

Mastergrads oppg. 20.

UNDERSØKELSE AV PROBIOTISK POTENSIAL HOS  
MELKESYRE- OG PROPIONSYREBAKTERIER, SAMT  
EGNETHETEN TIL OST SOM OVERFØRINGSMEDIUM FOR  
PROBIOTISKE BAKTERIER TIL FORDØYELSESSYSTEMET.

EXAMINATION OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID AND  
PROPIONIC ACID BACTERIA, AND THE SUITABILITY OF CHEESE AS A DELIVERY  
VEHICLE FOR PROBIOTIC BACTERIA.

MONA ELISE BREDE



UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP  
INSTITUTT FOR KJEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP  
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2010





## Forord

Denne oppgaven var en del av ”SUNN OST”-prosjektet, og ble gjennomført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap. Råvarer og økonomisk støtte ble gitt av TINE SA.

Hovedveileder og tilleggsveileder for oppgaven var Therese Faye og Siv Borghild Skeie. Jeg vil takke dem begge for deres hjelp under planlegging og gjennomføring av oppgaven. Deres råd og konstruktive tilbakemeldinger har vært uvurderlige i prosessen.

Jeg vil også rette en stor takk til de ansatte ved pilotanlegget, Arnold Olsen og Geirfinn Lund. Takket være deres erfaring og kunnskap gikk ystingen smertefritt. De fortjener også berømmelse for deres hjelp med den videre lagerbehandlingen av ostene.

Forskningsgruppen til Gerd Vegarud, og spesielt Irene Comi, må også få en stor takk. Uten mage- og tarmsaften som de skaffet til veie, og deres kunnskap om fordøyelsen, hadde det ikke vært mulig å sette opp et tilsvarende kunstig fordøyelsessystem som det ble gjort her.

Alle damene på laboratoriet har også vært til vært til umåtelig stor hjelp. De har sørget for at utstyr og kjemikalier har blitt skaffet til veie til rett tid, gitt praktisk hjelp og ikke minst hatt råd for det meste. May Aalberg, Tone Molland, May-Brit Abrahamsen og Kari Olsen – tusen takk for deres hjelp og strålende humør! Det har vært en fryd å jobbe på laboratoriet sammen med dere!

Sist men ikke minst vil jeg takke venner og familie for all deres støtte det siste drøye halvåret. Dere har bidratt på hvert deres vis til at jeg til slutt kom i mål med oppgaven. Tusen takk skal dere ha alle sammen!

Ås, 16. august 2010

Mona Elise Brede

## Sammendrag

I denne oppgaven ble det probiotiske potensialet til sju utvalgte melkesyrebakteriestammer; *Lactobacillus (Lb.) paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lactobacillus (Lb.) plantarum* 15D, *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* GG, *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *lactis* ML-8N, *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2, og to utvalgte propionsyrebakteriestammer; *Propionibacterium (P.) freundenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, og *Propionibacterium(P.) jensenii* INF P303 undersøkt. Bakteriestammenes syre- og galletoleranse ved 37 °C ble undersøkt *in vitro*. Åtte av de utvalgte bakteriestammene ble tilsatt under ysting av Gouda-type ost. Egnetheten til osten som overføringsmedium for potensielt probiotiske bakterier til tykktarm ble undersøkt ved å teste overlevelsesnivåen til bakteriestammene under ysting og sju ukers modningstid. Bakteriestammenes probiotiske potensial, samt ostens egnethet som deres overføringsmedium, ble videre testet gjennom et kunstig fordøyelsessystem som inkluderte mage- og tarmsaft fra friske personer. Bakteriestammene ble testet gjennom den kunstige fordøyelsen i form av vaskede celler fra renkultur, og inkorporert i mager og helfet ost. Deres overlevelsessevne gjennom systemet i de ulike mediene ble sammenlignet.

Samtlige bakteriestammer ble kraftig hemmet ved pH 2. Laktobasillene hadde generelt best syre- og galletoleranse. Propionsyrebakteriene hadde dårligst syretoleranse, mens dårligst galletoleranse ble observert hos *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene og propionsyrebakteriene. Det ble observert at *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N hadde minst like god toleranse for samtlige inkubasjonsforhold som laktobasillene, med unntak av ved pH 3. Sammenlignet med *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene, hadde *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N betydelig bedre toleranse for pH 2, galle og inkubasjonstemperatur på 37 °C. Det ble påvist noe bedre syre- og galletoleranse for *P. freundenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 enn for *P. jensenii* INF P303.

De åtte bakteriestammene som ble tilsatt under ysting overlevde ystingsprosessen og sju ukers modning i tilstrekkelig mengde i forhold til kravet for probiotiske produkter ( $\sim 10^6$ - $10^9$  kde/g ost). Propionsyrebakteriene viste best overlevelsessevne, mens laktokokkene viste dårligst overlevelse under modningstiden

Det ble påvist signifikant forskjell i bakteriestammenes gjennomsnittlige overlevelsessevne (endring i antall log kde/ml(g)) gjennom den kunstige fordøyelsen ( $p < 0,05$ ). Mediet som bakteriestammene befant seg i før de ble testet gjennom den kunstige fordøyelsen hadde

signifikant effekt på overlevelsesnivåen gjennom hele fordøyelsen ( $p < 0,05$ ). Interaksjonseffekten mellom bakteriestamme og medium var signifikant ( $p < 0,05$ ).

Som vaskede celler fra renkultur overlevde *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D og *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 best gjennom det kunstige fordøyelsessystemet, og hadde en reduksjon i antall dyrkbare celler på omtrent 1 logenhet. Dårligst overlevelsesnivå ble observert hos *P. jensenii* INF P303, med en reduksjon i antall dyrkbare celler på omtrent 6 logenheter.

Inkorporering i ost hadde ikke så god beskyttende effekt som forventet i forhold til bakteriestammens overlevelsesnivå gjennom det kunstige fordøyelsessystemet, siden kun tre av bakteriestammene overlevde bedre i ost enn som vaskede celler gjennom systemet. Dette skyldtes mest sannsynlig begrensninger ved prosedyren. Bakteriestammene som hadde best overlevelsesnivå, overlevde bedre som vaskede celler sammenlignet med når de var inkorporert i ost. For *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene virket inkorporering i ost beskyttende gjennom første del (i magesaft), og for *L. rhamnosus* GG og *P. jensenii* P303 medførte inkorporering i ost økt overlevelsesnivå gjennom andre del av den kunstige fordøyelsen (i tarmsaft).

Det kan konkluderes med at de mest lovende resultatene ble funnet for laktobasillene. Disse bakteriene hadde god syre- og galletoleranse, samt overlevelsesnivå gjennom den kunstige fordøyelsen. I sju ukers ost ble det funnet omtrent  $10^7$ - $10^8$  kde av laktobasiller per gram ost. Osten var relativt godt egnet som overføringsmedium for potensielt probiotiske bakterier. De fleste av de undersøkte bakteriestammene hadde en overlevelsesrate gjennom det kunstige fordøyelsessystemet på over  $10^6$  kde/ml når de var inkorporert i ost.

## Abstract

This study investigated the probiotic potential of seven selected strains of lactic acid bacteria; *Lactobacillus (Lb.) paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lactobacillus (Lb.) plantarum* 15D, *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* GG, *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *lactis* ML-8N, *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 and *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2, and two selected strains of propionic acid bacteria; *Propionibacterium (P.) freundenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 and *Propionibacterium (P.) jensenii* INF P303. Their acid and bile tolerance at 37 °C was investigated *in vitro*. Eight of the selected strains were added to different vats during making of Gouda type cheese. The suitability of the cheese as a delivery vehicle of potentially probiotic bacteria to the large intestine was studied by investigation of the survival rates of the added bacteria during cheese making and seven weeks of ripening. The bacteria's probiotic potential, and the suitability of cheese as their delivery vehicle, was further studied by testing the bacteria's survival rates through a simulated digestion system with added gastric and duodenal juice from healthy volunteers. The bacteria were tested through the system both as washed cells from pure culture, and incorporated into low- and full fat cheese.

All nine of the selected strains were considerably inhibited by a pH of 2. The lactobacilli were the most acid and bile tolerant strains, while the two strains of propionibacteria were the least acid tolerant. The propionibacteria and *L. lactis* subsp. *cremoris* strains were the least bile tolerant. It was shown that *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N survived at least as well as the lactobacilli at all incubation conditions, except for at pH 2. Compared to the strains of *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N showed a considerably better tolerance for pH 2, bile and incubation temperatures of 37 °C. The survival rate in acid and bile conditions were somewhat better for *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 compared to *P. jensenii* INF P303.

All eight strains that were added during cheese making survived the cheese making process and seven weeks of ripening in adequate amounts considering the criteria for probiotic products (~ 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> cfu/g cheese). The levels of survival were lowest for the lactococci, and highest for the propionibacteria.

Significant differences in the average survival rates of the bacterial strains were detected during the simulated digestion (p<0.05). The delivery vehicle of the strains through the digestion system had significant impact on the survival rates of the strains (p<0.05). The

interaction effect between type of bacterial strain and delivery vehicle was also significant ( $p < 0.05$ ).

It was shown that *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 had the best ability to survive through the simulated digestion system as washed cells, with a reduction in number of culturable cells of approximately 1 log unit. With a reduction of about 6 log units, *P. jensenii* INF P303 showed the poorest ability to survive.

Incorporation of the bacteria into cheese did not protect the bacteria as well as expected through the simulated digestion system. Only three of the tested strains survived better in cheese compared to as washed cells through the system. This was probably mainly due to limitations in the protocol. The strains that had the best ability to survive the simulated gastrointestinal conditions, survived better as washed cells compared to when they were incorporated into cheese. The two strains of *L. lactis* subsp. *cremoris* were protected by the cheese through the first part of the digestion system (in gastric juice), whilst *Lb. rhamnosus* GG and *P. jensenii* INF P303 were protected by cheese in the second part (in duodenal juice).

In conclusion the most promising results were obtained for the lactobacilli strains. These bacteria showed good acid and bile tolerance, and ability to survive through the simulated digestion system. After seven weeks of ripening the cheese contained approximately  $10^7$ - $10^8$  cfu of lactobacilli per gram cheese. The suitability of the cheese as a delivery vehicle of potentially probiotic bacteria was relatively good. Most of the tested strains had a survival rate through the simulated digestion system incorporated into cheese higher than  $10^6$  cfu/ml.

## Innholdsfortegnelse

<b>1. Innledning</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Litteraturliste</b> .....	<b>2</b>
2.1. Ost .....	2
2.2. Melkesyrebakterier .....	8
2.3. Propionsyrebakterier .....	15
2.4. Fordøyelsessystemet .....	19
2.5. Functional foods .....	25
2.6. Probiotika .....	26
2.7. Probiotisk ost – ost som functional food .....	36
<b>3. Forsøksdesign, materialer og metoder</b> .....	<b>42</b>
3.1. Bakteriekulturer .....	42
3.2. Ysting .....	45
3.3. <i>In vitro</i> undersøkelse av bakteriestammens syre- og galletoleranse ved 37 °C .....	54
3.4. Undersøkelse av bakteriestammens overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem .....	55
3.5. Statistisk analyse .....	58
<b>4. Resultater</b> .....	<b>60</b>
4.1. Ysting .....	60
4.2. Bakteriestammens syre- og galletoleranse ved 37 °C .....	72
4.3. Bakteriestammens overlevelsessevne gjennom kunstig fordøyelsessystem .....	77
<b>5. Diskusjon</b> .....	<b>92</b>
5.1. Ysting .....	92
5.2. Bakteriestammens syre- og galletoleranse .....	101
5.3. Bakteriestammens overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem .....	105
5.4. Oppsummering .....	110
5.5. Videre undersøkelser .....	111
<b>6. Konklusjon</b> .....	<b>112</b>
<b>7. Litteraturliste</b> .....	<b>113</b>
<b>Vedleggsliste</b> .....	<b>i</b>



## 1. Innledning

I kjølvannet av økt antall tilfeller av, og kunnskap om, kostholdsrelaterte helseproblemer, som diabetes, hjerte- og karsykdommer, allergi, matintoleranse, stoffskiftesykdommer, cøliaki, nyresykdommer, mage- og tarmsykdommer og overvekt, har det oppstått voksende interesse og etterspørsel etter matvarer med bestemte helsefremmende effekter (Makelainen et al. 2009).

Funksjonelle næringsmidler er en betegnelse for matvarer med positiv helseeffekt i tillegg til de daglige ernæringsmessige effektene (Kwak & Jukes 2001). Jevnlig inntak av slike næringsmidler skal kunne redusere risikoen for kroniske sykdommer som hjerte- og karsykdommer, kreft, diabetes, høyt blodtrykk og osteoporose (Lopez-Varela et al. 2002). Probiotika er mye brukt som tilsetning både i kosttilskudd og funksjonelle matvarer. Dette er ”levende mikroorganismer, som når de administreres i tilstrekkelig mengde, medfører positiv helseeffekt hos verten” (Baek & Lee 2009). Det er knyttet mange helsepåstander til inntak av probiotiske bakterier, men til dags dato gjenstår det ennå å få dem og de bakenforliggende mekanismene påvist. For å kunne utøve sin effekt må imidlertid bakteriene oppfylle en rekke framsatte krav, og et av de viktigste av disse er overlevelse gjennom fordøyelsessystemet og forlenget oppholdstid i tykktarm (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

Mange av de probiotiske næringsmidlene på markedet er fermenterte, yoghurtliknende produkter. Det er foreslått at ost, med sin fastere konsistens og høyere pH, samt bufferkapasitet, protein og fettinnhold, kan beskytte de probiotiske bakteriene bedre overfor fordøyelsesliknende forhold enn yoghurt (da Cruz et al. 2009).

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke det probiotiske potensialet til sju utvalgte melkesyrebakteriestammer og to utvalgte propionsyrebakteriestammer med hensyn på syre- og galletoleranse ved 37 °C, samt overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem med humane fordøyelsvæsker. Egnetheten til Gouda-type ost som overføringsmedium for potensielt probiotiske bakterier, i form av overlevelsessevne hos de utvalgte bakteriestammene under ysting og modning, samt gjennom det kunstige fordøyelsessystemet skulle også undersøkes.

## 2. Litteraturredel

### 2.1. Ost

#### 2.1.1. Generelt

I følge FAO/WHO er ost: “the ripened or unripened soft, semi-hard, hard, or extra-hard product, which may be coated, and in which the whey protein/casein ratio does not exceed that of milk, obtained by:

- (a) coagulating wholly or partly the protein of milk, skimmed milk, partly skimmed milk, cream, whey cream or buttermilk, or any combination of these materials, through the action of rennet or other suitable coagulating agents, and by partially draining the whey resulting from the coagulation, while respecting the principle that cheese-making results in a concentration of milk protein (in particular, the casein portion), and that consequently, the protein content of the cheese will be distinctly higher than the protein level of the blend of the above milk materials from which the cheese was made; and/or
- (b) processing techniques involving coagulation of the protein of milk and/or products obtained from milk which give an end-product with similar physical, chemical and organoleptic characteristics as the product defined under (a)” (FAO/WHO 1999).

Ost er en fellesbetegnelse for en rekke relativt ulike produkter, og i Norge defineres ost i følge § 1 i ”Forskrifter om tilvirkning, merking og omsetning av ost som”: ”produkter fremstilt av melk, fløte eller blandinger herav, 1. ved at myse delvis er fjernet fra melkens koagulerende proteiner, 2. ved delvis konsentrering av myse (mysost)” (Landbruks og matdepartementet 2004).

Ost er den mest mangfoldige gruppen av meieriprodukter, og også den mest utfordrende å framstille. De fleste ferdigstilte meieriprodukter er stabile, mens ost er både biologisk og biokjemisk dynamisk og ustabil. Under ysting og modning forekommer det en rekke biokjemiske endringer som dersom de kontrolleres og synkroniseres, resulterer i et produkt med særdeles god sensorisk kvalitet. Dersom modningen ikke kontrolleres ender det derimot med et produkt med uønsket lukt og smak (bismak) (Fox & McSweeney 2004).

Syrning av melk og påfølgende separasjon av ostekorn og myse, er en tradisjonell metode å framstille fersk ost og samtidig forlenge holdbarheten til råvaren på. Videreutvikling av metoden, ved blant annet innføring av bruk av koagulanter (løpe), forming, pressing, salting og modning har ført fram til de ostypene som en kjenner i dag. Det finnes en rekke ulike framstillingsmetoder, og dermed også varianter av ost, men alle kjennetegnes ved at melkas kasein og fettinnhold er konsentrert slik at produktet blir svært næringsrikt (Walstra et al. 2006). Ost har generelt høyt innhold av protein, kalsium, riboflavin, vitamin A og D (Heller et al. 2003). Holdbarheten er også betydelig bedre enn for både melk og syrnede meieriprodukter. Ostens egenskaper endres under oppbevaring. Vanligvis er dette fordelaktige endringer i forhold til smak og tekstur, og en sier at produktet modnes (Walstra et al. 2006).

### **2.1.2. Framstilling**

Ved ysting konsentreres melkas kasein og fett, mens de resterende melkekomponentene (hovedsakelig vann) fjernes sammen med mysa. Ysting involverer en rekke prosesstrinn og biokjemiske forandringer i melka (Walstra et al. 2006). Framstilling av Goudatype ost kan i følge van den Berg et al. (2004), oppsummeres på følgende måte: Før ysting varmebehandles og standardiseres ystemelka for å oppnå et produkt med god kvalitet. Pasteurisert melk kjøles til løpningstemperatur, og melka koaguleres ved tilsetning av syrekultur, løpe, og eventuelle andre ingredienser ( $\text{CaCl}_2$ , tilleggskultur). Det dannes en gel, og kaseinnettverket omgir og fanger opp fett i melka. Skjæring av gelen medfører økt overflate, og røring fremmer myseutskillelse fra gelen (synerese). Myse tappes av, før ostekorna vaskes med vann for å fjerne mest mulig av gjenværende laktose. Varmt vaskevann i kombinasjon med kraftigere etterrøring medfører ytterligere utskilling av myse. Siste myseavtapp skjer relativt langsomt slik at minst mulig luft blir fanget mellom ostekorna. Under forpressing begynner ostekorna å smelte sammen, og ostemassen er klar for å kuttes i mindre blokker. Blokkene overføres til former som osten blir presset i. Under pressing/forming skilles myse ut inntil osten oppnår ønsket form, og overflaten dekkes av en tynn skorpe. Syrningen vil fortsette i osten en tid etter forming og overføring av ostene til saltlake. Etter salting tørkes ostene noe, før de plastres og modnes. Under modningen holdes ostene i rom med kontrollert luftgjennomstrømming for å beskytte skorpen, kontrollere grad av avdamping og hindre synlig vekst av mikroorganismer på ostenes overflate (van den Berg et al. 2004).

