvat format lyase (PFL), som er det enzymet som omdanner pyruvat til acetyl-CoA, som videre vil omdannes til komponentene acetaldehyd, etanol og acetat. Ikke-organisk fosfat har også vist seg å være en viktig inhibitor for LDH og PFL (Mayo et. al., 2010).

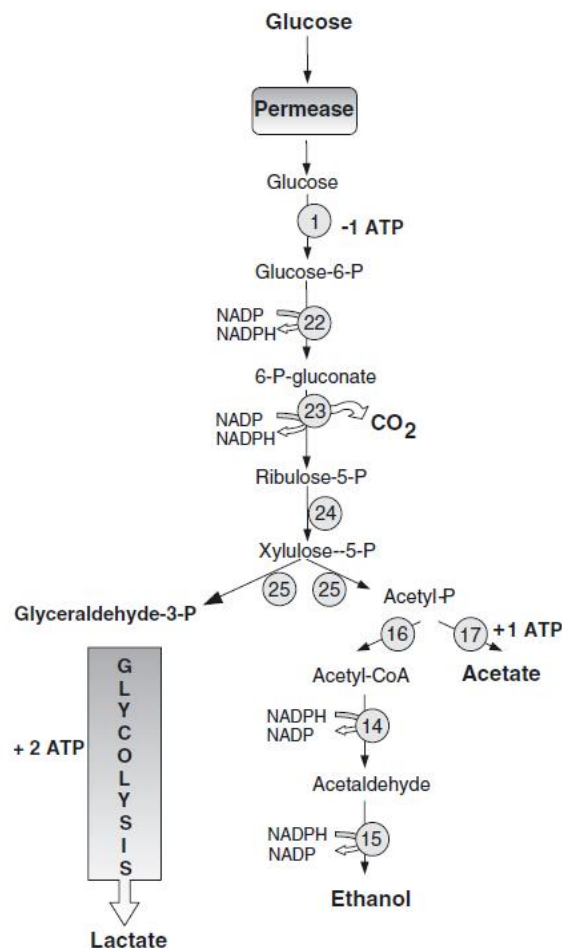
En studie på *Lc. lactis* (Even et. al., 1999) indikerer at redokspotensialet for NADH/NAD⁺ vil ha en innvirkning på metabolismen, mens Koebmann et. al. (2005) har vist at PK kontrollerer produksjonen av format og acetat, og er dermed med på å påvirke skiftet mellom homofermentativ metabolisme og blandet syremetabolisme. Blandet syremetabolisme og enzymene involvert i prosessen er vist i figur 2.



Figur 2. Blandet syremetabolisme for homofermentative bakterier. Reaksjonene katalyseres av følgende enzymer: 11. LDH= laktat dehydrogenase, 12. PDH= pyruvat dehydrogenase, 13. PFL= pyruvat format lyase, 14. ACDH= acetaldehyd dehydrogenase, 15. ADHE= alkohol dehydrogenase, 16. PTA= fosfotransacetylase, 17. ACK= acetat kinase, 18. ALS= α -acetolaktat syntase, 19. ALD= α -acetolaktat dekarboksylase, 20. BDH= 2,3-butandiol dehydrogenase, 21. DR= diacetyl reduktase (Mayo et. al., 2010).

2.3.2 Heterofermentativ fermentering

Bakterier med heterofermentativ metabolisme fermenterer sukkerer hovedsakelig via fosfoketolaseveien (PKP). Bakteriene har evnen til å bryte ned både heksosar (glukose, fruktose, mannose) og pentosar (xylose, ribose) i sin metabolisme. Pentosene kan omdannes til pyruvat og acetyl-P, som videre kan omdannes til melkesyre og eddiksyre. Heksosar kan konverteres til både melkesyre, CO₂ og etanol. MSB som har en heterofermentativ metabolisme er blant annet *Leuconostoc*, *Oenococcus* og noen *Lactobacillus* (Mayo et. al., 2010). For nærmere beskrivelse av fermentering via PKP samt aktive enzymer, henvises det til figur 3.



Figur 3. Heterofermentativ metabolisme via PKP. Reaksjonene katalyseres av følgende enzymer: 1. GLK= glukokinase, 14. ACDH= acetaldehyd dehydrogenase, 15. ADHE= alkohol dehydrogenase, 16. PTA= fosfotransacetylase, 17. ACK= acetat kinase, 22. G6PDH= glukose-6-P dehydrogenase, 23. 6PGHD= 6-P-glukonat dehydrogenase, 24. RPPE= ribulose-5-P-3-epimerase, 25. XPK= D-xylose-5P fosfoketolase (Mayo et. al., 2010).

Figur 3 viser at CO₂ allerede blir produsert når 6-P-glukonat degraderes til ribulose-5-P. Reaksjonen der xylose-5P gjøres om til GAP og acetyl-P katalyseres av enzymet XPK. Acetyl-P omgjøres til etanol og eddiksyre, mens GAP følger EMP-veien og omgjøres til melkesyre (Mayo et. al., 2010).

Enkelte MSB innen slektene *Oenococcus* og *Lactobacillus* har vist seg å kunne bryte ned karbohydrater både via PKP og EMP (Mayo et. al., 2010).

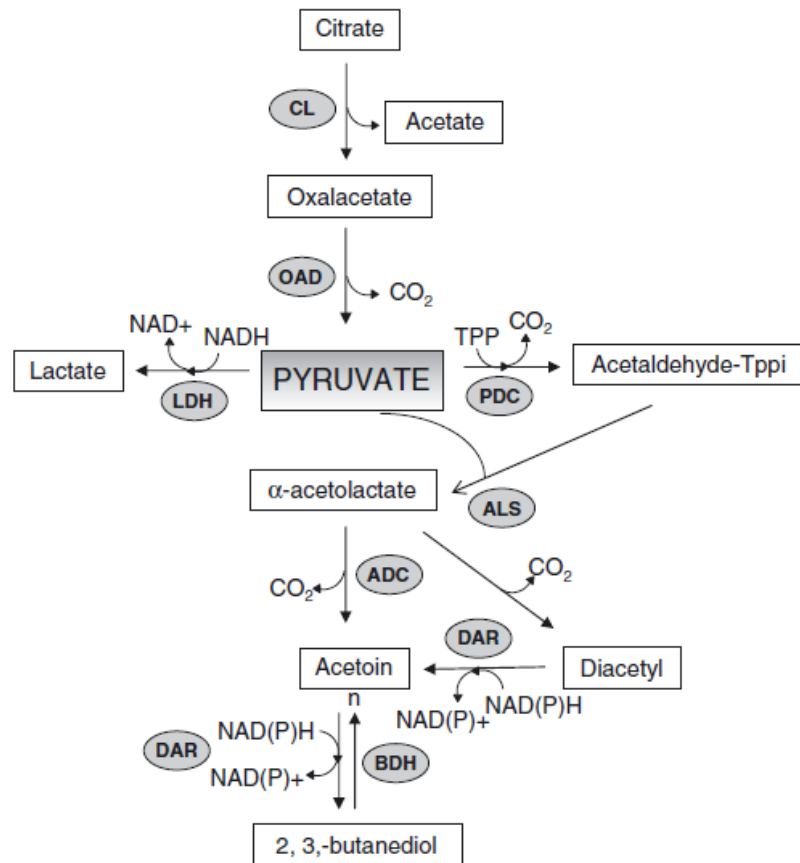
2.3.3 Sitratmetabolisme

Bakterier med sitratmetabolisme har evnen til å transportere sitrat inn i cellen og nedbryte det. Metabolisme av sitrat vil medføre produksjon av aromatiske flyktige komponenter som diacetyl, acetoin og 2,3-butandiol, som ofte er ønskelige i meieriprodukter. Evnen til å metabolisere sitrat har blitt påvist hos slektene *Lactococcus*, *Leuconostoc* og *Weisella* (Mayo et. al., 2010).

Transport av sitrat foregår ved hjelp av spesifikke membranassosierte permeaser, og nærmere karakterisering av permeaser har vist at transport av sitrat kan foregå med ulike mekanismer. De fleste melkesyrbakterier transporterer sitrat ved hjelp av 2-hydroxykarboxylat, som er en transportør av dikarboksylysyre og trikarboksylysyre. Av denne typen transportører blir CitS og CitP mest benyttet av MSB. CitP transporterer sitrat ved å generere et membranpotensial, mens CitS benytter Na²⁺-gradienten til transport av sitrat (Mayo et. al., 2010).

Inne i cellen vil sitrat spaltes til oxalacetat og eddiksyre ved hjelp av sitratlyase-enzymet. Videre skjer det en dekarboksyliering av oxalacetat til pyruvat via enzymet oxalacetat dekarboksylyase (OAD). Denne nedbrytningen vil generere CO₂. Deretter skjer nedbrytningen av pyruvat til diverse aromatiske komponenter. To molekyler av pyruvat vil kondenseres til α-acetolaktat ved hjelp av enzymet α-acetolaktat syntase. α-acetolaktat er et ustabil molekyl, og vil raskt dekarboksylieres til acetoin av enzymet α-acetolaktat dekarboksylyase. Dersom oksygen er tilstede vil det også forekomme ikke-enzymatisk dekarboksyliering til diacetyl (Mayo et. al., 2010).

Diacetyl kan reduseres til acetoin ved hjelp av enzymet diacetyl reductase. Det samme enzymet vil katalysere reaksjonen der acetoin reduseres til 2,3-butandiol. Acetoin og 2,3-butandiol er begge endeprodukter, og hvilket det er mest av vil variere med cellenes redoksstadium. Den reversible reaksjonen mellom 2,3-butandiol og acetoin katalyseres av enzymet 2,3-butandiol dehydrogenase. Noe pyruvat vil også omdannes til laktat (Mayo et. al., 2010). Figur 4 viser omdannelsen av sitrat til aromatiske komponenter.



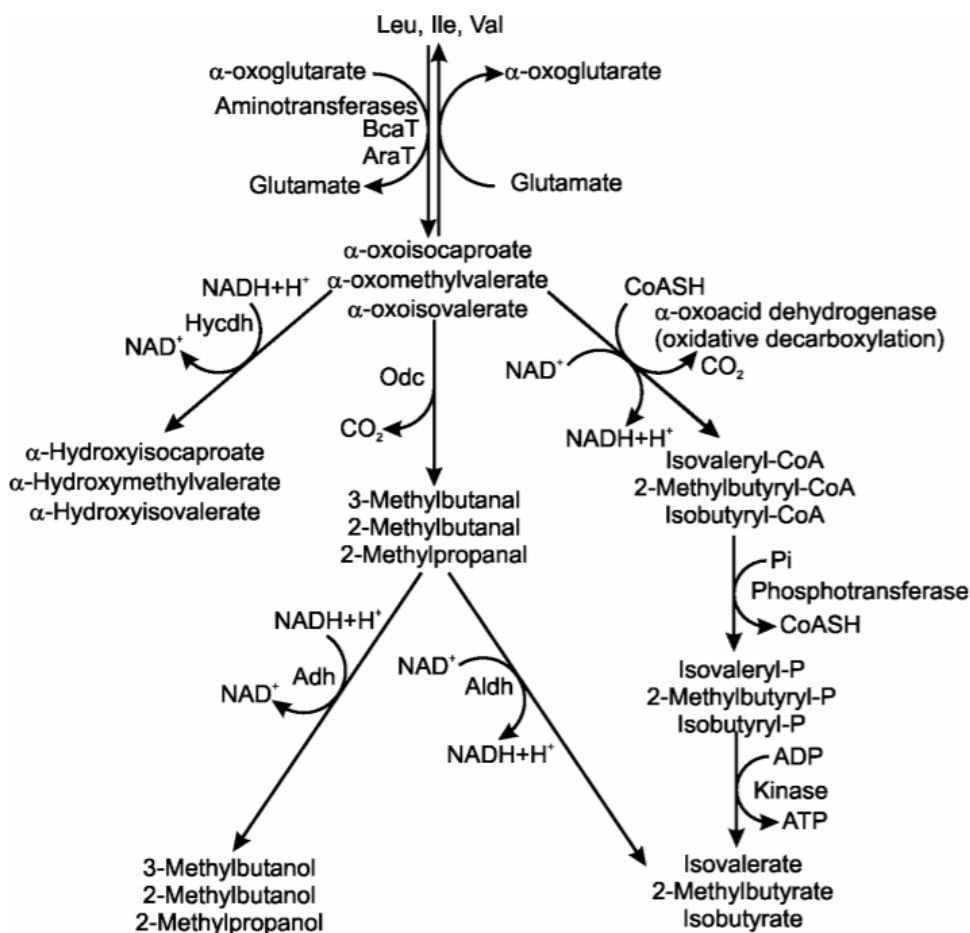
Figur 4. Sitratmetabolisme i MSB. Reaksjonene katalyseres av følgende enzymer: CL= citrat lyase, OAD= oxalacetat dekarboksylase, LDH= laktat dehydrogenase, PDC= pyruvat dekarboksylase, ALS= α -acetlaktat syntase, ADC= α -acetolaktat dekarboksylase, DAR= diacetyl acetoin reductase, BDH= 2,3-butandiol dehydrogenase; Tppi, thiamin, pyrofosfat (Mayo et. al., 2010).

2.3.4 Metabolisme av proteiner

Melk inneholder lite lett-tilgjengelig nitrogenholdige kilder, og bakteriene som vokser i melk har derfor behov for å bryte ned proteiner for å få tilgang på nitrogen. Bakterier som skal vokse i melk er avhengige av å ha proteolytiske enzymer i cellene til nedbrytning av proteiner. Som en konsekvens av dette er produksjon av melkesyre hos bakterier korrelert med tilstedeværende enzymssystem for proteolyse. Stammer som innehar slike enzymsystemer kalles Prt⁺-stammer, mens stammer uten dette systemet kalles Prt⁻-stammer. Dersom stammer er Prt⁻ er det likevel mulig for de å vokse i melk dersom Prt⁺-stammer også er tilstede og kan produsere tilgjengelig nitrogen (Walstra et. al., 2016).

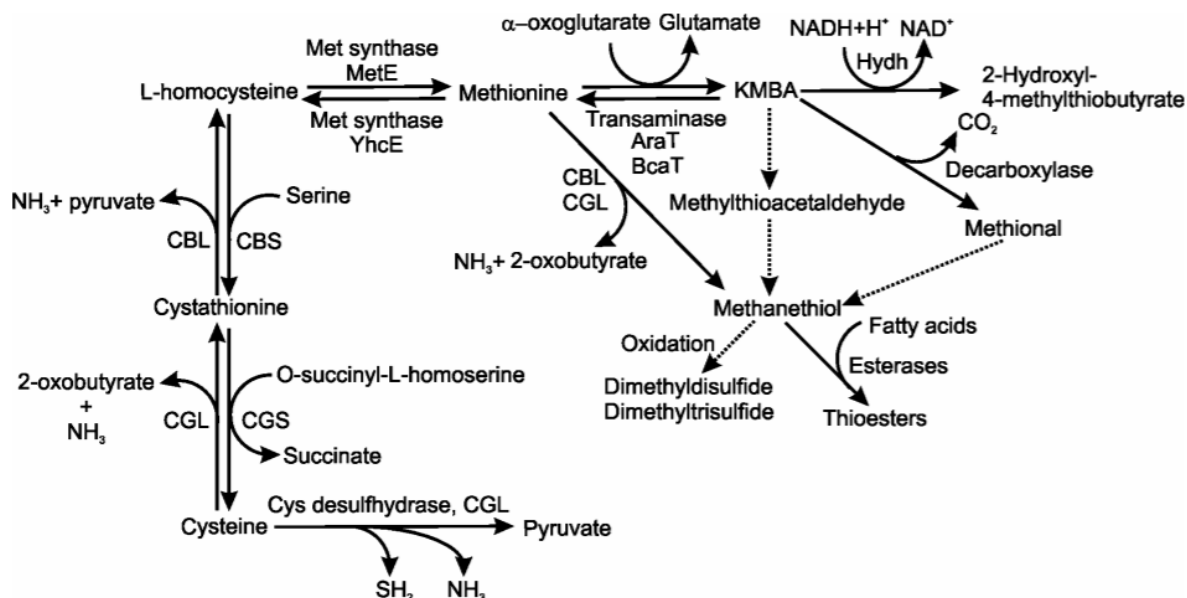
Som en samlet gruppe klarer MSB å bryte ned alle aminosyrer, mens evnen til nedbrytning av spesifikke aminosyrer vil variere veldig mellom ulike arter. Aminosyrer vil også benyttes av MSB til å bygge nye celler. Nedbrytningsveien av aminosyrer med tilhørende produkter vil variere mellom ulike aminosyrer (Fernández & Zúñiga, 2008). Nedbrytning av aminosyrer vil medføre produksjon av aromakomponenter, og dette er spesielt viktig for smaksutvikling i ost (Walstra et. al., 2016). I denne seksjonen vil aminosyrer som har fått påvist produksjon av aromatiske komponenter ved metabolisering av MSB beskrives.

Aminosyrer med mye forgreining, som leucin (Leu), isoleucin (Ile) og valin (Val), omdannes gjerne til komponenter som gir fruktig eller søt smak samt maltaroma (Ardö, 2006). Degraderingen av disse aminosyrene starter med hydrolyse ved hjelp av aminotransferaser som er avhengige av α -oxoglutarat. Videre blir Leu, Ile og Val degradert til henholdsvis α -oxoisocaproat, α -oxo- γ -methylvalerat og α -oxoisovalerat (Fernández & Zúñiga, 2008). Figur 5 viser den videre nedbrytningen av komponentene fra Leu, Ile og Val.



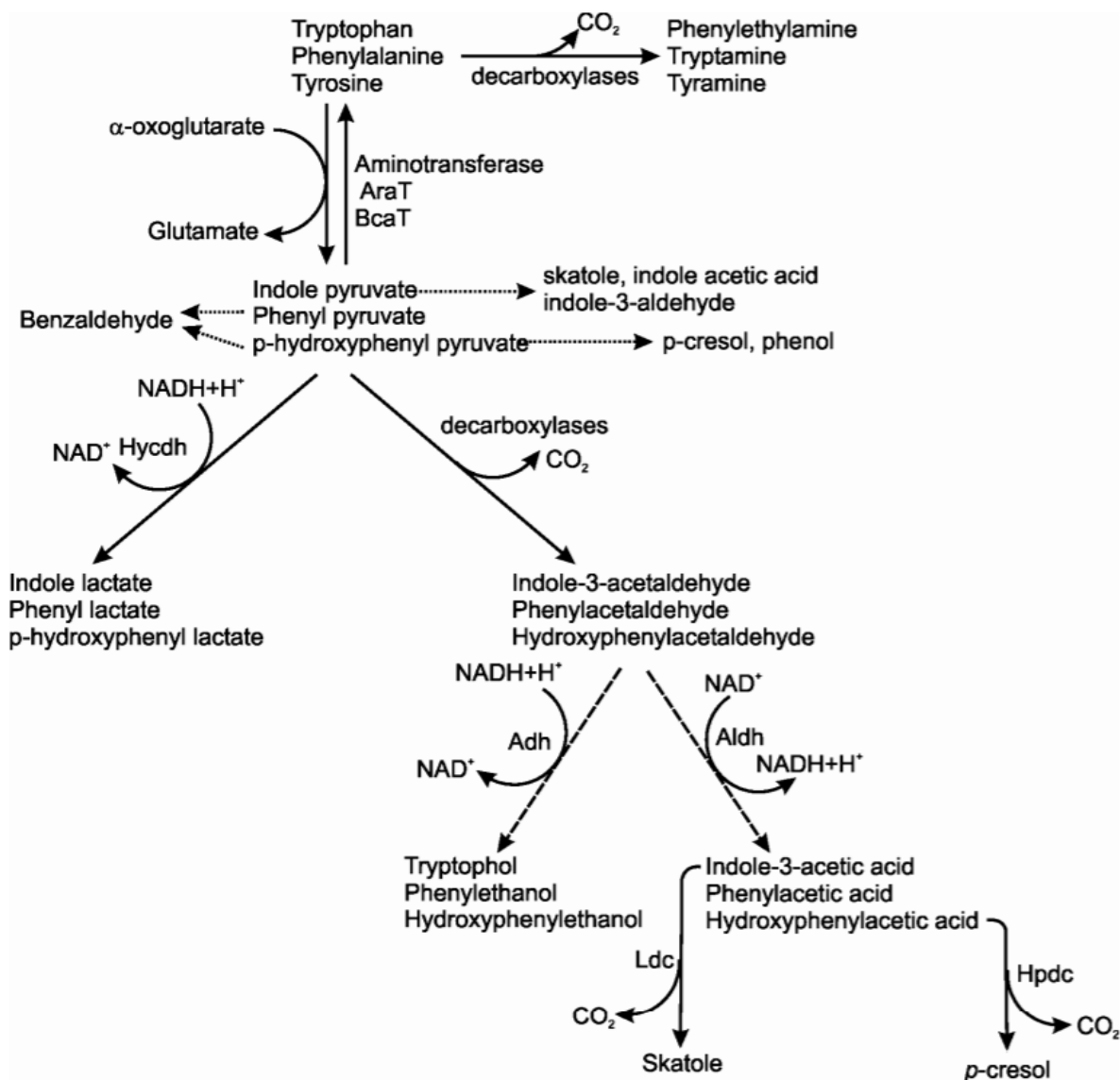
Figur 5. Katabolisme av de forgreinede aminosyrene leucin, isoleucin og valin for MSB. Adh= alkohol dehydrogenase, Aldh= aldehyd dehydrogenase, Hycdh= hydroxyisocaproat dehydrogenase, Odc= α -oxoacid dekarboxylase (Fernández & Zúñiga, 2008).

Aminosyrer med innhold av svovel, som metionin (Met) og cystein (Cys), medfører produksjon av komponenter med smak av kål, kjøtt og hvitløk (Ardö, 2006). MSB kan metabolisere Met på flere måter. Met kan omdannes til α -oxo- γ -methylthiobutyrate ved hjelp av deaminering etterfulgt av omdanning til metanthiol. Ved hjelp av S-adenosyl methionin kan også Met overføres til cystathionin. Cys kan degraderes til pyruvat samt en rekke andre komponenter, og katabolismen til Cys og Met er koblet sammen (Fernández & Zúñiga, 2008). Figur 6 viser en nærmere beskrivelse av katabolismen til Cys og Met samt alle nedbrytningsproduktene som blir produsert.



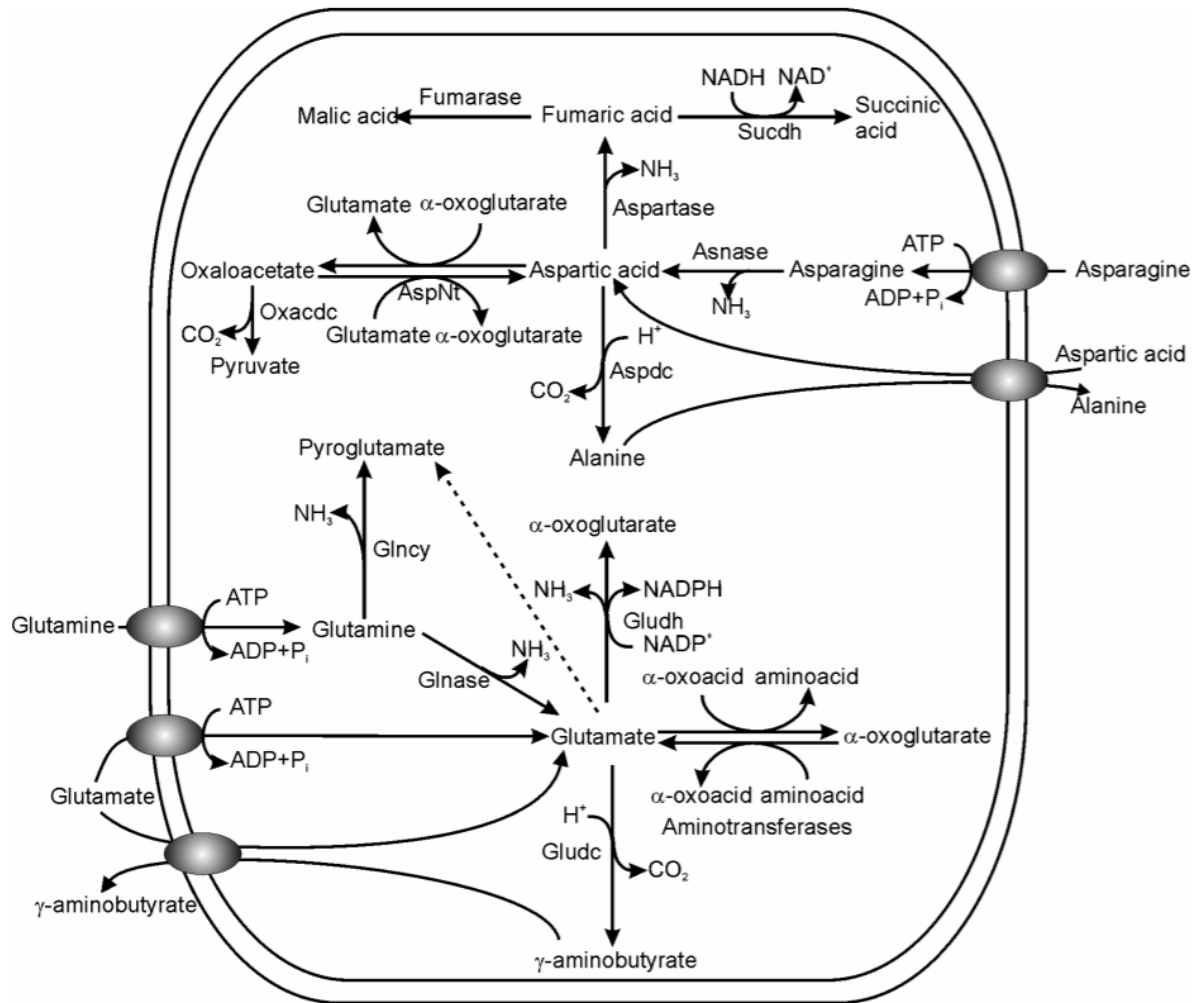
Figur 6. Katabolisme av cystein og metionin for MSB. CBS= cystathionine- β -synthase, CBL= cystathionine- β -lyase, CGL= cystathionine- γ -lyase, CGS= cystathionine- γ -synthase, Hydh= hydroxyacid dehydrogenase (Fernández & Zúñiga, 2008).

Fenylalanin (Phe), tyrosin (Tyr) og tryptofan (Trp) blir til aromastoffer med en kjemisk lukt eller lukt av blomster eller ekskrementer (Ardö, 2006). MSB vil bryte ned Phe, Tyr og Trp ved transaminering eller dekarboksylering. Transaminering vil medføre produksjon av indolepyruvat, fenylpyruvat og p-hydroxy-fenylpyruvat fra henholdsvis Trp, Phe og Tyr (Fernández & Zúñiga, 2008). Videre nedbrytning av disse komponentene samt enzymer ansvarlig for reaksjonene er vist i figur 7.



Figur 7. Katabolisme av tryptofan, fenylalanin og tyrosin av MSB. Prikkete linjer indikerer kjemiske reaksjoner. Stiplede linjer indikerer hypotetiske enzymatiske reaksjoner. Adh= alkohol dehydrogenas, Aldh= aldehyde dehydrogenase, Hpdc= hydroxyfenylacetate decarboxylase, Hycdh= hydroxyisocaproat dehydrogenase, Ldc= indole acetat decarboxylase (Fernández & Zúñiga, 2008).

Asparaginsyre (Asp) og asparagin (Asn) vil kataboliseres til stoffer med smøraroma (Ardö, 2006). Degradering av Asn starter med hydrolysering ved hjelp av asparaginaser til Asp og ammonium. Deretter kan Asp omgjøres på flere måter. Asp degraderes til fumarsyre som videre omdannes til eplesyre eller ravsyre. Andre metabolske veier er omdanning til pyruvat eller alanin (Fernández & Zúñiga, 2008). Katabolisme av Asp og Asn er vist i figur 8.



Figur 8: Katabolisme av asparaginsyre, asparagin, glutaminsyre og glutamin for MSB. Stiplet linje indikerer en ukarakterisert omdannelse til pyroglutamat. Aspdc= Asp decarboxylase, AspNt= Asp aminotransferase, Asnase= asparaginase, Glnase= glutaminase, Gludc= Glu decarboxylase, Gludh= Glu dehydrogenase, Oxadc= oxaloacetate decarboxylase, Sucdh= succinate dehydrogenase (Fernández & Zúñiga, 2008).

2.3.5 Metabolisme av fett

Lipolyse og katabolisme av frie fettsyrer har stor betydning for utvikling av smak og aroma i ost. Lipolyse er en biokjemisk reaksjon som spalter triglycider til frie fettsyrer og glycerol. De frie fettsyrene benyttes som energisubstrat, viktige bestanddeler for syntese av membraner og lipider, og som signalmolekyler for signalisering mellom celler. Lipolyse reguleres av lipolytiske enzymer (Lass et. al., 2011).

Det er få studier som beskriver MSB sin metabolisme av fett i melk, men en studie av Katz et. al. (2012) undersøkte blant annet lipolytisk aktivitet av MSB ved vekst i kjernemelk produsert av søyemelk. Studiet viste at lipolytisk aktivitet ser ut til å være stammespesifikk, da evnen til lipolyse varierte selv innad samme art. For stammene *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *E. faecalis* og *E. faecium* ble det registrert lipolytisk aktivitet i kjernemelk (Katz et. al., 2012).

2.4 Ønskede bakterier i melk

Enkelte bakterier er det ønskelig at skal vokse i melk, da produkter fra deres metabolisme kan benyttes til produksjon av meieriprodukter. I denne seksjonen vil to av slektene som skal undersøkes i denne oppgaven, *Lactococcus* spp. og *Lactobacillus* spp., beskrives. Flere av artene i disse slektene benyttes som syrekulturer i meieriprodukter, og slektene kan dermed i utgangspunktet ansees som ønskelige i melk.

2.4.1 *Lactococcus* spp.

Laktokokker er kokke-formede, Gram-positive, katalase-negative, ikke-motile, fakultativt anaerobe bakterier. De har veldig varierende kilde til næring, men typiske habitater vil være planter og dyr. Hovedproduktet til laktokokker etter fermentering er L-(+)-melkesyre, da de har en homofermentativ metabolisme. Morfologiens til laktokokker kjennetegnes av runde eller ovale celler med en diameter på 0,5-1 µm, og cellene eksisterer ofte i par eller kjeder. Laktokokker vokser stort sett ved temperaturer mellom 10 og 40 °C, men ved lenger inkuberingstid klarer enkelte også å vokse ned til 7 °C. Laktokokker trives best ved nøytral pH og saltkonsentrasjon på 4 % eller lavere, men de kan vokse ved pH-verdier ned til 4,5 (Sun et. al., 2014). En studie har også vist at *Lactococcus lactis* kan overleve helt ned til pH 4 (Rallu et al., 1996).

Lactococcus-slekten består av 11 validerte arter og underarter. I oppgaven vil følgende arter undersøkes: *Lc. lactis*, *Lc. garvieae* og *Lc. raffinolactis*. *Lc. lactis* er en svært viktig art innen *Lactococcus*-slekten og består av de fire underartene *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae* og *Lc. lactis* subsp. *tractae*. De to førstnevnte

artene finnes i meieriprodukter, og er veldig viktige i starterkulturer. *Lc. lactis* subsp. *lactis* finnes i tillegg i dyr og planter (Sun et. al., 2014).

Enkelte stammer av *Lc. lactis* subsp. *lactis* er sitratmetaboliserende, og klarer å bryte ned sitrat til CO₂, diacetyl og andre aromakomponenter. *Lc. garvieae* blir assosiert med mastitt, humane infeksjoner, gårdsmiljøer og som patogener i fisk, mens *Lc. raffinolactis* er en bakterie som har blitt isolert fra upasteurisert melk, gulrøtter, dyr og meieri- og gårdsmiljøer (Limsowtin, 2002). *Lc. lactis* er kjent for å vokse bra i melk, men studier har også vist vekst av *Lc. garvieae* og *Lc. raffinolactis* i melk (Morea et. al., 1999; El-Baradei et. al., 2008; Fernández et. al., 2010). I studiet til Morea et. al. ble det påvist sitratmetabolisme for den testede stammen av *Lc. garvieae*.

2.4.2 *Lactobacillus* spp.

Laktobasiller er Gram-positive, ikke-spordannere stav-formede bakterier, som forbruker glukose ved fermentering via glykolyse. Laktobasiller kan være enten homofermentative eller heterofermentative. De homofermentative bakteriene vil kunne produsere mer enn 85 % melkesyre fra glukose, mens heterofermentative produserer omtrent like mengder melkesyre, CO₂, etanol og/eller eddiksyre. Bakteriene er stort sett ikke-motile, og vil i noen tilfeller kunne redusere nitrat. Når bakteriene har tilgang på komplekse næringsmedier som karbohydrater, aminosyrer, peptider, fettsyrer, estere, salter, nukleinsyrederivater og vitaminer, vil de være katalase-negative (Sun et. al., 2014).

Laktobasiller finnes i mange ulike habitater, blant annet i mennesker og dyr, jord og gjødsel og i plantemateriale. Noen laktobasiller er ønskelige til fermentering av matvarer, mens andre anses som ødeleggende for mat (Limsowtin, 2002). Bakteriene forekommer som staver, og fasongen på stavene vil være litt ulik mellom de ulike artene. Cellene vil variere fra slanke og lange staver til korte og nesten kokke-formede celler. Ofte vil cellene danne kjeder, og de har en vidde på 0,5-1,2 µm og en lengde på 1,0-10 µm. Laktobasillene kan vokse i et temperaturområde fra 2-53 °C, men optimal veksttemperatur vil være mellom 30-40 °C. Optimal pH for vekst ligger mellom 5,5-6,2, men det har blitt observert vekst helt ned til pH 3 og opp til pH 8 (Sun et. al., 2014).

Lactobacillus-slekten består av 158 validerte arter der syv av disse artene til sammen består av 18 underarter. Artene kan karakteriseres innenfor ulike nisjer, dvs. de kan beskrives ut

ifra hvilket habitat de ble isolert fra. *Lactobacillus*-slekten deles i 8 ulike nisjer: plantematerialer, surdeig, kjøttprodukter, meieriprodukter, vinprodukter, mage-tarmkanalen til dyr eller mennesker, andre kilder fra dyr og mennesker og miljøet som generelt vekstmedium. Generelt er artene i *Lactobacillus* anaerobe men kan være aerotolerante (Sun et. al., 2014).

Siden det er små mange ulike laktobasiller er det vanlig å dele de inn i grupper. Gruppene deler slekten i forhold til deres metabolisme og skiller mellom obligat homofermentative (OHO), fakultativt heterofermentative (FHE) og obligat heterofermentative (OHE) arter, med basis i hvilke karbohydrater og fermenteringsprosesser som benyttes. Bakterier med OHO-metabolisme benytter glykolyse til fermentering av melkesyre som hovedprodukt, og fermenterer i hovedsak heksoser. I FHE-metabolismen blir også heksoser fermentert til melkesyre via glykolysen, men bakteriene klarer også å bryte ned pentoser og glukonat via pentose fosfat-fermenteringsveien. Dette skjer kun dersom det er lite heksoser tilstede i bakteriens miljø, og vil resultere i produksjon av eddiksyre, etanol og maursyre. Artene med OHE-metabolisme innehar FDB aldolase og kan derfor metabolisere både pentoser og heksoser via fosfoglukonat-fermenteringsveien. Dette resulterer i produksjon av melkesyre, etanol/eddiksyre og CO₂. Ut ifra disse forutsetningene deles slekten videre inn etter fylogenetiske forhold med basis i 16s rRNA-sekvensering (Sun et. al., 2014).

I oppgaven vil følgende arter fra *Lactobacillus*-slekten undersøkes: *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. paracasei* og *Lb. acidipiscis*. Artene *Lb. plantarum* og *Lb. pentosus* tilhører begge gruppen *Lb. plantarum*. *Lb. plantarum* består av seks arter og underarter. Alle artene i gruppen er FHE (Sun et. al., 2014), og studier har vist at både *Lb. plantarum* og *Lb. pentosus* klarer å vokse i melk (Pan et. al., 2014; Turchi et al., 2017)

Lb. paracasei tilhører gruppen *Lb. casei*, og har også FHE-metabolisme. Alle artene i gruppen kan produsere acetoin, og de produserer L(+)-melkesyre. *Lb. acidipiscis* tilhører gruppen *Lb. salivarius*. I gruppen er metabolismen ulik mellom de forskjellige artene, men *Lb. acidipiscis* har en metabolisme av typen FHF. Artene produserer enten L(+)-melkesyre eller både L(+)-melkesyre og D(-)-melkesyre. Ingen av artene i gruppen produserer kun D(-) isomeren av melkesyre (Sun et. al., 2014). Det ble ikke funnet forskningslitteratur som beskriver vekst av hverken *Lb. paracasei* eller *Lb. acidipiscis* i melk, men *Lb. paracasei* har vist gode vekstegenskaper i ost (Milesi et. al., 2010).

2.5 Uønskede bakterier i melk

Vekst av uønskede bakterier vil enten gi et produkt eller råstoff uønskede karakteristikk eller medføre sykdom hos dyr og mennesker. Bakterier som ikke er farlige, men gir produktet uønskede egenskaper kalles for kvalitetsforringende bakterier, mens sykdomsfremkallende bakterier gjerne kalles for patogener. Patogene bakterier vil generelt ikke vokse veldig bra i melk, og ofte betraktes melken primært som en fraktmetode for patogenene. Kvalitetsforringende bakterier derimot trives godt i melk (Walstra et. al., 2016).

Ifølge gjeldende teori (Walstra et. al., 2016) har det lenge vært en oppfatning at melken inne i kuens melkekjertler er steril, og at kontaminasjonen av melk først skjer i spenekanalene, og da helst av bakterieslektene *Micrococcus* og *Staphylococcus* og arten *Corynebacterium bovis*. I noen tilfeller vil også andre bakterier kunne være involvert. Hos kyr med jurbetennelse (mastitt) vil også patogene bakterier som *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus* være tilstede i juret. Dersom andre organer hos kyr er infisert vil disse også kunne invadere melken (Walstra et. al., 2016). I dette kapitlet vil slektene *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* og *Streptococcus* beskrives som potensielle mastittpatogener. *Pediococcus* blir ikke sett på som mastittpatogener, men er ofte ikke ønskelig i syrekulturen til meieriprodukter, og beskrives derfor her.

2.5.1 *Pediococcus* spp.

Pediococcus-slekten består av Gram-positive, katalasenegative og oksidasenegative bakterier. Slekten er en type MSB, men regnes ofte som en uønsket bakterie i melk. Bakteriene i slekten er fakultativt anaerobe og produserer melkesyre fra glukose. Bakteriene er homofermentative, og vil bryte ned glukose via glykolyse. Slekten klarer ikke å redusere nitrat og produserer ikke CO₂. De aller fleste arter produserer DL(+) melkesyre som hovedprodukt, men metabolismen vil variere litt mellom de ulike artene. *Pediooccus* er en slekt som skiller seg ut med høy toleranse for salt, og enkelte arter kan tåle konsentrasjoner opptil 18 %. Slekten har også høy toleranse for basiske miljøer, og kan vokse ved pH-verdier opptil pH 9 (Sun et. al., 2014).

Pediokokker danner kokke-formede celler som sjeldent er ovale, og cellene har en diameter på 0,6-1,0 µm. Slekten er ikke-motil og ikke-sporedannende. Ved celledeling deler cellene

seg vekselvis i to vinkelrette retninger, og former på denne måten tetraeder og ikke kjeder. Denne formen for celledeling er helt unik for *Pediococcus* spp (Sun et. al., 2014).

Pediococcus-slekten består av 11 validerte arter, og i dette forsøket vil det sees nærmere på *P. pentosaceus*. Slekten deles inn i to hovedgrupper, og *P. pentosaceus* tilhører en gruppe sammen med *P. argentanicus*, *P. claussenii*, *P. stilesii* og *P. acidilactici*. Pediokokker har blitt isolert fra mange forskjellige kilder, blant annet grønnsaker, meieriprodukter, kjøttprodukter, fisk, alkoholholdige drikker og humane kilder (Sun et. al., 2014). Det er trolig kun de to artene *P. pentosaceus* og *P. acidilactici* som er assosiert med meieriprodukter. *P. pentosaceus* skiller seg litt fra de andre pediokokkene, ved at den klarer å produsere equimolare mengder melkesyre og acetat fra pentoser (Crow, 2002). *P. pentosaceus* er flere ganger påvist for vekst i melk (Taboada et. al., 2017; Dineshkumar & Renu, 2008).

2.5.2 *Aerococcus* spp.

Slekten *Aerococcus* består av kokke-formede, Gram-positive og mikroaerofile bakterier. I utgangspunktet er bakteriene i slekten katalase-negative, men enkelte kan produsere en svak positiv reaksjon. Bakteriene i slekten er fakultativt anaerobe. Tidlig ble aerokokker identifisert ved veksttoleransetester. Bakteriene kan vokse ved opptil 45 °C, i 40 % saltløsning og ved pH 9,6. Enzymtester blir brukt til mer nøyaktig identifisering (Facklam et. al., 1995).

Aerococcus ble for første gang beskrevet i 1953, etter at de ble isolert fra plater satt ut i sykehusmiljø. Cellene til aerokokkene kan minne om streptokokker eller pediokokker, men Gram-farging har vist en litt annen cellemorfologi enn disse slektene. Aerokokkene kan minne om pediokokker fordi cellene deler seg i to plan, og dette gir produksjon av tetraeder og klustere som kan minne om pediokokkenes morfologi. Cellene til aerokokkene kan også danne par eller forekomme alene. *Aerococcus* og *Pediococcus* ble til å begynne med betraktet som så like at de ble vurdert sammenslått til en slekt (Facklam et. al., 1995).

Aerococcus har blitt isolert fra mange ulike miljøer, blant annet i luften, støv, jord, marine kilder, vegetasjon og fra saltlake til kjøttprodukter (Liu et. al., 2014). Det har også blitt funnet isolater fra humane infeksjoner, blant annet endokarditt, urinveisinfeksjon og hjernehinnebetennelse (Faklam et. al., 1995). Til å begynne med var det kun *Aerococcus*

viridans som tilhørte *Aerococcus*-slekten, men i senere år har også artene *A. christensenii*, *A. sanguinicola*, *A. suis*, *A. urinae* og *A. urinaehominis* blitt tilført slekten (Liu et. al., 2014). I denne oppgaven er det *A. viridans* som skal undersøkes. I de siste årene har det blitt isolert 36 stammer av *A. viridans* fra humane kilder. Disse har blitt isolert fra, blod, urin, spinalvæske, sår, øre og cyster (Facklam et. al., 1995). *A. viridans* er også en bakterie som er veldig vanlig å isolere i melk fra kyr med mastitt (Saishu et. al., 2015), og bakterien har vist seg å vokse i melk (Morea et. al., 1999).

2.5.3 *Enterococcus* spp.

Enterococcus-slekten består av kokke-formede Gram-positive bakterier som opprinnelig var inkludert i *Streptococcus*-slekten. Enterokokker har ovale celler som kan opptre i korte kjeder, i par eller alene. Det kan være vanskelig å skille cellene til enterokokker fenotypisk fra andre kokke-formende bakterier, fordi enterokokkene vil kunne ha ulike egenskaper innad sin slekt. Konvensjonelle tester for identifisering vil ofte kreve lange inkuberingstider, og selv ikke genotypisk identifisering vil alltid klare å skille de ulike artene i *Enterococcus*-slekten fra hverandre (Sun et. al., 2014).

Enterokokker er vanlige i tarmmikrobiotaen til pattedyr, fugler, reptiler og insekter (Werner et. al., 2012). Studier på pasienthelse har vist at *Enterococcus* spp. er ledende årsak til blodinfeksjoner og urinveisinfeksjoner hos pasienter ved intensivpleieenheter på sykehus (ECDC, 2011). Mange enterokokker blir derfor betraktet som patogener hos mennesker, men dette er sjeldnere tilfellet for dyr. Likevel er det to alvorlige infeksjoner med enterokokker i dyr som blir lagt merke til, og det er amyloid artropati hos kylling og mastitt hos kyr (Werner et. al., 2012).

Slekten består av 46 validerte arter og underarter, og i denne oppgaven vil *Enterococcus faecalis* undersøkes. *E. faecalis* og *E. faecium* skiller seg fra andre kokke-formede bakterier samt andre bakterier i *Enterococcus*-slekten, ved at de klarer å vokse i en saltkonsentrasjon på opptil 6,5 %, ved pH verdier opptil 9,5 og ved temperaturintervaller fra 10 til 45 °C (Sun et. al., 2014). *E. faecalis* har blitt påvist for vekst i melk (Morea et. al., 1999), da tilsetning av slekten til melk resulterte i nedgang i pH. Forsøket til Morea et. al., 1999 viste også at den testede stammen av *E. faecalis* hadde evnen til å metabolisere sitrat.

Enterokokker deles inn i tre grupper med basis i fylogeni. Gruppen *Enterococcus faecalis* innbefatter enterokokkene *E. faecalis*, *E. caccae*, *E. silesiacus*, *E. ureasiticus*, *E. rotai*, *E. ureilyticus*, *E. plantarum*, *E. moraviensis*, *E. haemoperoxidus*, *E. quebecensis*, *E. termitis*, *E. faecalis* og *E. rivorum*. Artene i denne gruppen er ganske ulike fylogenetisk, men har mange fenotypiske likheter. Alle bakteriene i gruppen kan vokse ved 10 °C, og ved en saltkonsentrasjon på 6,5 %, samt at de produserer røde kolonier på Slanetz-Bartley agar. Bakteriene kan likevel skilles fra hverandre ved bruk av diverse biokjemiske tester (Sun et. al., 2014).

2.5.4 *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus-slekten består av kokke-formede, Gram-positive og katalase-positive bakterier. De fleste artene er koagulase-negative, men en av de viktigste artene i slekten, *Staphylococcus aureus*, er koagulase-positiv. Artene er salttolerante og tåler mye uttørkning, og er ofte av den grunn assosiert med kolonisering på hud. Svært mange mennesker er bærere av *Staphylococcus spp.*, og bakteriene finnes ofte på huden, slimhinner i nese og respirasjonssystemet, mage- og tarmsystemet, samt i vaginale slimhinner. I tillegg kan bakteriene finnes i kontaminerte matprodukter og kontaminert jord. *St. aureus* er svært ofte assosiert med antibiotikaresistens (Johnson, 2018).

Staphylococcus spp. deles inn i 27 arter og 7 underarter. Staphylokokkene har en størrelse på 0,5-1,5 µm i diameter, og de har ofte celledeling i mer enn et plan, slik at cellene danner tredimensjonale klustere (Asperger et. al., 2002).

Den arten av *Staphylococcus* som har blitt mest undersøkt er *St. aureus*. *St. aureus* er fakultativ anaerob, og vil produsere syrer fra glukose, laktose, maltose og mannitol ved både aerobe og anaerobe forhold. Ved anaerobe forhold vil bakterien i tillegg klare å produsere syrer fra enda flere karbohydrater. Ved anaerob metabolisme produserer bakterien hovedsakelig melkesyre, mens det ved aerobe forhold produseres hovedsakelig acetat og CO₂. *St. aureus* vokser aller best under aerobe forhold. Bakterien er en hardfør organisme som tåler vannaktivitet helt ned til 0,83-0,86 a_w og saltkonsentrasjoner på opptil 15 %. *St. aureus* kan vokse ved temperaturer fra 7 °C til 48 °C og ved pH-verdier fra 4 til 10. Likevel er det optimalt med en temperatur på 37 °C og en pH-verdi på mellom 6 og 7 (Asperger et. al., 2002).

I denne oppgaven vil det bli sett nærmere på *St. epidermidis* og *St. chromogenes*. *St. epidermidis* er gjerne en normal del av mikrobiotaen på hud og slimhinner. Bakterien angriper ofte de med nedsatt immunforsvar og assosieres med produksjon av biofilm (Johnson, 2018). Biofilm er multicellulære samfunn av mikroorganismer festet til overflater. Biofilm er ofte svært vanskelig å fjerne, og samarbeid mellom mikroorganismene samt utvikling av resistens mot antibiotika og desinfiseringsmidler gjør de også vanskelige å inaktivere (Otto, 2009).

St. chromogenes forårsaker generelt ikke sykdommer i friske dyr, og er ofte betraktet som en del av den naturlige hudfloraen hos landdyr. Patogenet er imidlertid veldig kjent for deltakelse i mastittinfeksjoner hos kyr, og er også bakterien som forårsaker eksudativ epidermitt hos gris. I tillegg forårsaker *St. chromogenes* hudinfeksjoner hos geit (Lü et. al., 2012). Staphylokokker er ofte assosiert med mastitt i kyr, og *St. aureus* er ansvarlig for opptil 30-40 % prosent av alle tilfeller av mastitt (Asperger et. al., 2002).

Både *St. epidermidis* og staphylokokker på generell basis har vist tegn til vekst i melk (Morea et al., 1999; Hettinga et. al., 2008), men det ble ikke funnet studier spesifikt på vekst av *St. chromogenes* i melk.

2.5.5 *Streptococcus spp.*

Streptococcus-slekten består av Gram-positive, ikke-motile, ikke-sporedannende, katalasenegative bakterier. Bakteriene er fakultativt anaerobe og har en homofermentativ metabolisme. Noen av bakteriene krever ekstra tilgang på CO₂ i tillegg til et anaerobt miljø for vekst. Bakteriene metaboliserer karbohydrater med melkesyre som hovedprodukt og uten produksjon av gasskomponenter. Stort sett trives streptokokkene best ved 37 °C, men både maksimum- og minimumstemperaturer vil variere mye mellom de ulike artene. De ulike artene vil i tillegg ha ulike behov når det kommer til næringsstoffer (Sun et. al., 2014).

Streptokokker har runde eller ovale celler som gjerne henger sammen i par eller kjeder. Cellene har gjerne en størrelse på 0,8-1,2 µm i diameter, og kjedene kan inneholde alt fra et par celler til over 50. Enkelte av artene, som *Str. pyogenes* og *Str. pneumoniae*, produserer kapsler. Førstnevnte produserer en kapsel bestående av hyaluronsyre, mens sistnevnte produserer kapsler bestående av ulike polysakkarider. Det har også blitt

observert at enkelte arter produserer ekstracellulære polysakkarider ved tilgang på sukrose, fruktose eller glukaner (Sun et. al., 2014).

Bakterieslekten ble isolert første gang fra sår hos mennesker, og det var *Str. pyogenes* som først ble beskrevet. Ordet «streptokokker» kommer fra bakteriecellenes morfologiske oppbygning der de ble isolert. Senere har streptokokker blitt isolert fra flere kilder, blant annet hos hester og mennesker med lungebetennelse og kuer med mastitt. Nesten 100 arter har blitt oppdaget innen slekten *Streptococcus*, og i dette forsøket er det *Streptococcus uberis* som undersøkes (Sun et. al., 2014), og *Str. uberis* har blant annet vist seg å vokse i melk (Hettinga et. al., 2008; Thomas et. al., 2016; Morea et. al., 1999).

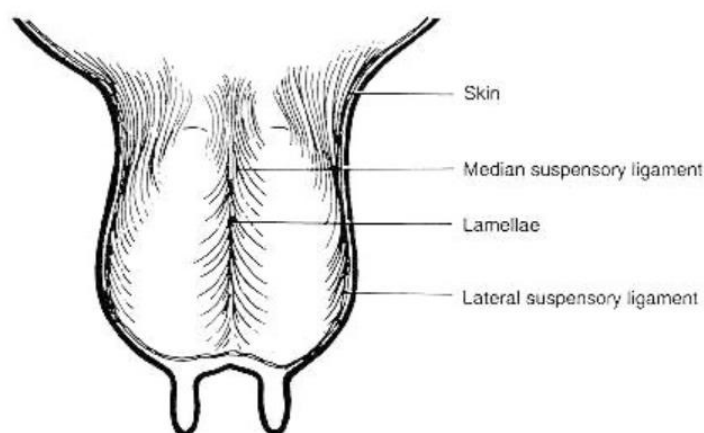
Det har blitt gjort flere forsøk på å gruppere streptokokkene. I 1906 lagde Andrewes og Horder en klassifisering basert på karakteristikkene innen morfologi, serologi, fysikk og biokjemi. Jones (1978) lagde et nytt system for klassifisering der streptokokker ble delt inn i 7 grupper basert på patogenisitet, habitat og oksygentoleranse. Lancefield lagde i tillegg i 1933 en inndeling etter antigener for streptokokkene (Sun et. al., 2014).

Sherman (1937) delte streptokokker inn i fire ulike grupper: «Pyogenic», «viridans», «lactic» og «*Enterococcus*». Bakteriene i gruppen pyogenic var β -haemolytiske arter med definerte antigener. Viridans-gruppen besto av arter som ikke ville vokse ved 10 °C, ikke tolererte høye pH-verdier eller saltkonsentrasjoner og ikke var β -haemolytiske. Bakteriene i gruppen lactic var ikke assosiert med sykdommer, men hadde blitt isolert fra meieriprodukter. Bakteriene i den siste gruppen, *Enterococcus*, klarte å vokse ved høy pH og høye saltkonsentrasjoner og ved et temperaturintervall på mellom 10 °C og 45 °C. Senere ble bakteriene i *Enterococcus*-gruppen overført til en ny slekt med samme navn, mens bakteriene i lactic-gruppen ble overført til den nye slekten *Lactococcus* (Sun et. al., 2014).

Nye metoder innen DNA-teknologi har gjort det mulig å karakterisere bakteriene etter både fenotype og fylogeni, og det er derfor i dag flere arter innen *Streptococcus*-slekten som har blitt flyttet til andre slekter. I dag har 16S rRNA-sekvensering gjort inndeling enda lettere, og streptokokkene deles nå inn i gruppene «pyogenic», «bovis», «mutans», «mitis», «anginosus» og «salvarius». *Str. uberis* tilhører pyogenic-gruppen (Sun et. al., 2014).

2.6 Jurets anatomi

Når det gjelder utvendig anatomi kan juret deles inn i fire spener, der de to bakerste spenene ofte er større enn de fremste. For å støtte juret og holde det på plass, har juret flere suspensor ligamenter. Median suspensor ligamenter deler juret i en venstre og en høyre del. Median suspensor ligamentene er bygd opp av tett bindevev med mye elastikk, og denne typen ligamenter har derfor evnen til å streke seg nedover. Lateral suspensor ligamenter vil ligge rundt resten av juret, og består av lite fleksibelt bindevev. Sammen gir disse ligamentene juret støtte og nødvendig elastisitet når juret fylles med melk (Džidić, 1999). Median suspensor ligamenter og lateral suspensor ligamenter sin plassering på juret er illustrert i figur 9.