Samtlige trinn i prosessen påvirker utbytte, sammensetning og kvalitet i osten, og optimalisering av framstillingsprosessen er forholdsvis komplisert (Walstra et al. 2006). Hvordan ost klassifiseres indikerer framstillingsmetoden for produktet, og både vanninnhold og koaguleringsmetode benyttes for klassifisering. På bakgrunn av vanninnhold kan en dele oster som konsumeres etter en viss modningstid inn i tre hovedgrupper: harde oster (20-45 % vann), halvfaste oster (45-55 % vann) og myke/bløte oster (>55 % vann). Ferske oster er klare til konsum etter mysedrenering og har et høyere vanninnhold (>70 %) (Heller et al. 2003).

### 2.1.3. Syrekulturer

Melkesyrebakterier er alltid til en viss grad involvert ved framstilling av ost. I løpefelt ost har syrekulturer som hovedoppgave å produsere syre under ysting i slike mengder at pH i ystemelka reduseres til ønsket nivå. I tillegg bidrar de til smaksutvikling i fersk og moden ost. I fersk ost produserer noen bakterier diacetyl fra citrat, og CO<sub>2</sub> fra laktose og citrat, som bidrar til henholdsvis smak og åpen tekstur i osten. Under modning bidrar de til aromadannelse ved å frigi proteolytiske og lipolytiske enzymer ved autolyse (Parente & Cogan 2004; Walstra et al. 2006). Melkesyrebakteriene som er involvert i dette kalles med en samlebetegnelse for primærstarter, starter- eller syrekulturer. Vanligvis er artene som benyttes nøye utvalgt, og tilsettes i store mengder til ystemelka. De fleste bakteriene tilhører *Lactococcus (L.) lactis*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus (S.) thermophilus*, *Lactobacillus (Lb.) delbrueckii* subsp. *bulgaricus* og *Lactobacillus (Lb.) helveticus*. Andre mikroorganismer som kan benyttes ved framstilling av ost er f.eks. *Propionibacterium (P.) freudenreichii*, *Brevibacterium linens*, *Penicillium roquefortii* og *Penicillium. camemberti*. Dette er mikroorganismer som ikke er forbundet med selve ystingsprosessen, men som bidrar til biokjemiske og organoleptiske endringer under modningen. På bakgrunn av dette kalles slike mikroorganismer for sekundærstartere eller tilleggskulturer. Da tilleggskulturene utøver sin funksjon under modning av osten, er det ikke nødvendig at disse er til stede i like store mengder i ystemelka. Før var naturlig kontaminering fra melka og ystingslokalet (Non-Starter Lactic Acid Bacteria) ofte tilstrekkelig for å oppnå den ønskede sensoriske kvaliteten i osten. Forbedrede hygieniske tiltak i forhold til ystemelka har imidlertid resultert i utstrakt bruk av tilleggskulturer for å oppnå forbedret sensorisk kvalitet eller helsemessige fordeler av osten.

Det kan benyttes naturlige eller kommersielle syrekulturer ved framstilling av ost. Naturlige syrekulturer inneholder en udefinert blanding av arter/stammer, og reproduseres daglig i

meieriene ved såkalt ”backslopping”. Det finnes også kommersielle syrekulturer basert på de beste av de naturlige kulturene. Selv om disse kulturene er udefinerte, reproduseres de under mer kontrollerte forhold slik at variasjonen reduseres. Slike udefinerte syrekulturer, både naturlige og kommersielle, kalles også tradisjonelle syrekulturer på bakgrunn av sin lange historie. Nå finnes det også såkalte definerte syrekulturer, som inneholder en eller flere bestemte bakteriestammer. Da disse er optimaliserte, både med hensyn på reproduserbarhet, yteevne og resistens mot bakteriofager, har de utkonkurrert de tradisjonelle syrekulturene ved produksjon av en rekke ostetyper (Parente & Cogan 2004).

Syrekulturer kan grupperes på flere ulike måter. Avhengig av om ettervarmingstemperaturen er over eller under 40 °C benyttes henholdsvis termofile eller mesofile syrekulturer. En annen måte å gruppere syrekulturer på tar utgangspunkt i deres metabolisme. Til framstilling av fermenterte meieriprodukter finnes det syrekulturer av rene syredannere, aromadannere, og syrekulturer med en blanding av syre- og aromadannere. De fleste mesofile syrekulturer inneholder arter av *L. lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus* (*L.*) *lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus* (*L.*) *lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis* og *Leuconostoc cremoris*. Av disse er *L. lactis* subsp. *lactis* og *L. lactis* subsp. *cremoris* rene syredannere, og syrekulturer som kun inneholder disse artene kalles O-kulturer. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc* sp. er aromadannere som fermenterer citrat til diacetyl. Syrekulturer som inneholder *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* kalles D-kulturer, mens syrekulturer som inneholder *Leuconostoc* sp. kalles L-kulturer. Dersom en syrekultur inneholder begge aromadannerne kalles den for en DL- kultur (Mäyrä-Mäkinen & Bigret 2004).

#### **2.1.4. Non-Starter Lactic Acid Bacteria**

Non-Starter Lactic Acid Bacteria, gjerne forkortet som NSLAB, er bakterier som kommer over i ystemelka ved kontaminasjon, og som vokser opp i osten. Størstedelen av disse bakteriene er laktobasiller (Walstra et al. 2006), som har god toleranse for forholdene som råder i osten under modning. De vokser over et bredt temperaturspekter (2-53 °C), og er syretolerante med optimal pH for vekst på 5,5-6,2 (Beresford & Williams 2004). Noen arter er ikke avhengige av sukker som energikilde, men kan benytte seg av bestemte aminosyrer eller karbohydratdelen av glykoproteiner i fettkulemembranen (Walstra et al. 2006). I modnet ost utgjør dermed NSLAB en stor del av mikrofloraen (Beresford & Williams 2004), og kan nå et

nivå på omtrent  $10^7$ - $10^8$  kde/g. Deres sterke proteolytiske aktivitet medfører produksjon av en rekke smakskomponenter under modning, både ønskede og uønskede sådanne (Walstra et al. 2006).

### 2.1.5. Modning

I følge FAO/WHO er modnet ost: "cheese which is not ready for consumption shortly after manufacture but which must be held for such time, at such temperature, and under such other conditions as will result in the necessary biochemical and physical changes characterizing the cheese in question" (FAO/WHO 1999).

Ostemodning er en kompleks prosess hvor de unike karakteristikkene ved de enkelte ostetyper utvikles (Walstra et al. 2006). Sammensetningen av mikrofloraen i osten endres, men både bakterier, gjær og mugg vil være tilstede under modningen avhengig av hvilken ostetype som lages. Mikrobiell vekst og utvikling under ostemodning bestemmes av miljøfaktorer som vann- og saltinnhold, pH, tilstedeværelse av organiske syrer og nitrat, redokspotensial og modningstemperatur. En del av disse faktorene avhenger igjen av framstillingsprosessen som påvirker ostens sammensetning i form av salt i væskefase, vanninnhold i fettfri masse, fett i tørrstoff og pH.

Mikrofloraen som knyttes til ostemodning er som regel svært mangfoldig, men kan inndeles i to hovedgrupper, syrekulturen og sekundær mikroflora. Sekundærflora er en samlebetegnelse på ulike grupper mikroorganismer; tilleggskulturer som, propionsyrebakterier, mugg, og gjær og bakterier som vokser på overflaten til kittmodnet ost, samt NSLAB som kan bestå av en eller flere ulike arter av *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* og *Leuconostoc*. Syrekulturen er ansvarlig for syreproduksjon under ysting, mens sekundærfloraen har sin viktigste rolle under modningsperioden. I fersk ostemasse utgjør syrekulturen vanligvis en stor del av den mikrobielle biomassen, og i 24 timers ost er det vanlig med en konsentrasjon av syrekulturen på over  $10^8$  kde/g. På grunnlag av sin høye konsentrasjon i osten har disse bakteriene et stort biokatalytisk potensial i forhold til reaksjoner knyttet til ostemodning. Da de fleste enzymene imidlertid er intracellulære, må syrekulturcellene lysere for å utøve noen effekt (Beresford & Williams 2004).

Når syrekulturen dør ut og lyserer under modningen, kan tilfeldig NSLAB-flora utvikles og vokse opp (McSweeney 2004). Disse bakteriene har ikke kun fordelaktige egenskaper i

forhold til ostemodning. Utvalgte tilleggsstammer av *Lactobacillus* sp. kan imidlertid forbedre ostens kvalitet. Obligate heterofermentative laktobasiller, som *Lactobacillus (Lb.) helveticus* og *Lb. delbrueckii*, som kan inntre i siste del av modningsperioden assosieres med uønsket tekstur og bismak i Cheddar, samt bismak i Gouda. Rasemisering av L- til D-laktat kan også medføre sensoriske feil som krystallisering av kalsium -D-laktat som gir hvite flekker på overflaten av osten. Andre stammer, som *Lactobacillus (Lb.) casei* og *Lactobacillus (Lb.) plantarum*, har igjen vist evne til å bidra til blant annet forbedret smak, mer intens aroma og raskere modning. Tilstedeværelse av tilfeldige NSLAB medfører en variasjon i modningsprosessen, som vanskelig kan kontrolleres av ysteren. Det forekommer variasjoner mellom ysterier, ystingsdager, og mellom ystekar samme dag, – noe som gir forskjeller som er umulig å forutsi. Det er ennå ikke funnet noen klar sammenheng mellom variasjonen i NSLAB-floraen og variasjoner i ost fra ulike batcher i forhold til ostenes kvalitet (Beresford & Williams 2004).

I mange ostetyper tilsettes det tilleggs kulturer som blir dominerende under modningstiden. Den metabolske aktiviteten til disse tilleggs kulturrene er ofte særdeles viktig for smaksutviklingen i osten (McSweeney 2004). Blant annet tilsettes propionsyrebakterier ved ysting av Sveitserost for å oppnå den karakteristiske søtlige og nøtteaktige aromaen, samt hullsettingen som forbindes med slike oster. Propionsyrebakterier overlever den høye ettervarmingstemperaturen som benyttes under ystingen, og er til stede i en mengde på  $10^8$ - $10^9$  kde/g etter et par uker. Det er lite som tyder på at disse bakteriene dør ut og lyses under modningen (Beresford & Williams 2004).

Ostens sensoriske egenskaper som tekstur og aroma utvikles og bestemmes av biokjemiske reaksjoner som kan inndeles i fire hovedgrupper; 1: glykolyse av gjenværende laktose og katabolisme av laktat, 2: katabolisme av citrat (spesielt viktig i noen ostetyper), 3: lipolyse og katabolisme av frie fettsyrer og 4: proteolyse og katabolisme av aminosyrer (McSweeney 2004; Walstra et al. 2006). Grad av proteolyse og lipolyse avhenger av vanninnhold, pH, og saltinnhold i osten. Ulike enzymer medfører dannelse av peptider, aminosyrer, fettsyrer, karbonyl- og svovelforbindelser. For å unngå harsk og bitter smak i osten må graden av lipolyse og proteolyse kontrolleres og begrenses. Mikrofloraen bidrar positivt til modningsprosessen direkte ved deres metabolske aktivitet, eller indirekte ved frigjøring av enzymer når cellene lyses (Beresford & Williams 2004).

### 2.1.6. Gouda

Van den Berg et al. laget i 2004 en inngående beskrivelse av Gouda og liknende type oster. I følge denne kan Gouda klassifiseres som en halvfast type ost. Osten kjennetegnes av halvfast konsistens, glatt tekstur og som regel små hull. Det er stor variasjon i smaksintensiteten til ostene, og lang lagringstid resulterer i kort og hard konsistens, samt utkrystallisering av aminosyrer. Til Gouda type ost benyttes det som regel kumelk, standardisert til en fettprosent på omtrent 40 i ostens tørrstoff (van den Berg et al. 2004). Syrekulturene som benyttes er vanligvis udefinerte blandingskulturer av mesofile laktokokker og *Leuconostoc*, som har som hovedoppgaver å produsere melkesyre, CO<sub>2</sub>, diacetyl og bidra til proteolyse (Parente & Cogan 2004). Osten presses for å oppnå en tett skorpe. Syrningen foregår hovedsakelig i ostemassen etter myseavtapp, under pressing og første del av saltingen. Til Gouda-type ost benyttes det ingen overflateflora, og osten må modnes i minst 4 uker før den kan spises.

Gouda og liknende ostetyper kan variere en del når det gjelder blant annet fettinnhold, pH og modningstid. Mengde fett i ostens tørrstoff kan variere fra 40 til over 50 prosent, og pH kan variere fra 4,9 i sprø Edamer til 5,6 i vellagret Gouda. Modningstiden kan være alt fra to måneder til to år (van den Berg et al. 2004).

## 2.2. Melkesyrebakterier

### 2.2.1. Historie

Etter at melkesyrebakterier først ble oppdaget av Louis Pasteur under alkoholfermentering i 1857, og Tissier isolerte *Bacillus bifidus* (*Bifidobacterium*) i 1899, ble det startet en storstilt pediatrik forskning omkring spedbarnsernæring og tarmflorasammensetning. Dette førte blant annet til at Moro i 1900 oppdaget *Bacillus acidophilus* (*Lactobacillus acidophilus*), Metchnikoff i 1904 viste tilstedeværelse *Bacillus bulgaricus* (*Lb. thermophilus* subsp. *bulgaricus*) i yoghurt, og at *Lb. casei* ble isolert fra ost av Orla-Jensen i 1916, og fra menneskets fordøyelsessystem av Shirota i 1929. I dag er melkesyrebakterier blant de viktigste mikroorganismene i kommersiell bruk, og benyttes både i en rekke næringsmidler og kosttilskudd (Baek & Lee 2009).



### 2.2.2. Generelt

Melkesyrebakterier er en samlebetegnelse for mange medlemmer av en orden, kalt *Lactobacillales*. Betegnelsen kommer av at disse bakteriene produserer melkesyre som deres viktigste eller eneste fermenteringsprodukt (Prescott et al. 2005).

Rent genetisk sett er melkesyrebakterier relativt forskjellige, men de har likevel en rekke sammenfallende karakteristiske egenskaper. De er gram-positive, ikke-bevegelige og ikke sporedannende (Walstra et al. 2006). Da de ikke er i stand til å produsere jernholdige komponenter, som f.eks. katalase og cytochromer, skaffer de heller til veie energi ved substratnivå-fosforylering enn via elektrontransportkjeder. Dermed klassifiseres melkesyrebakterier som fakultativt anaerobe eller aerotolerante anaerobe (Prescott et al. 2005). Etter taksonomiske revisjoner finnes det i dag omlag 20 slekter av melkesyrebakterier. De viktigste av disse som er forbundet med matindustri er *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* og *Weisella* (Axelsson 2004). De fire slektene som vanligvis benyttes til fermentering av meieriprodukter er: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* og *Leuconostoc*. (Walstra et al. 2006). Til framstilling av håndlagede oster, spesielt fra Middelhavsområdet, benyttes også ofte arter av slektene *Enterococcus* og *Staphylococcus* (Parente & Cogan 2004). Slekten *Bifidobacterium* betraktes ofte som en melkesyrebakterie, og har mange av deres typiske egenskaper. Bifidobakterier er imidlertid fylogenetisk ubeslektet med melkesyrebakteriene, og har en egen form for sukkermetabolisme (Axelsson 2004).

Melkesyrebakterier er avhengige av fermentering av sukker/karbohydrater til melkesyre gjennom ulike metabolske veier (Axelsson 2004; Walstra et al. 2006). To hovedveier for sukkerfermentering er homofermentering og heterofermentering. Homofermentering involverer glykolyse (Embden, Meyerhof, Parnas pathway), og endeproduktet er melkesyre. Heterofermentering (6-fosfogluconate/fosfoketolase-pathway) resulterer i betydelig mengder av etanol, eddiksyre og CO<sub>2</sub> i tillegg til melkesyre. Ulike vekstbetingelser kan imidlertid medføre endringer i fermenteringsendeprodukter, som følge av at bakteriene tar i bruk alternativ pyruvatmetabolisme eller eksterne elektronakseptorer (oksygen eller organiske forbindelser) (Axelsson 2004). Tabell 1 gir en oversikt over karakteristikk hos noen utvalgte melkesyrebakterier som benyttes i fermenterte meieriprodukter.

**Tabell 1: Klassifiseringskarakteristikker for noen utvalgte melkesyrebakterier involvert i produksjon av fermenterte meieriprodukter (Walstra et al. 2006).**

Slekt	<i>Lactococcus</i>		<i>Lactobacillus</i>	
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. casei</i>
<b>Art</b>				
<b>Morfologi</b>	Kokker	Kokker	Staver	Staver
<b>Vekst ved 10 °C</b>	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Vekst ved 45 °C</b>	Nei	Nei	Nei	Nei
<b>Temperatur- avhengighet</b>	Mesofil	Mesofil	Mesofil	Mesofil
<b>Laktose- fermentering</b>	Homoferm.	Homoferm.	Fak. heteroferm <sup>a</sup>	Fak. heteroferm <sup>a</sup>
<b>Melkesyreisomer</b>	L	L	D, L <sup>b</sup>	L
<b>Citratmetabolisme</b>	Nei	Nei	Nei/Ja <sup>c</sup>	Nei
<b>Diacetylproduksjon</b>	Nei	Nei	Nei/Ja <sup>c</sup>	Nei
<b>Eksopolysakkarid- dannelse</b>	Ja/Nei	Ja/Nei	Ja/Nei <sup>d</sup>	Ja/Nei <sup>e</sup>
<b>Toleranse for 6,5 % salt</b>	Nei	Nei	Ja/Nei	Ja/Nei

a) (Axelsson 2004).

b) *Lb. plantarum* produserer hovedsakelig L-melkesyre (Skeie 2010).

c) *Lb. plantarum* INF15D er blitt påvist å være i stand til å degradere citrat til blant annet diacetyl (Skeie et al. 2008).

d) Ikke oppgitt av Walstra et al (2006), men produksjon av eksopolysakkarider ble blant annet påvist for *Lb. plantarum* EP56 (Tallon et al. 2003).

e) Ikke oppgitt av Walstra et al (2006), men produksjon av eksopolysakkarider ble blant annet påvist for *Lb. casei* CRL87 (Mozzi et al. 2009).