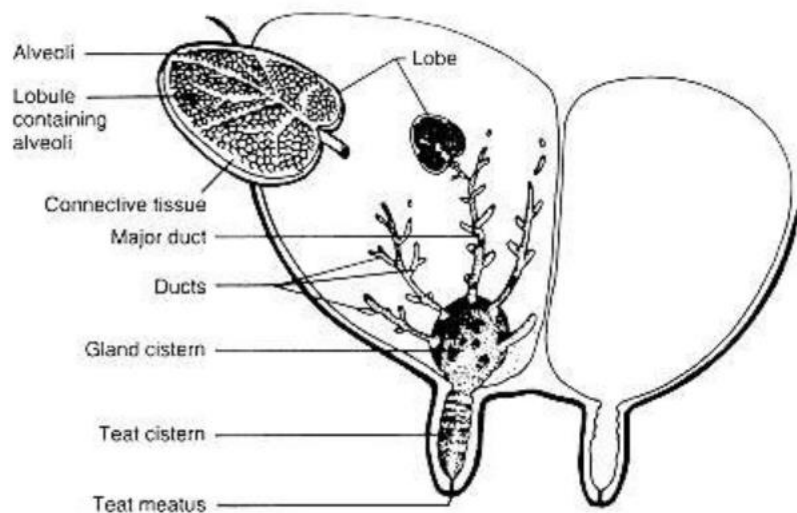


Figur 9. Jurets utvendige anatomi (Cortes, ukjent dato)

Juret består av kjertelvev og bindevev, og hver spene vil ha kjertelvev separert fra de andre spenene. De bakerste spenene vil gjerne ha mellom 25 og 50 % mer kjertelvev enn de fremste spenene. Kjertelvevet består av epitelceller som er spesialisert på syntetisering av melk. Kjertelvevet er bygd opp av alveoler som igjen består av et lag med celler koblet til en membran, vaskulært system og myoepitelceller. Alveolene ligger tett sammenpakket i grupper og holdes sammen ved hjelp av tynne lag med bindevev, som også innehar blodårer og nerver (Džidić, 1999). Myoepitelcellene vil ligge som et muskellag rundt alveolene, og når disse musklene kontraherer vil melk frigjøres fra alveolene (Nickerson, 1995).

Inne i hver alveole vil komponenter fra blodet syntetiseres til melkekomponenter som proteiner, laktose og fett, og disse komponentene vil lagres på innsiden av alveolene. Til hver alveole er det tilkoblet en kanal som munnar ut i en felles kanal for hver gruppe av alveoler, og melken vil vandre gjennom disse kanalene og frem til spenene. Kjertlene

munner alle ut i en kjertelcisterne som har en kapasitet på mellom 100 og 2000 ml melk. Etter dette går melken videre inn i en spenecisterne med en kapasitet på mellom 10 og 50 ml melk. I enden av juret finnes spenekanalen med en lengde på mellom 5 og 13 mm, og denne er svært viktig for å hindre kontaminasjon av juret. Spenekanalen er omgitt av tynne muskelfibre som vil bidra til å holde spenekanalen lukket for omgivelsene mellom melkinger (Nickerson, 1995). De ulike bestanddelene til jurets indre anatomi er illustrert i figur 10.



Figur 10. Jurets innvendige anatomi (Cortes, ukjent dato)

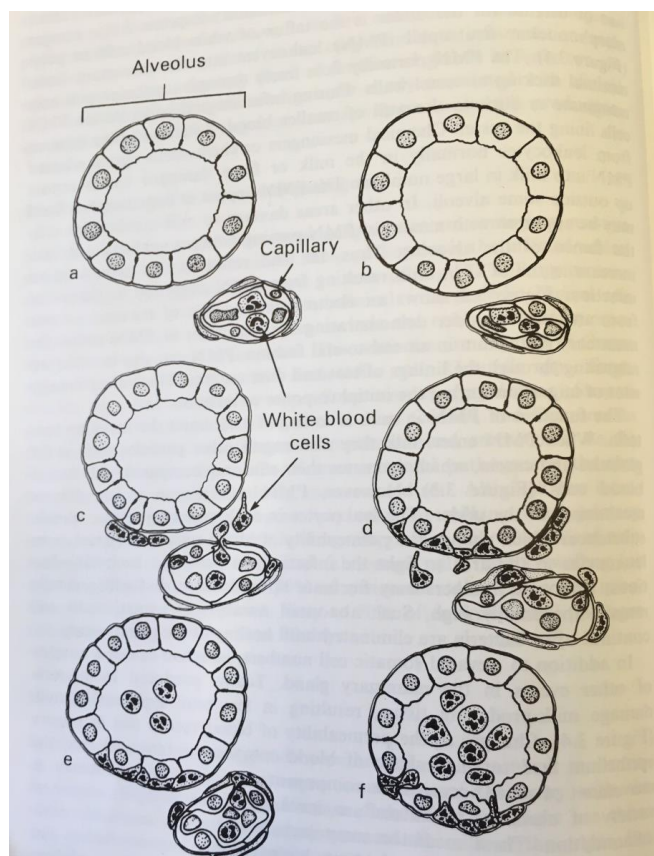
2.7 Mastitt

Mastitt kan defineres som inflammasjon av melkekjertler, og er kroppens forsvarsmekanisme mot skadelige påkjenninger i melkekjertlene. Ved inflammasjon vil mengden leukocytter øke i blodet og på denne måten øke det somatiske celledetallet. Hensikten med inflammasjonen er å nøytralisere skaden eller organismen som påfører skaden, slik at melkekjertlene kan gå tilbake til sin normale funksjon. Inflammasjon kan være et resultat av infeksjon, psykisk traume, kjemiske midler eller vekst av mikroorganismer. Ved infeksjon av melkekjertlene av mikroorganismer, vil mikroorganismene komme seg inn i juret, øke i antall og starte produksjon av toksiner. Det vil være toksinene som påfører melkekjertlene skade og medfører påfølgende inflammasjon. Mikroorganismer som invaderer juret kan være både bakterier, gjær og muggsopp, men det er oftest bakterier som er hovedårsaken til mastitt (Harmon, 1995).

De patogene bakteriene som hovedsakelig forårsaker mastitt er *St. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *Str. bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *E. faecium* og *E. faecalis*. De overnevnte bakteriene regnes som hovedpatogener for mastitt, og det er disse bakteriene som medfører størst inflammasjon og økning i somatisk celletall. I enkelte utbrudd har også *Actinomyces pyogenes*, *Serratia* spp. og *Pseudomonas* spp. vært viktig bakterier for utvikling av mastitt. Noen bakterier regnes for å være mindre viktige patogener i utvikling av mastitt, og disse medfører inflammasjoner og økt somatisk celletall i lavere grad enn hovedpatogenerne. Eksempler på slike mindre viktige patogener er *Corynebacterium bovis* og koagulase-negativ *Staphylococcus* (Harmon, 1995).

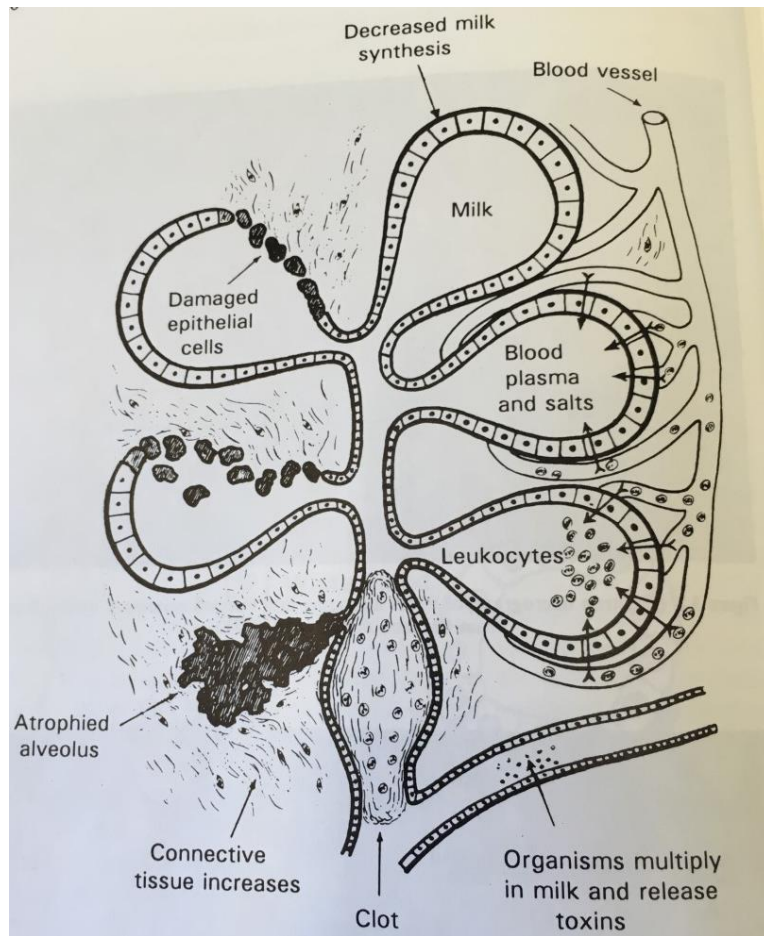
Mastitt deles gjerne inn i to ulike typer; klinisk og subklinisk mastitt. Subklinisk mastitt er den minst alvorlige infeksjonen, der det ikke oppstår synlige endringer i melken eller juret, men man vil kunne merke et mindre melkeutbytte samt tilstedeværelse av bakterier i melken ved analysering. Klinisk mastitt er en alvorlig infeksjon der melken vil ha store endringer og juret vil være tydelig påvirket av infeksjonen. Juret kan bli smertefullt og svulle i størrelse, samt at kua vil få feber og være slapp (Harmon, 1995).

Når mikroorganismer produserer toksiner som vil kunne skade juret, reagerer kroppen ved å sende store mengder hvite blodceller, også kalt polymorphonuclear neutrophiler (PMN), til det infiserte juret. Ved infeksjon vil kjemotaktiske stoffer frigjort fra leukocytter i skadet vev eller i melk i kontakt med skadet vev, tiltrekke PMN til det skadede vevet. PMN vil da kunne legge seg som et beskyttende lag rundt epitelcellene i kjertelvevet som syntetiserer melk. Dette resulterer i at mye PMN vil bli med over i syntetisert melk, og mengden PMN i melken benyttes derfor til å vurdere grad av mastitt i juret. Selve funksjonen til PMN er å innkapsle og bryte ned bakteriecellene som har invadert juret. Dette vil også medføre noe innkapsling av fett og protein for PMN tilstede i melk. Antallet PMN vil variere noe i løpet av mastittinfeksjonen, men vil generelt være svært høyt helt til juret er friskt igjen (Harmon, 1995). Figur 11 viser hvordan PMN innkapsler epitelcellene i alveolene og overføres til melken.



Figur 11. PMN sin beskyttelse av juret ved innkapsling av epitelceller. (a) Normal alveole og blodårer. (b) PMN fester seg til blodåreveggen. (c) PMN emigrerer og fester seg til utsiden av alveolen. (d) Migrering av PMN gjennom ytre membran og mellom epitelceller. (e) Akkumulering av PMN inni alveolen og i ytre epitellag. (f) Migrering av PMN etter ødeleggelse av epitelceller (en mulig mekanisme for kryssing av epitellaget) (Harmon, 1995).

Gjennom kroppens prosess med å beskytte individet ved infeksjonen i juret, vil melken påvirkes på en negativ måte. Permeabiliteten mellom blodårer og kjertelvev endres, og dette medfører at blodkomponenter lekker inn i melken. I tillegg vil infeksjonen medføre mindre syntetisering av melk, og at noen syntetiserte melkekomponenter lekker ut av alveolene. Aggregering av leukocytter vil kunne medføre tette kanaler, slik at ikke all melk finner veien ut av juret. Selv etter at juret har blitt friskt igjen vil enkelte skader ved infeksjon ikke kunne repareres, og dette medfører nedsatt melkesyntetisering i juret permanent for individet. Alvorligheten av ettervirkningene vil variere med infeksjonens omfang og mikroorganismene involvert (Harmon, 1995). Figur 12 viser de potensielle skadene på juret etter en mastittinfeksjon.



Figur 12. Skader på juret etter mastittinfeksjon (Harmon, 1995).

Mastitt medfører endringer i melkens sammensetning. Sammensetningen av proteinene endrer seg ved at prosentandelen kasein minker, mens myseproteiner som albumin, immunoglobuliner og transferrin øker. Det blir også en økning i prosentandelen av det jernbindende proteinet laktoferrin, som man mener har en antimikrobiell effekt. Sammensetningen av melkens ioner vil også påvirkes av en mastittinfeksjon. Kaliumioner vil kunne forsvinne ut av melken via skadete epitelceller, hvilket vil føre til et lavere innhold enn i melk fra friske individer. Siden permeabiliteten mellom blodårene og epitelcellene er endret, vil natrium- og kloridioner lettere passere inn i melken. I tillegg vil en reduksjon i mengden kasein i melken medføre færre bindingssteder for kalsium, og følgelig gi en lavere kalsiumkonsentrasjon. pH-verdien i melken vil kunne øke grunnet flere blodkomponenter i melken enn ellers, og i tillegg er melk fra individer med mastitt assosiert med melk med flere frie fettsyrer og økt lipaseaktivitet (Harmon, 1995).

2.8 Jurets mikrobiota

Det er flere studier som nylig har undersøkt jurets mikrobiota, og disse studiene viser en stor diversitet i mikroorganismer. I en studie (Derakhshani et. al., 2018) ble sammensetningen av mikrobiota i juret og spenekanalen hos melkekyr utsatt for antimikrobiell dry cow therapy (DCT) undersøkt. Tørkeperioden i laktasjonssyklusen hos kyr er en god mulighet til å behandle infeksjoner i juret. Selve tørkeprosessen i seg selv vil bidra til eliminering av mikroorganismer, men det har vist seg å være mer effektivt kombinert med antimikrobiell behandling. Antibiotika vil kunne brukes til å behandle infeksjoner gjennom hele tørkeperioden (Laven, 2016).

I studiet til Derakhshani et. al (2018) ble jurets mikrobiota i undersøkt helt i starten av tørkeperioden før utførelse av antimikrobiell DCT, og helt mot slutten av tørkeperioden, det vil si ved kalving. Hensikten var å undersøke om jurets mikrobiota hadde noen endringer gjennom tørkeperioden etter utførelse av antimikrobiell DCT. I undersøkelsene ble det valgt ut to nisjer for analyser; spenekanalen og sekresjonsprodukter fra juret (melk og kolostrum). Kuene som ble valgt ut til analyse hadde ikke vært utsatt for mastittinfeksjon eller antibiotika minst 4 måneder før prøveuttaket.

Resultatene i studiet (Derakhshani et. al., 2018) viste at i begge nisjer av juret var *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* og *Actinobacteria* dominerende. Det viste seg å være størst endringer i mikrobiota i prøver isolert fra sekresjonsproduktene fra juret. Likevel viste kvalitative analyser at prøver isolert fra de to ulike tidspunktene fra begge nisjer av juret hadde mye til felles. Det viste seg at mikrobiota korrelert med mastitt som ble isolert fra juret før tørkeperioden, i mange tilfeller også var i prøvene etter kalving. Resultatene tyder på at mye av jurmikrobiota er svært robust mot langtidsvirkende antibiotika i tørkeperioden i laktasjonssyklusen.

I studiet til Derakhshani et. al (2018) ble det påvist vekst av bakterieslektene *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* og *Acinetobacter* i spenekanalen både før og etter DCT. I sekresjonsproduktene ble de samme bakterieslektene påvist, men *Streptococcus* og *Campylobacter* ble kun påvist før utførelse av DCT.

Bouchard et. al (2016) utførte en studie med fokus på isolering av MSB fra jurmikrobiota. I studiet ble prøver samlet inn både fra spenekanalen og fra kolostrum fra 20 kyr fordelt på to gårder. DNA-analyser av isolater viste at jurmikrobiota hovedsakelig besto av

Enterococcus (28,9 %), *Streptococcus* (28,9 %), *Lactobacillus* (22,4 %), *Enterobacteriaceae* (9,2 %), *Lactococcus* (6,6 %) og *Staphylococcus* (3,9 %). Videre identifisering viste at isolater for streptokokker og enterokokker stort sett var slekter assosiert med mastitt, dvs. *S. infantarius* og *S. uberis*. Særlig interessante MSB-slekter for studiet var *Lactococcus* og *Lactobacillus*, og nærmere bestemt artene *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. brevis*, *L. plantarum* og *L. casei*.

Det har i tillegg blitt utført studier på forekomsten av mikroorganismer i rå melk, og i og med at dette er melk som kommer direkte fra juret ofte uten videre bearbeiding, kan det også være relevant å studere disse resultatene. Quigley et. al. (2013) har laget en oversikt over hva vi vet om mikrobiota i rå melk fra ku, geit, sau og menneske. Undersøkelsene viste at rå melk fra kyr typisk vil inneholde mye MSB, spesielt *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* og *Enterococcus*. Melken inneholder også psykrotrofe bakterier som *Pseudomonas*, *Acinetobacter* og *Aeromonas*.

I en studie som så på mikroorganismer i rå melk benyttet til osteproduksjon i Danmark (Masoud et. al., 2012) ble det detektert 256 bakteriearter. *S. thermophilus* og *L. lactis* utgjorde henholdsvis 43,7 % og 19% av artene i melken. I studiet ble det i tillegg detektert mikrobiota tidligere assosiert med rå melk, bestående av *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*.

Addis et. al. (2016) sammenliknet nylige studier relatert til bakterievekst i melk fra friske spener hos kyr. Undersøkelsene viste at det vokser mye ulike bakterier i melk fra friske kyr, og de som ble isolert i størst grad var *Propionibacterium*, *Aeribacillus*, samt uklassifiserte Lachnospiraceae og Ruminococcaceae.

De overnevnte studiene viser at det er stor variasjon i hvilke bakterier som isoleres fra melk hos friske kyr, men at det generelt er mye MSB, psykrotrofe bakterier og patogener assosiert med mastitt. Hensikten med denne oppgaven er undersøke de metabolske egenskapene ved vekst i melk for noen utvalgte melkesyrebakterier og potensielle mastittpatogener isolert fra friske kyr. Målet er å finne ut om det finnes potensielle syrekulturer blant de undersøkte bakteriene, samt deres produksjon av metabolitter i melk.

3.0 Materialer og metoder

I prosjektet «Jurfrisk» ble det isolert flere tusen ulike bakteriestammer fra 60 friske kyr. Bakteriestammene ble identifisert ved hjelp av Maldi-TOF mass spectrometry. En del av prosjektet skal undersøke MSB blant disse isolatene for deres teknologiske egenskaper, det vil si deres evne til å vokse og metabolisere i melk. Da det ble isolert bare noen få stammer av MSB, ble det også valgt å inkludere et utvalg patogene bakterier i denne oppgaven og undersøke deres evne til å vokse i melk.

Det ble først utført innledende forsøk der det ble kontrollert vekst og stammerenhet for de utvalgte stammene. Videre ble det utført oppdyrking av stammer etterfulgt av nedfrysning. Etter frysing ble celletallet kontrollert, og hovedforsøket kunne utføres. Dette besto av screening av oppdyrkede stammer i melk og undersøkelse av ulike metabolitter ved bruk av metodene High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Headspace Gas Chromatography (HSGC) og pH-målinger.

3.1 Innledende forsøk

3.1.1 Oppdyrking av stamme

For å kunne undersøke stammens teknologiske egenskaper måtte de først dyrkes frem fra fryst tilstand. Stammene var lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i Eppendorfrør med 15 % vektvolum bestående av glycerol og dimetylsulfoxid (DMSO) for frysestabilitet. Hver stamme ble podet fra de nedfryste Eppendorfrørene til sterile reagensrør med 9 mL buljong ved å benytte engangspodeøser. Stammene ble dyrket i 24 t før rørene med buljong ble sjekket for vekst. Rør med lite eller ingen vekst fikk stå i 48 t.

Stammene av slekten *Lactococcus* ble dyrket i M17-buljong (Merck, Darmstadt, Tyskland) som er et medium som fremskynder vekst av *Lactococcus* spp. i melkeprodukter. For stammer av slekten *Lactobacillus* ble det valgt å benytte De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) buljong (Merck, Darmstadt, Tyskland) som er et medium som fremskynder vekst av laktobasiller. Patogene bakterier ble dyrket i brain heart infusion (BHI) buljong (Merck, Darmstadt, Tyskland) som er et næringsrikt vekstmedium mange bakterier trives i.

Tabell 2 viser hvilke stammer som ble inkludert i forsøket, samt hvilket stammenummer de hadde.

Tabell 2. Oppdyrkede stammer med angitte stammenummer.

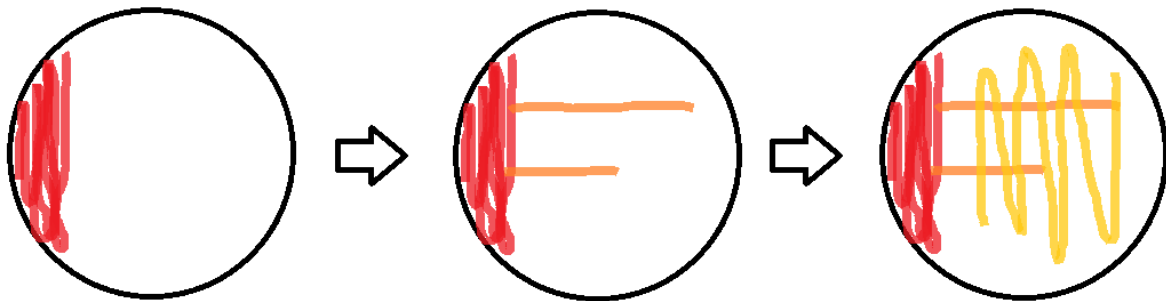
Stammer	Stamme nr.
<i>Lactococcus garvieae</i>	B385-1
<i>Lactococcus garvieae</i>	M385-1
<i>Lactococcus lactis</i>	MA120-4
<i>Lactococcus lactis</i>	M227-2
<i>Lactococcus lactis</i>	B227-1
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	M367-3
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	MRS71-2
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	M73-4
<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRS99-1
<i>Lactobacillus pentosus</i>	MRS102-1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MA45-1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS70-1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS89-1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS373-1
<i>Aerococcus viridans</i>	BO80-1
<i>Corynebacterium bovis</i>	BO267-3
<i>Corynebacterium bovis</i>	BO266-4
<i>Enterococcus faecalis</i>	BO37-1
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	MRS9-1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BO109-3
<i>Streptococcus uberis</i>	BO94-1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	BO151-1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	BO152-1

Stammenumrene refererer til hvilket medium stammene ble isolert fra, samt fra hvilken ku og uttak prøven ble isolert ifra. Bokstavene i stammenumrene kan forklares slik: B= blodagar, BO= blodagar anaerob, MA= melkeagar, MRS= MRS-agar og M= M17-agar.

Etter påvisning av vekst ble stammene podet over til nye rør med buljong. Disse rørene fikk stå i 24 timer før videre analyser. Stammene MA45-1, BO267-3 og BO266-4 ville ikke vokse i buljong og ble derfor ikke med i videre analyser.

3.1.2 Kontroll av renhet

Renheten til prøvene ble kontrollert ved utstrykning på ferdigstøpte agar-skåler. Det ble benyttet agar av samme medium som tidligere for de respektive stammene. En podeøse med oppdyrket buljong ble spredd i hjørnet av skålen. Podeøsen ble brent av før den ble benyttet til å dra to streker ut fra hjørnet av skålen. Igjen ble podeøsen brent av og de ble laget et sikksakkmønster mellom de to strekene på skålen. Utstrykningen ble utført på denne måten for å oppnå en tilstrekkelig fortynning av prøven slik at separate kolonier kunne observeres. Metoden er illustrert i figur 13.



Figur 13. Utstrykningsmetode for kontroll av stammerenhet.

Skålene ble inkubert ved 30 °C i 2-3 døgn før kolonivekst ble kontrollert. Laktobasillene, *E. faecalis* og *P. pentosaceus* vokste veldig tregt ved aerob inkubering, og ved nærmere undersøkelser viste det seg at de foretrakk anaerobe vekstforhold. Ved videre analyser ble det derfor valgt å inkubere disse anaerobt.

For noen stammer ble det observert ulik kolonistørrelse, og for disse ble det tillaget våtpreparater for undersøkelse i mikroskop. I alle tilfeller viste det seg at celler fra både de små og store koloniene hadde tilsvarende morfologi, og alle prøvene ble derfor betraktet som renkulturer.

3.1.3 Opparbeidelse av prøvemateriale

Når det var konstatert at kulturene var rene, ble det dyrket og opparbeidet prøvemateriale for videre poding i melk. Hensikten med dette var å tillage podematerialet som kunne brukes videre til å undersøke vekst i melk. Det var viktig å ha en standardisert frossen kultur slik at antall bakterier i utgangspunktet var tilnærmet likt ved hvert forsøk.

Hver stamme ble podet i buljong i sterile 50 mL falcon-rør og inkubert ved 30 °C i 24 timer. Det ble podet 500 µL til 45 mL buljong, og hver stamme ble podet i samme buljong som ved tidligere oppdyrking. Etter ferdig inkubering ble falcon-rør med laktobasiller og laktokokker sentrifugert i en sentrifuge av typen Heraeus Multifuge X3R centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Lagensfeld, Tyskland). Rørene ble sentrifugert med en hastighet på 8000 rpm (7012 rcf) i 10 minutter.

For de patogene bakteriene ble det benyttet en annen sentrifuge fordi det var nødvendig å benytte en som befant seg inne på laboratoriet for patogene mikroorganismer. Det ble derfor benyttet en sentrifuge av typen Centrifuge 3430 R (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Rørene ble sentrifugert med en hastighet på 7500 rpm (6603 rcf) i 10 minutter. Grunnen til at det ble benyttet lavere sentrifugeringshastighet i for disse rørene var fordi 7500 rpm var maksimal sentrifugeringshastighet for denne sentrifugen.

Etter sentrifugering ble supernatanten forsiktig dekantert av og 40 mL Ringers løsning ble tilsatt bakteriepelleten for å rense pelleten for buljong. Pelleten ble ristet opp og sentrifugeringen ble utført igjen under samme betingelser som forrige sentrifugering. Igjen ble supernatanten dekantert forsiktig av, og rørene ble tilsatt 15 mL UHT-melk. Pelleten ble ristet opp godt i melken, og det ble overført 1,8 mL prøvemateriale av hver prøve til 7 sterile 2 mL Eppendorfrør. Rørene ble raskt overført til fryseren ved – 80 °C.

For de fleste stammene gikk det greit å løse pelleten både i Ringers løsning og UHT-melk, men for stammene av *S. chromogenes* bød dette på utfordringer da det var vanskelig å løse opp pelleten.

3.1.4 Undersøkelse av bakteriecelletall i nedfrosne kulturer

For å kunne ha et likt utgangspunkt for alle stammene ved poding i melk ble hver frosne stamme undersøkt for celletall. Hver stammesuspensjon fikk tine i romtemperatur i omtrent 1 t. Prøvene ble fortynnet med Ringers løsning til 10^{-7} , 10^{-8} og 10^{-9} , og støpt inn i sine respektive agar-medier. Antall kolonier ble avlest for alle prøver etter 2-3 dager ved 30 °C.

3.2 Hovedforsøk

3.2.1 Poding i melk

Hovedhensikten med dette forsøket var å undersøke bakteriens vekst i melk og tilhørende metabolisme. Podingen ble utført ved å ta ut en opparbeidet prøve fra fryseren hver halvtime og pode denne i melk. Målet var å ha et celletall på omtrent log 7 for hver prøve ved poding, og podemengden av hver prøve ble beregnet deretter.

Celltallene fra forforsøkene ble benyttet til å bestemme podemengden av hver prøve ved dyrking i melk. Hver stamme ble podet i sterile flasker med 100 mL UHT-melk. Flaskene ble ristet godt, og det ble overført 3 mL til sterile reagensrør. Reagensrørene ble satt til kjøling, for å senere kunne benyttes til beregning av celletall før inkubering. Melken i 100 mL flaskene ble overført til to 50 mL flasker, og flaskene ble satt til inkubering ved 22 °C og 30 °C. Etter nøyaktig 24 t ble flaskene tatt ut av inkubatorene, og det ble overført 3 mL av hver flaske til sterile reagensrør for å kunne beregne celletall etter vekst i 24 t.

Noen av stammene som viste seg å ha interessante egenskaper i analyseringen ble utsatt for gjentak. Denne gangen var det også ønskelig å analysere stammene etter 48 t. Stammene ble podet i flasker med 200 mL UHT-melk som ble fordelt på fire 50 mL flasker. To av flaskene ble satt til inkubering ved 22 °C og to ble inkubert ved 30 °C. Etter 24 t ble det tatt ut en flaske ved hver temperatur og de to siste flaskene ble tatt ut etter 48 t.

3.2.2 Analysering av metabolitter ved vekst i melk

3.2.2.1 HSGC

Etter ferdig inkubering ble det målt ut prøvemateriale til HSGC og HPLC. HSGC er en kromatografisk metode som detekterer flyktige forbindelser. For dette prøvematerialet ble det veid inn 10,00 g i headspace-flasker (Machery Nagel, Dueren, Tyskland), som umiddelbart ble forseglet med teflonbelagt septa med aluminiumring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Videre ble prøvene satt inn i en Agilent Technologies 7679A automatisk headspace sampler med et 6890 GC system og en flamme ioniseringsdetektor. Det ble benyttet programvaren Open LAB EZChrom.

Headspace-flaskene ble varmet opp til 50 °C i 45 minutter med miksing bestemt til 70 ristinger i minuttet. Helium ble benyttet som bæregass med en total flow på 11,1 mL i minuttet, og headspace-flaskene ble satt under trykket 10 PSIG i 1,50 minutter før injeksjon. Injeksjonstiden var på 30 sekunder.

Til separering av komponentene ble det benyttet en CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland), og følgende temperaturprogram ble benyttet i analysen: 53°C, 1 min; økning med 15°C min⁻¹ til 70°C, 2 min; økning med 22°C min⁻¹ til 130°C, 3 min. Selve kolonnen hadde en filmtykkelse på 5,0 µm og kolonnen var 25 meter lang med en indre diameter på 0,53 mm. Komponentene ble separert med basis i komponentenes ulike affinitet for kolonnens stasjonære fase samt ulik flyktighetsgrad. Mengden av de ulike forbindelsene ble identifisert ved kalibrering av standardløsninger med kjent konsentrasjon av følgende komponenter: acetaldehyd, diacetyl, etylacetat, 2-butanon, 2-metyl-butanal, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanal, 3-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol (Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, 1-butanol, 2-butanol og 2.3-pentadion (Merck, Tyskland).

3.2.2.2 HPLC

Konsentrasjonen av organiske syrer og karbohydrater i prøvematerialet ble målt ved hjelp av HPLC. 1,00 g prøvemateriale ble veid inn i 10 mL reagensrør. Deretter ble det tilsatt 2,5 mL ionebyttet vann, 200 µm 0,5 M H₂SO₄ og 8 mL acetonitril. Prøvene ble ristet godt før de ble plassert i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 minutter. Prøvene ble satt til sentrifugering i 10 minutter ved 3300 rpm i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Etter ferdig sentrifugering ble prøvene filtrert gjennom 0,2 µm PTFE Membran filter (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i HPLC-rør. Selve HPLC-analysen ble utført ved benyttelse av HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore). Dette instrumentet besto av en pumpe, autosampler, kolonneovn, DAD-UV detektor og RI-detektor og det ble benyttet programvaren OpenLab CDS (Agilent Technologies, Singapore). 25 µl av prøvematerialet ble ført igjennom en forkolonne av typen Cation-H refill før komponentene ble separert i en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Kolonnetemperaturen var på 32 °C, og det ble benyttet 5 mM H₂SO₄ som mobile fase med en hastighet på 0,4 mL i minuttet.

For kalibrering av prøvene ble det benyttet standardløsninger. Karbohydrater benyttet til standardløsning var maltose, fruktose, laktose, glukose og galaktose, mens det for organiske syrer ble benyttet sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina). Karbohydratene og eddiksyre ble detektert ved hjelp av en RI-detektor, mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en DAD-UV detektor. Standardløsningene ble preparert på samme måte som prøvematerialet.

For identifikasjon av komponentene i prøvematerialet ble retensjonstid i prøvematerialet sammenliknet med retensjonstid i standardløsningene. For beregning av konsentrasjonene ble de integrerte arealene av de ulike komponentene sammenliknet med arealene til standardløsninger med kjente konsentrasjoner.

3.2.2.3 pH

Det ble det målt pH i prøvematerialet ved bruk av PHM 92 LAB pH Meter (Radiometer Analytical SA, København, Danmark). pH-meteret ble kalibrert med bufferløsninger (Merck, Darmstadt, Tyskland) med pH 4,01 og pH 7,00 og temperaturen ble satt til 20 °C. For prøver med patogene bakterier ble det benyttet PHM 102 LAB pH Meter (Radiometer Analytical SA, København, Danmark) som fungerer ved samme betingelser.

4.0 Resultater

4.1 Forforsøk

Før hovedforsøket kunne igangsettes var det nødvendig å utføre noen forforsøk og forberedelser. Først ble de aktuelle, utvalgte, stammene undersøkt for vekst i buljong. Deretter ble stammenes renhet undersøkt med utstrykning, og for de rene stammene ble det opparbeidet podematerialet. For å ha et utgangspunkt for podemengde i hovedforsøket ble celletall undersøkt for alle stammer.

4.1.1 Vekst i buljong

Det første som ble undersøkt for alle bakteriene var deres evne til å vokse i buljong. Kun de stammene som ville vokse i buljong ble tatt med i videre forsøk, og det er derfor bare disse som har blitt gitt navn. Tabell 3 viser navn på hver stamme, hvilket stamnummer prøvene hadde i fryseren og deres vekst i buljong.

Tabell 3. Oppdyrkede stammer med angitte stamnummer og vekstutslag i buljong.

Navn	Stamme	Stamme nr.	Vekst (+)/ikke-vekst (-)
LG1	<i>Lactococcus garvieae</i>	B385-1	+
LG2	<i>Lactococcus garvieae</i>	M385-1	+
LL1	<i>Lactococcus lactis</i>	MA120-4	+
LL2	<i>Lactococcus lactis</i>	M227-2	+
LL3	<i>Lactococcus lactis</i>	B227-1	+
LR	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	M367-3	+
LA1	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	MRS71-2	+ (48 t)
LA2	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	M73-4	+ (48 t)
LPA	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRS99-1	+
LPE	<i>Lactobacillus pentosus</i>	MRS102-1	+ (48 t)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MA45-1	-
LPL1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS70-1	+
LPL2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS89-1	+
LPL3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS373-1	+
AV	<i>Aerococcus viridans</i>	BO80-1	+
	<i>Corynebacterium bovis</i>	BO267-3	-
	<i>Corynebacterium bovis</i>	BO266-4	-
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>	BO37-1	+
PP	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	MRS9-1	+
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BO109-3	+
SU	<i>Streptococcus uberis</i>	BO94-1	+
SC1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	BO152-1	+ (48 t)
SC2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	BO151-1	+

Tabell 3 viser at *Lb. plantarum* med stammenr. MA45-1 ikke ville vokse i buljong, og det samme gjaldt *Corynebacterium bovis*. Stammer som hadde behov for lenger tid til vekst i buljong var *Lb. acidipiscis*, *Lb. pentosus* og *St. chromogenes* med stammenr. BO152-1.

4.1.2 Kontroll av renhet

Samtlige prøver så ut til å kun bestå av en art. Dette ble evaluert ved visuell inspeksjon og mikroskopering av våtpreparater.

4.1.3 Undersøkelse av celletall

Etter opparbeidelse av prøvemateriale ble alle prøver fryst ned til $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deretter ble det smeltet et eksemplar av hver prøve til undersøkelse av celletall. Resultatene ble benyttet til beregning av prøvefortynning i hovedforsøket. Det var ønskelig med et startpunkt i podet melk på omtrent log 7, og det ble valgt ut mengde podemateriale deretter. Celletall i nedfryste prøver og valg av fortynning i hovedforsøket er vist i tabell 4.

Tabell 4. Celletall for stammer etter nedfrysning og beregnet podemengde til hovedforsøk.

Navn	Nr	Celletall (log CFU ml ⁻¹)	Podemengde hovedforsøk (ml per 100 ml melk)
LG1	B385-1	8,96	1
LG2	M385-1	8,83	1
LL1	MA120-4	8,22	1
LL2	M227-2	9,70	0,1
LL3	B227-1	9,92	0,1
LR	M367-3	8,91	1
LA1	MRS71-2	9,44	0,5
LA2	M73-4	7,14	1
LPA	MRS99-1	9,43	0,5
LPE	MRS102-1	8,67	1
LPL1	MRS70-1	9,12	1
LPL2	MRS89-1	9,49	0,5
LPL3	MRS373-1	9,26	1
AV	BO80-1	8,09	1
EF	BO37-1	9,40	1
PP	MRS9-1	7,94	1
SE	BO109-3	9,03	1
SU	BO94-1	8,87	1
SC1	BO152-1	8,28	1
SC2	BO151-1	8,78	1

Tabell 4 viser at det ble benyttet 0,1, 0,5 eller 1 ml av podematerialet til poding i 100 ml melk for å oppnå et utgangspunkt på log 7. For prøver med log 8 CFU ml⁻¹ burde det ha blitt benyttet 2 mL prøvemateriale, men så mye var ikke tilgjengelig, og det ble derfor benyttet 1 ml også for disse prøvene. Rådata for utregning av log CFU ml⁻¹ finnes i vedlegg.

4.2 Metabolisme i melk for utvalgte bakterier

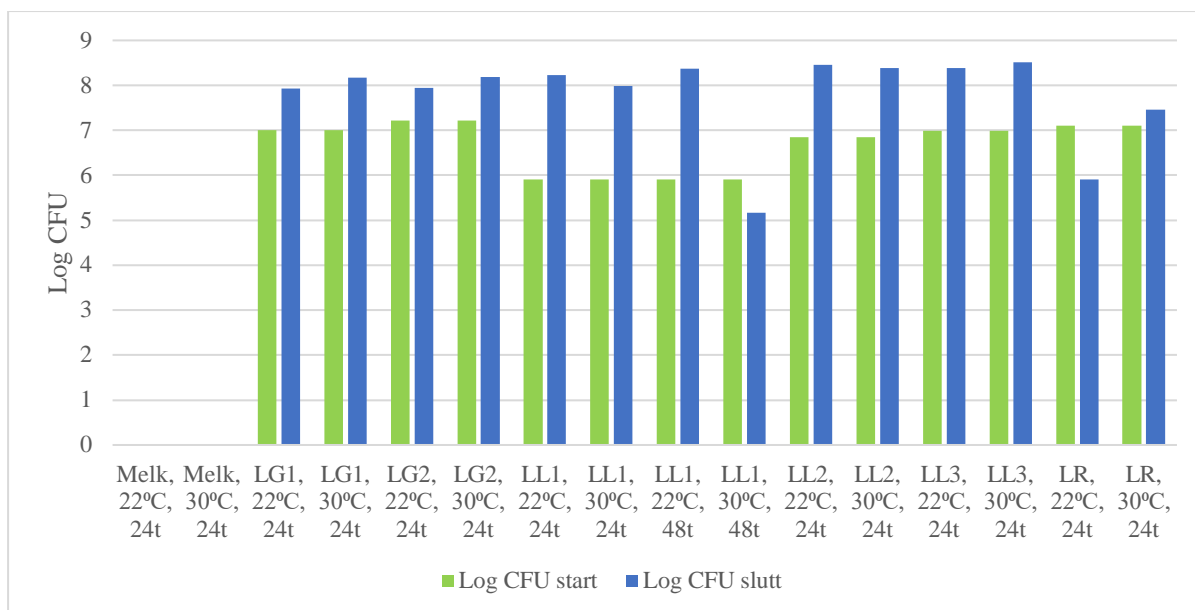
I denne seksjonen vil det fremlegges resultater for analyse av pH og produksjon av metabolitter for utvalgte bakterier og melk som kontrollprøve. Det ble utført analyser av celletall, pH, organiske syrer, karbohydrater og flyktige forbindelser i melk podet med bakterier. Resultatene vil presenteres som diagrammer. For laktokokkene og laktobasillene var det kun en stamme innen hver slekt som var aktuelle for mer dyptgående forsøk.

4.2.1 Laktokokker

Seks ulike stammer ble analysert etter vekst i UHT-melk ved 22 °C og 30 °C etter 24 t. Stammene ble navngitt LG (*Lc. garvieae*), LL (*Lc. lactis*) og LR (*Lc. raffinolactis*). I de tilfeller der det var flere stammer av samme art ble stammene navngitt med nummer etter navn, for eksempel LL1, LL2 og LL3. Senere ble det utført tre gjentak av analysene for LL1, som ble utført etter vekst i melk ved 22 °C og 30 °C og etter både 24 og 48 t. LL1 ble valgt ut til nye forsøk da den hadde mest vekst og produksjon av melkesyre. I figurene vil resultater for LL1 ved både 24 og 48 t presenteres. Resultater fra første forsøk med LL1 viste mye avvik fra de andre parallellene, og det ble derfor valgt å utelate disse resultatene ved utregning av gjennomsnitt og standardavvik. For alle analyser ble melk benyttet som kontrollprøve, og disse resultatene presenteres i hver figur til sammenlikning.

Av resultater er det valgt å illustrere komponenter som viste interessante forskjeller mellom prøvene. For følgende komponenter ble det detektert svært små forskjeller mellom prøvene: 2-methyl-propanal, 2-butanon, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-butanal, 2-methyl-butanal, 2,3-pentadione, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol og urinsyre. Det var også noen komponenter som ikke ble registrert i det hele tatt, og som heller ikke er illustrert i resultatene: 2-butanol, etylacetat, glukose og ravsyre.

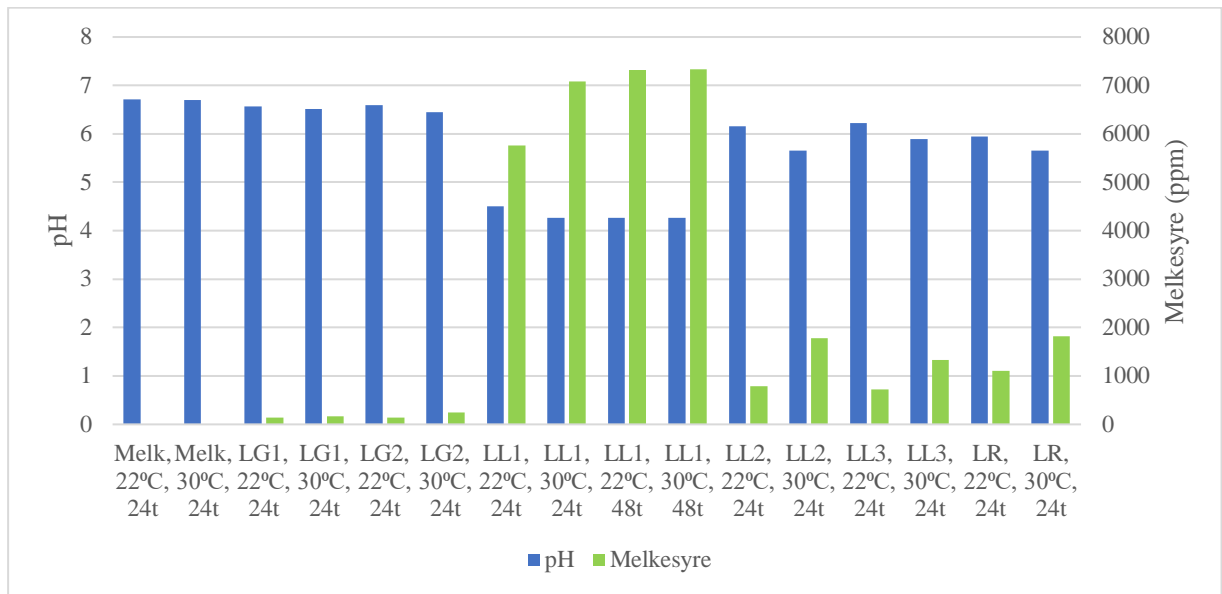
Analyse av celletall ble utført rett før og etter inkubering for alle prøver. Figur 14 viser en sammenlikning av celletall ved start og celletall etter ferdig inkubering.



Figur 14. Celletall oppgitt i log CFU før inkubering og etter inkubering ved både 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Figur 14 viser at de fleste stammer hadde et celletall på rundt log 7 CFU ml⁻¹ før inkubering, med unntak av LL1 som startet på log 5,9 CFU ml⁻¹. Ulikhetene i celletall ved start kan skyldes ulik mengde celler ved poding. Etter inkubering i 24 t hadde nesten samtlige stammer oppnådd log 8 CFU ml⁻¹ eller høyere, med unntak av LR som hadde et mye lavere celletall. LL1 inkubert i 48 t ved 30 °C skiller seg ut med et lavt celletall på log 5,16 CFU ml⁻¹ etter inkubering. For de fleste stammer var celletallet høyere etter 24 t for stammer inkubert ved 30 °C, med unntak av LL1 og LL2, der celletallet var høyest ved 22 °C.

pH i melk ble målt etter vekst ved både 22 °C og 30 °C, samt at melkesyre i prøvene ble analysert ved bruk av HPLC. Resultatene for disse målingene er presentert i figur 15.

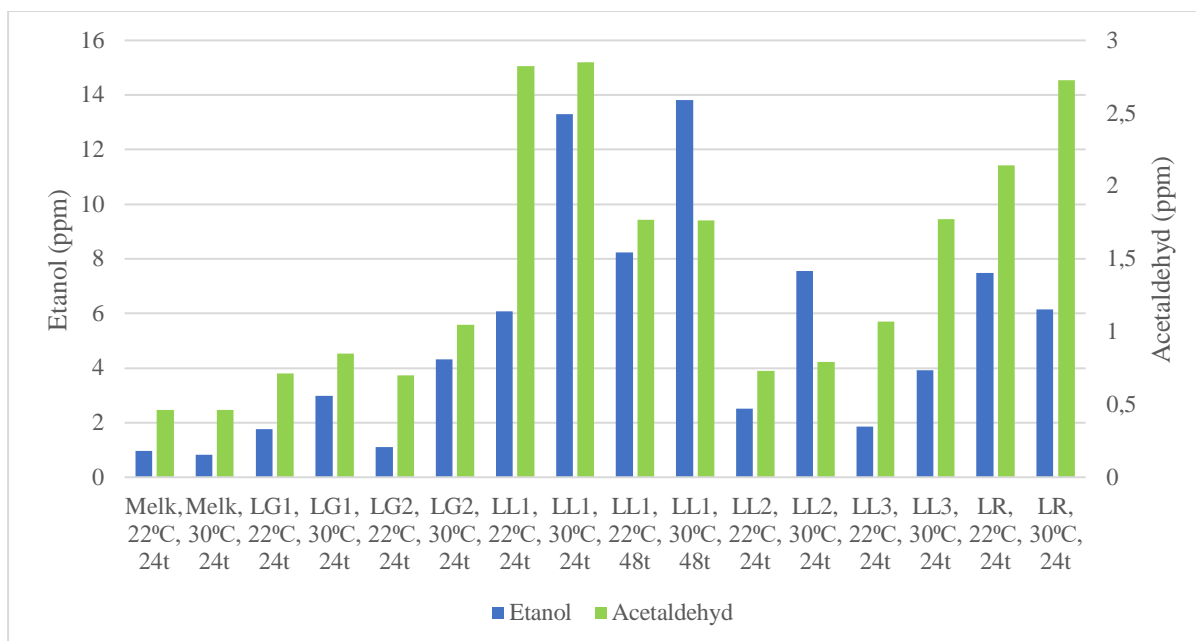


Figur 15. Innhold av melkesyre (ppm) og pH-verdier for melk inokulert med laktokokker inkubert ved 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Figur 15 viser at var betydelig mer produksjon av melkesyre i melk podet med LL1 enn i melk podet med de andre laktokokkene. Resultatene viser også høyere produksjon av melkesyre i melk podet med LL2, LL3 og LR enn melk podet med LG1 og LG2. For samtlige stammer var innholdet av melkesyre høyere ved 30 °C enn 22 °C. I kontrollprøven ble det ikke detektert melkesyre.

Når det gjelder resultatene for pH, kan det observeres at melk podet med LL1 hadde lavere pH enn melk podet med de andre stammene, med pH-verdi ned på 4,2 etter 48 t inkubering. LL2, LL3 og LR hadde lavere pH enn kontrollprøven og LG1 og LG2. For samtlige stammer var pH lavere etter inkubering ved 30 °C enn 22 °C.

Etanol og acetaldehyd er to flyktige komponenter av stor interesse når det kommer til MSB sin metabolisme. Konsentrasjonene i melk av disse komponentene er vist i figur 16.

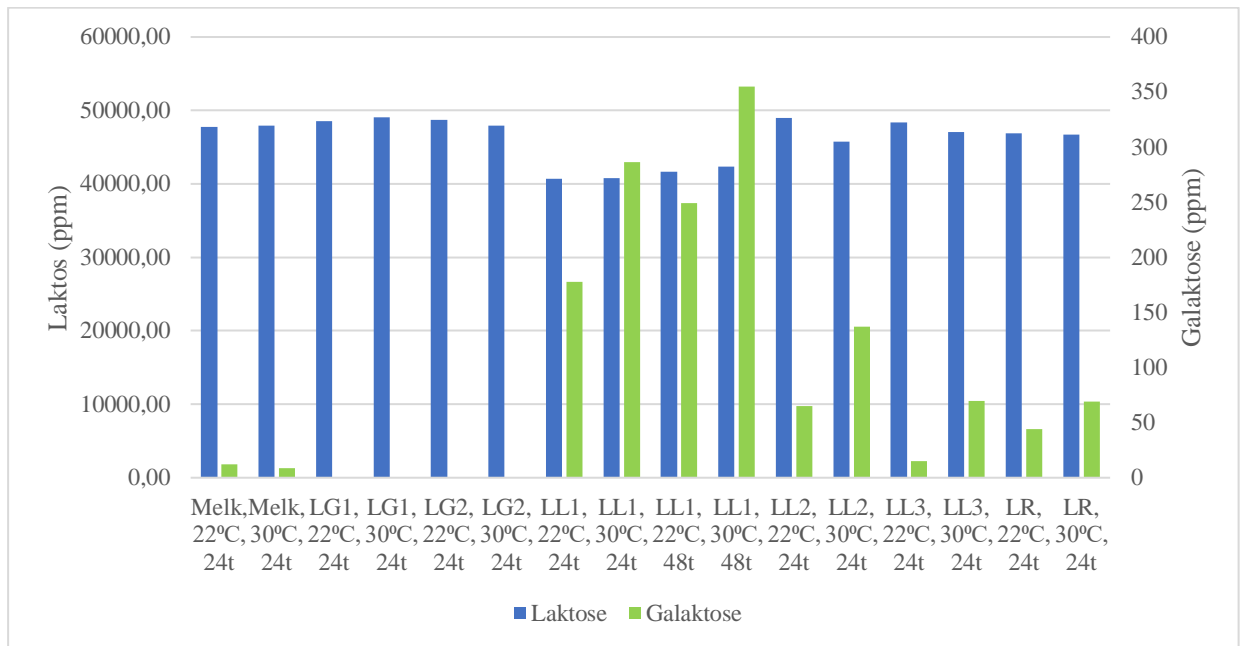


Figur 16. Innhold av acetaldehyd og etanol (ppm) for melk inokulert med laktokokker inkubert ved 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Innholdet av etanol varierte mellom de ulike prøvene og etter inkubasjon ved ulike temperaturer. LL1 viste høyest produksjon av etanol ved 30 °C både etter 24 og 48 t, med et innhold på henholdsvis 13,3 og 13,8 ppm. Ved 22 °C var innholdet av etanol i melk podet med LL1 betydelig lavere. LG1, LG2 og LL3 viste lavest produksjon av etanol. LL2 viste lav produksjon av etanol ved 22 °C, men en produksjon på 7,6 ppm ved 30 °C. LR skiller seg ut ved å ha høyere produksjon av etanol ved 22 °C enn 30 °C.

Når det gjelder produksjon av acetaldehyd var det igjen LL1 som skilte seg ut med høyere verdier, og etter 24 timer var de høyeste konsentrasjonene 2,82 ppm ved 22 °C og 2,85 ppm ved 30 °C. LL3 og LR fikk også høyere verdier for acetaldehyd, mens for de resterende stammene og kontrollprøven ble innholdet av acetaldehyd målt til 1 ppm eller lavere.

Når det gjelder karbohydrater er det spesielt interessant å studere melkens innhold av laktose, glukose og galaktose etter vekst av MSB. Glukose ble ikke funnet i noen prøver etter inkubering, men Figur 4 viser innholdet av laktose og galaktose i de ulike melkeprøvene.

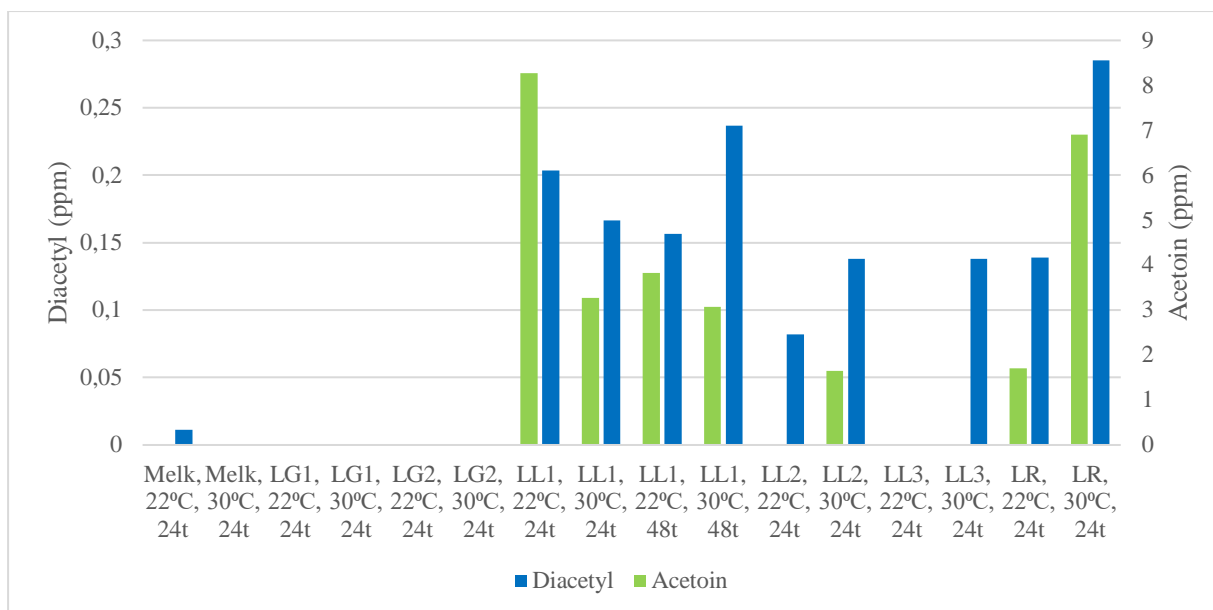


Figur 17. Innhold av laktose og galaktose (ppm) for melk inokulert med laktokokker inkubert ved 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Figur 17 viser at laktoseinnholdet lå på mellom omtrent 46 000 og 49 000 ppm for de fleste stammer og for kontrollprøven. Hos LL1 var derimot konsentrasjonen av laktose redusert til mellom 40 000 og 42 000 ppm.