Melkesyrebakterier er naturlig tilstedeværende i mange ulike habitater, men felles for disse er vanligvis at de er rike på næringsstoffer (Baek & Lee 2009). Dette fordi melkesyrebakterier har relativt begrensede biosyntetiske egenskaper, og er nokså ernæringsmessig krevende. De fleste arter krever spesifikke aminosyrer, vitaminer, pyrimidiner og pyrimidiner som vekstfaktorer (Prescott et al. 2005; Walstra et al. 2006). Eksempler på habitater hvor en finner melkesyrebakterier er matvarer og plantemateriale som bakteriene kan fermentere og/eller ødelegge, samt jord, vann, avføring, kloakk og silo. I tillegg finnes enkelte typer melkesyrebakterier både i munnhulen, fordøyelseskanalen og vagina hos mennesker, hvor de kan utøve både fordelaktig og/eller negative effekter på økosystemene (Baek & Lee 2009).

### 2.2.3. Laktokokker

Laktokokker var tidligere inkludert i slekten *Streptococcus* sammen med slektene *Enterococcus*, *Streptococcus* og *Vagococcus* (Axelsson 2004). Slekten *Lactococcus* består av fem arter: *Lactococcus garviae*, *L. lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* og *Lactococcus raffinolactis* (Schleifer et al. 1995). Bakteriene er gram-positive kokker. De er homofermentative, og produserer kun L(+)-isomeren av melkesyre. Laktokokkene er ikke  $\beta$ -hemolytiske, og kun svakt  $\alpha$ -hemolytiske. Vanlige habitat for laktokokker er planter og hudoverflaten til dyr. Laktokokker finnes i råmelk som følge av kontaminasjon fra foret under melking (Casalta & Montel 2008).

Laktokokker er sterkt forbundet med meieriindustri, og en undersøkelse av 35 europeiske meieriprodukter viste at laktokokker var den vanligste melkesyrebakterien, og utgjorde 38 % av bakterieisolatene som ble identifisert i produktene. Det er imidlertid kun en av de fem artene som man kjenner i dag som vanligvis finnes i råmelk og meieriprodukter, og som faktisk benyttes i meieriindustrien. Dette er arten *L. lactis*, som igjen har tre underarter nemlig; subsp. *lactis*, subsp. *cremoris* og subsp. *hordniae*. Det er kun de to førstnevnte underartene som er av industriell interesse, og de kan vokse til et nivå på over  $10^8$  kde/g allerede så tidlig som etter 24 timer i ost (Axelsson 2004; Casalta & Montel 2008).

*L. lactis* subsp. *cremoris* kan skilles fra *L. lactis* subsp. *lactis* ved at de ikke kan vokse ved 40 °C eller 4 % NaCl, og ikke er i stand til å hydrolysere arginin eller fermentere ribose (Axelsson 2004). Begge underartene benyttes som syrekulturer ved framstilling av fermenterte meieriprodukter. Deres hovedoppgave er å produsere melkesyre, men de bidrar også til smaksutvikling ved produksjon av aromatiske forbindelser (alkoholer, ketoner, aldehyder) eller metabolisme av citrat, aminosyrer og/eller fett (Casalta & Montel 2008).

Noen stammer av begge underarter er i stand til å produsere eksopolysakkarider. Eksopolysakkaridene kan danne en kapsel som er tett eller løst forbundet til produsentcellen, eller frigjøres i melka, og kan dermed bidra til teksturdannelse, samt til at fermenterte melkeprodukter holder seg stabile ved lave temperaturer (hindrer synerese) (Walstra et al. 2006). Den biologiske rollen til eksopolysakkaridene er ikke helt ut forstått ennå. Det antas at produksjon av eksopolysakkarider kan beskytte bakteriene mot harde miljøforhold, og bidra til adhesjonsegenskaper og dannelse av biofilm. I tillegg spekuleres det omkring mulige positive effekter på human helse. I dette henseende er både produksjon av kortkjedede fettsyrer, forebyggende effekt mot kreft og magesår, kolesterolsenkende og

immunmodulerende effekter (økt formering av T-lymfocytter, aktivering av makrofager og cytokinproduksjon) nevnt, men ikke bevist (Duboc & Mollet 2001; Mozzi et al. 2009; Ruas-Madiedo et al. 2002). I noen tilfeller kan eksopolysakkarider også fungere som prebiotika. De kan virke beskyttende mot tykktarms- og endetarmskreft på to måter: (1) Degradering av eksopolysakkarider av den “gode/fordelaktige mikrofloraen” i tykktarmen kan medføre dannelsen av kortkjedede fettsyrer (2) Ikke degraderte eksopolysakkarider vil medføre økt mengde avføring, og kan utøve spesifikk adsorpsjon av karsinogener (Mozzi et al. 2009).

På bakgrunn av deres evne til å produsere organiske syrer og bakteriosiner, som nisin, kan laktokokker også benyttes som konserveringsmiddel i produkter (Walstra et al. 2006). Laktokokker klassifiseres vanligvis som GRAS-organismer, dvs. generally recognized as safe. *L. lactis* ansees ikke som noen opportunistisk patogen, da det kun er blitt rapportert om to tilfeller av endokarditt i løpet av femti år (Casalta & Montel 2008).

#### **2.2.4. Laktobasiller**

*Lactobacillus* er med 106 beskrevne arter den største og mest heterogene slekten av melkesyrebakterier. Dette gjenspeiles i deres G+C -innhold (prosentandel av nitrogenbasene i DNAet som utgjøres av guanin og cytosin) som varierer fra 35-50 % (Axelsson 2004; Prescott et al. 2005; Vasiljevic & Shah 2008). Laktobasillene mangler katalase og cytokromer, og er vanligvis fakultativt eller mikroaerofile og kjemoorganotrofe. Melkesyre er deres viktigste fermenteringsprodukt, og bakteriene har strenge næringskrav. Laktosefermentering foregår enten homofermentativt via Embden-Meyerhof-veien, eller heterofermentativt via pentosefosfat-veien (Prescott et al. 2005). Vanligvis inndeles slekten i tre hovedgrupper, etter deres metode for sukkerfermentering, jfr. Tabell 2.

Tabell 2: Oversikt over karakteristiske egenskaper ved ulike arter av laktobasiller inndelt etter sukkerfermenteringsmetode (Axelsson 2004).

Karakteristikk	Gruppe 1: Obligat homofermentative	Gruppe 2: Fakultativt heterofermentative	Gruppe 3: Obligat heterofermentative
Pentose fermentering	Nei	Ja	Nei
CO <sub>2</sub> fra glukose	Nei	Nei	Ja
CO <sub>2</sub> fra gluconate	Nei	Ja, når det fermenteres	Ja, når det fermenteres
FDP aldolase tilstede	Ja	Ja	Nei
Fosfoketolase tilstede	Nei	Ja, induserbar av pentoser	Ja
Arter	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrüeckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

Optimal vekst oppnås ved svakt sure forhold (pH 4,5-6,4) (Prescott et al. 2005). Laktobasiller trives best i karbohydratrike omgivelser (Vasiljevic & Shah 2008), og vanlige habitater for slekten er planteoverflater, meieriprodukter, kjøtt, vann, kloakk, øl, frukt og mange andre materialer. Laktobasiller er også vanlige deltakere i menneskers normale bakterieflora, og finnes både i munnhule, fordøyelsessystemet og vagina. Laktobasiller er vanligvis ikke patogene, og er særdeles viktige i matindustrien hvor de benyttes i produksjon av meieriprodukter, fermenterte vegetabiliske produkter, surdeigsbrød, harde ostetyper, yoghurt og pølser. Bakteriene kan imidlertid også medføre ødeleggelse av matvarer. Deres metabolske endeprodukter kan medføre uønsket lukt og smak i øl, melk og kjøttprodukter (Prescott et al. 2005).

Til tross for at laktobasiller finnes omtrent over alt, er det blitt rapportert om svært få tilfeller av infeksjoner forårsaket av disse bakteriene. Rapporterte tilfeller er kun forbundet med personer med svekket immunforsvar. Noen stammer av laktobasiller innehar antibiotikaresistens, og dette kan gjøre infeksjonene mer kompliserte. Det er derfor viktig å undersøke hvor følsomme laktobasillene er overfor antibiotika før de tas i bruk i industrien (Bernardeau et al. 2008).

### 2.2.5. Antimikrobiell aktivitet

Melkesyrebakterier har evne til å produsere en rekke inhibitorer som kan virke hemmende på vekst av andre mikroorganismer. På denne måten bidrar de til å forbedre holdbarhet og sikkerhet i ulike matvarer. Den viktigste hemmende egenskapen er produksjon av udissoierte syrer som melke- og eddik- og maursyre ved nedbrytning av sukker. Syrene bidrar til redusert pH i miljøet omkring dem, og hemmer vekst av syresensitive arter.

Under oksidasjon av NADH ved hjelp av flavoproteiner produserer de fleste melkesyrebakterier også hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ), som virker sterkt oksiderende på bakterieceller. Melkesyrebakterier er aerotolerante, og kan vanligvis overkomme problemene som oppstår som følge av oksygen eller oksygenmetabolitter ved hjelp av katalase (Walstra et al. 2006). Det er godt dokumentert at organiske syrer og  $H_2O_2$  produsert av melkesyrebakterier kan virke hemmende mot koliforme, salmonella og klostridier *in vitro*, men overbevisende resultater for effekt *in vivo* mangler fortsatt (Nousiainen et al. 2004).

Mange melkesyrebakterier produserer også bakteriosiner, antibakterielle peptider eller proteiner, som vanligvis virker mot nært beslektede arter. Det mest kjente bakteriosinet er nisin, som produseres av *L. lactis* subsp. *lactis*. Nisin er et lanthibiotika, en samlebetegnelse for bakteriosiner som inneholder en uvanlig aminosyre, kalt lanthionin, dannet ved posttranslasjonell modifisering. Nisin er et bredspektret bakteriosin, og virker hemmende mot *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, og *Listeria*. Andre eksempler på såkalte lanthibiotika er lacticin 481 og lactocin S som produseres av henholdsvis *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ og *Lactobacillus sake*. Det finnes også en rekke andre bakteriosiner, for eksempel klasse II bakteriosiner, som ikke inneholder lanthionin. Disse har ofte et smalere spekter av organismer som de er aktive mot. *L. lactis* subsp. *cremoris* produserer ulike bakteriosiner av denne gruppen. Genene som er involvert i produksjon av bakteriosiner kan være plasmidbundne eller kromosomale. Bakterier som produserer bakteriosiner innehar som regel et immunitetsgen som koder for en forsvarsfunksjon mot sitt eget bakteriosin (Walstra et al. 2006).

## 2.3. Propionsyre bakterier

### 2.3.1. Generelt

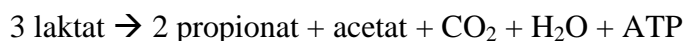
Propionsyrebakterier ble for første gang beskrevet i 1906, av Freudenreich og Jensen, og navngitt tre år senere. Navnet stammer fra bakterienes hovedfermenteringsprodukt, propionsyre. I følge Arthur C. Ouwehand kan propionsyrebakterier ”generelt karakteriseres som gram-positive, ikke-sporedannende, ikke-bevegelige, pleomorfiske staver”. Dette er hovedsakelig anaerobe bakterier, men noen stammer kan være aerotolerante. Det finnes to hovedgrupper propionsyrebakterier; klassiske propionsyrebakterier med hovedhabitat i meieriprodukter (spesielt sveitseroster) og kutane propionsyrebakterier som ofte isoleres fra menneskets hud. De klassiske propionsyrebakteriene har også blitt isolert fra blant annet vominnhold fra kyr og råtnende oliven og appelsiner, mens bakteriene fra den andre gruppen er blitt isolert fra avføring fra mennesker, kylling og gris (Ouwehand 2004).

### 2.3.2. Metabolisme

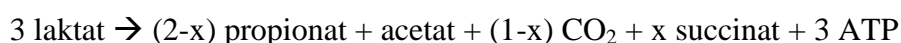
Propionsyrebakterier skaffer til veie energi ved fermentering av glukose til propionsyre, eddiksyre og CO<sub>2</sub>, og oppnår 4 mol ATP per mol glukose. Bakteriene er i stand til å generere ATP både ved substratnivåfosforylering og oksidativ fosforylering.

En viktig egenskap ved propionsyrebakterier er deres evne til å vokse på melkesyre under anaerobe forhold. Fermentering av melkesyre til propionsyre kan foregå på tre måter; via klassisk vei, ved dannelse av succinat ved fiksering av CO<sub>2</sub>, eller ved bruk av aspartat som elektronakseptor. I tillegg til propionsyre, eddiksyre og CO<sub>2</sub>, dannes det via de to sistnevnte veiene succinat eller succinat og ammoniakk.

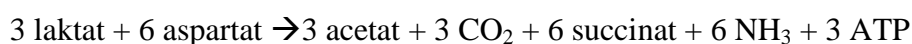
#### Klassisk vei:



#### Dannelse av succinat ved fiksering av CO<sub>2</sub>:



#### Aspartat som elektronakseptor:



For å kunne gjennomføre propionsyrefermentering kreves det både biotin og vitamin B<sub>12</sub>. Dette er forbindelser som bakteriene selv kan syntetisere og dermed er en rik kilde til (Ouwehand 2004).

### 2.3.3. Egenskaper i meieriprodukter

Propionsyrebakteriers viktigste rolle i meieriprodukter er deres bidrag til smaksutvikling i modnet ost. Bakteriene kan bidra til nedbryting av både peptider og frie aminosyrer som finnes i osten. Nedbrytningen medfører økning i mengde fri prolin, som er viktig for utvikling av den karakteristiske smaken forbundet med sveitserost/ost tilsatt propionsyrebakterier. Hullene som finnes i slike oster skyldes CO<sub>2</sub> som produseres når propionsyrebakteriene fermenterer melkesyre produsert av starterkulturen og andre melkesyrebakterier i osten. Propionsyren som dannes under fermenteringen, samt forgreinede fettsyrer fra aminosyrenedbrytning (katabolisme) er også viktige smakskomponenter i sveitserost.

En annen viktig egenskap som enkelte propionsyrebakteriestammer innehar er evnen til å produsere eksopolysakkarider i melk. Dette endrer reologien i produkter, og i likhet med enkelte laktokokker, kan propionsyrebakterier kanskje benyttes til produksjon av fortykningsmiddel (Ouwehand 2004).

### 2.3.4. Antimikrobiell aktivitet

Propionsyrebakterier har relativt stor antimikrobiell aktivitet. Bakteriene produserer blant annet propionsyre, en svak organisk syre, som kan virke hemmende på enkelte bakterier og sopp dersom det medfører tilstrekkelig pH-reduksjon i nærmiljøet. Propionat har mye sterkere hemmende effekt på både gjær og mugg sammenlignet med andre organiske syrer som laktat og acetat. Den konserverende evnen til propionsyrebakterier og deres fermenteringsprodukt er interessant for næringsmiddelindustrien (Ouwehand, 2004), og propionat, natrium-, kalium og kalsiumpropionat er tillatt som konserveringsmidler i en rekke land. Microgard™ og Bioprofit™ er eksempler på produkter bestående av henholdsvis *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* og *P. freudenreichii* JS i kombinasjon med *Lb. rhamnosus* LC705, som benyttes som konserveringsmidler i blant annet meieriprodukter og surdeigsbrød (Holo et al. 2002; Ouwehand 2004).



Enkelte stammer *Propionibacterium (P.) jensenii*, *Propionibacterium (P.) thoenii* og *P. freudenreichii*, er også i stand til å produsere bakteriosiner. (Ouwehand 2004). Noen av disse har relativt brede virkningspekter, og kan virke hemmende mot gram-positive og -negative bakterier, gjær og sopp (Holo et al. 2002). Eksempler på bakteriosiner produsert av propionsyrebakterier er et antimikrobielt peptid produsert *P. jensenii* INF P303, som har en rekke egenskaper til felles med klasse II bakteriosiner (Faye et al. 2002), og propionicin T1, produsert av *P. thoenii*, som virker hemmende mot alle klassiske (meieri) propionsyrebakterier med unntak av *P. freundenreichii* (Brede et al. 2005).

Det er også blitt observert at propionsyrebakterier kan produsere forbindelser som kan virke hemmende på virus, nemlig propioniner. Det trengs imidlertid mer forskning på området før en kan uttale seg om effekten av disse substansene.

### 2.3.5. Probiotisk potensial

Når det gjelder propionsyrebakteriers probiotiske potensial er det gjort en del forskning omkring de framsatte kriterier for probiotiske bakterier. Kriteriet om human opprinnelse er ingen fordel for propionsyrebakterier, da det ikke er fastslått at disse bakteriene utgjør noen viktig del av menneskets tarmflora. Isolater av propionsyrebakterier fra tarm vil ofte også inneholde bakterier fra den hovedgruppen av propionsyrebakterier som forbindes med hud. Disse er ofte assosiert med sykdom, og er dermed ikke egnet som probiotika.

Evne til å tolerere forholdene som råder i fordøyelsessystemet har blitt påvist, i form av syre- og galletoleranse, for enkelte propionsyrebakteriestammer. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS viste seg også å kunne adhere til Caco-2 enterocyttiliknende vevskulturceller på lik linje med *Lb. rhamnosus* GG. Propionsyrebakteriestammen adherte ikke noen særlig grad til mucus/slim fra menneskelig tarmslimhinne, men adhesjonsevnen ble forbedret dersom andre probiotiske bakterier hadde adhert i forkant. Dette gir propionsyrebakterier et teoretisk godt utgangspunkt i forhold til det å inneha potensielt probiotiske egenskaper. Oppfyllelse av de framsatte krav for probiotiske bakterier, er imidlertid ingen garanti for probiotisk effekt/virkning *in vivo* (Ouwehand 2004).

Det er også andre egenskaper ved propionsyrebakterier som kan være interessante i forhold til deres potensielt probiotiske evne. Det er blitt observert at organiske syrer, og spesielt propionsyre, fremmer vekst av bifidobakterier i tarmsystemet hos mennesker. Selv om

bifidobakterier ansees som en viktig del av vår normale tarmflora er det usikkert om økt konsentrasjon av disse vil ha noen positiv helseeffekt. Forsøk med mus har vist at propionsyrebakterier har evne til å endre tarmflorasammensetningen, i form av blant annet reduksjon i nivået av koliforme bakterier. Hos barn med ubalanse i tarmfloraen har det blitt observert at propionsyrebakterier kan øke nivået av fekale bifidobakterier og laktobasiller, og redusere nivået av enterokokker og stafylokokker. Om dette også kan gi beskyttelse mot patogener er fortsatt usikkert (Bougle et al. 1999; Ouwehand 2004)

Ulike stammer av propionsyrebakterier har i forsøk med mus og mennesker vist seg å ha evne til å redusere nivå av fekale enzymer som bidrar til dannelse av mutagene, karsinogene, og tumor promoterende forbindelser (Chaia et al. 1999; Ouwehand). Det er imidlertid ennå ikke påvist at redusert nivå av f.eks.  $\beta$ -glucuronidase, azoreductase og aflatoxin B1 vil medføre redusert risiko for utvikling av kreft hos mennesker (Ouwehand 2004).

Mange påstått probiotiske bakteriestammer er blitt undersøkt for evne til å redusere serumkolesterolnivået. Propionsyrebakterier kan muligens ha en bedre evne til å gjøre dette sammenlignet med melkesyrebakterier. Dette fordi eddiksyre, et av endeproduktene ved melkesyrefermentering, har vist seg å øke nivået av kolesterol i blodet- en effekt som kan motvirkes av propionsyre. Propionsyrebakterier produserer hovedsakelig propionsyre, og det er blitt vist at *Propionibacterium acidipropionici* har evne til å redusere kolesterolnivå hos mus. Mekanismen bak dette er ennå usikker, men det er blitt foreslått at bakteriene absorberer eller metaboliserer kolesterol, i tillegg til at propionsyra kan ha en egen kolesterolsenkende effekt (Ouwehand, 2004).

### 2.3.6. Sikkerhet

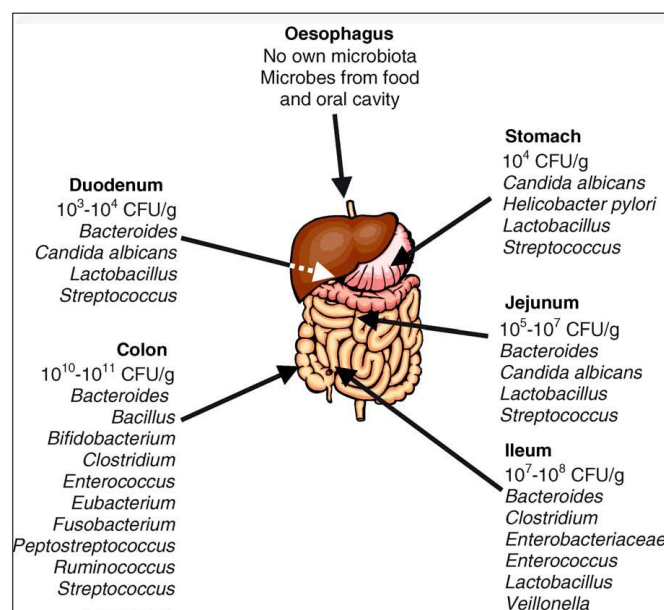
Klassiske propionsyrebakterier (fra meieriprodukter) har fått såkalt GRAS (Generally Recognized as Safe) –status (Brede et al. 2005). Det er ikke blitt rapportert om tilfeller hvor meieri -propionsyrebakterier er blitt gjenfunnet ved infeksjoner etter inntak av meieriprodukter (Meile et al. 2008). Propionsyrebakterier har imidlertid ikke kun helsefremmende effekt. Det antas at propionsyrebakterier er en dominerende bakterieart i feces, og bidrar signifikant til proteaseaktiviteten i tykktarmen. Dette er ikke bare gunstig, da det medfører dannelse av frie aminosyrer, som tryptamin og histidin, som kan virke betennelsesfremmende. Propionsyrebakterier fra hovedgruppe to, er også opportunistiske, og

kan blant annet medføre infeksjoner hos personer med redusert allmenntilstand (Ouwehand 2004).

## 2.4. Fordøyelsessystemet

### 2.4.1. Generelt

Hos mennesker koloniseres overflater og organer i tarmsystemet av en normal, såkalt iboende, mikroflora. Mikrofloraen er kompleks og dynamisk, og det opprettholdes en likevekt mellom de 500-1000 ulike artene som finnes her (Collado et al. 2009). Mikrofloraen utvikler seg, og øker både i bakterietall og kompleksitet gjennom livet. Toppunktet nåes i voksen alder, og da er antallet av bakterieceller per gram tarminnhold større enn antall celler i kroppen (de Graaf & Venema 2008; Mikelsaar et al. 2004). Mikrofloraen i fordøyelsessystemet kan grovt deles inn i tre hovedgrupper: 1: Melkesyrebakterier, inkludert *Lactobacillus* og *Streptococcus*, samt *Bifidobacterium*, 2: Aerobe bakterier, inkludert *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* og gjær, 3: Obligate anaerobe bakterier, inkludert *Bacterioides*, *Eubacterium*, anaerobe *Streptococcus* og *Bifidobacterium*. Sistnevnte gruppe utgjør hovedandelen av mikroorganismene i tykktarmen (Baek & Lee 2009). Figur 1 gir en skjematisk framstilling av de dominerende mikroorganismene i de ulike delene av fordøyelsessystemet.



Figur 1: Skjematisk framstilling av dominerende mikroorganismer i de ulike delene av fordøyelsessystemet (Isolaari et al. 2004).

### 2.4.2. Forskjeller i ulike deler av fordøyelsessystemet

Det at mikrofloraen varierer i ulike deler av tarmsystemet skyldes at ulike områder er mer passende for vekst og overlevelse av bestemte arter (de Graaf & Venema 2008). Andre faktorer som spiller inn, og medfører individuelle forskjeller og unik mikroflorasammensetning hos hver enkelt person, er genetiske faktorer, kontakt med omgivende miljø, kosthold og sykdom (Isolauri et al. 2004). Antall mikroorganismer øker gjennom systemet, og er størst i tykktarmen hvor det finnes omtrent  $10^{12}$  mikroorganismer per gram tarminnhold (de Graaf & Venema 2008). Her finnes det over 500 ulike arter, og bakterier utgjør 35-50 % av volumet av innholdet i tykktarmen (Isolauri et al. 2004). Mikroorganismene i tarmen, både midlertidige og iboende, spiller en viktig rolle i forhold til næringsopptak og vertens helsetilstand (de Graaf & Venema 2008; Isolauri et al. 2004).

Mat har kort oppholdstid og passerer raskt gjennom magesekk og tynntarm. Da miljøet i øvre del av fordøyelsessystemet i tillegg er relativt uvennlig (de Graaf & Venema 2008), som følge av sekreter fra magesekk, lever, bukspyttkjertel, paneth celler i tarmslimhinnen og lamina propria (Isolauri et al. 2004), hindrer dette tett mikrobiell kolonisering. Antall mikroorganismer overskrider dermed sjelden  $10^7$  celler per gram tarminnhold. Det høye bakterietallet i tykktarmen skyldes at ufordøyd mat har lenger oppholdstid her. Med overflod av substrater, inkludert noen produsert av verten selv (blant annet mucin), har mikroorganismene gode vekstforhold (de Graaf & Venema 2008). Mer anaerobe forhold medfører dominans av anaerobe bakterier i nedre del av fordøyelsessystemet (Isolauri et al. 2004).

### 2.4.3. Mutualisme

Det er et intimt forhold mellom mennesker og mikroorganismene i deres fordøyelsessystem. Forholdet kan beskrives som mutualisme, da både vert og mikroflora drar nytte av sameksistensen, og det antas at det er essensielt for opprettholdelse av god tarmhelse (de Graaf & Venema 2008). Senere studier indikerer at mikrofloraen ikke består av inerte organismer, men heller celler som aktivt kommuniserer med immunsystemet og epitelcellene i magen. Dette kan igjen medføre beskyttelse mot patogene organismer og øke vertens velvære (Mikelsaar et al. 2004).

#### 2.4.4. Tarmens immunsystem

Overflaten til slimhinnene i mage- og tarmsystemet utgjør det største kontaktstedet for mikroorganismer og antigener med verten. Under slimhinnene finnes det ulike typer immunceller og sekundært lymfoid vev, bestående av Peyerske flekker, enkle follikler og store lymfeknuter i mesenteriet, jfr. Figur 2. Disse cellene kalles med en fellesbetegnelse for tarmassosiert lymfoid vev (GALT) (Lea 2006). Gjennom GALT foregår det en utstrakt kommunikasjon mellom og iboende og passerende mikroorganismer og immunsystemet. Immunceller i fordøyelsessystemet er organisert i ulike grupperinger. Funksjonelt kan de deles etter effektor og induksjonssteder. Induksjonssteder, hvor immunresponser settes i gang, består av organisert lymfoid vev som Peyerske flekker, follikler og mesenteriske lymfeknuter. Effektorstedene befinner seg utenom det organiserte lymfoide vevet, og består av spredte lymfocytter i tarmslimhinnen, og lymfocytter, antigenpresenterende og IgA-produserende plasmaceller i lamina propria (bindevevslag under slimhinnen) (Lea 2006; Winkler et al. 2007).

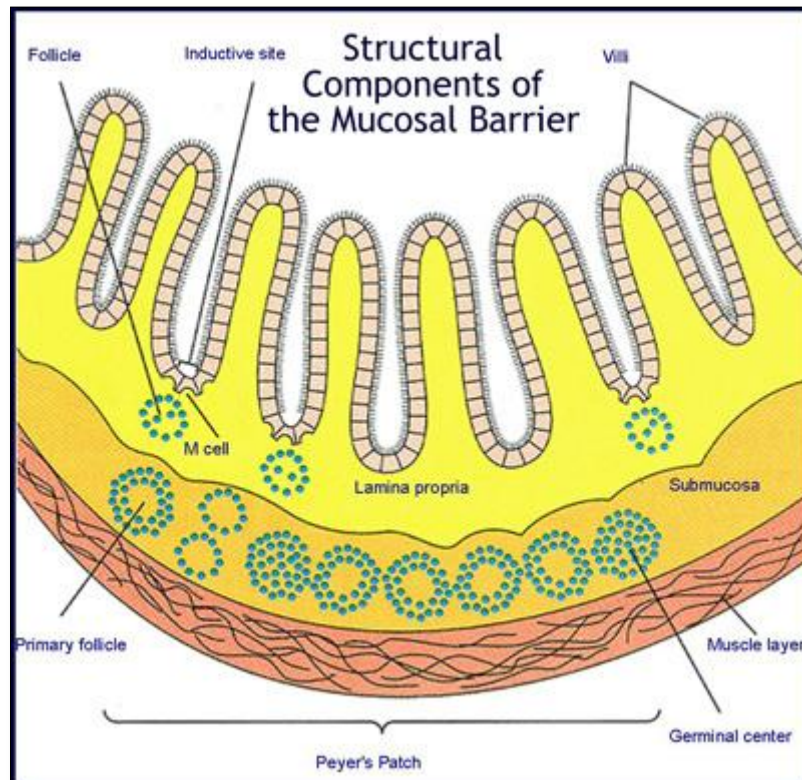
I tynntarmen består det ytterste epitelcellelaget av absorbtive enterocytter, slimproduserende goblet celler, enteroendokrine celler, og Paneth celler i såkalte krypter (Salminen et al. 1998; Winkler et al. 2007). Disse Paneth cellene er granulocytter som produserer antimikrobielle forbindelser, og finnes ikke i tykktarmen. Epitelcellene holdes tett sammen ved hjelp av tette kontaktpunkter (tight junctions), som fungerer som kanaler for kontrollert paracellulær transport av spesifikke substanser (Lea 2006). Epitelceller, makrofager og dendritiske celler inkludert i epitelcellelaget foretar en kontinuerlig undersøkelse av miljøet i fordøyelsessystemet. Videre koordinerer de nødvendige mekanismer for å forsvare vevene i slimhinnen. Mikroorganismer identifiseres ved hjelp av mønstergjenkjennende reseptorer, som gjenkjenner spesifikke mikrobielle faktorer, kalt toll-liknende (TLRs) og nukleotidbindende oligomeriserende domene-reseptorer (NODs).

Epitelcellelaget er omgitt av den såkalte lamina propria, som består av lymfeorganer som inneholder plasmaceller, T-hjelperceller, granulocytter og mastceller. Lamina propria er igjen omgitt av glatt muskelvev.

Under epitelcellelaget finnes de tidligere omtalte Peyerske flekker. Dette er organiserte lymfocellfollikler som er mer tilgjengelig for mikroorganismer enn andre overflater i fordøyelsessystemet. Tilgjengeligheten skyldes redusert antall slimproduserende gobletceller i epitelcellelaget over. Det aggregerte immuncellelaget består hovedsakelig av B-cellefollikler

med T-celler innimellom. Epitelcellelaget over Peyerske flekker inneholder M-celler (Microfold celler), som er fagocytiske celler som undersøker makromolekyler og mikroorganismer i lumen, og overleverer dem intakte til det underliggende lymfevevet ved transcellulær transport. Dette medfører induksjon av immunresponser eller toleranse. Når substansene frigis i den karakteristiske domregionen av det organiserte mukosaassosierte lymfevevet (MALT) under M-cellene, fanges antigener opp av profesjonelle antigenpresenterende celler som presenterer dem videre for naive T- og B-lymfocytter.

Mange patogener kan forsøke å invadere M-celler for å infisere verten. Probiotiske bakterier, som f.eks. *Lb. casei*, kan krysse barrieren i epitelcellelaget på denne måten, og slik komme i kontakt med immunocytter (Salminen et al. 1998; Winkler et al. 2007).



Figur 2: Skjematisk framstilling av oppbygningen av tarmslimhinnen (BioMatrix Neuroceuticals 2006)

#### 2.4.5. Mikrofloraen i tarmens effekt på immunsystemet

I følge en review-artikkel av de Graaf og Venema fra 2008 er bakteriene i tarmen viktige for utvikling og modulering av menneskers immunsystem (de Graaf & Venema 2008). Etter fødselen øker antall såkalte Peyerske flekker og immunglobulin (Ig) A-produserende celler som følge av utsettelse for mikroorganismer først fra morens mikroflora, deretter gjennom kosthold og omgivende miljø. Når det etableres en mikroflora i fordøyelsessystemet fører dette til utstrakt utsettelse for antigener, slik at utvikling og modning av såkalt tarmassosiert lymfevev (GALT) stimuleres (Isolauri et al. 2004). I friske slimhinner påvises det en viss kronisk, basal, inflammatorisk aktivitet i lamina propria. Aktiviteten er knyttet til den intestinale mikrofloraen, og er viktig for slimhinnenes barrierefunksjon. Den nødvendige inflammatoriske aktiviteten skyldes interaksjon mellom bakterier, deres metabolske produkter og epitelcellene i tykktarmen (de Graaf & Venema 2008). Den metabolske aktiviteten inkluderer blant annet fermentering av eksogene og endogene karbonkilder. Fermentering av ulike oligosakkarider øker vertens energiutnyttelse av inntatte matvarer ved at det produseres kortkjedede fettsyrer. Den viktigste av disse er butyrat, en av hovedenergikildene til epitelceller i tarmen, og som dermed er særdeles viktig for opprettholdelse av god tarmhelse i tykktarmen (de Graaf & Venema 2008, Isolauri et al 2004). Mikrofloraen i tarmen bidrar til dens forsvarsbarriere på flere måter. De konkurrerer blant annet med innkommende mikroorganismer/patogene om både næringskilder og steder å feste seg til tarmepitelet på. I tillegg produseres det flere ulike forbindelser som kan virke hemmende på vekst av patogene og midlertidig passerende bakterier som ikke er en del av den normale tarmfloraen (Isolauri et al 2004).

#### 2.4.6. Mikrofloraen i tarmens balanse og dens betydning for helse

De iboende bakteriene kan potensielt være både skadelige og/eller helsefremmende, men størstparten av dem tilhører den kommensale mikrofloraen. Stammer med fordelaktige egenskaper, som potensielt kan være probiotiske, tilhører vanligvis slektene *Bifidobacterium* og *Lactobacillus*. Noen av disse har sterke antiinflammatoriske egenskaper, kan stimulere immunrespons, og kan utøve kompetitiv eksklusjon av patogene organismer. Mange av tarmbakteriene har evne til å produsere vitaminer. De kan også benytte andre substrater enn oligosakkarider, og nedbrytning av proteiner og aminosyrer kan føre til dannelse av ulike toksiske og kreftfremkallende forbindelser. Lave nivåer av bakterier fra slekter som *Candida* ssp. og *Clostridium* ssp. kan være bidragsytende til opprettholdelse av en god tarmhelse, men

da dette er opportunistiske patogener er spesielt klostridier mindre ønskelige i tarmen (Collado et al. 2009; de Graaf & Venema 2008).