Galaktose ble ikke detektert i melk podet med LG1 og LG2, og det ble funnet meget lave verdier på mellom 8 og 12 ppm i kontrollprøven. Den høyeste konsentrasjonen av galaktose ble funnet i melk podet med LL1, og etter 24 t inkubasjon ble det registrert 177 ppm ved 22 °C og 286 ppm ved 30 °C. Etter 48 t hadde konsentrasjonen økt både ved 22 °C og 30 °C. I prøver dyrket med LL2, LL3 og LR ble det også detektert små mengder galaktose.

Videre ble melken analysert for sitronsyre, acetoin og diacetyl. Sitronsyre ble ikke metabolisert av noen av laktokokkene, men konsentrasjonen av acetoin og diacetyl er presentert i figur 18.

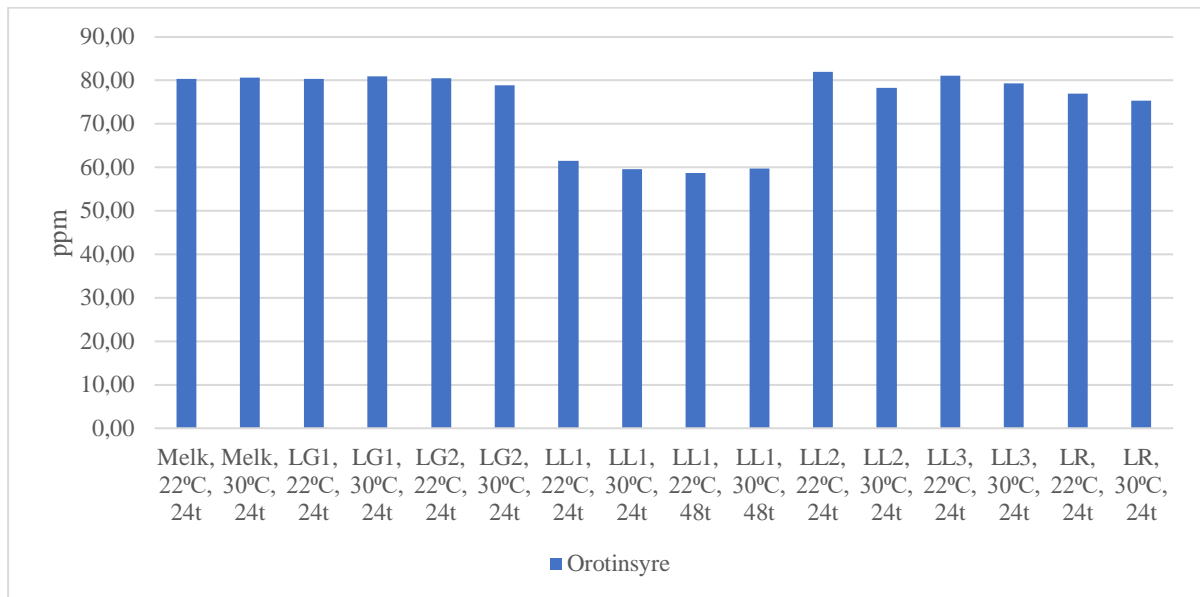


Figur 18. Innhold av diacetyl og acetoin (ppm) for melk inokulert med laktokokker inkubert ved 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Figur 18 viser at funn av diacetyl og acetoin var noe sporadisk, og at innholdet var lavt for samtlige prøver. Det ble ikke detektert hverken diacetyl eller acetoin i LG1 og LG2. Diacetyl ble detektert i melk podet med både i LL1, LL2, LL3 og LR, men det ser ikke ut til å være sammenheng mellom konsentrasjon og inkubasjonstemperatur.

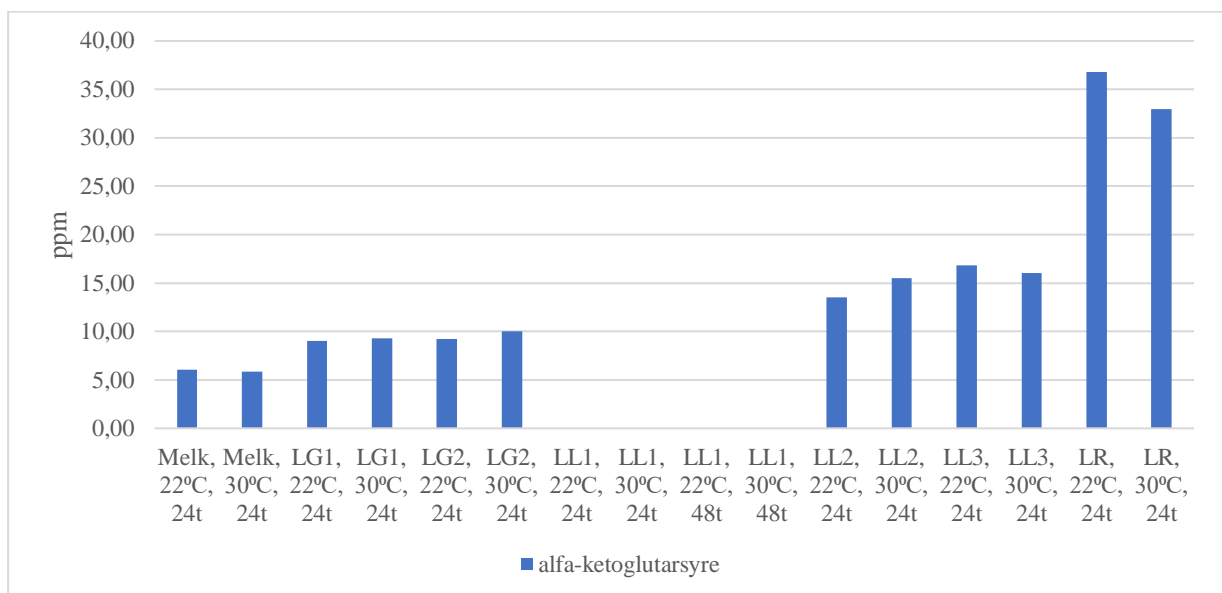
Acetoin ble detektert i melk podet med LL1, LL2 og LR, men for LL3 ble det kun detektert ved 30 °C. Heller ikke for acetoin ser det ut til å være sammenheng mellom konsentrasjon og inkubasjonstemperatur.

Konsentrasjon av orotinsyre, alfa-ketoglutarsyre og aceton i melk er presentert i figur 19, 20 og 21.



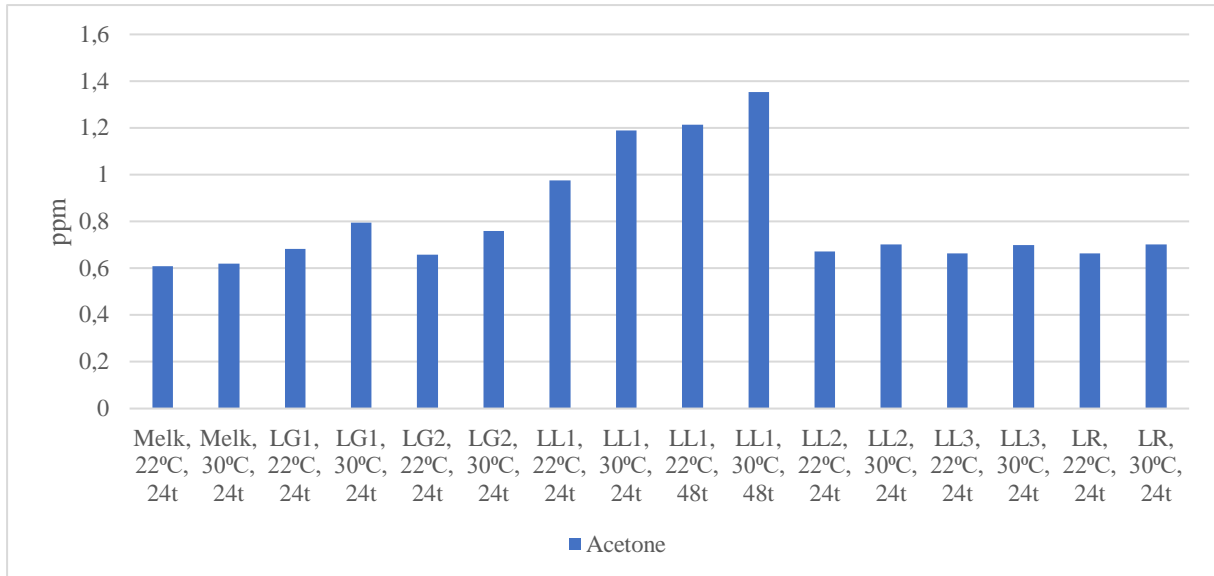
Figur 19. Innhold av orotinsyre (ppm) for melk inokulert med laktokokker inkubert ved 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Figur 19 viser at kontrollprøven inneholdt omtrent 80 ppm orotinsyre, og bare melk inokulert med LL1 viste en nedgang i nivå til nærmere 60 ppm etter 24 og 48 t inkubasjon.



Figur 20. Innhold av alfa-ketoglutarsyre (ppm) for melk inokulert med laktokokker inkubert ved 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Figur 20 viser at det ble registrert like over 5 ppm alfa-ketoglutarsyre i kontrollmelken, og mellom 9 og 10 ppm for LG1 og LG2. For LL1 ble det ikke registrert alfa-ketoglutarsyre hverken etter 24 eller 48 t inkubasjon. LL2 og LL3 viste omtrent likt innhold av alfa-ketoglutarsyre med verdier konsentrasjon fra 13,52 til 16,82 ppm. LR viste høyest konsentrasjon alfa-ketoglutarsyre med 36,83 ppm ved 22 °C og 32,96 ppm ved 30 °C.



Figur 21. Innhold av aceton (ppm) for melk inokulert med laktokokker inkubert ved 22 °C og 30 °C. LG= *Lc. garvieae*, LL= *Lc. lactis*, LR= *Lc. raffinolactis*.

Figur 21 viser at kontrollmelken inneholdt 0,6 ppm aceton, og at LL1 skiller seg ut med et høyere innhold av aceton enn de resterende prøvene. Generelt ble det registrert mer aceton ved 30 °C enn 22 °C.

Andre interessante funn i resultatene var at DL-pyrogglutamic syre, eddiksyre og maursyre kun ble detektert i LL1, mens pyrurdruesyre ble registrert både for LL1 og LR.

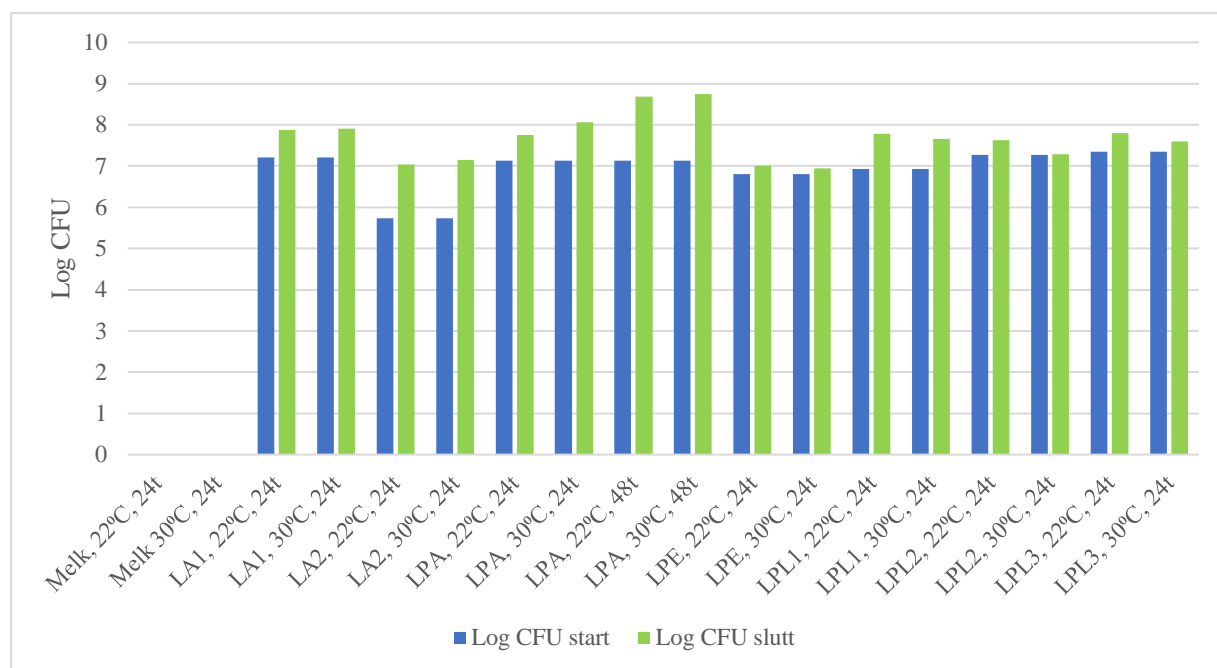
4.2.2 Laktobasiller

Syv ulike stammer ble analysert etter vekst i melk ved 22 °C og 30 °C etter 24 t. Stammene ble navngitt LA (*Lb. acidipiscis*), LPA (*Lb. paracasei*), LPE (*Lb. pentosus*) og LPL (*Lb. plantarum*). I de tilfeller med flere stammer av samme slekt og art ble navnene tilført nummer, for eksempel LPL1, LPL2 og LPL3. Ved senere tidspunkt ble det utført tre gjentak av analysene for LPA, som ble utført etter vekst i melk ved 22 °C og 30 °C og etter både 24

og 48 t. I figurene vil resultater for LPA ved både 24 og 48 t bli presentert. Det ble ikke utført gjentak av analyser for noen andre laktobasiller enn LPA. Resultater fra første forsøk med LPA viste mye avvik fra de andre parallellene, og det ble derfor valgt å utelate disse resultatene ved utregning av gjennomsnitt og standardavvik. For alle analyser ble melk benyttet som kontrollprøve, og disse resultatene presenteres i hver figur til sammenlikning.

I resultatene er det valgt å illustrere komponenter som viste interessante forskjeller mellom prøvene. For følgende komponenter ble det detektert svært små forskjeller mellom prøvene: 2-butanon, 2,3-pentadione og urinsyre. Det var også noen komponenter som ikke ble registrert i det hele tatt, og som heller ikke er illustrert i resultatene: 2-metyl-propanal, 2-butanon, etylacetat, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol og ravsyre.

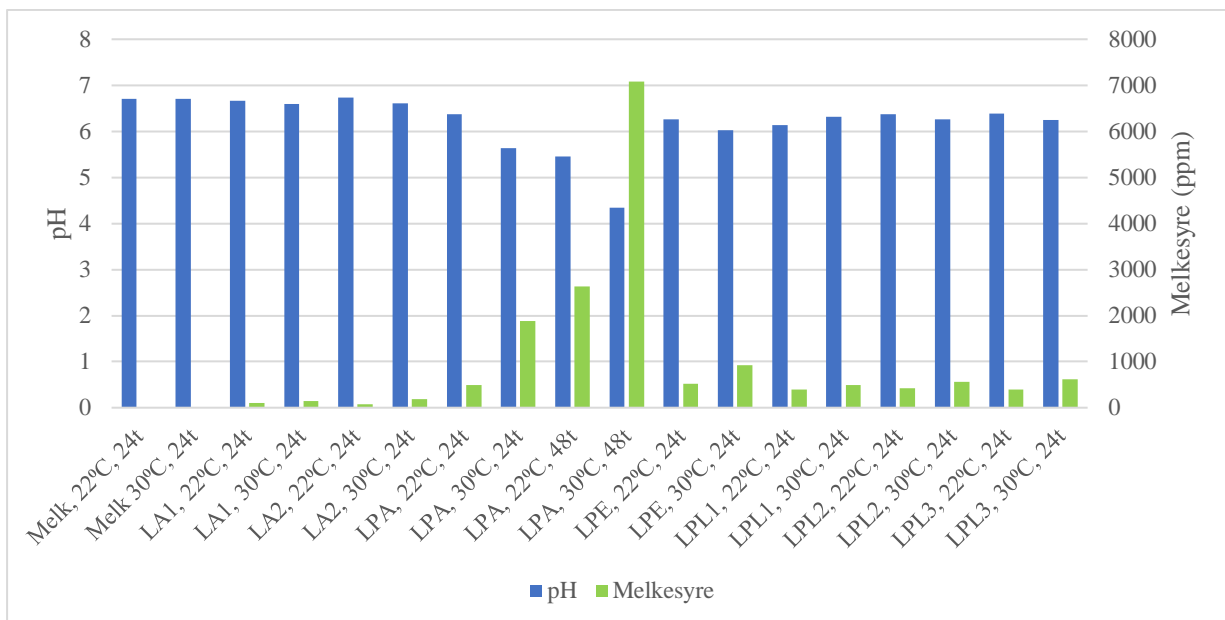
Analyse av celletall ble utført rett før og etter inkubering for alle prøver. Figur 22 viser en sammenlikning av celletall ved start og celletall etter avsluttet inkubering.



Figur 22. Celletall oppgitt i log CFU før inkubering og etter inkubering ved både 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

Figur 22 viser at de fleste stammer hadde et celletall på rundt log 7 CFU ml⁻¹ før inkubering, med unntak av LA2 som startet på log 5,7 CFU ml⁻¹. Grunnen til dette er at det var færre celler i podematerialet til LA2 enn for de andre laktobasillene (tabell 3). Etter inkubering i 24 timer hadde de fleste stammer nådd et celletall på mellom log 7 og 8 CFU ml⁻¹, med unntak av LA2 på omtrent log 7 CFU ml⁻¹ og LPE som nesten ikke vokste i det hele tatt. LPA inkubert i 48 t skilte seg også fra de andre stammene med et celletall etter inkubasjon på nærmere log 9 CFU ml⁻¹.

pH i melk ble målt etter vekst av stammer ved både 22 °C og 30 °C, samt at melkesyre i prøvene ble analysert ved bruk av HPLC. Resultatene for disse målingene er presentert i figur 23.

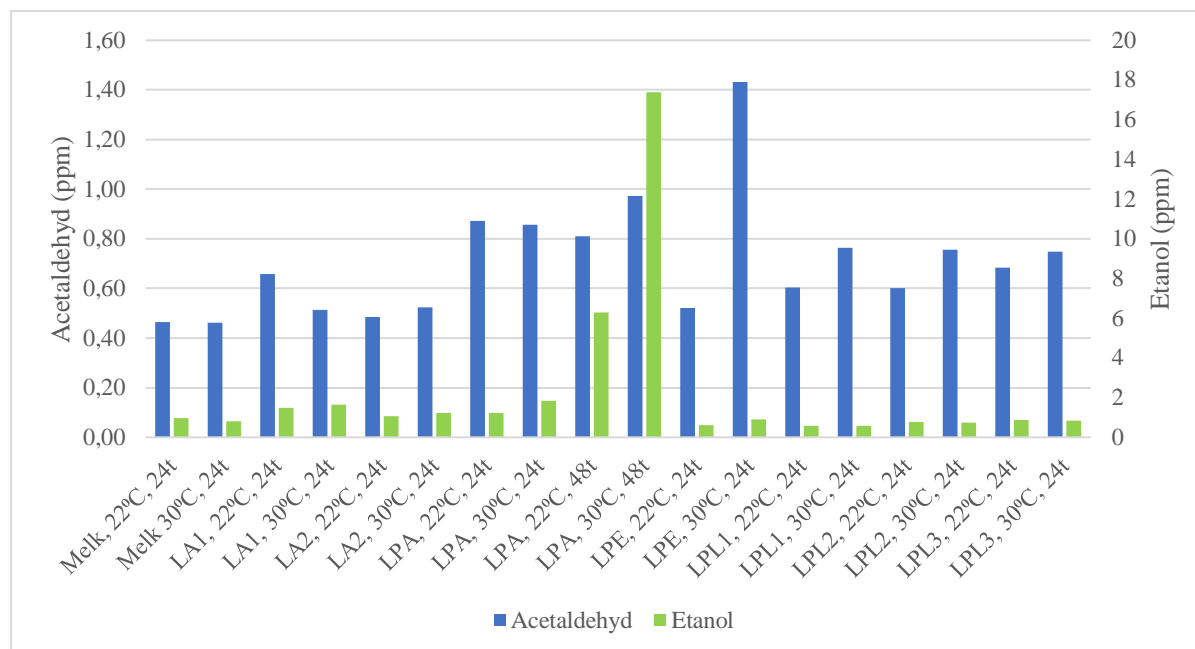


Figur 23. Innhold av melkesyre (ppm) og pH-verdier for melk inokulert med laktobasiller inkubert ved 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

Figur 23 viser at for samtlige stammer var pH mellom 6 og 7, med unntak av LPA. Etter 24 t inkubasjon ble pH i melk inokulert med LPA registrert til 6,4 ved 22 °C og 5,6 ved 30 °C. For LPA var det en tydelig nedgang i pH etter 48 t inkubasjon, og det ble registrert pH 5,5 ved 22 °C og pH 4,3 ved 30 °C. For samtlige stammer ble det registrert lavere pH ved 30 °C enn 22 °C, med unntak av LPL1 som hadde lavest pH ved 22 °C.

For alle stammer unntatt LPA var konsentrasjon av melkesyre på < 1000 ppm etter 24 t. Etter en inkubasjonstid på 48 t ved 30 °C hadde LPA høyeste konsentrasjon av melkesyre på 7084 ppm.

Etanol og acetaldehyd ble analysert i alle prøver ved bruk av HSGC, og konsentrasjonen av disse i melk podet med laktobasiller er vist i figur 24.

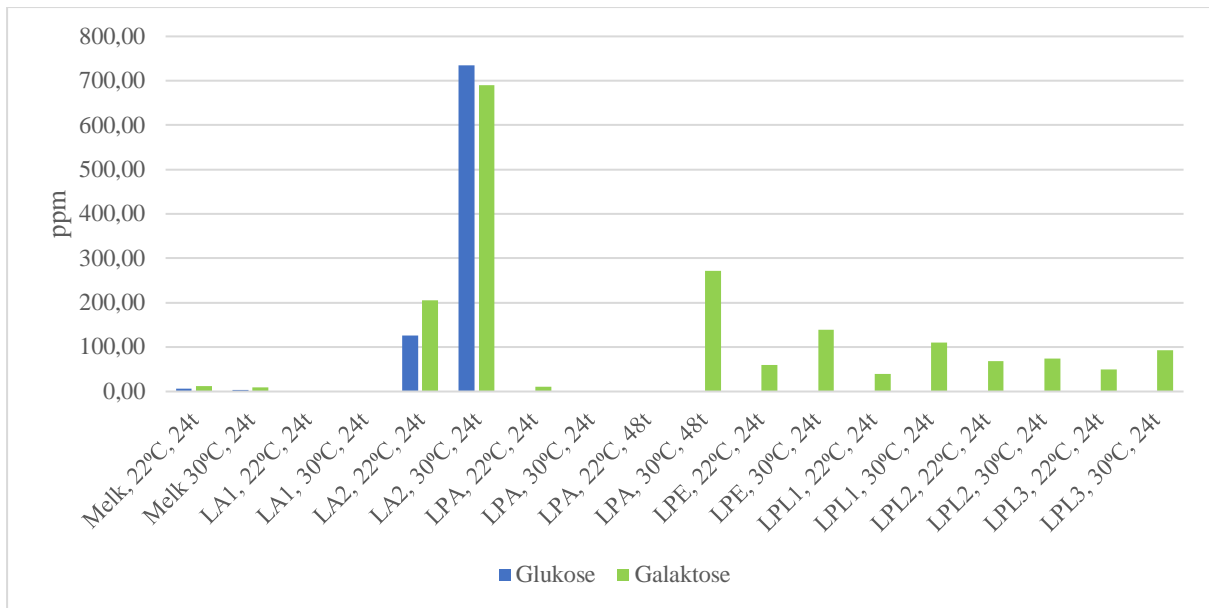


Figur 24. Innhold av acetaldehyd og etanol (ppm) for melk inokulert med laktobasiller inkubert ved 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

Innholdet av etanol ble målt til under 2 ppm for alle prøver unntatt LPA med inkubasjonstid på 48 t, som viste 6,3 ppm ved 22 °C og 17,4 ppm ved 30 °C.

Produksjonen av acetaldehyd varierte mellom stammene, men samtlige inneholdt < 0,8 ppm, med unntak av LPE, som hadde 1,43 ppm acetaldehyd ved inkubering ved 30 °C. LPA skilte seg også ut med litt høyere konsentrasjoner av acetaldehyd enn de andre stammene.

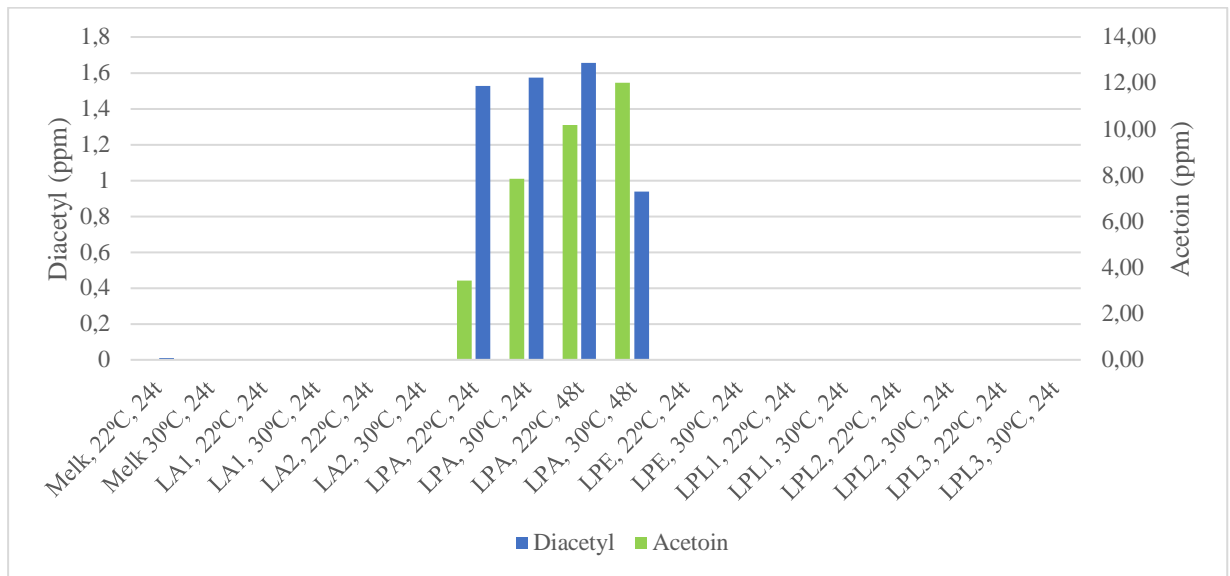
Innholdet av laktose, glukose og galaktose ble også undersøkt i melk inokulert med laktobasiller. Innholdet av laktose holdt seg stabilt på mellom 45000 ppm og 55000 ppm, men variasjonen av glukose og galaktose er vist i figur 25.