Normalt er det en delikat balanse mellom de ulike samfunnene i tarmfloraen, og skadelige bakterier holdes i sjakk slik at man holder seg frisk (Gill & Prasad 2008). Selv om sammensetningen av den mikrobielle tarmfloraen er unik for hver enkelt person, som følge av genetiske faktorer, fødselsmåte, kosthold, alder, antibiotikabehandling m.fl., forekommer det kun små endringer i den mikrobielle tarmfloraen i voksen alder (Collado et al. 2009). Når kroppen eldes endres dette, og spesielt avtar både mengden og diversiteten av bifidobakterier. Balansen i tarmfloraen kan også endres som følge av ulike faktorer som sykdom både i og utenom mage- og tarmsystemet, bruk av antibiotika (Isolauri et al. 2004), inntak av medisin som hemmer immunsystemet, operasjoner og stråling (Williams 2010). Forstyrrelser i økosystemet i mage- og tarmsystemet involverer ofte en betydelig økning i bakterietall i tynntarmen, økt antall aerobe bakterier, og reduksjon i antall bifidobakterier, og/eller tilstedeværelse av *Clostridium perfringens* (Gill & Prasad 2008). Da forstyrrelser i likevekten blant den mikrobielle populasjonen i fordøyelsessystemet er forbundet med økt risiko for bestemte sykdommer som IBD og antibiotikaassosiert diaré, samt allergi, overvekt og diabetes, ansees opprettholdelse av likevekten som viktig for å bevare god helse (Collado et al. 2009).



## 2.5. Functional foods

Functional foods kan på norsk omtales som funksjonell mat, eller mat med tilleggsegenskaper. Functional foods representerer en nytt interessefelt innen alternativ/komplementerende medisin. Det finnes ingen internasjonal entydig, konkret definisjon, men man er enige om at det er mat som bidrar positivt til folks helse utover den daglige ernæringseffekten, ved å ha effekt på bestemte kroppsfunksjoner, forbedre helse og velvære, og/eller redusere risiko for sykdom (Arai et al. 2002; Hasler 2002; Lopez-Varela et al. 2002).

Uttrykket functional foods oppstod i Japan på 1980-tallet som følge av at det ble observert at mat kunne ha andre roller enn tilførsel av næring og gastronomisk nytelse. Her benyttes betegnelsen ”FOSHU”, som er en forkortelse for Foods for Specific Health Use. Japan er nå det landet med størst marked for slike matvarer, og var de første til å innføre lovgivning på området (300 matvarer med FOSHU-status i 2002). I Europa utarbeidet International Life Sciences Institute Europe i 1999 en definisjon på FUFOSE (Functional food in Europe). Definisjonen fastslår at functional foods;

- Er konvensjonelle eller vanlige matvarer som inntas som en del av det daglige kostholdet.
- Består av naturlig forekommende komponenter, i noen tilfeller i økt konsentrasjon eller tilstedeværende i matvarer hvor de vanligvis ikke finnes.
- Har vitenskapelig demonstrert evne til å fremme positive helseeffekter på bestemte målfunksjoner utover generell ernæring.
- Antas å ha fremmende effekt på velvære og helsetilstand slik at de øker livskvaliteten og/eller reduserer risikoen for sykdom.
- Kun kan merkes med vitenskapelig beviste og lovlig godkjente helsepåstander (Lopez-Varela et al. 2002).

Det er viktig at såkalte functional foods inneholder så store mengder av de(n) aktive komponenten(e) at den gunstige helseeffekten oppnås ved å innta produktet som en del av et vanlig kosthold (Hasler 2002; Lopez-Varela et al. 2002; Walker et al. 2006). Naturlige matvarer, som f.eks. frukt, er ikke functional foods. Det er kun matvarer som er blitt prosessert på en eller annen måte (fjerning/tilsetning av komponenter, modifisert framstillingsmetode, genetiske endringer o.l.) som kan kalles funksjonelle. I dag er de

vanligste komponentene som blir tilsatt matvarer probiotika, prebiotika, synbiotika (blanding av pro- og prebiotika) og næringsstoffer. Det er blitt foreslått at jevnlig inntak av functional foods kan redusere risiko for flere kroniske sykdommer, som hjerte- og karsykdommer, kreft, diabetes, høyt blodtrykk og osteoporose. Mekanismene bak de foreslåtte helseeffektene er imidlertid ennå relativt dårlig etablerte (Lopez-Varela et al. 2002).

Regelverket omkring functional foods er omfattende og innfløkt. I følge EU-regulativ 1924/2006 skal alle ernæringsmessige og helsemessige påstander som brukes i forbindelse med et næringsmiddel oppfylle en rekke krav som er nedlagt. Dersom det ønskes å benytte påstander omkring redusert risiko for sykdommer og vekst og utvikling hos barn må det søkes om tillatelse til dette. Søknaden behandles av EFSA, som gir råd til EU-kommisjonen som til slutt godtar eller avslår søknaden. Siden regelverket ble innført har det kommet inn flere tusen søknader. Så langt har over 1000 søknader blitt gjennomgått, og ennå har ingen søknader om bruk av helsepåstander basert på generelt aksepterte vitenskapelige data blitt godkjent (Verhagen et al. 2010).

## **2.6. Probiotika**

### **2.6.1. Historie og definisjon**

Probiotika som fenomen kan sies å ha oppstått med Elie Metchnikoffs bok fra 1907, kalt "Prolongation of Life". I boka konkluderte han med at daglig inntak av fermenterte meieriprodukter medførte gunstige helseeffekter og et lengre liv (Cogan et al. 2007; Parvez et al. 2006). Selve betegnelsen probiotika har opprinnelse fra gresk, og betyr "for livet" (Baek & Lee 2009). Betegnelsen ansees å stamme fra Werner Kollath, og ble først tatt i bruk i 1965 av Lilley og Stillwell for beskrivelse av mikroorganismer som stimulerer vekst av andre mikroorganismer. En rekke definisjoner på probiotika er blitt formulert opp gjennom tidene. Fuller definerte det i 1989 på følgende måte; "Levende mikrobielle tilsetningsstoffer som virker fordelaktig for forbrukeren ved å forbedre dens mikrobielle balanse i tarmen". I 2002 definerte FAO/WHO probiotika som "levende mikroorganismer, som når de administreres i tilstrekkelig mengde, medfører positiv helseeffekt hos verten". Denne definisjonen er også blitt adaptert av "The International Scientific Association for probiotics and prebiotics" og EU (Baek & Lee 2009).

### 2.6.2. Krav til potensielt probiotiske bakterier

I følge en review-artikkel av Isolauri et al. fra 2004 var bakgrunnen for at probiotika ble tatt i terapeutisk bruk deres potensielle evne i forhold til oppretting av en ubalansert mikroflora i fordøyelsessystemet. Slik ubalanse er dokumentert forbundet med en rekke sykdomsbilder, blant annet antibiotikaassosiert diaré, matallergi, atopisk eksem, inflammatoriske tarmsykdommer (IBD) som Crohn's sykdom og ulserativ kolitt og leddgikt. Friske personer har utviklet toleranse for sin egen mikrobielle tarmflora, men denne toleransen er svekket hos pasienter med ulike betennelsesreaksjoner. Tarmfloraens endrede egenskaper kan medføre aktivering av immunsystemet slik at betennelsen vedvarer og barrieren i mage- og tarmsystemet reduseres. I slike tilfeller er hensikten med tilføring av probiotiske bakterier å manipulere sammensetningen av tarmfloraen i positiv retning, slik at den onde sirkelen stoppes. På denne måten kan sykdomsutviklingen kontrolleres, og varigheten av symptomene reduseres.

I utgangspunktet ble altså probiotika benyttet for å påvirke helsetilstanden hos både mennesker og dyr gjennom påvirkning av sammensetningen av den mikrobielle tarmfloraen (Isolauri et al. 2004). Etter hvert ble det klart at probiotika også kan utøve fordelaktig helseeffekt ved modulering av immunsystemet (Borchers et al. 2009). De fleste mekanismene og virkningen av probiotika avhenger av interaksjoner med den spesifikke mikrofloraen hos verten og/eller immunkompetente celler i tarmslimhinnen. Det er påvist at mange såkalte probiotiske stammer er stand til å;

- Modulere den mikrobielle floraen i fordøyelsessystemet, i hvert fall midlertidig.
- Hindre kolonisering av potensielt patogene bakterier i tarmsystemet.
- Hindre at patogene bakterier passerer gjennom veggen i tarmsystemet og infiserer andre organer (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

Med utgangspunkt i denne kunnskapen er det framsatt en rekke kriterier som må oppfylles dersom en bakteriestamme skal kunne kalles probiotisk. Kriterier, fastslått av blant annet (Borchers et al. 2009; de Vrese & Schrezenmeir 2008; Ouwehand et al. 1999) for å være en potensielt probiotisk bakterie inkluderer at bakterien bør;

- Være identifisert på slekts, arts og stammenivå
- Være av human opprinnelse (omdiskutert).
- Være trygg å bruke i mat og kliniske forsøk.
  - Må ikke være patogen.
  - Må ikke virke nedbrytende på tarmslimhinnene.
  - Må være mottakelig for antibiotika, og ikke bære overførbare antibiotikaresistensgener.
  - Må ikke konjugere gallesalter.
- Være i stand til å overleve gjennom fordøyelsessystemet.
  - Må være syre- og galleresistent.
  - Må være tilstrekkelig motstandsdyktig mot fordøyelsesenzymer.
- Være i stand til å feste seg til tarmepitelet.
- Være i stand til å kolonisere menneskers tarmsystem eller vagina (i alle fall midlertidig).
- Være i stand til å reproducere seg i tykktarm.
- Være i stand til å produsere antimikrobielle stoffer.
- Være i stand til å virke antagonistisk mot patogene bakterier.
- Inneha klinisk dokumentert og validert helseeffekt.
  - Det må minst være gjennomført en positiv fase 2 studie, og resultatene bør helst motta uavhengig bekreftelse fra andre institusjoner.
- Ha gode teknologiske egenskaper, samt være stabil under prosessering og lagring av produkter.

De fleste bakterier som kan oppfylle disse kravene er melkesyrebakterier, og de artene som vanligvis har blitt forbundet med probiotisk effekt inntil nå tilhører bakterieslektene *Lactobacillus* og *Bifidobacterium*. Andre arter har imidlertid vist seg å ha stammer som er potensielt probiotiske; blant annet arter av *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, ikke-patogene stammer av *Escherichia coli* (Borchers et al. 2009), *Propionibacterium* (Huang & Adams 2004), samt noen stammer av gjær (Borchers et al. 2009).

Mange ulike helseeffekter har blitt knyttet til inntak av probiotika, og noen av disse er bedre dokumenterte enn andre. Et viktig faktum er at de påviste og potensielle helseeffektene er svært stammespesifikke, og det finnes ingen bestemt bakteriestamme som oppfyller alle

framsatte helseeffekter. De mest undersøkte stammene til dags dato er *Lb. rhamnosus* GG (Valio), *Saccharomyces (S.) cerevisiae* Boulardii (Biocodex), *Lb. casei* Shirota (Yakult) og *Bifidobacterium(B.) animalis* Bb-12 (Chr. Hansen). Disse har veletablerte effekter mot laktoseintoleranse, diaré forårsaket av rotavirus, antibiotikaassosiert diaré (AAD) og diaré forårsaket av *Clostridium (Cl.) difficile* (Vasiljevic & Shah 2008).

### 2.6.3. Helsepåstander og virkningsmekanismer

I følge de Vrese & Schrezenmeir (2008) utøver ikke probiotiske bakterier sin virkning kun i eller på tykktarmen via påvirkning av den iboende mikrofloraen. Probiotika kan også påvirke andre organer, enten via modulering av immunsystemet, endring i tarmpermeabilitet og bakteriell translokasjon, eller ved å bidra med biologisk aktive eller regulatoriske metabolitter.

På bakgrunn av en rekke *in vitro* og *in vivo* forsøk, og et begrenset antall randomiserte, velkontrollerte intervensjonsstudier blant mennesker, har noen veletablerte helsepåstander knyttet til probiotiske bakterier blitt framsatt. Det finnes også en rekke andre foreslåtte, men ennå ubekreftede, effekter ved inntak av probiotika. Potensielle virkningsmekanismer bak de observerte effektene er foreslått, men disse er imidlertid relativt vanskelig å påvise (de Vrese & Schrezenmeir 2008). I følge de Vrese & Schrezenmeir (2008) og Vasiljevic & Shah (2008) kan de mest velkjente helsepåstandene, og foreslåtte virkningsmekanismer oppsummeres slik;

#### **Veletablerte og vitenskapelig aksepterte helseeffekter påvist ved kliniske studier;**

- Hindring av sykdomsutvikling og reduksjon av varighet og plager ved diaré forårsaket av rotavirus.
- Hindring av eller redusert alvorlighet ved antibiotikaassosiert diaré (AAD).

Foreslåtte virkningsmekanismer:

- Kompetitiv eksklusjon.
- Translokasjon/barriereeffekt.
- Forbedret immunrespons.

- Redusert alvorlighet og plager grunnet laktoseintoleranse.

Foreslåtte virkningsmekanismer:

- Frigjøring av intracellulær  $\beta$ -galactosidase i fordøyelsessystemet.

### **Veletablerte effekter, men korrelasjon med sann helseeffekt er uklar;**

- Modulering av iboende mikroflora.
- Modulering av immunsystemet.

Foreslåtte virkningsmekanismer:

- Gjenkjennelse via TLR → induksjon av medfødt og tilegnet immunrespons.
  - Nedregulering av betennelsesfremmende cytokiner og chemokiner.
  - Oppregulering av fagocytisk aktivitet.
  - Regulering av Th1/Th2-balanse.
- Redusert konsentrasjon av kreftfremkallende enzymer og/eller forråtnelsesmetabolitter i mage- og tarmsystemet.

Foreslåtte virkningsmekanismer:

- Metabolisme av mutagener.
- Endring i den mikrobielle tarmfloraen.
- Endring i metabolsk aktivitet i tarmen.
- Normalisering av tarmens permeabilitet.
- Forbedret intestinal immunitet.

### **Potensielle effekter. Observerte effekter, men kun i bestemte målgrupper;**

- Hemming eller lettelse av allergi og atopisk sykdom hos spedbarn.

Foreslåtte virkningsmekanismer:

- Translokasjon/barriereeffekt.
  - Immuneksklusjon, eliminering og regulering.
- Fordelaktige effekter på mikrobielle avvik/irregulæriteter, betennelser i fordøyelsessystemet (IBD), *Helicobacter pylori* infeksjon (HPI) og bakteriell overvekst.

Foreslåtte virkningsmekanismer mot HPI:

- Kompetitiv eksklusjon.
- Barriereeffekt.
- Produksjon av antimikrobielle forbindelser.

#### Foreslåtte virkningsmekanismer mot IBD:

- Kompetitiv eksklusjon.
  - Forbedring av tette kontaktpunkter (tight junctions).
  - Modifisering av tarmpermeabilitet.
  - Modulering av immunrespons.
  - Produksjon av antimikrobielle forbindelser.
  - Nedbrytning av patogene antigener.
- Behandling av urinveisinfeksjoner.
  - Hindring av og lettelse ved uspesifikke og uregelmessige plager forbundet med fordøyelsessystemet hos friske personer.
  - Hindring av luftveisinfeksjoner og andre infeksjonssykdommer.

#### **Potensielle effekter, men tilstrekkelig kliniske og/eller epidemiologiske data foreligger ikke;**

- Forebygging av kreft.
- Normalisering av avføringsvaner (hyppighet og konsistens) hos personer som lider av obstipasjon eller irritert endetarm.
- Hindring eller behandling av iskemisk hjertesykdom.
- Forbedring/reduere alvorlighet av autoimmune sykdommer.

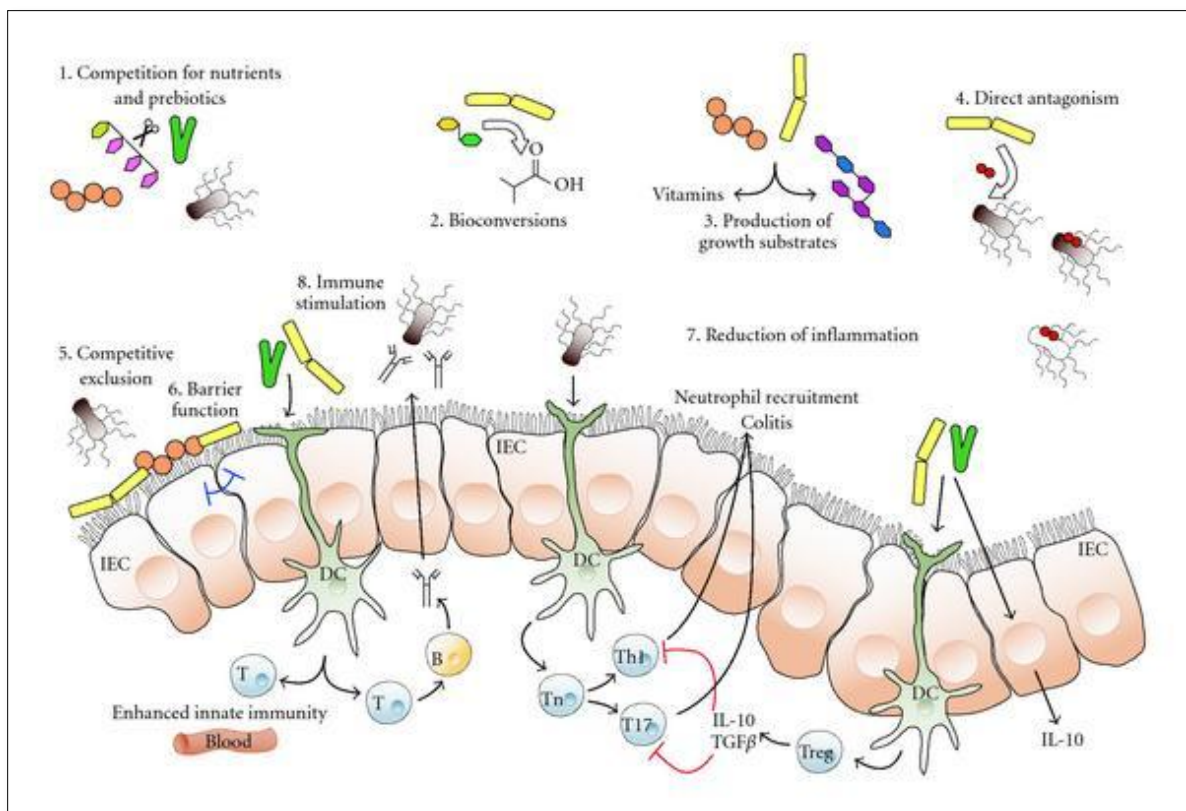
#### **Foreslåtte men ikke påviste effekter;**

- Kolesterol senkende effekt.