Figur 25. Innhold av glukose og galaktose (ppm) for melk inokulert med laktobasiller inkubert ved 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

Glukose ble kun detektert i LA2, som hadde konsentrasjon på 125 ppm ved 22 °C og 734 ppm ved 30 °C. Galaktose ble detektert i alle melkeprøver unntatt melk podet med LA1 og det ikke detektert galaktose i alle prøver med LPA. De høyeste konsentrasjonene av galaktose ble registrert i melk podet med LA2, som hadde en konsentrasjon på 690 ppm ved 30 °C.

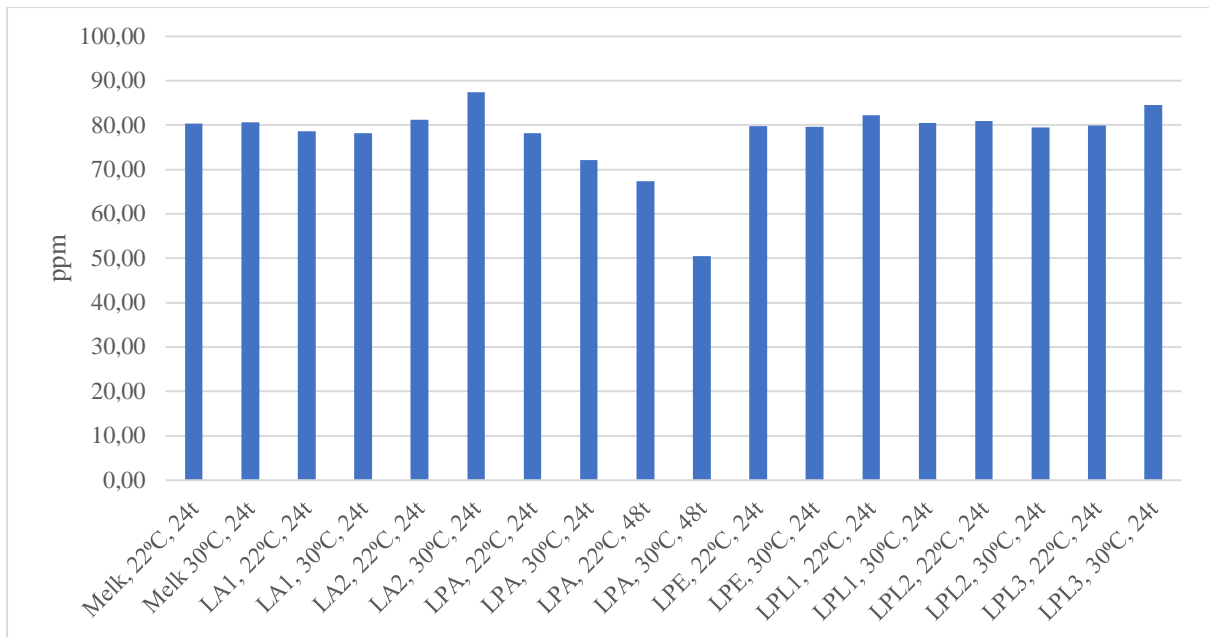
Melkeprøvene ble også analysert for sitronsyre, acetoin og diacetyl. Innholdet av sitrat minket ikke for noen av prøvene, men konsentrasjonen av acetoin og diacetyl er vist i figur 26.



Figur 26. Innhold av diacetyl og acetoin (ppm) for melk inokulert med laktobasiller inkubert ved 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

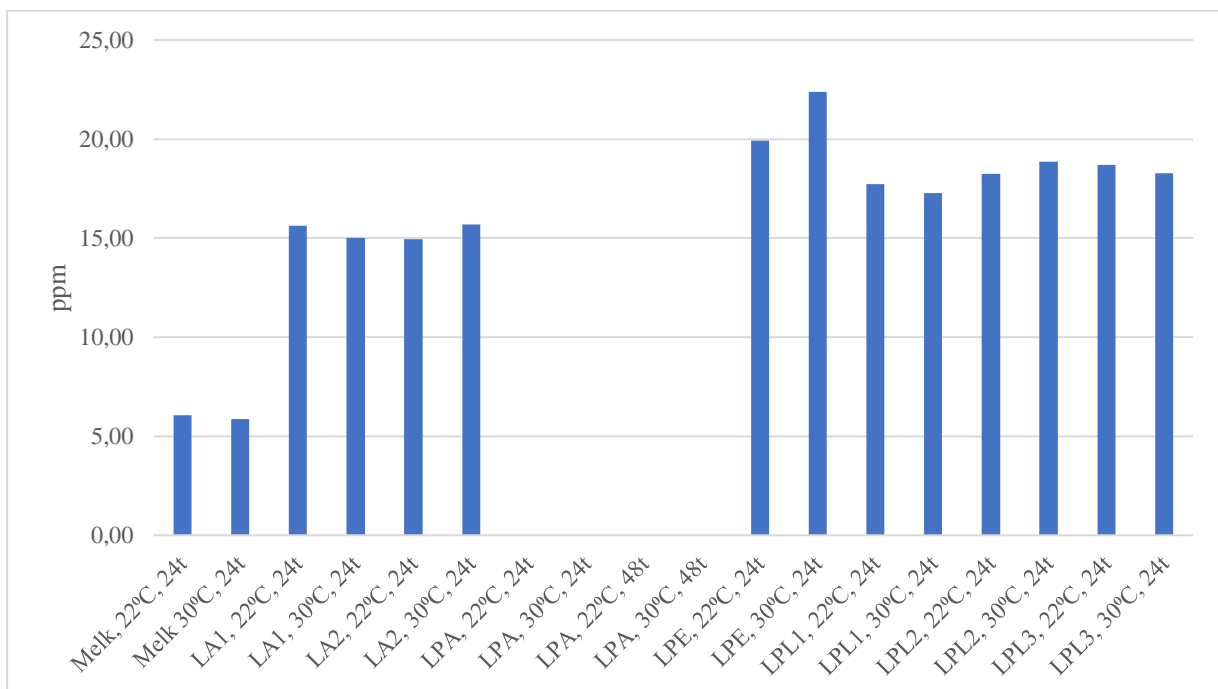
Figur 26 viser at diacetyl og acetoin kun ble detektert i melk podet med LPA. Det ble detektert mer acetoin i melk podet med LPA inkubert i 48 t enn 24 t. Diacetyl ble detektert til en konsentrasjon på mellom 1,5 og 1,7 i LPA, med unntak av inkubasjon i 48 t ved 30 °C som hadde en konsentrasjon på 0,9 ppm.

Konsentrasjon av orotinsyre, alfa-ketoglutarsyre og aceton i melk er presentert i figur 27, 28 og 29.



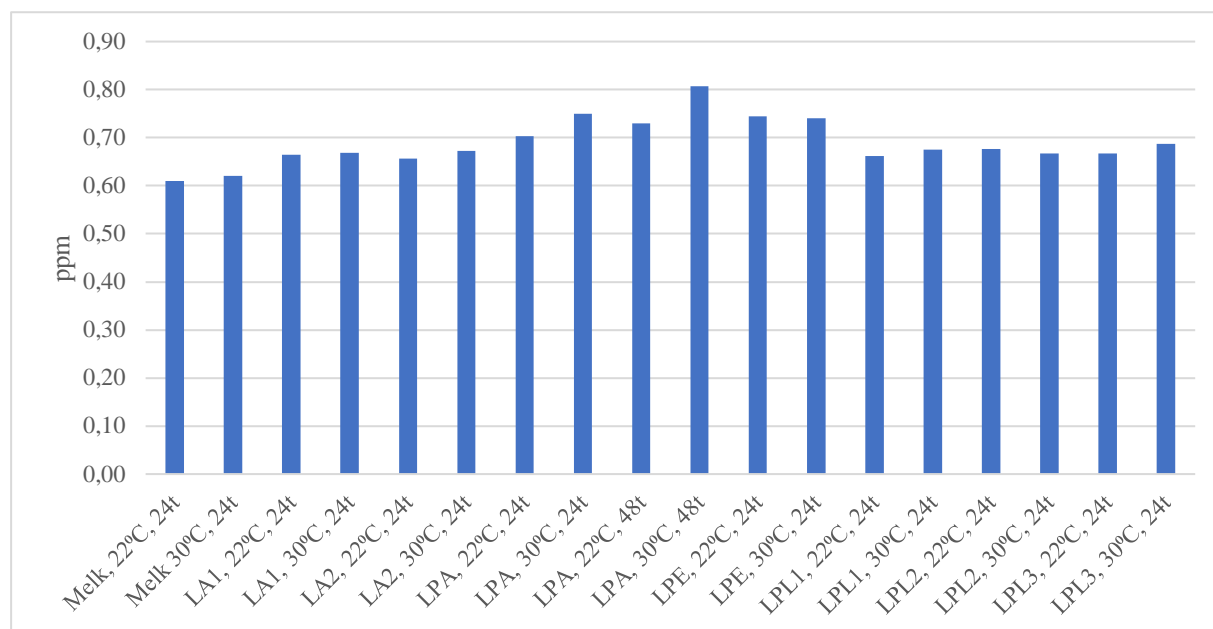
Figur 27. Innhold av orotinsyre (ppm) for melk inokulert med laktobasiller inkubert ved 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

Figur 27 viser at alle prøver inneholdt omtrent 80 ppm orotinsyre, med unntak av LPA som hadde en nedgang til 60 ppm for prøver inkubert i 48 t ved 30 °C. De andre melkeprøvene inokulert med LPA hadde en konsentrasjon av orotinsyre på mellom 67 og 78 ppm.



Figur 28. Innhold av alfa-ketoglutarsyre (ppm) for melk inokulert med laktobasiller inkubert ved 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

Figur 28 viser at det ble detektert en konsentrasjon på mellom 15 og 20 ppm alfa-ketoglutarsyre for de fleste stammer. LPE hadde en litt høyere konsentrasjon på mellom 20 og 25 ppm. Det ble ikke detektert alfa-ketoglutarsyre i LPA.



Figur 29. Innhold av aceton (ppm) for melk inokulert med laktobasiller inkubert ved 22 °C og 30 °C. LA= *Lb. acidipiscis*, LPA= *Lb. paracasei*, LPE= *Lb. pentosus*, LPL= *Lb. plantarum*.

Figur 29 viser at konsentrasjonen av aceton stort sett var på mellom 0,60 og 0,70 i melkeprøvene, med unntak melk inokulert med LPA og LPE som hadde en konsentrasjon på mellom 0,70 og 0,80 ppm.

Andre interessante funn i resultatene var at DL-pyroglutamic syre, eddiksyre og maursyre kun ble detektert i LPA, mens pyruvdruesyre kun ble funnet i LPA og LPE.

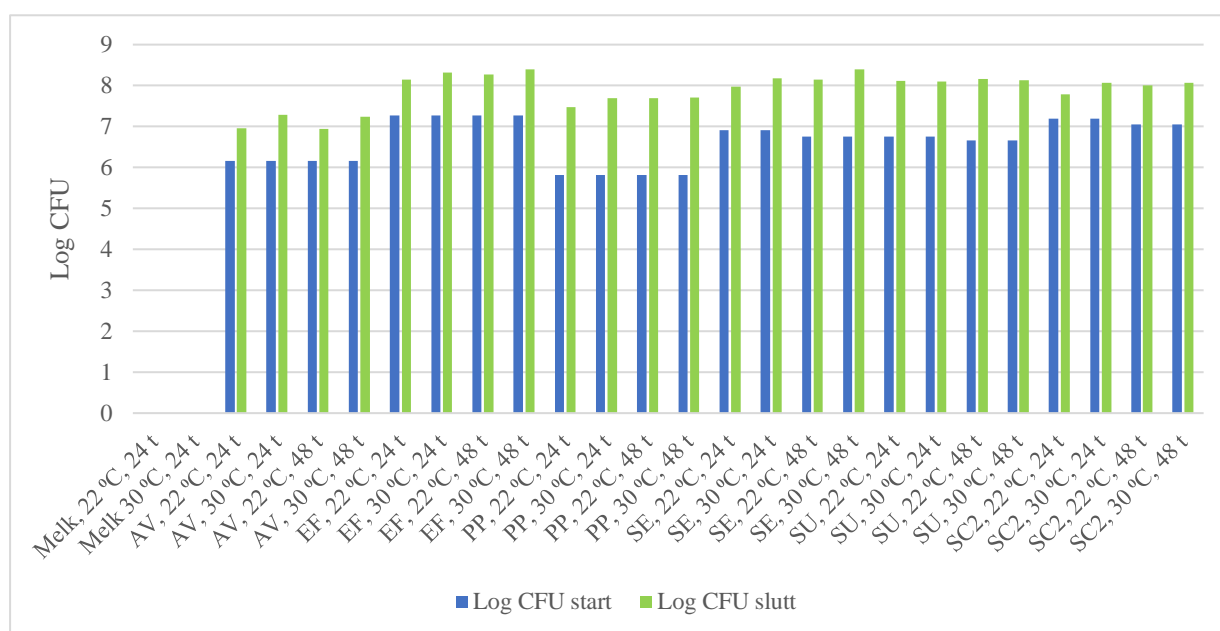
4.2.3 Potensielle mastittpatogener

Syv stammer ble analysert for vekst og metabolisme i melk ved 22 °C og 30 °C etter både 24 og 48 t. Stammene ble navngitt AV (*Aerococcus virodans*), EF (*Enterococcus faecalis*), PP (*Pediococcus pentosaceus*), SE (*Staphylococcus epidermidis*), SC (*St. chromogenes*) og SU (*Streptococcus uberis*). I de tilfellene med flere stammer av samme slekt og art ble navnene tilført nummer, for eksempel SC1 og SC2. Det ble undersøkt to stammer av *St.*

chromogenes, men den ene, SC1, brukte veldig lang tid på å vokse og det ble derfor ikke valgt å ta med resultatene i denne seksjonen. Alle de andre stammene vokste bra i melk, og det ble derfor utført gjentak på alle stammer. For alle analyser ble melk benyttet som kontrollprøve, og disse resultatene presenteres i hver figur til sammenlikning.

I denne seksjonen er det valgt å illustrere komponenter som viste interessante forskjeller mellom prøvene. For følgende komponenter ble det detektert svært små forskjeller mellom prøvene: 2-butanon, urinsyre, orotinsyre og acetoin. Det var også noen komponenter som ikke ble registrert i prøvene i det hele tatt, og som heller ikke er illustrert i resultatene: glukose, ravsyre, DL-pyroglutamatsyre, diacetyl, 2-butanol, etylacetat, 2-metyl-1-propanol, 2-metyl-butanal, 2.3-pentadione, 3-metyl-1-butanol og 2-metyl-1-butanol.

Celletall ble analysert for alle melkeprøver rett før og rett etter ferdig inkubasjon både etter 24 og 48 t. Resultatene er vist i figur 30.

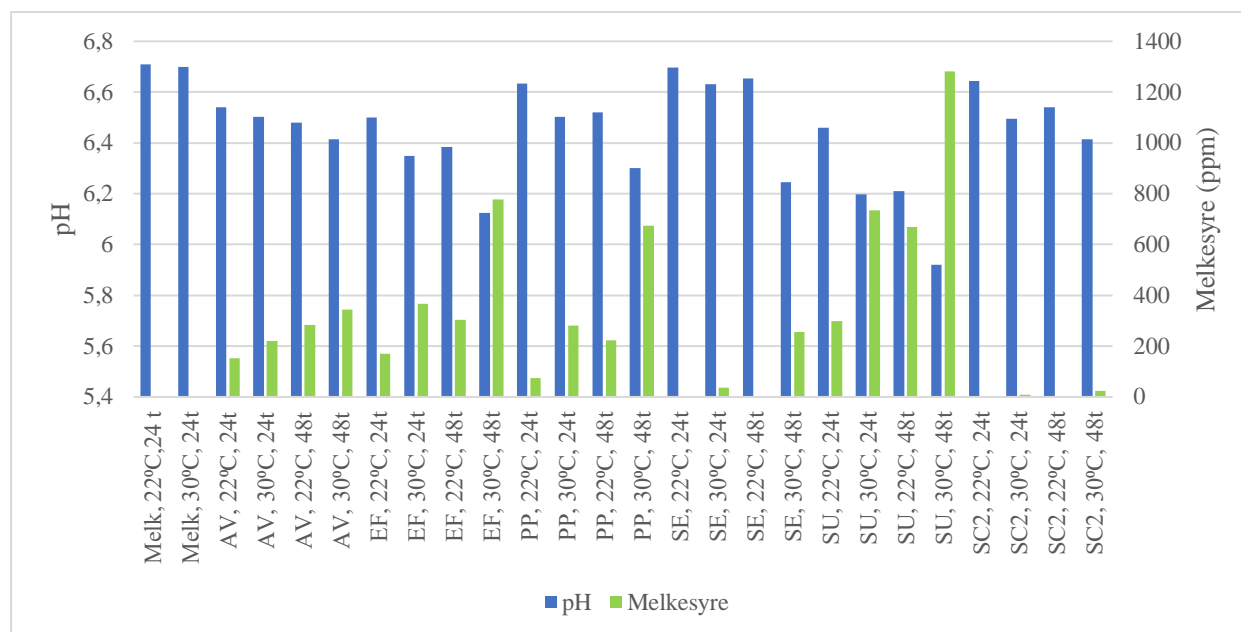


Figur 30. Celletall oppgitt i log CFU før inkubering og etter inkubering ved både 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*.

De fleste stammer hadde et celletall på rundt log 7 CFU ml⁻¹ før inkubering, med unntak av AV og PP som hadde et celletall på rundt log 6 CFU ml⁻¹. Etter inkubering hadde de fleste stammer et celletall på mellom log 8 og log 9 CFU ml⁻¹, med unntak av AV og PP som hadde et celletall på mellom log 7 og log 8 CFU ml⁻¹. Altså vokste de fleste stammer

med 1-2 log CFU ml⁻¹. For samtlige prøver var celtallet høyere etter inkubering ved 30 °C enn ved 22 °C, og det var lite videre vekst etter 24 t.

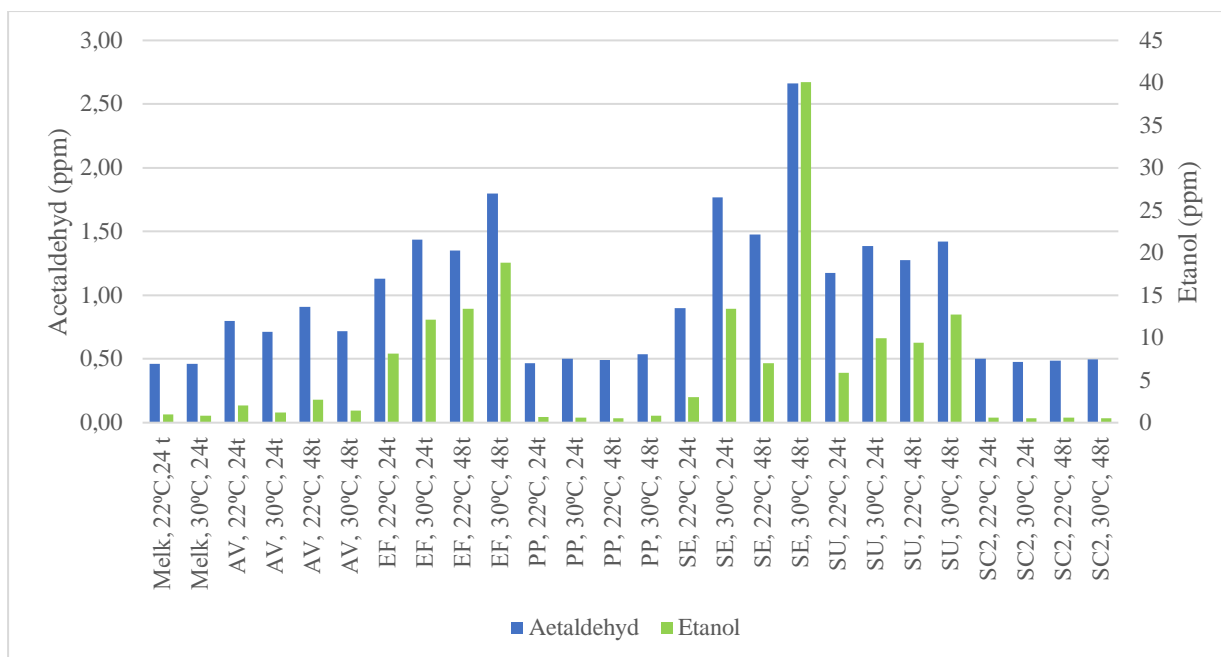
Det ble målt pH i melk etter vekst av stammer ved 22 °C og 30 °C etter både 24 og 48 t. Det ble også detektert melkesyre i prøvene, og resultatene for konsentrasjon av melkesyre og pH-målinger er vist i figur 31.



Figur 31. Innhold av melkesyre (ppm) og pH-verdier for melk inokulert med patogener inkubert ved 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*.

Figur 31 viser at alle melkeprøver hadde en pH på mellom 6 og 7. Konsentrasjonen av melkesyre varierte litt mellom prøvene, men var generelt lav og oversteg ikke 1300 ppm for noen prøver. Melkesyrekonsentrasjonen økte ved økende inkubasjonstid og økende inkubasjonstemperatur.

Etanol og acetaldehyd ble analysert i melkeprøvene ved bruk av HSGC. Resultatene er presentert i figur 32.

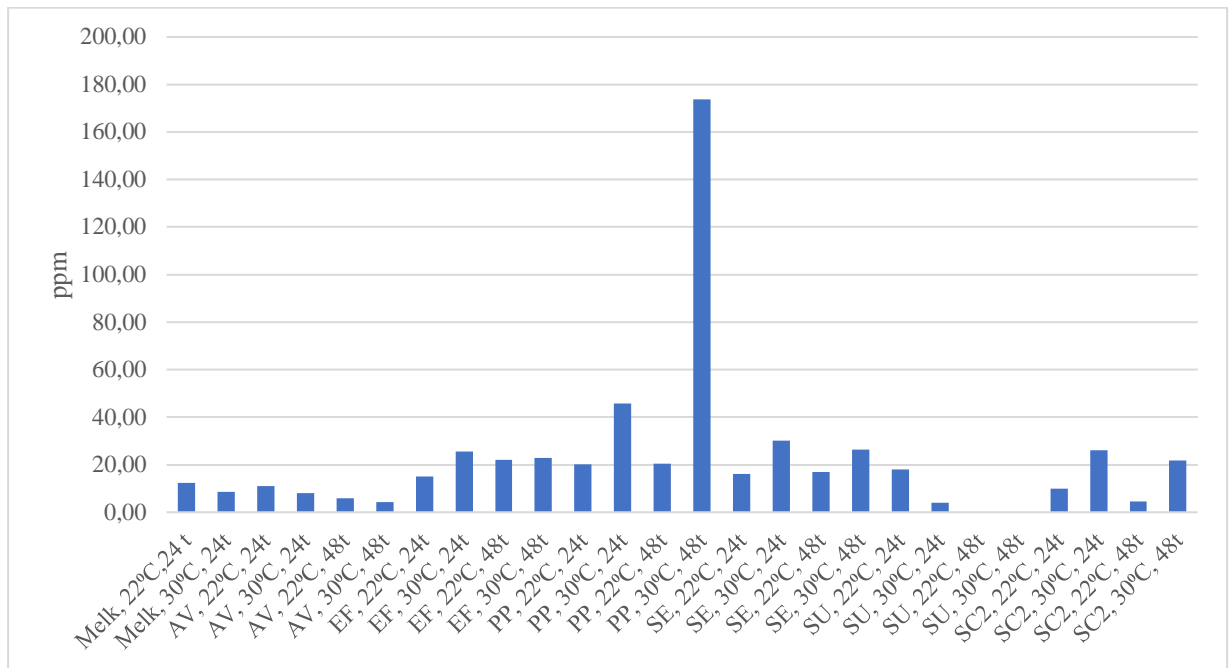


Figur 32. Innhold av acetaldehyd og etanol (ppm) for melk inokulert med patogener inkubert ved 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*.

Figur 32 viser at innholdet av etanol varierte veldig mellom melkeprøvene, men at det generelt var mest fremtredende konsentrasjoner i melk inokulert med EF, SE og SU. Aller høyest konsentrasjon på opptil 40 ppm etanol ble detektert i SE inkubert i 48 t ved 30 °C. Generelt var det stort sett høyere konsentrasjon av etanol i prøver inkubert i 48 t, og mer etanol i prøvene som ble inkubert ved 30 °C enn ved 22 °C.

For flere av prøvene var konsentrasjonen av acetaldehyd under 1 ppm, med unntak for EF, SE og SU. SE inkubert ved 30 °C i 48 t hadde den høyeste konsentrasjonen av acetaldehyd på 2,7 ppm.

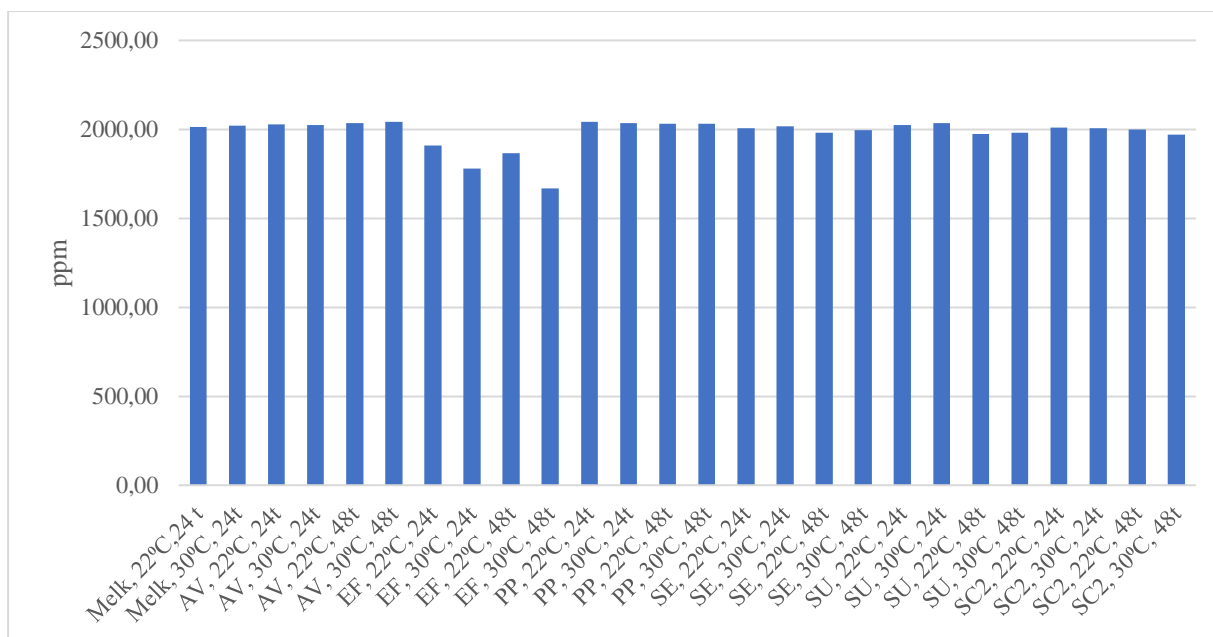
Melkeprøvenes innhold av laktose, glukose og galaktose ble også analysert. Det ble ikke detektert glukose i prøvene, og innholdet av laktose holdt seg konstant på rundt 45000 i alle prøvene. Konsentrasjonen av galaktose er vist i figur 33.