##### Foreslåtte virkningsmekanismer:

- Dekonjugering av gallesalter.
- Forbedret mineralabsorpsjon.
  - Forbedret munnflora, hindring av karies.

De fleste virkningsmekanismene som ligger til grunn for de observerte helseeffektene knyttet til probiotiske bakterier er ennå ikke fastslått. Kort oppsummert er følgende virkningsmekanismer foreslått; reduksjon i pH i tarmsystemet (syreproduksjon), produksjon av antibakterielle substanser ( $H_2O_2$ , organiske syrer, bakteriosiner), agglutinerings av patogene mikroorganismer, forsterket barrierefunksjon i tarmslimhinnen, konkurranse om fermenterbare substrater og reseptorer på tarmslimhinnen, produksjon av laktase, frigivelse av metabolitter og enzymer som kan virke beskyttende på mage- og tarmsystemet, absorpsjon eller nedbrytning av potensielt patogene, giftige eller kreftfremkallende forbindelser, modulering av immunsystemet, stimulering av bevegelse i mage- og tarmsystemet og økt slimproduksjon (Collado et al. 2009; de Vrese & Schrezenmeir 2008). Noen av disse mekanismene er illustrert i Figur 3.



Figur 3: Skjematisk framstilling av noen foreslåtte virkningsmekanismer bak observerte helseeffekter ved inntak av probiotika. IEC: epitelceller, DC=dendrittiske celler, T= T-celler (O'Toole & Cooney 2008).



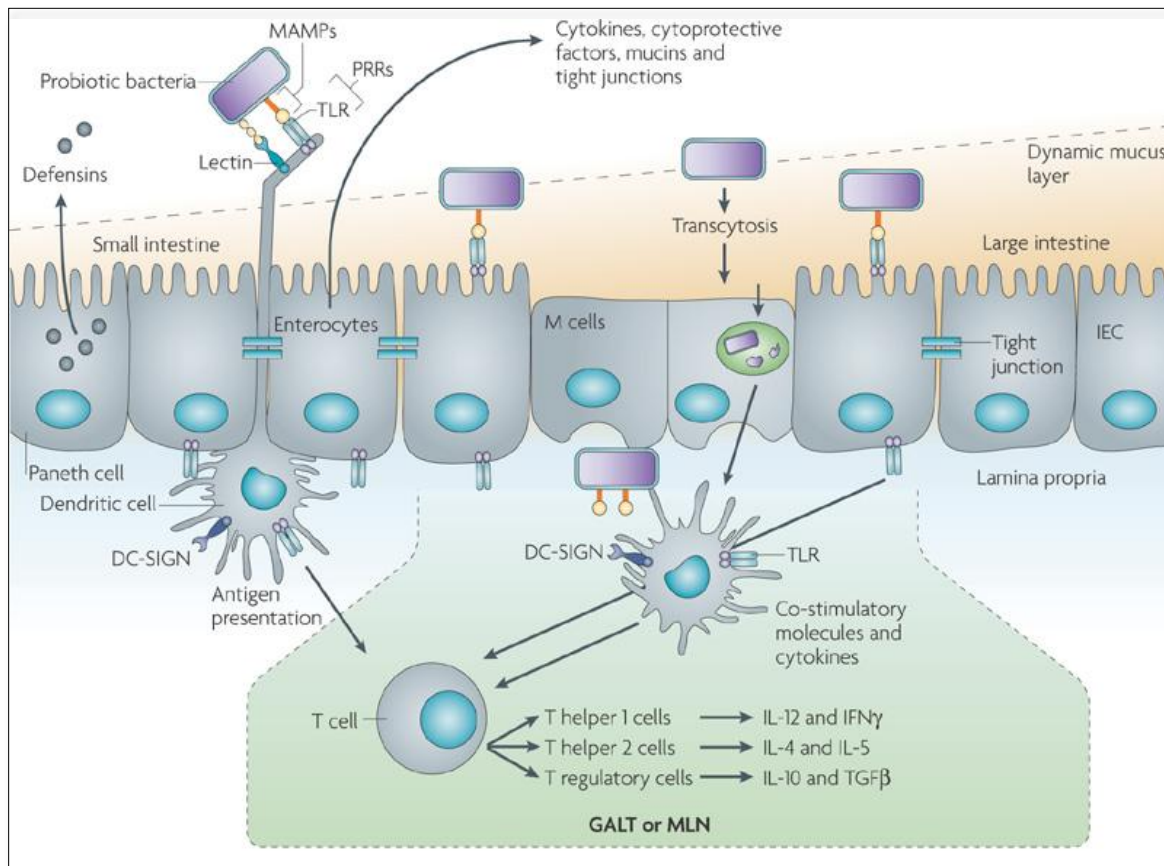
Effekten av probiotika skyldes i følge Collado et al. (2009) interaksjoner mellom vert og probiotika på flere nivå;

**Interaksjoner mellom probiotika og epitelceller i mage- og tarmsystemet** involverer blant annet adhesjon av probiotiske bakterier til epitelceller eller celler i tarmslimhinnen. Dette kan bidra til økt produksjon av slim (mucus) og forsvarsmolekyler som muciner, defensiner og cathelicidiner, samt hindre ødeleggelse av proteiner involvert i cytoskjelett og tette kontaktpunkter (tight junctions) i og mellom epitelceller, slik at tarmens barrierefunksjon forsterkes. I tillegg kan probiotika stimulere det medfødte immunsystemet, sørge for mindre alvorlige sekretoriske og inflammatoriske konsekvenser av bakterielle infeksjoner, og øke bevegelsen gjennom tarmen (Collado et al. 2009; Oelschlaeger 2010; Ohland et al. 2010; Saxelin et al. 2005).

**Interaksjoner mellom probiotika og immunsystemet** foregår hovedsakelig via interaksjoner mellom probiotiske stammer og epitelceller. Denne interaksjonen er viktig for å opprettholde kontroll med produksjon av cytokiner og kjemokiner som skilles ut av epitelceller og leucocytter (Delcenserie et al. 2008). Både probiotiske mikroorganismer, deres celleveggkomponenter, DNA og metabolitter kan påvirke immunsystemet hos mennesker. I mus og andre modeller er det påvist at probiotiske bakterier kan modulere både sekretoriske (lokale) og systemiske immunresponser. (Collado et al. 2009; de Vrese & Schrezenmeir 2008). Eksempler på slike effekter påvist *in vitro* er; økt reproduksjon i organer som tilhører immunsystemet, stimulering av aktiviteten og kapasiteten til fagocytter, makrofager og naturlige dreperceller, økt/reduert frigjøring av cytokiner, økt produksjon av sekretorisk IgA, endringer i balansen mellom Th1- og Th2-celler slik at allergiske og atopiske reaksjoner reduseres, økt produksjon av spesifikke antistoffer, og økt motstandskraft mot toksiner, virus eller patogene bakterier (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

Probiotika kan stimulere og regulere immunsystemet ved interaksjoner med epitelceller og lymfevev i tarmslimhinnen, jfr. Figur 4. Probiotika gjenkjennes av og kan bindes til såkalte toll-liknende reseptorer på overflaten til epitelceller og antigenpresenterende celler i tarmslimhinnen. På denne måten induseres humorale eller cellulære responser og det settes i gang en kaskade av forsvarsmekanismer. Signalkaskadene kan dirigeres i enten betennelsesdempende eller -fremmende retning, som føllge av produksjon av cytokiner og videre opp- eller nedregulering av celleoverflatemolekyler. Frigjøring av løselige faktorer kan

også igangsette tilsvarende signalkaskader (Collado et al. 2009; Delcenserie et al. 2008; Oelschlaeger 2010; Vasiljevic & Shah 2008). Det er påvist effekt av probiotika på produksjon av både betennelsesfremmende og –hemmende cytokiner og chemokiner (Vasiljevic & Shah 2008). Effekten på immunsystemet er stammespesifikk, og avhenger i tillegg av dosering av probiotika og vertens immunologiske status (Collado et al. 2009).

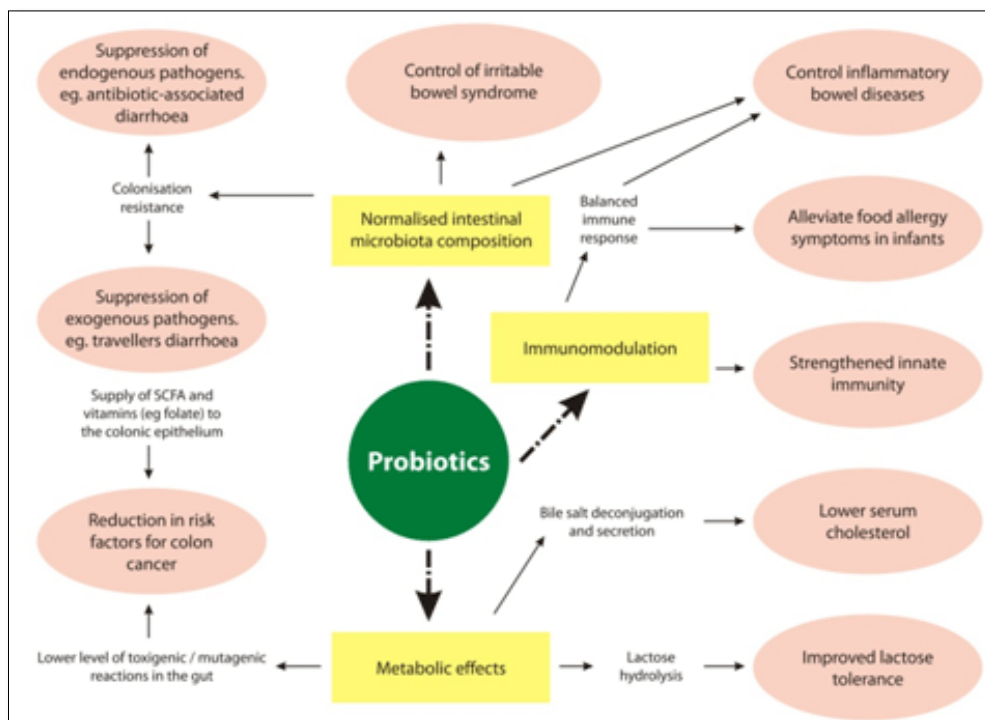


**Figur 4:** Skjematisk framstilling av mulige interaksjoner mellom probiotiske bakterier og epitelceller i tarmen (IEC) og dendrittske celler (DC) i GALT. MAMPs= microorganism associated molecular patterns, PRRs=pattern recognition receptors (mønstergjenkjennende reseptorer) (Lebeer et al. 2010).

**Interaksjoner mellom probiotika og innkommende, uønskede, muligens patogene mikroorganismer** i fordøyelsessystemet kan medføre at patogene bakterier hemmes. Probiotika kan forhindre at patogene bakterier får adhere til celler i tarmslimhinnen, og dermed hindre dem i å etablere og reproducere seg her. Dette oppnås ved at kompetitiv hemming i tillegg til blant annet sekresjon av antimikrobielle forbindelser, konkurranse om

næringsstoffer, nedbrytning av giftige stoffer, og fremming av produksjonen av antimikrobielle forbindelser i tarmcellene (Collado et al. 2009; Ohland et al. 2010).

De generelle virkningsmekanismene for effekt av probiotiske bakterier kan i følge Collado et al. (2009) inndeles i tre hovedkategorier; normalisering av tarmflora, modulering av immunrespons og metabolske funksjoner, jfr. Figur 5.



Figur 5: Oversikt over ulike påståtte helsefordeler ved inntak av probiotika (Parvez et al. 2006).

Modulering av både medfødt og tilegnet immunforsvar er viktig i forbindelse med hindring og behandling av infeksjose sykdommer og (kroniske) betennelser i fordøyelsessystemet. Direkte effekt på andre mikroorganismer, både kommensale og patogene, er viktig for å hindre og behandle infeksjoner og gjenopprette den mikrobielle tarmfloraen. Når det gjelder metabolske effekter kan probiotiske bakterier både forbedre biotilgjengeligheten av næringsstoffer og produsere vitaminer, samt inaktivere toksiner og avgifte potensielt kreftfremkallende forbindelser (Oelschlaeger 2010).

## 2.7. Probiotisk ost – ost som functional food

Det finnes en rekke probiotiske produkter på markedet, både i form av kosttilskudd (kapsler, tabletter, pulver) eller matvarer (Williams 2010). Probiotiske matvarer utgjør en betydelig del av utvalget av functional foods (Lopez-Varela et al. 2002). Spesielt er yoghurtliknende meieriprodukter ofte tilsatt probiotiske bakterier, men det finnes også blant annet probiotisk ost, smør og cerealbaserte produkter.

### 2.7.1. Framstilling av probiotisk ost

I prinsippet kan det tillages probiotisk ost ved kun å tilsette den/de utvalgte probiotiske bakteriestammene direkte til ystemelken sammen med syrekulturen før løpetilsetning, eller ved innblanding i skjært ostemasse. Ved sistnevnte metode er det viktig at bakteriekulturen er i god fysisk tilstand for at den skal kunne overleve modning og lagring (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

Det kan forekomme en rekke teknologiske utfordringer ved framstilling av probiotisk ost. Et av kriteriene for potensielt probiotiske bakteriestammer, som vel og merke ikke er et absolutt krav, er at stammene skal ha human opprinnelse. Dermed er en del potensielt probiotiske bakterier ikke meieriorganismer, men stammer fra vårt fordøyelsessystem. Dersom slike bakterier benyttes ved framstilling av matvarer kan det hende at produktet ikke tilbyr et stabilt nok miljø til at bakteriene overlever. Bifidobakterier vokser eksempelvis svært dårlig i melk (Stanton et al. 1998).

Det viktigste kriteriet for utvelgelse av probiotiske bakteriestammer til ysting er at de kan overleve og opprettholde sin metabolske aktivitet og probiotiske effekt under ysting, modning og lagring av osten (Stanton et al. 1998). Da forholdene under disse trinnene i framstillingsprosessen er tilrettelagt for å hemme vekst av uønskede bakterier, trengs det kunnskap om hvordan probiotiske bakterier best behandles under industriell osteproduksjon. I noen tilfeller må prosessparametre eller teknikker modifiseres for å oppnå et produkt av god kvalitet samtidig som de probiotiske bakteriene beskyttes (Ross et al. 2002). Det kan også være mulig å framdyrke mer robuste bakteriestammer ved å utsette dem for ikke-dødelige, men stressende, miljøforhold (da Cruz et al. 2009; Ross et al. 2002).

Myseavtapp og ettervarmingstemperatur opp mot 55 °C, samt salting og lang modningstid er prosessparametre for modnede oster som kan medføre at en del av de tilsatte probiotiske bakteriene forsvinner. De fleste forsøk har imidlertid vist at det er mulig å produsere modnede oster som inneholder tilstrekkelig mengde levende probiotiske bakterier, ved tilsetting av f.eks. *Lactobacillus (Lb.) acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lactobacillus (Lb.) paracasei*, *Bifidobacterium (B.) infantis*, *Bifidobacterium (B.) lactis* og *Enterococcus (E.) faecium* som tilleggskulturer i ystemelken. Fra alle disse forsøkene meldes det om en overlevelse på mer enn  $5 \times 10^6$  cfu/g ost av de probiotiske stammene etter modning i 5-39 uker (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

Det finnes imidlertid noen ulemper ved tilsetting av probiotiske bakterier under ysting. Blant annet kan det forekomme interaksjoner mellom produktet og de probiotiske bakteriene på grunn av pH, O<sub>2</sub>, red-oks potensial, vannaktivitet, proteolyse og lipolyse. Dette er interaksjoner som kan ha negative konsekvenser for ostens sensoriske kvalitet (de Vrese & Schrezenmeir 2008). Et eksempel på dette er eddiksyreproduksjon hos bifidobakterier som kan gi sur smak på ost (Stanton et al. 1998). I tillegg kan de probiotiske bakteriene og starterkulturen motvirke hverandre, og hverandres oppgaver i osten, ved produksjon av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, benzosyre, melkesyre, bakteriosiner og biogene aminer (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

Dersom de probiotiske bakteriestammene som tilsettes skal ha påvirkningskraft på den endelige sensoriske kvaliteten til osten, bør denne være positiv. Med dette som utgangspunkt er det blitt foreslått å tilsette bifidobakterier som produserer eksopolysakkarider, for å forbedre tekstur og munnfølelse i fermenterte produkter (Stanton et al. 1998). Dette er mest aktuelt i forhold til yoghurtliknende produkter, men kan også virke fordelaktig i forhold til tekstur i magre ostetyper.

### **2.7.2. Hvorfor framstille probiotisk ost?**

Det antas at ost kan fungere like godt, om ikke bedre, som overleveringsmiddel for probiotiske bakterier til fordøyelsessystemet som yoghurtliknende meieriprodukter. Dette fordi det antas at osten kan beskytte de probiotiske bakteriene bedre mot de harde forholdene de møter gjennom fordøyelseskanalen. Ost har flere fordeler sammenlignet med surere fermenterte meieriprodukter som yoghurt. Den har høyere pH, og en relativt høy bufferkapasitet som kan virke beskyttende mot lav pH i magesekken. Den faste konsistensen, samt innkapsling av bakteriene i protein-fett-matriksen i osten kan også gi beskyttelse mot

tarmsaft, gallesalter og fordøyelsesenzymer ved at kontakten med disse stoffene ved passering gjennom tarmen reduseres (de Vrese & Schrezenmeir 2008; Hayes et al. 2006; Stanton et al. 1998).