Figur 33. Innhold av galaktose (ppm) for melk inokulert med patogener inkubert ved 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*.

Konsentrasjonen av galaktose var lavere enn 50 ppm for alle prøver med unntak av PP inkubert ved 30 °C i 48 t, som hadde en konsentrasjon på 170 ppm.

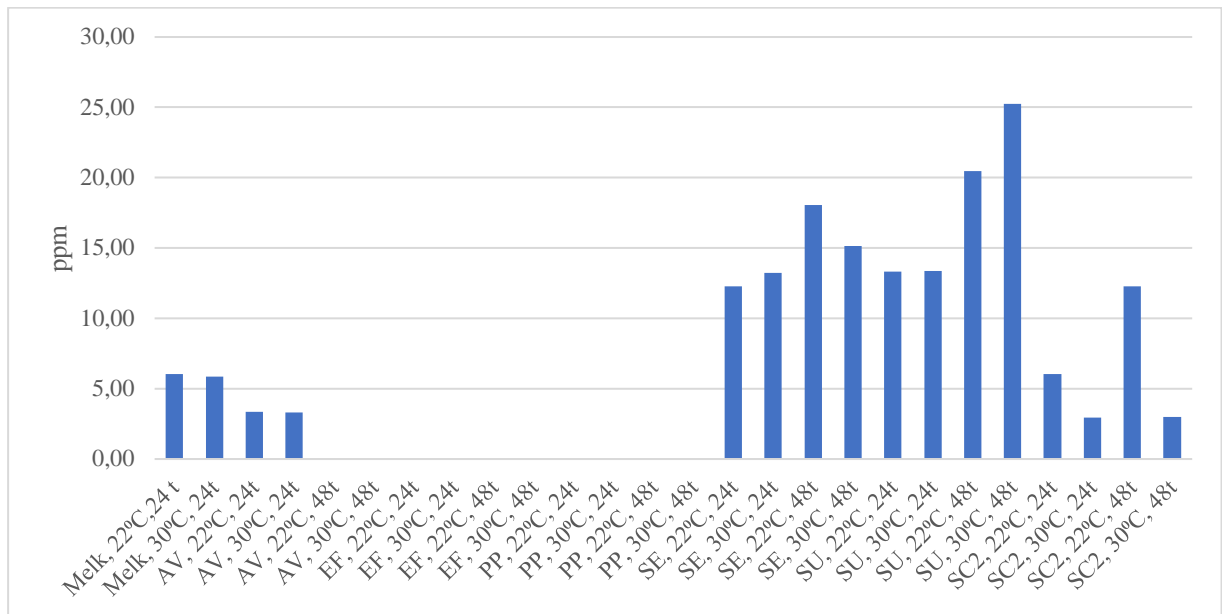
Videre ble melken analysert for sitronsyre, acetoin og diacetyl. Diacetyl ble ikke registrert i noen av prøvene, og acetoin ble kun registrert i SE inkubert i 48 t ved 30 °C. Resultatene for sitronsyre er presentert i figur 34.



Figur 34. Innhold av sitronsyre (ppm) for melk inokulert med patogener inkubert ved 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*

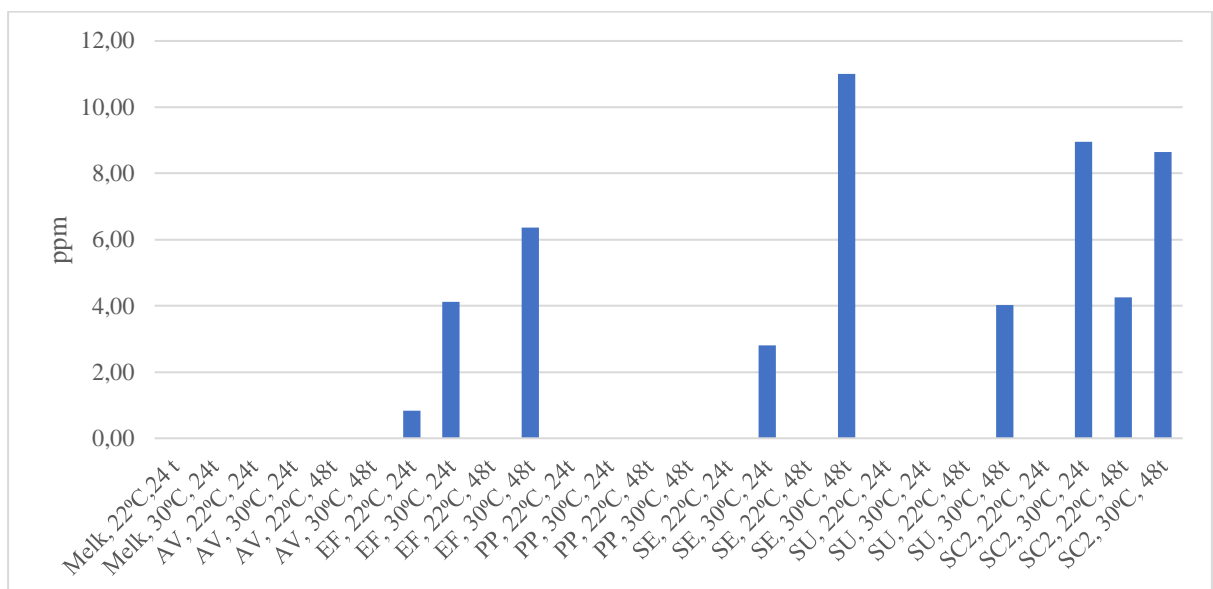
Figur 34 viser at bare melk inokulert med EF viste en nedgang i sitronsyre fra 2000 ppm til mellom 1668 og 1909 ppm. Den laveste konsentrasjonen var på 1668 ppm og ble registrert i EF inkubert i 48 t ved 30 °C.

Andre interessante forskjeller mellom komponentene ble funnet for konsentrasjonene av alfa-ketoglutarsyre, pyrodruesyre og aceton, og dette er vist i figur 35, 36 og 37.



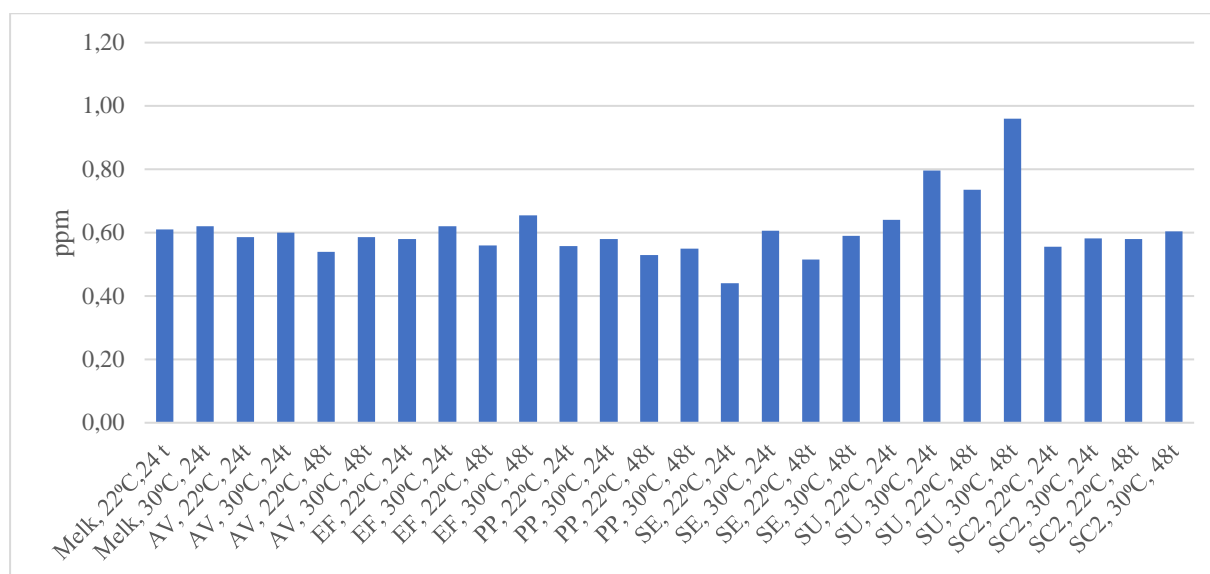
Figur 35. Innhold av alfa-ketoglutarsyre (ppm) for melk inokulert med patogener inkubert ved 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*

Figur 35 viser at det ikke ble registrert alfa-ketoglutarsyre i det hele tatt i melkeprøver inokulert med EF og PP, hvilket er en nedgang fra kontrollprøven. Den høyeste konsentrasjonen ble registrert for SU inkubert i 48 t ved 30 °C.



Figur 36. Innhold av pyrodruesyre (ppm) for melk inokulert med patogener inkubert ved 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*

Konsentrasjonen av pyrodruesyre ser ut til å være noe sporadisk fordelt mellom stammene. For EF ble det registrert pyrodruesyre for alle melkeprøver med unntak av inkubasjon ved 48 t ved 22 °C, og for SE ble det kun registrert pyrodruesyre ved 30 °C. For SC2 ble det registrert pyrodruesyre i alle prøver unntatt inkubasjon i 24 t ved 22 °C, mens det for SU kun ble registrert i prøven inkubert i 48 t ved 30 °C. Alle prøver ble målt til 11 ppm eller lavere.



Figur 37. Innhold av aceton (ppm) for melk inokulert med patogener inkubert ved 22 °C og 30 °C. AV= *A. viridans*, EF= *E. faecalis*, PP= *P. pentosaceus*, SE= *St. epidermidis*, SU= *Str. uberis*, SC= *St. chromogenes*

Figur 37 viser at konsentrasjonen av aceton var på 0,6 for kontrollprøven og melkeprøvene. Unntaket var SU som hadde en konsentrasjon på mellom 0,6 og 1 ppm.

Andre interessante funn i resultatene var at maursyre kun ble detektert i EF og SE, eddiksyre ble kun detektert i EF, SE og SU. 2-metyl-propanal ble kun detektert i SE med høyeste konsentrasjoner på 0,04 og 0,05 ppm. 3-metyl-butanal kun ble registrert i SE og SC2 med konsentrasjoner opptil 0,1 ppm.

5.0 Diskusjon

I denne oppgaven ble diverse MSB og potensielle mastittpatogener isolert fra jur hos friske kyr undersøkt. Stammene ble valgt ut fra en liste med flere tusen stammer isolert fra 60 friske kyr, og for de patogene stammene ble det tatt hensyn til hvor stort antall det var i de opprinnelige prøvene. Det ble først utført forforsøk der bakterienes evne til vekst og stammerenhet ble undersøkt. Det ble også opparbeidet standard podemateriale for hver stamme. Videre ble hovedforsøket igangsatt, der produksjon av metabolitter ved vekst i melk ble analysert for hver stamme. I dette kapitlet vil mulige forklaringer på resultatene diskuteres, og resultatene vil knyttes opp mot annen relevant forskning.

5.1 Forforsøk

I forforsøkene ble det først avklart hvilke stammer som var levedyktige. Det ble avklart at ingen av de utprøvde isolater av *C. bovis* ville vokse i BHI-buljong, og at en av stammene av *Lb. plantarum* ikke ville vokse i MRS-buljong. Det ble dyrket flere stammer av *Lb. plantarum*, og alle de andre vokste i MRS-buljong. Fravær av vekst kan skyldes at den utvalgte buljongen ikke ville støtte veksten eller at den aktuelle stammen ikke var levedyktig.

Noen av stammene krevde inkubering i 2 døgn i buljongen før vekst kunne påvises. Dette kan skyldes at det var få bakterier i prøven i utgangspunktet, eller at bakteriene hadde behov for lenger tid for å venne seg til vekstmediet. Det er også stor variasjon i vekst mellom ulike bakterier, og bakteriene kan rett og slett ha vært av en type som vokser sent.

Undersøkelsene av stammerenhet viste tilfredsstillende renhet for alle stammer. Ved undersøkelse av celletall i frosne prøver, viste de ulike stammene en variasjon fra log 7 CFU ml⁻¹ til nærmere log 10 CFU ml⁻¹. Dette kan skyldes at stammene vokste i ulikt tempo eller ble podet med litt ulik mengde celler fra start, slik at celletallet etter endt inkubering var ulikt mellom stammene. Maksimum antall bakterier vil også variere med tilgang på vekstfaktorer, mangel på enzymer og eventuell opphoping av avfallsstoffer. De ulike cellekonsentrasjoner ble bruk til å bestemme podemengde i hovedforsøket, ettersom det var ønskelig at podekonsentrasjonen skulle være så lik som mulig mellom de ulike stammene.

5.2 Hovedforsøk

5.2.1 Ønskede bakterier i melk

5.2.1.1 *Lactococcus* spp.

I dette forsøket ble isolater av *Lc. garvieae*, *Lc. lactis* og *Lc. raffinolactis* undersøkt. Resultatene for celletall viste at alle artene vokste til en viss grad i melk, men at det var størst økning i log CFU ml⁻¹ for LL1, som var en av *Lc. lactis* stammene som ble undersøkt. De andre stammene av *Lc. lactis*, LL2 og LL3, hadde også en større økning i celletall, men ikke på samme nivå som LL1. *Lc. lactis* er en art som er kjent for å vokse godt i melk, og det er derfor ikke uventet at denne arten vokste best av laktokokkene i melk. Likevel er det interessant at den ene stammen vokste bedre enn de andre stammene av samme art.

I en studie utført av Cavanagh et. al. i 2010 ble ulike stammer av *Lc. lactis* isolert fra grønnsaker, gress og mage hos drøvtyggere. Stammene ble dyrket i M17-buljong i 48 t ved 30 °C før de ble rensset. Laktokokkene ble deretter dyrket i melk, og pH ble avlest frem til 18 t. Forsøket ble gjentatt for stammer av *Lc. lactis* som blir benyttet som tradisjonelle starterkulturer i meieriprodukter, og sammenliknet med *Lc. lactis* isolert fra de andre kildene. Overnevnte forsøksoppsett er veldig likt det som har blitt benyttet i denne oppgaven, er det er derfor interessant å sammenlikne resultatene.

Resultatene i studiet til Cavanagh et. al. viste at etter 18 t var det stor variasjon i pH mellom stammene av *Lc. lactis*. En av stammene som ble isolert fra mage hos drøvtyggere hadde en pH på 4,67, mens pH var under 4,5 for de andre stammene. Analysene av *Lc. lactis* fra meiriindustrien viste lavere pH-verdier, og den raskeste stammen hadde en pH på 4,17 etter 18 t.

I denne oppgaven ble det kun utført gjentak på LL1, og pH for denne stammen ved 30 °C etter 24 t ble registrert til 4,26. De andre laktokokkene ble forkastet grunnet lav syreproduksjon. Selv om målingene ble utført etter 24 t, og ikke etter 18 t som i forsøket til Cavanagh et. al., er pH-verdiene nærme hverandre, og dette kan tyde på at akkurat denne stammevarianten av *Lc. lactis* er en stamme som har melk som habitat. De andre stammene av *Lc. lactis* i denne oppgaven hadde pH-verdier på 5,66 og 5,89 etter 24 t inkubering ved

30 °C, og dette er en mye høyere pH enn noen av stammene i studiet til Cavanagh et. al. fikk påvist. Dette kan tyde på at LL2 og LL3 har et annet habitat enn melk, men mest sannsynlig skyldes det manglende enzymer for vekst i melk.

Lc. lactis er kjent for å bidra med produksjon av melkesyre for pH-nedgang i meieriprodukter, men melkesyre vi også bidra til produktets smaksprofil (McAuliffe et. al., 2018). I resultatene kan det observeres høyest konsentrasjon av melkesyre for LL1, og mer moderate mengder for LL2 og LL3. Dette stemmer godt overens med pH-verdiene som ble registrert i forsøket. I LL1 ble det registrert flere aromatiske komponenter som acetadehyd, etanol, diacetyl og acetoin enn for de andre stammene, men dette kan også skyldes at bakterien hadde størst økning i celletall og følgelig størst produksjon av disse komponentene.

En interessant observasjon i denne oppgaven var at ved vekst av LL1 i melk ved 30 °C i 48 t ser det ut til at stammen dør, da det for samtlige paralleller ble det observert lavere celletall enn ved start. Utvikling av celletall frem til 24 t viser at bakterien vokser bra i melk, så celledøden er mest sannsynlig et resultat av opphoping av avfallsstoffer fra metabolismen.

Lc. garvieae blir først og fremst betraktet som en av de viktigste patogenene i fisk (Ghittino et. al., 2003; Vendrell et. al., 2006), men arten har også blitt isolert fra ku og buffalo med mastitt (Devriese et. al., 1999; Teixeira et. al., 1996), kjøtt og grønnsaker (Kawanishi et. al., 2007; Rantsiou et. al., 2005), samt fra humane kilder (Chan et. al., 2011; Mofredj et. al., 2000). *Lc. garvieae* har i tillegg blitt funnet i meieriprodukter produsert fra rå melk. Studier viser at det er liten genetisk likhet mellom stammer isolert fra fisk og meieriprodukter. Blant annet har forskning vist at *Lc. garvieae* isolert fra meieriprodukter inneholder gener som muliggjør nedbrytning av laktose. Det er derfor ikke unaturlig at det i denne oppgaven kan observeres vekst av *Lc. garvieae*. Likevel reflekterer ikke resultatene at *Lc. garvieae* vokser i melk ved nedbrytning av laktose. Den undersøkte stammen produserte svært lite melkesyre og det ble ikke registrert galaktose i melk inokulert med *Lc. garvieae*, som ville ha vært et tegn på nedbrytning av laktose.

Lc. raffinolactis ga også interessante resultater ved vekst i melk. Det ble registrert veldig lave celletall for *Lc. raffinolactis* etter 24 t ved 22 °C, men dette kan skyldes at skålene for denne inkuberingen var vanskelig å lese av. Likevel produserte *Lc. raffinolactis* moderate mengder melkesyre og acetaldehyd, etanol, diacetyl og acetoin på nivå med *Lc. lactis*

(LL1). Dersom *Lc. raffinolactis* hadde hatt muligheten til å vokse med en bakterie som la forholdene til rette for vekst, er det mulig at *Lc. raffinolactis* hadde hatt bedre vekst i melk.

Kimoto-Nira et. al. (2012) forsket på interaksjonen mellom *Lc. lactis* og *Lc. raffinolactis* ved vekst i melk. 43 stammer ble påvist for vekst i melk. 11 var *Enterococcus* spp., 1 var *Lactobacillus* spp., 14 var *Lactococcus* spp., 1 var *Leuconostoc* spp., 5 var *Streptococcus* spp., 5 var *Weisella* spp. og 6 stammer ble ikke identifisert. Bakteriene som ble undersøkt ble isolert fra rå kumelk. Etter identifisering av stammene ble diverse stammer podet (1%) i skummet melk. *Lc. lactis* og *Lc. raffinolactis* ble dyrket både alene og sammen. pH ble målt i melken etter inkubasjon i 24 t ved 30 °C og 37 °C.

Betingelsene for forsøket (Kimoto-Nira et. al., 2012) var veldig like som i denne oppgaven. Resultatene i forsøket viste at ved dyrking alene hadde melk inokulert med *Lc. lactis* lavere pH enn melk med *Lc. raffinolactis*, men når de ble dyrket sammen ble pH målt til en lavere verdi enn for noen av de individuelle målingene. Med dette som bakgrunn kan det derfor konstateres at *Lc. lactis* og *Lc. raffinolactis* gir gode vekstbetingelser for hverandre. Det er derfor mulig at *Lc. raffinolactis* hadde vokst bedre i nærvær av *Lc. lactis*, og dermed produsert høyere konsentrasjoner av aromakomponentene.

For alle laktokokkene ble det registrert produksjon av acetaldehyd i høyere nivåer enn i kontrollprøven. Det er flere muligheter for produksjon av disse komponentene. Acetaldehyd og etanol produseres ved nedbrytning av pyruvat ved blandet syremetabolisme samt ved sitratmetabolisme (Mayo et. al., 2010). Siden konsentrasjonen av sitrat holdt seg jevn mellom alle prøvene, er det større sannsynlighet for at overskuddet av acetaldehyd og etanol er et resultat av mikset syremetabolisme.

Diacetyl og acetoin ble produsert av enkelte av *Lc. lactis* og av *Lc. raffinolactis*. Dette er også komponenter som kan stamme fra både blandet syremetabolisme og sitratmetabolisme, og igjen er det mer sannsynlig at blandet syremetabolisme er kilden. Diacetyl og acetoin vil brytes videre ned til 2,3-butandiol som ikke er mulig å detektere i analysene som ble utført i forsøket. Noe av grunnen til at det ikke ble registrert diacetyl eller acetoin for alle stammer kan dermed være omdannelse til 2,3-butandiol (Mayo et. al., 2010).

Det gjenstående forskjellene mellom stammene når det gjelder konsentrasjonen av blant annet orotinsyre, alfa-ketoglutarsyre og acetoin er det vanskelig å forklare. Det som går igjen for en del av resultatene er at enkelte komponenter ble registrert i høyre

konsentrasjoner for LL1 enn resten av stammene. Dette kan selvsagt skyldes LL1 sin gode vekst i melk, men det kan også skyldes analyseforholdene. Gjentakene av LL1 ble utført noen uker etter første analysering av prøvene. Til gjentakene ble det benyttet en annen batch med UHT-melk enn det ble benyttet til de første analysene, og det at melken ble produsert på ulike datoer, og dermed muligens hadde en litt annen sammensetning, kan ha hatt innvirkning. Likevel viser ikke parallellene til kontrollprøvene store forskjeller mellom komponenter, så antagelig er det ikke dette som avgjør.

5.2.1.2 *Lactobacillus* spp.

I oppgaven ble *Lb. acidipiscis*, *Lb. paracasei*, *Lb. pentosus* og *Lb. plantarum* analysert for teknologiske egenskaper ved vekst i melk. Resultatene for celletall viste at *Lb. paracasei* hadde størst økning i log CFU ml⁻¹. Når *Lb. paracasei* fikk vokse ved 30 °C i 48 t produserte den melkesyre på nivå med *Lc. lactis*. pH-verdiene står i overensstemmelse med mengden melkesyre målt i de ulike prøvene.

Tradisjonelt har slektene *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* og *Lb. helveticus* blitt benyttet som starterkulturer i meieriindustrien, da disse gjerne produserer smakskomponenter som er ønskelige i meieriprodukter (El Kafsi et. al., 2014). *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* og *Lb. plantarum* er laktobasiller som ikke blir sett på som starterkulturer, men disse artene har også vist seg å ha en stor effekt på smaksprofilen til enkelte meieriprodukter (McAuliffe et. al., 2018). Med så høyt innhold av melkesyre som ble registrert for *Lb. paracasei* i dette forsøket bør kanskje også denne bakterien vurderes som starterkultur.

Av de andre artene som ble undersøkt ble det registrert vekst av *Lb. acidipiscis*, men veldig lite vekst av de resterende artene. Det er interessant å se i resultatene at *Lb. acidipiscis* hadde tilnærmet ingen produksjon av melkesyre til tross for økning i log CFU ml⁻¹. Likevel kan det observeres tegn på nedbrytning av laktose ved observasjon av små mengder galaktose og glukose. Det kan da stilles spørsmål ved hvordan *Lb. acidipiscis* klarer å vokse i melk. En mulig forklaring på lite produksjon av melkesyre i kombinasjon med høy økning i log CFU ml⁻¹ er at bakterien har benyttet seg av aerob respirasjon fremfor fermentering. Aerob respirasjon i form av oksidativ fosforylering gir bakteriene mye mer energi til vekst i form av ATP enn fermentering (Wolfe, 2015).

For samtlige arter, med unntak av *Lb. paracasei*, var det lav konsentrasjon av etanol, diacetyl og acetoin. Som tidligere nevnt kan produksjon av disse komponentene være både et resultat av blandet syremetabolisme og sitratmetabolisme. Resultatene for konsentrasjon av sitrat viste at alle prøvene hadde omtrent samme nivå som kontrollprøven. Det ble registrert litt lavere mengde sitrat for *Lb. paracasei* ved 30 °C enn for de andre laktobasillene, men det er vanskelig å fastslå om dette skyldes sitratmetabolisme eller ulikheter i analyse materialet.

Lb. paracasei er i samme gruppe som *Lb. casei*, og de er derfor nært beslektet. I en studie på myke oster (Milesi et. al., 2010) ble stammer av *Lb. plantarum* og *Lb. casei* tilsatt starterkulturen bestående av *Streptococcus thermophilus*, og sammenliknet med oster tilsatt kun *Str. thermophilus*. Studiet viste en signifikant økning i konsentrasjonen av diacetyl for oster med *Lb. plantarum* og *Lb. casei* inkludert i starterkulturen. Det ble også påvist et høyere innhold av acetoin i oster med starterkultur tilsatt laktobasiller. Forskerne i studiet mente at dette indikerte en økning i metabolismen av sitrat eller asparagin, da metabolisme av disse komponentene vil medføre dannelsen av aromakomponenter som diacetyl og acetoin. Nærmere undersøkelser viste at innholdet av asparagin steg i oster tilsatt laktobasiller, mens sitratkonsentrasjonen holdt seg konstant. Resultatene indikerte derfor at aromakomponentene hovedsakelig stammet fra nedbrytning av asparagin (Milesi et. al., 2010). Siden *Lb. paracasei* og *Lb. casei* er nært beslektet er det mulig at produksjonen av acetoin og diacetyl skyldes nedbrytning av asparagin.

I denne oppgaven ble det ikke registrert noe produksjon av diacetyl eller acetoin for *Lb. plantarum* og generelt lite vekst. Hadde denne arten fått vokse sammen med en annen starterkultur, i dette tilfellet *Str. thermophilus*, hadde kanskje resultatet også i denne oppgaven blitt annerledes. *Str. thermophilus* kunne med sin metabolisme muligens ha bidratt til optimale vekstvilkår for *Lb. plantarum*.

Lb. paracasei ser ut til å forbruke noe orotinsyre og alfa-ketoglutarsyre i sin metabolisme. Det ble utført gjentak av *Lb. paracasei* og *Lc. lactis* samtidig og med samme batch av melk. Likheter i metabolismen til *Lb. paracasei* og *Lc. lactis*, som var de eneste av laktobasillene og laktokokkene som det ble foretatt gjentak for, forsterker inntrykket av at også batchen med melk vil kunne ha noe innvirkning på prøveresultatene.

Lb. pentosus skilte seg litt fra de andre med høy konsentrasjon av acetaldehyd, og dette har også blitt registrert i andre forsøk. Pan et. al. utførte i 2014 en undersøkelse på vekst av *Lb. pentosus* i melk, der flasker med 150 ml melk ble inokulert med 2% *Lb. pentosus* og inkubert i 12 t ved 37 °C. I forsøket ble det registrert produksjon av 2,3-butandion, som er et nedbrytningsprodukt av acetaldehyd. Det er likevel ganske uventet å finne så mye acetaldehyd i melkeprøven med *Lb. pentosus* når celletallene viste lite tegn til vekst.

5.2.2 Potensielle mastittpatogener

Stammene som ansees som potensielle mastittbakterier vokste alle med omtrent log 1-2 CFU ml⁻¹ i melk, og de viste alle lav produksjon av melkesyre med pH-verdier på mellom 6 og 7 ved alle inkubasjonstemperaturer og inkubasjonstider. Som nevnt i kapittelet for laktobasiller kan høy stigning i log CFU ml⁻¹ kombinert med lav produksjon av melkesyre være et tegn på at bakteriene benytter aerob respirasjon i melk. Det har vært veldig lite forskning på disse bakterienes vekst i melk. I kapitlene i denne seksjonen vil det lille som ble funnet av relevant forskningslitteratur sammenliknes med resultatene i oppgaven.