I tillegg til dens potensielle egnethet som overføringsmedium for probiotiske bakterier har ost til alle tider blitt ansett for å ha høy ernæringsmessig kvalitet. Ost kan være en god kilde til protein og kalsium, og magre varianter betraktes som sunne matvarer. Fermenterte meieriprodukter, som ost, inneholder også en rekke sekundære metabolitter som vitaminer, bioaktive peptider og konjugert linolensyre (CLA). Disse oppstår blant annet som følge av proteolytisk nedbryting av kasein og myseprotein til peptider og frie aminosyrer ved hjelp av enzymer utskilt fra melkesyrebakterier. I tillegg til å bidra til smaksutvikling har forbindelsene ofte helsefremmende egenskaper. Bioaktive peptider, defineres som ”peptider fra matvarer som i tillegg til sin ernæringsmessige rolle utøver en fysiologisk effekt i kroppen”. Slike peptider har blitt foreslått å kunne påvirke både hjerte- og karsystemet, nervesystemet og immunforsvaret. Enkelte peptider antas å ha blodtrykkssenkende, blodfortynnende, opioid, antimikrobiell og immunmodulerende effekt (Hayes et al. 2006). Et eksempel på dette er peptider som frigis i såkalt Festivo-ost som er blitt vist å redusere blodtrykk i rotter. Effekten av bioaktive peptider, i likhet med  $\beta$ -galactosidase produsert av melkesyrebakterier, er ikke avhengig av overlevelse av mikroorganismene, men av opprettholdelse av enzymenes aktivitet, gjennom fordøyelsessystemet (Heller et al. 2003). En ulempe med bioaktive peptider er imidlertid at de har så kort varighet. I produkter brytes de videre ned til frie aminosyrer etter en viss tid, og mister dermed sin helsebringende effekt (Hayes et al. 2006).

CLA, en samlebetegnelse for en gruppe flerumettede fettsyrer som er posisjonelle og geometriske isomerer av linolensyre, er en naturlig komponent i melkefett. Det har i de siste årene foregått utstrakt forskning angående helseeffekter ved inntak av CLA med størst fokus på kreft, immunfunksjon, artherosklerose, kroppssammensetning og vektkontroll. Da visse bakterier, blant annet melkesyrebakterier, propionsyrebakterier og bifidobakterier, er i stand til å danne *c9-t11*-isomeren av CLA fra fri linolensyre, kan tilsetning av disse bidra til å øke mengden CLA i meieriprodukter (Hayes et al. 2006).

### 2.7.3. Status i dag

I dag er probiotiske yoghurtliknende meieriprodukter mye mer populære blant forbrukere enn probiotisk ost. Utvalget er også større av ferske, fermenterte meieriprodukter sammenlignet med modnede oster. Dette til tross for at ost kan være en alternativ kilde til probiotika for personer som ikke er glad i surmelksprodukter og personer med laktoseintoleranse.

Årsakene til det lavere konsumet av probiotisk ost kan være at forbrukere kjøper ost hovedsakelig på grunn av smaksopplevelsen heller enn dens ernæringsmessige kvalitet. Det at ost også vanligvis konsumeres i små mengder kan være en ulempe, da dette medfører at det er nødvendig å øke konsentrasjonen av probiotiske bakterier i produktet. Dette kan igjen påvirke sensorisk kvalitet i en ugunstig retning. I mange land preges også ostemarkedet av mange små aktører og merker, og det kan være vanskelig å skaffe seg et veletablert merkevareravn. Usikkerheten omkring etterspørselen gjør det dermed risikabelt å forsøke å finansiere den forskning og markedsføring som kreves i følge regelverket for å få et probiotisk produkt ut på markedet (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

Flere ulike typer ost har blitt testet som overføringsmiddel for probiotiske bakterier. Den mest utprøvde ostetypen er imidlertid Cheddar. Til Cheddar har det blitt tilsatt ulike stammer av laktobasiller og bifidobakterier (Hayes et al. 2006). Ved tilsetning av laktobasiller som tilleggskultur i Cheddar har det blitt oppdaget stor forskjell på overlevelsessevnen til ulike stammer under framstilling og modning av ostene. En studie hvor *Lb. paracasei* og *Lactobacillus (Lb.) salivarius* av human opprinnelse ble benyttet, ble det vist at *Lb. paracasei* stammene overlevde i stor grad, mens *Lb. salivarius*-stammen døde ut under modningen av osten. Da laktobasillene vokste underveis i framstillingsprosessen kunne det brukes et lavt inokulumsnivå ( $10^5$ - $10^6$  cfu/ml). De utvalgte laktobasillene hadde i tillegg umerkbar effekt på kvalitet og smak på moden Cheddar. Dette kan være interessant for industrien, da tilsetning av probiotiske laktobasiller til Cheddar lett kunne gjennomføres uten endringer i ysteteknikken. (Stanton et al. 1998).

Studier har vist motstridende resultater når det gjelder både overlevelse av probiotiske bakterier og sensorisk kvalitet på ferdige oster tilsatt probiotika. Gardiner et al (1999) viste blant annet at Cheddar ga et gjennomsnittlig høyere fekalt innhold av probiotiske bakterier hos griser sammenlignet med yoghurt tilsatt samme probiotiske bakteriestamme. Enda finnes det likevel lite kunnskap omkring hvordan de probiotiske egenskapene utarter seg når bakteriene innlemmes i en ostematriks (Heller et al. 2003).

I 1999 ble det innvilget et patent for utvikling av probiotisk ost, og i 2000 ble det introdusert en probiotisk ost med *Lb. rhamnosus* GG på det finske markedet. Det finnes ingen informasjon angående denne bakteriestammens probiotiske egenskaper når den er inkorporert i en ostematriks (Heller et al. 2003). Osten er imidlertid blitt tatt ut av markedet igjen, som følge av dårlig etterspørsel (Jatila 2009)

I Norge finnes det en rekke probiotiske fermenterte meieriprodukter. TINE SA har flere typer probiotisk yoghurt og syrnnet melk: Biolaprodukter tilsatt *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. acidophilus* LA-5, *B. lactis* Bb12 (TINE SA 2010a) og Culturaprodukter tilsatt *Lb. acidophilus* LA-5, *B. lactis* Bb12 (TINE SA 2010b). Q-meieriene tilbyr probiotisk yoghurt og syrnnet melk hvor probiotika, *Lactobacillus (Lb.) reuteri* protectis, og fiber (1 % kostfiber fra sikorirot og havre) er kombinert (Kavli AS Norge 2010).

#### **2.7.4. Resultater av *in vitro* tester på dyr – gunstige effekter av probiotisk ost**

Til tross for at kliniske bevis for positive helseeffekter er en nødvendig forutsetning for å kunne betegne en ost som probiotisk, finnes det få kliniske studier på området. Fokus har til nå ligget på å påvise overlevelse av de probiotiske bakteriene i tilstrekkelig mengde gjennom fordøyelsessystemet til å kunne utøve probiotisk effekt. Hva som er tilstrekkelig mengde er et omdiskutert tema, men generelt er det akseptert at en normal daglig porsjon av matvaren skal inneholde omtrent  $10^8$  bakterier. Ved inntak av hard ost vil dette tilsvare  $\geq 3 \cdot 10^6$  kde/g dersom det inntas 1-3 skiver a 30 gram (Heller et al. 2003).

Da det antas at ostematriksen og ostens bufferkapasitet kan beskytte bakteriene mot de harde forholdene i fordøyelsessystemet, har det blitt undersøkt hvordan enkelte probiotiske stammer i ost tolererer både syre og galle. *Bifidobacterium (B.) longum*, *B. infantis*, *Lb. acidophilus* og *Lb. casei*, samt *P. freudenreichii* og *P. acidopropionici* viste god overlevelse ved utsettelse for syre og galle i henholdsvis Argentinsk Fresco ost, og Emmental-liknende ost (Heller et al. 2003). Foringsforsøk med gris har vist at inntak av Cheddar inneholdende *Lb. paracasei* NFBC 338 eller *E. faecium* PR68 resulterte i høyere fekalt innhold av de probiotiske bakteriene sammenlignet med inntak av yoghurt tilsatt samme probiotiske bakterier (Gardiner et al. 1999; Stanton et al. 1998). Det ble også observert en positiv IgG respons hos griser foret med ost tilsatt probiotika, men det ble ikke påvist noen positiv effekt verken på innhold av fekale koliforme bakterier eller grisenes vekst eller forutnyttelse (Gardiner et al. 1999).



Andre effekter av ulike typer probiotiske oster inkluderer immunmodulerende effekt i mus av en type argentinsk ferskost tilsatt *Lb. acidophilus* A9, *B. bifidum* A12 og *Lb. paracasei* A13. Det ble observert økt fagocytisk aktivitet i tynntarm, økt mengde IgA-produserende celler i tykktarm og interaksjon mellom probiotika som bakterielle antigener i tykk- og tynntarm. Undersøkelse av effekt av probiotisk Edamer ost inneholdende *Lb. rhamnosus* LC705 og *Lb. rhamnosus* GG indikerte at inntak av denne osten kunne redusere risiko for karies generelt, selv om det ikke ble observert noen statistisk signifikant forskjell i den mikrobielle populasjonen i spyttet. En annen studie foreslo også at inntak av probiotisk ost kan benyttes som en profylaktisk metode for å redusere risiko for lav spyttproduksjon og tørr munnfølelse, og at det generelt kan bidra til bedret munnhelse (da Cruz et al. 2009).

### 3. Forsøksdesign, materialer og metoder

I denne oppgaven ble det benyttet sju utvalgte stammer av melkesyrebakterier og to propionsyrebakterier. Probiotisk potensial, i form av syre- og galletoleranse ved 37 °C i tre timer, ble undersøkt *in vitro* for samtlige stammer.

Det ble gjennomført et ystingsforsøk hvor det ble ystet 16 ulike ostetyper. Til ostene ble åtte av de utvalgte bakteriestammene tilsatt, som tilleggskulturer eller startere. Det ble framstilt både magre og helfete varianter av ostene tilsatt de ulike stammene. Det ble foretatt kjemiske og mikrobiologiske analyser underveis i ystings- og modningsprosessen. Utvikling av de utvalgte bakteriestammene i ostene ble fulgt ved tre punkter i modningstiden; etter 24 timer, fire og sju uker.

Bakteriestammenes probiotiske potensial ble videre undersøkt ved testing av deres overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem som ved bruk av human mage- og tarmsaft skulle simulere normale fordøyelsesforhold. Bakteriestammene ble kjørt gjennom fordøyelsen både i form av vaskede celler fra renkulturer løst i Ringers løsning, og inkorporert i modnet mager og helfet ost. Overlevelsesevnen til bakteriestammene gjennom fordøyelsessystemet som vaskede celler alene og inkorporert i ost ble deretter sammenlignet.

#### 3.1. Bakteriekulturer

Til denne oppgaven ble det valgt å benytte ni utvalgte bakteriestammer, hvorav sju melkesyre- og to propionsyrebakteriestammer. Samtlige bakteriestammer kom fra egen samling på Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap.

##### 3.1.1. Laktobasiller

Til forsøket ble det valgt ut fire ulike stammer av laktobasiller, nemlig *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D og *Lb. rhamnosus* GG. De tre førstnevnte laktobasillene ble opprinnelig isolert fra ost (Skeie 2010), mens *Lb. rhamnosus* GG er en velkjent, kommersiell stamme fra Valio med dokumentert probiotisk effekt (Vasiljevic & Shah 2008). Samtlige laktobasillstammer ble undersøkt for probiotisk potensial og benyttet til ysting.

### 3.1.2. Laktokokker

Det ble valgt ut tre stammer av laktokokker, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 og *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N. Stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* var opprinnelig isolert fra tettemelk, mens *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N er en stamme isolert fra en syrekultur brukt til ysting av Cheddar. Stammen kom opprinnelig fra New Zealand, men ble skaffet til veie av Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKMB) fra University College Cork. Det har vist seg at denne stammen ikke er dyrkbar i melk, og av praktiske årsaker ble det derfor valgt å se bort fra denne når det skulle velges ut åtte stammer til ystingsforsøket. Probiotisk potensial ble imidlertid undersøkt for alle de tre stammene.

### 3.1.3. Propionsyrebakterier

Det ble valgt ut to stammer av propionsyrebakterier, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 og *P. jensenii* INF P303. Begge stammer var opprinnelig isolert fra ost. De ble både benyttet til ysting og undersøkt for probiotisk potensial.

### 3.1.4 Oppbevaring og behandling av bakteriekulturene

Det ble tillaget frysestocker fra ferske overnattekulturer av de ni bakteriestammene. Bakteriekultur (600 µl), sterilt vekstmedium (300 µl) og steril glyserol (60 %, 350 µl) ble blandet i sterile eppendorfrør (2 ml), og oppbevart ved -80 °C. I forkant av undersøkelser ble det sterilt tatt opp prøver fra frysestockene (en podeøse) som fikk vokse opp i buljong ved optimale vekstforhold, jfr. Tabell 3. Melkesyrebakteriestammene ble ompodet hvert døgn (1 % poding), mens propionsyrebakteriene ble ompodet hvert annet døgn (2 % poding). Samtlige bakteriestammer ble ompodet minimum tre og maksimalt seks ganger før de ble benyttet til undersøkelser.

**Tabell 3: Oversikt over vekstforhold i form av vekstmedium (buljong), inkubasjonstemperatur og -tid, samt oksygentilgang benyttet for de ulike bakteriestammene.**

<b>Bakteriestamme</b>	<b>Vekst-medium</b>	<b>Ink.temp. (°C)</b>	<b>Ink.tid (døgn)</b>	<b>Oksygentilgang</b>
<i>Lb. paracasei</i> 448	MRS <sup>1</sup>	30	3	Anaerobe kar*
<i>Lb. paracasei</i> 456	MRS <sup>1</sup>	30	3	Anaerobe kar*
<i>Lb. plantarum</i> 15D	MRS <sup>1</sup>	30	3	Anaerobe kar*
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	MRS <sup>1</sup>	30	3	Anaerobe kar*
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML-8N	M17 <sup>2</sup>	30	2	Aerobt
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Ar-1	M17 <sup>2</sup>	22	3	Anaerobe kar*
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Bf-2	M17 <sup>2</sup>	22	3	Anaerobe kar*
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> INF P203	NLB <sup>3</sup>	30	6	Anaerobe kar*
<i>P. jensenii</i> INF P303	NLB <sup>3</sup>	30	6	Anaerobe kar*

\* Ved inkubasjon i anaerobe kar ble det plassert to konvolutter med OXOID Anaerogen™ (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) i hvert kar.

1) de Man, Rugosa and Sharpe (Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA/ Le Pont de Claix Cedex, Frankrike).

2) (Merck, Darmstadt, Tyskland)

3) Natriumlaktat-buljong (egen oppskrift)

1L NL- buljong:

10 gram trypton (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)

10 gram gjærekstrakt (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)

15 ml natriumlaktat (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Tyskland/St. Louis, USA).

0,250 gram dikaliumhydrogenfosfat (Merck, Darmstadt, Tyskland).

## 3.2. Ysting

### 3.2.1. Forsøksoppsett

Ystingsforsøket ble gjennomført i pilotanlegget ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap. Ystingen ble foretatt over fire dager, hvor det ble benyttet lik ystingsteknikk, men to varierende forsøksfaktorer. Faktorene som ble variert var type bakteriekultur (utvalgte potensielt probiotiske stammer) som ble tilsatt som tilleggskulturer, og ostens fettprosent (10 % eller 28 %). Fjerde ystingsdag ble imidlertid to av de potensielt probiotiske stammene benyttet som syrekultur, da dette var laktokokker. Dette resulterte i at det totalt ble framstilt 16 ulike oster. Av praktiske årsaker ble forsøket ikke fullstendig randomisert, men fulgte oppsettet som er skjematisk framstilt i Tabell 4.

Tabell 4: Skjematisk oversikt over forsøksoppsettet (ystingsdag, karnummer, syrekultur, tilleggskultur og fettprosent).

Ystingsdag	Ystekar	Syrekultur	Tilleggskultur	Fettprosent
1	1	DL	<i>Lb. paracasei</i> 448	10
1	2	DL	<i>Lb. paracasei</i> 448	28
1	3	DL	<i>Lb. paracasei</i> 456	10
1	4	DL	<i>Lb. paracasei</i> 456	28
2	1	DL	<i>Lb. plantarum</i> 15D	28
2	2	DL	<i>Lb. plantarum</i> 15D	10
2	3	DL	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	28
2	4	DL	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	10
3	1	DL	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> INF P203	28
3	2	DL	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> INF P203	10
3	3	DL	<i>P. jensenii</i> INF P303	28
3	4	DL	<i>P. jensenii</i> INF P303	10
4	1	<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Ar-1	-	28
4	2	<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Ar-1	-	10
4	3	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Bf-2	-	28
4	4	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Bf-2	-	10

### 3.2.2. Framstilling av ost

#### 3.2.2.1. Melkebehandling

Melken som ble benyttet til ystingen ble levert fra TINE SA, og kom fra gårdsbruket på Universitetet samt en nærliggende gård. Melken ble varmet til 50 °C og deretter separert. Skummetmelk og fløte ble pasteurisert ved henholdsvis 72 °C i 15 sekunder, og 90 °C i 5 minutter. For å ytterligere redusere antall mikroorganismer i melka ble skummetmelka etter pasteurisering mikrofiltrert ved 50 °C i mikrofiltreringsanlegget UF/MF PILOT MCC (AVP, Pasilac, Silkeborg, Danmark). Anlegget hadde en kapasitet på 500 liter/time, og porestørrelsen på membranen var på 1,4 µm. Retentatet fra mikrofilteringen ble ikke benyttet videre i ystingen.

Fettinnholdet i ystemelken ble standardisert til 1,0-1,1 % og 2,7 % ved tilsetning av pasteurisert fløte, noe som resulterte i ost med henholdsvis 10 % og 28 % fett. Det ble benyttet 350 liter ystemelk per kar ved ysting av magre oster (10 % fett), og 300 liter ystemelk ved ysting av helfete oster (28 % fett).

#### 3.2.2.2 Syrekulturer

Det ble benyttet samme syrekultur i samtlige oster ved første til tredje ystingsdag. Dette var en frysetørket DVS DL-kultur, Probat Visbyvac 505 (Danisco, København, Danmark), som det ble tillaget brukssyre av. Kulturen ble oppbevart ved -40 °C før bruk. Ved tillaging av brukssyre ble det benyttet 3 og 3,5 liter rekonsitert skummetmelk (10 %, TINE SA, Norge). Melken ble inkubert ved 90 °C i 30 minutter før den ble avkjølt og podet med syrekulturen. Brukssyren ble inkubert ved 22 °C i ca. 18 timer før ysting.

Det ble benyttet en podeprosent på 1 % i ystekarene, og det ble dermed tilsatt 3 og 3,5 liter brukssyre til ystekar med henholdsvis helfet og mager ost. Fjerde ystingsdag ble det ikke benyttet kommersielle startere. Her ble det tillaget brukssyre av bakteriekultur av *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 dyrket i melk.

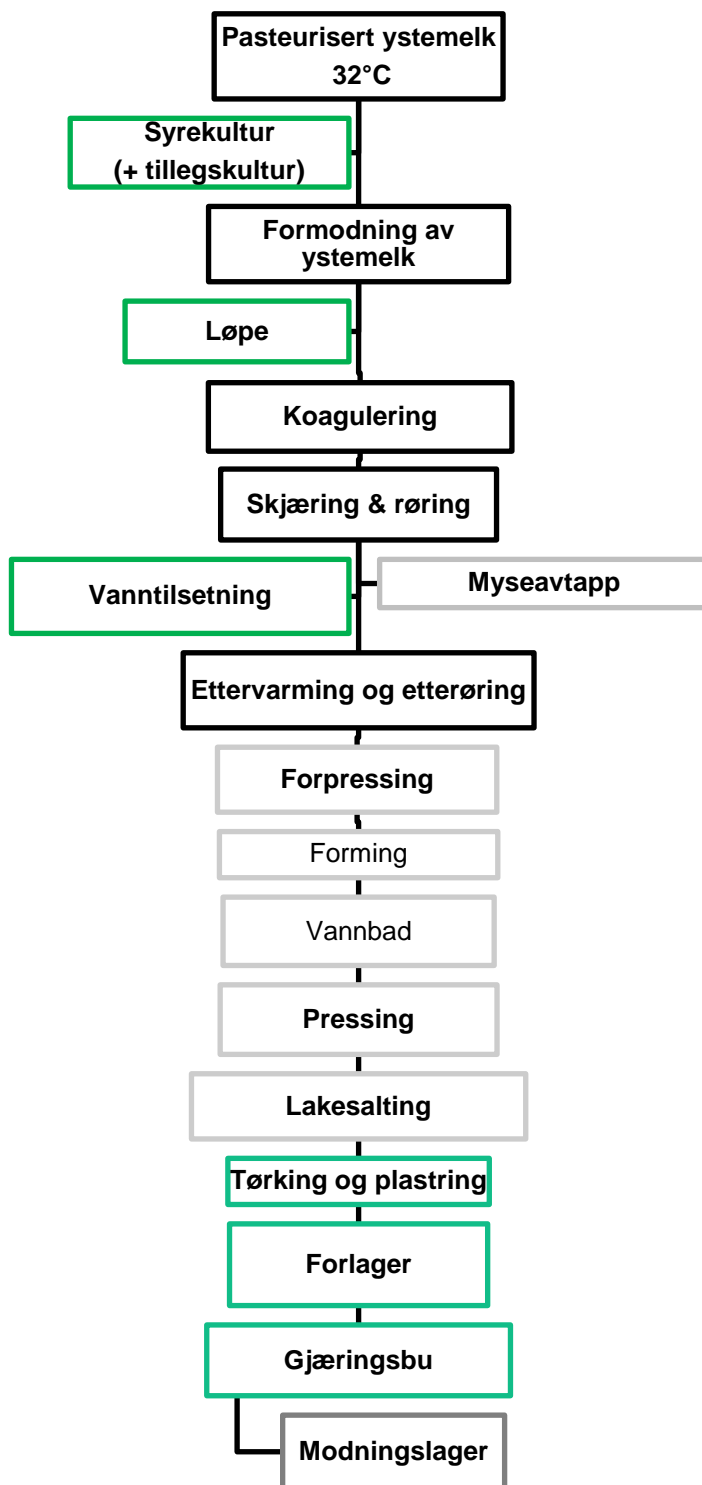
### **3.2.2.3 Tilleggskulturer**

Kulturene ble oppbevart ved -80 °C, og laktobasiller, propionsyrebakterier og laktokokker ble dyrket opp i henholdsvis de Man Rugosa and Sharpe (MRS)-, natriumlaktat –buljong (NLB) og melk. Laktokokkene ble inkubert ved 22 °C, og de resterende stammene ved 30 °C. Bakteriekulturene ble ompodet tre ganger før de ble tilsatt i ystekarene. Det ble benyttet en podeprosent på 0,3 %. Fersk overnatkultur av tilleggskulturene ble tilsatt samtidig med tilsetting av syrekultur.

### **3.2.2.4 Ystingsteknikk**

Ostene ble ystet etter en teknikk vist i flytskjema i Figur 6. Det ble ystet i 500 liters ystekar med pneumatisk røreverk. Melken hadde en temperatur på 32 °C før syrekultur ble tilsatt. Ostemassen fra ystekarene ble delt i seks, slik at en fikk seks oster à 5 kg fra hvert ystekar. Før bruk ble alt utstyr desinfisert med damp, og mindre gjenstander ble oppbevart i klorvann når de ikke ble benyttet.

Forpresset ostemasse ble overført til former hvor de gjennomgikk etterpressing. Ferdigpressede oster oppbevart i kaldt vann i fem timer før de ble plassert i saltlake (11 °C, 22 °Be, pH=5,0-5,3).



Figur 6: Skjematisk oversikt over framstillingsprosessen for løpefelt, halvfast hollandsk type ost.



### **3.2.2.5 Lagerbehandling**

Etter 10 timers salting ble ostene plassert på forlager i 10 døgn ved 11 °C. På forlager ble ostene vendt hver dag, og plastret med to lag Ceska-WL 10 innholdende 0,025 % natamycin (SCK Food Enrichment B.V, Leeuwarden, Nederland) for å bidra til skorpedannelse og hindre muggvekst.

Etter forlager ble ostene flyttet til gjæringsbu hvor de ble oppbevart ved 19 °C i 14 døgn. På gjæringsbu ble ostene vendt hver tredje dag. Ostene ble deretter vakuumpakket i plastposer (Cryovac, Skjetten, Norge) og plassert på modningslager. På modningslageret ble ostene oppbevart ved 4 °C fram til prøveuttak (ca. sju uker etter ysting), og vendt hver uke.

Detaljer omkring ystingen er oppsummert i Tabell 5.

Tabell 5: Oppsummering av detaljer omkring ystingsteknikken som ble benyttet for framstilling av magre (10 % fett) og helfete (28 % fett) oster.

Prosesstrinn	10 %	28 %
<b>Syrekultur:</b>		
Type:	Frysetørret Probat Visbyvac 505	Frysetørret Probat Visbyvac 505
Medium:	Skummet melk	Skummet melk
Varmebehandling:	90 °C, 30 min	90 °C, 30 min
Inkubasjonstemp:	22 °C	22 °C
Inkubasjonstid:	18 timer	18 timer
Nedkjøling til:	8 °C	8 °C
<b>Ystemelk:</b>		
Mikrofiltrering/Baktofugering:	Mikrofiltrering	Mikrofiltrering
Varmebehandling:	72 °C, 15 sek	72 °C, 15 sek
Mengde pr. kar:	350 liter	300 liter
Fettinnhold:	1,0-1,1 %	2,7 %
38 % fløte:	10 L	21 L
<b>Tilsetninger i ystekaret:</b>		
Syrekultur:	1 %, 3,5 l pr ystekar	1 %, 3 liter pr.ystekar
NSLAB: 10 <sup>8</sup>	0,3 % 1 L til 350 L melk	0,3 % 0,85 L til 300 L melk
Løpetype:	Chy max Plus (Chr. Hansen, Hørsholm, DK)	Chy max Plus
Løpemengde:	25 ml/100 l ystemelk 87,5 ml pr. ystekar	25 ml/100 l ystemelk 75 ml pr. ystekar
<b>Ystingsteknikk:</b>		
Formodning:	45 min ved 30,5 °C	30 min, 32 °C
Løpning:	30-40 min, 30,5 °C	30-40 min, 32 °C
Skjæring og røring:	20 min	20 min
Myseavtapp:	45 % (157, 5 L)	40 % (120 L)
Vanntilsetning:	20 % (70 L)	40 % (120 L)
Etttervarmingstemperatur:	36 °C Temp. ystevann; 44 °C	39 °C
Etttervarmingstid:	1 min	5 min
Ettterrøringstid:	45 min	35 min
<b>Pressing:</b>		
Forpressing:	15 min ved 1,5 bar	15 min ved 1,5 bar
Etterpressing:	15 min ved 1,5 bar 60 min ved 2,0 bar	15 min ved 1,5 bar 60 min ved 2,0 bar
<b>Salting:</b>		
Tid:	10 timer	10 timer
Laketemperatur:	11 °C	11 °C
Saltkonsentrasjon:	22 °Be	22 °Be
pH-verdi:	5,0-5,3	5,0-5,3
<b>Lagerbehandling:</b>		
Forlager:	10 døgn, 11 °C	10 døgn, 11 °C
Gjæringsbu:	14 døgn, 19 °C	14 døgn, 19 °C
Modningslager:	24 døgn, 4 °C	24 døgn, 4 °C

### 3.2.3. Analyser

Det ble foretatt en rekke mikrobiologiske og kjemiske analyser under ysting og modning av ostene. Analysene ble foretatt på selve ystingsdagen, samt etter 24 timer, fire og sju ukers modning av osten. Samtlige analyser som ble gjennomført er oppsummert i Tabell 6.

Tabell 6: Oversikt over analyser gjennomført på ulike tidspunkt underveis i framstillingsprosessen av ostene (måling av pH, fettprosent, mikrobiologi (vekst på VRBA, NLA, PCA, M17 og LBS) og tørrstoffprosent).

	pH	Fett (%)	Mikrobiologiske analyser					Tørrstoff
			VRBA <sup>1</sup>	NLA <sup>2</sup>	PCA <sup>3</sup>	M17 <sup>4</sup>	LBS <sup>5</sup>	
<b>Ystemelk</b>	X	X	X		X			
<b>Før løpetilsetning</b>	X			X		X	X	
<b>Skjæring</b>	X							
<b>Første myseavtapp</b>	X		X					
<b>Vanntilsetning</b>	X							
<b>Andre myseavtapp</b>	X		X					
<b>Etter forpressing</b>	X		X					
<b>Etter pressing</b>	X							
<b>24 timers ost</b>	X		X	X		X	X	X
<b>Ut av gjæringsbu (fire uker)</b>	X		X	X		X	X	X
<b>Sju ukers ost</b>	X	X	X	X		X	X	X

1) Violet Red Bile Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England).

2) Natriumlaktat-buljong tilsatt 15 g Bactoagar (Saveen Werner AB, Malmø og Stockholm, Sverige). Analyser ble kun foretatt for ost tilsatt propionsyrebakterier.

3) Plate Count Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England).

4) M17-buljong tilsatt 15 g Bactoagar (Saveen Werner AB, Malmø og Stockholm, Sverige).

5) Lactobacillus Selection agar (Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA/ Le Pont de Claix Cedex, Frankrike).

#### 3.2.3.1. Mikrobiologiske analyser

Prøveuttak til mikrobiologiske analyser ble foretatt aseptisk ved bruk av sterile bulkotester under ysting, og med steril ostesøker fra ostene i henhold til prosedyre 50C beskrevet i IDF-standard (1995). 11 gram av osten ble veid ut og homogenisert med 99 ml sterilt trinatrium-sitratvann (2 %, pH 7,5, 48 °C) i autoklaverte Omni-Mixere (Omni Int, Waterbury, CT, USA) i 2 minutter ved hastighet 4,5. Av homogeniserte prøver ble det tillaget standard fortynningsrekker med steril Ringers løsning. Fra prøveuttak underveis i ystingen ble det tillaget fortynningsrekker direkte fra bulkotestene. Antall kolonidannende enheter av de ulike bakterietypene ble funnet ved innstøpning med selektive vekstmedium (agar) på petriskåler. Skålene ble inkubert i henhold til Tabell 7. Ved behandling av resultatdata, framstilling av figurer og statistisk analyse ble manglende verdier og punkter hvor en ikke hadde nøyaktig bakterietall fjernet fra datasettet.

**Tabell 7: Oversikt over vekstmedium (agar), inkubasjonstemperatur og –tid, samt oksygentilgang som ble benyttet for å undersøke innhold av koliforme bakterier, totalt antall aerobe mesofile bakterier, laktobasiller og laktokokker under ysting og modning av ostene.**

Bakterietype til undersøkelse	Vekstmedium	Ink.temp. (°C)	Ink.tid (døgn)	Oksygentilgang
Koliforme bakterier	VRBA <sup>1</sup>	37	1	Aerobt
Totaltall; Aerobe, mesofile bakterier	PCA <sup>2</sup>	30	3	Aerobt
Laktobasiller	LBS <sup>3</sup>	30	4	Anaerobskap
Laktokokker*	M17 <sup>4</sup>	30	2	Anaerobskap
		22	3	Anaerobe kar
Propionsyrebakterier	NLA	30	2	Anaerobe kar

\* For undersøkelse av utvikling av *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene som ble benyttet som syrekulturer fjerde ystingsdag ble M17-skålene med innstøpte prøver inkubert i anaerobe kar ved 22 °C.

### 3.2.3.1.1. Bakterietall i tilleggskulturer

Det ble laget tilleggs- eller syrekulturer (av laktokokker) av de åtte bakteriestammene som ble utvalgt til ysting. Bakterietall i tilleggskultur og brukssyre ble undersøkt ved innstøpning på Lactobacillus Selection (LBS)- agar for laktobasillene, NLB-agar for propionsyrebakteriene og M17-agar for laktokokkene. Agarskålene ble inkubert ved optimale forhold i henhold til Tabell 7.

### 3.2.3.1.2. Mikrobiologiske analyser under ysting

Under ystingen ble det tatt ut en rekke prøver til mikrobiologiske analyser. Totalt antall aerobe, mesofile bakterier i ystemelka ble undersøkt ved innstøpning med Plate Count Agar (PCA). Hygienen under ystingen samt effektivitet av pasteurisering ble kontrollert ved undersøkelse av antall koliforme bakterier i ystemelk, etter første og andre myseavtapp, og etter forpressing. Undersøkelsene ble gjennomført ved innstøpning med lokk av prøveuttak med Violet Red Bile Agar (VRBA). Mengde laktokokker og laktobasiller i ystemelka etter formodning/ før tilsetting av løpe ble undersøkt ved innstøpning av prøveuttak med henholdsvis M17- og LBS-agar.

### 3.2.3.1.3. Mikrobiologiske analyser under modning av ostene

Det ble foretatt analyser av ostene etter 24 timer, fire og sju uker. Det ble undersøkt for innhold av koliforme bakterier, laktokokker og laktobasiller ved innstøpning med henholdsvis VRBA, M17, LBS. For ost fra tredje og fjerde ystingsdag ble det i tillegg undersøkt for innhold av henholdsvis propionsyrebakterier og laktokokker ved innstøpning i NLA og M17 (22 °C).

### **3.2.3.2 Kjemiske analyser**

Til kjemiske analyser ble det benyttet en sektor av hver ost. Prøveuttaket ble gjort i henhold til IDF standard 50 c (IDF 1995). Voks og eventuelle tusjmerker ble fjernet før osten ble revet opp.

#### **3.2.3.2.1 Tørrstoff**

Utviklingen i tørrstoffinnhold i ostene under modning ble undersøkt ved analyse av ostenes tørrstoffinnhold etter 24 timer, fire og sju uker. Analysen ble utført i henhold til IDF standard 4d fra 1982 (IDF 1982). Omtrent 5 gram opprevet ost ble veid inn med fire desimalers nøyaktighet i forhåndsveide aluminiumsskåler. Osteprøvene stod i romtemperatur i 24 timer før de ble plassert i tørkeskap ved 102 °C i 20 timer. Før veiing etter tørking ble prøvene satt i eksikator til de nådde romtemperatur (ca en times tid). Skålene ble veid på ny, og gjennomsnittlig tørrstoffinnhold i osten ble beregnet ut i fra tre parallelle prøver fra hver ost.

#### **3.2.3.2.2 pH**

pH-utvikling i ostene under ysting ble fulgt ved prøveuttak underveis i ystingen. pH ble målt med et temperaturkalibrert pH-meter (Thermo Scientific Orion 320, Orion Research, Boston, USA). Etter pressing ble pH målt direkte med pH-elektrode i osten. For pH-måling i 24 timers, fire og sju ukers ost ble det benyttet revet ost fra en sektor av osten. 25 gram ost ble veid ut i Ola-beger og tilsatt 10 ml destillert vann. Osteprøvene fikk ekvillibrere en times tid i romtemperatur før pH ble målt med et pH-meter (PHM 210, MeterLab Radiometer Analytical, Brønshøj, Danmark).

#### **3.2.3.2.3 Fettprosent**

For standardisering av fettprosent i ystemelken ble fettinnholdet undersøkt i henhold til IDF-standard 226 (IDF 2008b), også kalt Gerbers metode. Fettprosent i ferdig modnet ost (7 uker) ble analysert i henhold til IDF-standard 222, også kalt Van Gulliks metode (IDF 2008a).

### **3.3 *In vitro* undersøkelse av bakteriestammens syre- og galletoleranse ved 37 °C**

#### **3.3.1. Prosedyre**

For undersøkelse av bakteriestammens syre- og galletoleranse ble det benyttet bakteriekulturer dyrket over natt. Fra overnattekkulturene ble bakteriestammene podet (1 % poding) over i reagensrør inneholdende 9,9 ml av normalt vekstmedium, vekstmedium tilsatt 0,3 % gallesalt (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Tyskland/St. Louis, USA), samt til medium med pH justert til 2 og 3. Reagensrørene ble plassert i vannbad ved 37 °C. Det ble tatt ut prøver (100 µl) fra vekstmediene før inkubasjon, og etter 3 timers inkubasjon ved 37 °C. Prøvene ble overført til reagensrør med 9,9 ml steril Ringers løsning. Ut i fra disse ble det laget standard fortynningsrekker, og prøvene ble sådd ut på petriskåler ved hjelp av innstøpning i passende agar. Skålene ble inkubert ved optimale vekstforhold i henhold til Tabell 3.

## **3.4. Undersøkelse av bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem**

### **3.4.1. Kunstig fordøyelse av vaskede bakterieceller fra renkulturer**

#### ***3.4.1.1. Oppdyrking av bakteriekulturer***