5.2.2.1 *Aerococcus viridans*

A. viridans vokser i melk, men produserer ikke mye melkesyre eller aromakomponenter. Sun et. al. (2017) undersøkte forskjellene i sammensetning av melk fra kyr med mastitt infisert med *A. viridans* og friske kyr. Forsøkene viste at melk infisert med *A. viridans* hadde signifikant høyere prosentvist proteininnhold, og at innholdet av laktose i melken var signifikant prosentvist lavere enn i melk uten *A. viridans*. I denne oppgaven ble det produsert svært små mengder galaktose og melkesyre i prøvene med *A. viridans*, og nivået av laktose er på nivå med kontrollprøven. Dermed stemmer ikke resultatene i denne oppgaven veldig godt overens med resultatene til Sun et. al. Det er viktig å huske på at i melk med mastitt vokser det andre bakterier enn bare *A. viridans*, og det er mulig at disse også har hatt en effekt på nedbrytning av laktose. I tillegg ble det forsøket til Sun et. al forsket på prosentvist innhold av komponenter, hvilket betyr at den prosentvise andelen av hver komponent påvirkes av variasjonen av de andre komponentene.

I forbindelse med karakterisering av dominante bakterier i tradisjonell Mozzarella ost (Morea et. al., 1999) ble *A. viridans* dyrket i skummet melk, og pH ble målt etter 6 og 24 t ved inkubering ved 30 °C. Dette forsøksoppsettet minner veldig om det som ble utført i denne oppgaven, og det kan derfor være interessant å gjøre en sammenlikning av resultatene. I forsøket til Morea et. al. var pH 6,47 etter 24 t, men det i dette forsøket ble registrert en pH på 6,50, og det er dermed en veldig god overensstemmelse mellom denne oppgaven og tidligere forskning når det gjelder pH i melk.

5.2.2.2 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis viste ikke høy produksjon av melkesyre, men likevel mer enn *A. viridans*. Bakterien skiller seg ut med ved at det ser ut som den forbruker noe sitronsyre og orotinsyre sammenliknet med de andre bakteriene. Metabolisme av sitronsyre ble også funnet i studiet til Morea et. al. (1999), og kan muligens forklares av dette, mens reduksjon i orotinsyre er det ingen god forklaring på. *E. faecalis* produserte ganske høye mengder acetaldehyd med nivåer opptil 1,80 på det høyeste, og dette er interessant med tanke på mulig smakutvikling i meieriprodukter.

Det er få studier på vekst av *E. faecalis* i melk, men studier på halv-faste oster (Garde et. al., 1997; Oumer et. al., 2000) har vist at *E. faecalis* har en positiv innvirkning på smaksutvikling i ost. I studiet til Oumer et. al. ble flyktige komponenter i ost målt ved benyttelse av kromatografisk massespektrometri. Resultatene viste at inokulering av ystemelk med *E. faecalis* hadde en signifikant økning av 3-metylbutanal, diacetyl og acetoin sammenliknet med kontrollost uten tilsetning av *E. faecalis*. I tillegg ble det detektert lavere konsentrasjon av etanol, 3-metyl-3-buten-1-ol, aceton, 2-butanon, 2-heptanon og oktan. I forsøket ble det tilsatt ulike mengder *E. faecalis* til ostene, og i det med høyest mengde (0,3 eller 1,0 g kultur per kg) ble det detektert lik eller større mengde acetaldehyd enn i oster uten *E. faecalis* (Oumer et. al., 2000). I samme forsøk ble ostene evaluert sensorisk, og det viste seg smaksintensiteten samt smaks kvaliteten ble signifikant forbedret ved tilsetning av *E. faecalis* til ystemelken. Dette er interessante resultater med tanke på mulig utnyttelse av *E. faecalis* i meieriprodukter, og det hadde vært spennende å se hvilken effekt denne bakterien hadde hatt ved tilsetning i syrekulturen av andre

meieriprodukter. Resultatene til Oumer et. al. kan også være en mulig forklaring på registrering av acetaldehyd for prøvene med *E. faecalis* i denne oppgaven.

En studie utført av Biscola et. al. (2016) viste at utvalgte stammer av *E. faecalis* hadde proteolytisk aktivitet. Mange av komponentene som ble detektert i ostene i forsøket til Oumer et. al. (2000) kan stamme fra proteolyse og videre nedbrytning av aminosyrer. Dette gjelder blant annet 3-metylbutanal, som er et produkt fra metabolisme av Leu, Ile og Val. Det ble ikke registrert produksjon av slike komponenter i denne oppgaven, men det er mulig det kunne ha blitt observert ved tilsetning av *E. faecalis* til for eksempel ost. Produksjon av acetaldehyd som registreres derimot kan være et resultat av nedbrytning av aminosyren asparagin (Milesi et. al., 2010).

I forsøket til Morea et. al. (1999) ble *E. faecalis* undersøkt for pH etter 24 t dyrket i skummet melk, og pH ble målt til 5,68, mens det i dette forsøket ble registrert en pH på 6,35, og det er dermed litt forskjeller mellom det som ble målt i denne oppgaven og i tidligere forsøk.

5.2.2.3 *Pediococcus pentosaceus*

P. pentosaceus var den bakterien som vokste aller best i melk blant bakteriene som er uønsket i melk, og den hadde en vekst på nærmere $\log 2$ CFU ml⁻¹ ved alle inkubasjonstemperaturer og inkuberingstider. Likevel produserte ikke stammen betydelig mer melkesyre enn de andre stammene, og den ser derfor ikke ut til å være noen syreprodusent. *P. pentosaceus* var også en av stammene som produserte aller minst acetaldehyd og etanol.

Taboada et. al. (2017) undersøkte diverse ikke-starterkulturer sin evne til å senke pH i systemelk fra geit. I den forbindelse ble pasteurisert geitemelk tilsatt 2 % inokulum av diverse stammer med $\log 8$ CFU ml⁻¹, og inkubert ved 38 °C. To av stammene som ble undersøkt var av arten *P. pentosaceus*. I forsøket til Taboada et. al. ble pH målt kontinuerlig de neste 7 timene, og etter 7 timer var pH 5,40 for den en av stammene, og 5,50 for den andre stammen. I forsøkene utført i denne oppgaven viste *P. pentosaceus* en pH på rundt 6,50 etter inkubering i 48 t ved 30 °C, og pH-nedgangen gikk dermed mye saktere enn i forsøket til Taboada et. al.

Det er flere mulige grunner til at pH-utviklingen gikk så mye saktere for stammene i dette forsøket enn for stammene i forsøket til Taboata et. al. Geitemelk har en litt annerledes kjemisk sammensetning enn kumelk, og ulike mengder vekstsubstrat kan ha hatt en påvirkning på vekst. I denne oppgaven hadde prøvematerialet log 8 CFU ml⁻¹ for poding akkurat som i forsøket til Taboata et. al., men sistnevnte hadde dobbelt så stor podemengde samt høyere inkuberingstemperatur. Det hadde vært spennende å undersøke effekten av disse betingelsene også for stammen undersøkt i denne oppgaven. Likevel viser celletall for *P. pentosaceus* i dette forsøket at det har vært betydelig vekst i melk etter både 24 og 48 t, så forskjellen i pH i dette forsøket og forsøket til Taboada et. al. kan skyldes at *P. pentosaceus* er en bakterie med stor variasjon i syreproduksjon for ulike stammer.

5.2.2.4 *Staphylococcus* spp.

I oppgaven ble to arter av *Staphylococcus* spp. undersøkt; *St. epidermidis* og *St. chromogenes*. Produksjonen av melkesyre for begge disse bakteriene var veldig lav, og for *St. chromogenes* gjelder det samme for konsentrasjonen av acetaldehyd og etanol. *St. epidermidis* derimot var den bakterien med høyest produksjon av etanol og acetaldehyd av alle de patogene bakteriene, og dette er en interessant forskjell.

I forsøket til Morea et. al. (1999) ble også *St. epidermidis* undersøkt, og etter 24 t var pH 6,23, mens det i dette forsøket ble registrert en pH på 6,63. pH-verdiene som ble registrert for denne arten i dette forsøket har altså en relativt god overenstemmelse med annen forskning.

Det ble ikke funnet litteratur på flyktige og aromatiske komponenter for de spesifikke staphylokokkene i oppgaven, men Hettinga et. al. utførte i 2008 en studie der flyktige komponenter i melk fra kyr med mastitt og kyr uten mastitt ble sammenliknet. Til detektering av flyktige komponenter ble det benyttet kromatografisk metoder. Det vil være mange bakterier i mastittinfisert melk, men metodene i forsøket muliggjorde tilknytning av komponenter til spesifikke bakteriegrupper. En av bakteriene som ble undersøkt var *St. aureus*, og for denne arten ble det blant annet registrert acetaldehyd. *S. aureus* ble ikke undersøkt i denne oppgaven, men deteksjonen av acetaldehyd av Hettinga et. al. kan likevel bidra til å forklare produksjonen av aromatiske komponenter for *Staphylococcus* spp. på generell basis.

For *St. epidermidis* ble det i oppgaven registrert produksjon av 2-metyl-propanal, og for både *St. epidermidis* og *St. chromogenes* ble det registrert 3-metyl-butanal. Dette er komponenter som produseres ved metabolisering av aminosyrene Leu, Ile og Val, og det tyder på at *St. epidermidis* og *St. chromogenes* har enzymer som muliggjør nedbrytning av disse aminosyrene.

5.2.2.5 *Streptococcus uberis*

Str. uberis var den bakterien som produserte mest melkesyre av de patogene bakteriene, og den eneste som fikk registrert pH til under 6 (48 t, 30 °C). Stammen var i tillegg blant de patogenene med høyeste konsentrasjon av acetaldehyd og aceton. *Str. uberis* var også en av bakteriene som ble undersøkt i forsøket til Hettinga et. al. (2008). I bakteriegruppene ble streptokokkene *Str. uberis* og *Str. dysgalactiae* knyttet sammen, da det ikke var mulig å skille disse statistisk. Streptokokkene ble knyttet mot produksjon av både acetaldehyd og 2,3-butandiol, som er nedbrytningsproduktet til acetaldehyd. Dette kan bidra til å forklare deteksjonen av acetaldehyd i prøvene i denne oppgaven.

Generelt viste resultatene i forsøket til Hettinga et. al. at prøvene fra kyr infisert med mastitt viste høyere andel flyktige komponenter enn melk fra friske kyr. Dette viser at mastittbakterier, som svært ofte er uønsket i meieriprodukter, kan produsere flyktige komponenter som kan være positivt for smaksprofilen til meieriprodukter. I tillegg klarte metodene å skille mellom ulike grupper av bakterier med basis i produksjon av flyktige komponenter, hvilket er et fremskritt når det kommer til klassifisering av mastittpatogener.

En studie utført av Thomas et. al. (2016) undersøkte produksjon av metabolitter i melk fra kuer infisert med *Str. uberis*. Seks kuer ble infisert med *Str. uberis* og melkeprøver ble tatt ut til analyser etter 0, 36, 42, 57, 81 og 312 t etter infeksjonen. Prøvene ble analysert med Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS). Studiet viste at antallet ulike metabolitter økte helt frem til 81 t etter infeksjon, mens veksten av bakterier begynte å minke etter 36 t. Dette indikerer at selv om bakteriene vokser sakte, vil fortsatt produksjonen av metabolitter øke. I denne oppgaven ble veksten stoppet etter 48 t, og det hadde vært veldig interessant å se utviklingen av metabolitter ved videre vekst. Thomas et. al detekterte også peptider og lipider de mente kunne stamme fra bakteriell nedbrytning av henholdsvis proteiner og fett. Det ble registrert få slike komponenter i denne oppgaven, men det kunne ha blitt detektert dersom bakteriene hadde fått vokse over lenger tid.

I forsøket til Morea et. al. (1999) ble også *Str. uberis* undersøkt, og pH ble målt til 5,50 etter 24 t, mens det i dette forsøket ble registrert en pH på 6,19. pH-verdiene som ble registrert for denne arten i dette forsøket hadde altså litt høyere verdi enn pH-verdiene i forsøket til Morea et. al.

6.0 Konklusjon

Det er ikke mange år siden forskere mente at juret hos friske kyr var tilnærmet sterilt, men nyere forskning, inkludert prosjekt «Jurfrisk», har motbevist disse påstandene. I denne oppgaven ble vekst og metabolisme for utvalgte MSB og potensielle mastittpatogener isolert fra jur hos friske kyr undersøkt. Resultatene viste at en stamme av *Lc. lactis* og en stamme av *Lb. paracasei* hadde gode syringsegenskaper, og bør vurderes som nye starterkulturer. Mastittpatogenene vokste godt i melk, men de fleste hadde liten produksjon av melkesyre og aromatiske komponenter. Alle bakteriene undersøkt vokste i større eller mindre grad, hvilket har en avgjørende betydning for videre forskning i prosjekt «Jurfrisk».

7.0 Videre arbeid

Det var uventet at så få stammer av MSB ble isolert fra friske kyr i prosjekt «Jurfrisk» (Narvhus, 2019). I denne oppgaven ble det registrert best vekst og produksjon av melkesyre for stammer av *Lc. lactis* og *Lb. paracasei*. Det hadde derfor vært interessant å undersøke disse stammenes syrningsegenskaper i større grad og forske på muligheten til å benytte disse som starterkulturer i ulike meieriprodukter.

Som nevnt har studier (Kimoto-Nira et al., 2012; Milesi et al., 2010) forsket på å kombinere starterkultur bakterier med andre MSB, og observert en positiv effekt på vekst og produksjon av aromakomponenter. For videre forskning kunne det derfor ha vært interessant å inokulere noen av stammene sammen i melk, og se hvilket utslag dette får på pH, samt HSGC- og HPLC-analyser. Siden *Lc. lactis* i form av LL1 i dette forsøket har vist seg å være en god syreprodusent, kunne det ha vært interessant å kombinere *Lc. lactis* og *Lc. raffinolactis*, spesielt siden de har hatt en positiv interaksjon i andre studier (Kimoto-Nira et al., 2012).

I denne oppgaven ble melk inokulert med bakterier inkubert i 24 og 48 t ved 22 °C og 30 °C. For mange av bakteriene som ble undersøkt, spesielt de patogene, hadde det også vært interessant å undersøke vekst ved andre temperaturer. Patogeners vekst i melk ved 4 °C hadde vært veldig interessant å studere, da dette er kjøletemperaturen for lagring av upasteurisert melk. Det kunne også ha vært spennende å studere vekst av både MSB og patogener ved 37 °C.

Litteratursøk i forbindelse med denne oppgaven viste at det har vært lite forskning på vekst av patogene bakterier i melk. En studie (Hettinga et al., 2008) viste likevel at patogener klarer å produsere flyktige komponenter som kan være positivt for smaksprofilen til meieriprodukter. I og med at patogene bakterier vil kunne produsere skadelige stoffer for dyr og mennesker (Walstra et al., 2016), er det lite aktuelt å utnytte dette i næringsmidler, men studiet til Hettinga et al. viste at produksjonen av flyktige komponenter potensielt kan benyttes til å skille patogener fra hverandre. Denne oppgaven viste også litt ulikheter i produksjonen av flyktige komponenter mellom patogenene, og denne forskningen hadde vært spennende å ta videre med et større omfang av patogener og vekstbetingelser. Forskjellene i denne oppgaven var ikke veldig store, og ved videre forskning vil det bli et behov for statistisk analyse for å sikre signifikante forskjeller.

Når en bakterie blir satt til å vokse i et medium som vanligvis ikke er deres habitat, kan de ha behov for justere sitt enzymesystem slik at de klarer å bryte ned komponentene i mediet i sin metabolisme (Walstra et. al., 2016). Bakteriene fikk vokse i melk i 24 eller 48 t, og dette er ikke nødvendigvis lang nok tid til å vende seg til mediet. Hadde nye prøver med melk blitt podet med melk og bakterier fra de forrige prøvene kan det hende at bakteriene hadde hatt et bedre grunnlag for vekst. Dette er derfor også noe å vurdere for videre forskning. Det har også blitt vist (Thomas et. al., 2016) at selv etter at antallet bakterier har begynt å synke vil fortsatt omfanget av komponenter produsert i melk kunne stige, og dette er nok et grunnlag for å studere bakterienes vekst i melk i en lenger tidsperiode.

I denne oppgaven ble kun et fåtall av flere tusen stammer isolert fra friske kyr undersøkt. Resultatene i denne oppgaven er et godt grunnlag for videre forskning, men for å kunne si noe spesifikt om artenes metabolisme i melk er det behov for å undersøke et større omfang av stammer fra samme art. I tillegg vil det være behov for flere gjentak av de individuelle stammene for å sikre statistisk signifikante resultater.

8.0 Referanser

8.1 Tekst

- Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* 24:238–242.
- Asperger, H. & Zangerl, P. (2003). *Staphylococcus aureus*. I: Roginski, H., Faquay, J. W. & Fox, P. F. (red.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. s. 2563-2569. Academic press, London, England.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. Third edition. Marcel Dekker inc. New York.
- Biscola, V., Tulini, F. L., Choiset, Y., Rabesona, H., Ivanova, I., Chobert, J. M., Todorov, S. D., Haertlé, T. & Franco, B. D. G. M. (2016). Proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* VB63F for reduction of allergenicity of bovine milk proteins. *J. Dairy Sci.* 99:5144–5154.
- Bouchard, D., Seridan De Assis B., Saraoui, T., Rault, L., Gonzalez, M. C., Chain, F. ... Even, S. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria from mammary microbiota. Delkapittel I doktoravhandling: Seridan De Assis, B. (2016). Identification of lactic acid bacteria isolated from bovine udder ecosystem and its characterisation as potential inhibitors against mastitis-associated pathogens. l'Université Européenne de Bretagne.
- Cavanagh, D., Casey, A., Altermann, E., Cotter, P. D., Fitzgerald, G. F. & McAuliffe, O. (2015). Evaluation of *Lactococcus lactis* isolates from nondairy sources with potential dairy applications reveals extensive phenotype-genotype disparity and implications for a revised species. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:3961–3972.
- Chan, J. F. W., Woo, P., Teng, J., Lau, S., Leung, S., Tam, F. & Yuen, K. Y. (2011). Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infection* 39:259–264.
- Crow, V. & Curry, B. (2003). *Pediococcus* spp. Roginski, H., Faquay, J. W. & Fox, P. F. (red.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. s. 2245-2247. Academic press, London, England.
- Derakhshani, H., Plaizier, J. C., De Buck, J., Barkema, H. W., & Khafipour, E. (2018). Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. *J. Dairy Sci.* 101: 10191–10205. doi: 10.3168/jds.2018-14858.
- Devriese, L.A., Hommeze, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P. & Haesebrouck, F. (1999). Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 70:87–94.
- Dineshkumar, N. & Renu, A. Preparation of a Probiotic Fermented Milk Using a Native Isolate of *Pediococcus Pentosaceus* MTCC 5151. (2008). *Research Journal of Biotechnology*. 4:28-31.

- Džidić, A. (1999). Physiology of Lactation and Machine Milking. *Mljekarstvo*, 49: 163-174.
- ECDC. (2011). Annual Epidemiological Report — Reporting on 2009 Surveillance Data and 2010 Epidemic Intelligence Data. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. & Ogier, J. C. (2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 121:295–301.
- El Kafsi, H., Binesse J., Loux, V., Buratti, J., Boudebouze, S., Dervyn, R. ... van de Guchte, M. (2014). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*: A chronicle of evolution in action. *BMC Genomics* 15:407.
- Even, S., Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N. D. & Coccagn-Bousquet, M. (1999). Pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* is dependent upon glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase activity. *Metab Eng* 1:198 – 205.
- Facklam, R. & Elliott, J. A. (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*8: 479–495.
- Fernández, M. & Zúñiga, M. (2008). Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 32: 155-183.
- Fernández, E., Alegría, A., Delgado, S. & Mayo, B. (2010). Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *International Dairy Journal* 20:142–148.
- Garde, S., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (1997). Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnology Letters* 19:1011–1014.
- Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panzieri, C, Lauro, L., Ciappelloni, R. & Petracca, G. (2003). Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet. Res. Commun.* 27:471–479.
- Harmon, R. (1995). Mastitis and milk quality. I: Harding, F. (red). *Milk quality*, s. 26-39. London, Chapman & Hall.
- Hettinga, K. A., van Valenberg, H. J. F., Lam, T. J. G. M. & van Hooijdonk, A. C. M. (2008). Detection of Mastitis Pathogens by Analysis of Volatile Bacterial Metabolites. *J. Dairy Sci.* 91:3834–3839.
- Johnson, D. I. (2018). Chapter 9: *Staphylococcus* spp. I: Johnson, D. I. (red). *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. s. 127-145. Burlington, USA, Springer.
- Katz, M., Medina, R., Gonzalez, S. & Oliver, G. (2002). Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe's Milk and Cheese. *Journal of Food Protection* 65:1997–2001.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Okada, S., Endo, A., Murakami, M., Suzuki, S. & Morita, H. (2007). Characterization of *Lactococcus*

- garvieae isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. *Lett. Appl. Microbiol.* 44:481–487.
- Kimoto-Nira, H., Aoki, R., Mizumachi, K., Sasaki, K., Naito, H., Sawada, T. & Suzuki, C. (2012). Interaction between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk: Development of a new starter culture. *J. Dairy Sci.* 95:2176–2185.
- Koebmann, B. J., Solem, C., & Jensen, P. R. (2005) Control analysis as a tool to understand the formation of the las operon in *Lactococcus lactis*. *FEBS J* 272: 2292 – 2303.
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. & Zechner, R. (2011). Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res.* 50:14–27.
- Laven, R. (2016). Mastitis Part 8 - Dry Cow Therapy.
- Limsowtin, G. K. Y., Broome, M. C. & Powell, I. B. (2003). I: Roginski, H., Faquay, J. W. & Fox, P. F. (red.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. s. 1470-1478. Academic press, London, England.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H. & Cai, Y. (2014). Chapter 2: Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. I: Zhang, H & Cai, Y (red.) *Lactic Acid Bacteria. Fundamentals and Practice*. s. 103-205. New York, Springer.
- Lü, A. J., Hu, X. C., Wang, Y., Ming, Q. L. & Hu, H. X. (2012). Immune response in the skin of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), against *Staphylococcus chromogenes*. *Journal of Fish Diseases* 35: 699-704.
- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sorensen, S. J. & Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int J Food Microbiol* 153: 192–202.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P. & Bardowski, J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. I: Mozzi, F., Raya, R. R. & Vignolo, G. M. (red.) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. s. 3-35. Blackwell publishing.
- McAuliffe, O., Kilcawley, K. & Stefanovic, E. (2018). Symposium review: Genomic investigations of flavour formation by dairy microbiota. *J. Dairy Sci.* 102:909–922.
- Milesi, M. M., Wolf, I. V., Bergamini, C. V. & Hynes, E. R. (2010). Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* 93:5020–5031.
- Mofredj, A., Baraka, D., Cadranel, J. F., Lemaitre, P., Kloeti, G. & Dumont, J. L. (2000). *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient. *Am. J. Med.* 109:513–514.
- Morea, M., Baruzzi, F. & Cocconcelli, P. S. (1999). Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology* 87:574–582.

- Narvhus, J. (2019). Personlig meddelelse fra professor Judith Narvhus ved NMBU, Ås. (3.5.2019).
- Nickerson, S. C. (1995). Milk production: factors affecting milk composition. Harding, F. (red). Milk quality, s. 3-24. London, Chapman & Hall.
- Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis —the ‘accidental’ pathogen. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, The National Institutes of Health, USA. *Nature reviews Microbiology* 7: 555-567.
- Oumer, A., Gaya, P., Fernández-García, E., Mariaca, R., Garde, S., Medina, M. & Nuñez, M. (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *Journal of Dairy Research* 68:117-129
- Pan, D. D., Wu, Z., Peng, T, Zeng, Q & Li, H. (2014). Volatile organic compounds profile during milk fermentation by *Lactobacillus pentosus* and correlations between volatiles flavor and carbohydrate metabolism. *J. Dairy Sci.* 97:624–631.
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37: 664–698.
- Rademaker, J. L. W., Herbet, H., Starrenburg, M. J. C., Naser, S. M., Gevers, D., Kelly, W. J., ... van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2007). Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 73:7128 –7137
- Rallu, F., Gruss, A. & Maguin, E. (1996). *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:243-251.
- Rantsiou K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G. & Cocolin, L. (2005). Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1977–1986.
- Saishu, N., Morimoto, K., Yamasato, H., Ozaki, H. & Murase, T. (2015). Characterization of *Aerococcus viridans* isolated from milk samples from cows with mastitis and manure samples. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 1037–1042.
- Sun, M., Gao, J., Ali, T., Yu, D., Zhang, S., Khan, S. U., Fanning, S. & Han, B. (2017). Characteristics of *Aerococcus viridans* isolated from bovine subclinical mastitis and its effect on milk SCC, yield, and composition. *Trop Anim Health Prod* 49:843–849
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W. & Zhang, H. (2014). Chapter 1: Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. I: Zhang, H & Cai, Y (red.) *Lactic Acid Bacteria. Fundamentals and Practice.* s. 1-102. New York, Springer.
- Taboada, N., Medina, R., Núñez, M. & López Alzogaray, S. (2017). Biochemical and microbiological changes throughout the ripening of Argentinean fresh goat’s mol cheeses made with native cultures. *J Microbiol Biotech Food Sci* 6:1174-1180.
- Teixeira, L. M., Merquior, V. L. C., Vianni, M. C. E., Carvalho, M. G. S., Fracalanza, S. E. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. & Facklam, R. R. (1996). Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from

water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:664 – 668

- Thomas, F. C., Mudaliar, M., Tassi, R., McNeilly, T. N., Burchmore, R., Burgess, K., Herzyk, P., Zadox, R. N. & Eckersall, P. D. (2016). Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* mastitis: 3. Untargeted metabolomics. *Mol. BioSyst.* 12:2762-2769.
- Turchi, B., Pedonese, F., Torraca, B., Fratini, F., Mancini, S., Galiero, A., Montalbano, B., Cerri, D. & Nuvoloni, R. (2017). *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus thermophilus* as starter cultures for a donkey milk fermented beverage. *Int J Food Microbiol.* 256:54-61.
- Vendrell D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O. & Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp.Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29:177–198.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. (2016). *Dairy Science and Technology*. Second edition. CRC Press Taylor & Francis Group. New York.
- Werner, G., Fleige, C., Feßler, A. T., Timke, M., Kostrzewa, M., Zischka, M. ... Schwarz, S. (2012). Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Veterinary Microbiology* 160: 162–169.
- Wolfe, A. J. (2015). *Glycolysis for Microbiome Generation*. I: Conway, T. & Cohen, P. (red.) *Metabolism and Bacterial Pathogenesis*. ASM Press, Washington DC, USA.

8.2 Figurer

- Cortes, C. (ukjent år). Mammary gland: physiology and anatomy. E-learning course from ESA. Nedlastningsdato: 26/3-19. Hentet fra:
http://www.groupeesa.com/ladmec/bricks_modules/brick01/1%20%20Mamary%20gland%20physiology%20and%20anatomy.pdf
- Fernández, M. & Zúñiga, M. (2008). Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 32: 155-183.
- Harmon, R. (1995). Mastitis and milk quality. I: Harding, F. (red). *Milk quality*, s. 26-39. London, Chapman & Hall.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P. & Bardowski, J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. I: Mozzi, F., Raya, R. R. & Vignolo, G. M. (red.) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. s. 3-35. Blackwell publishing.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway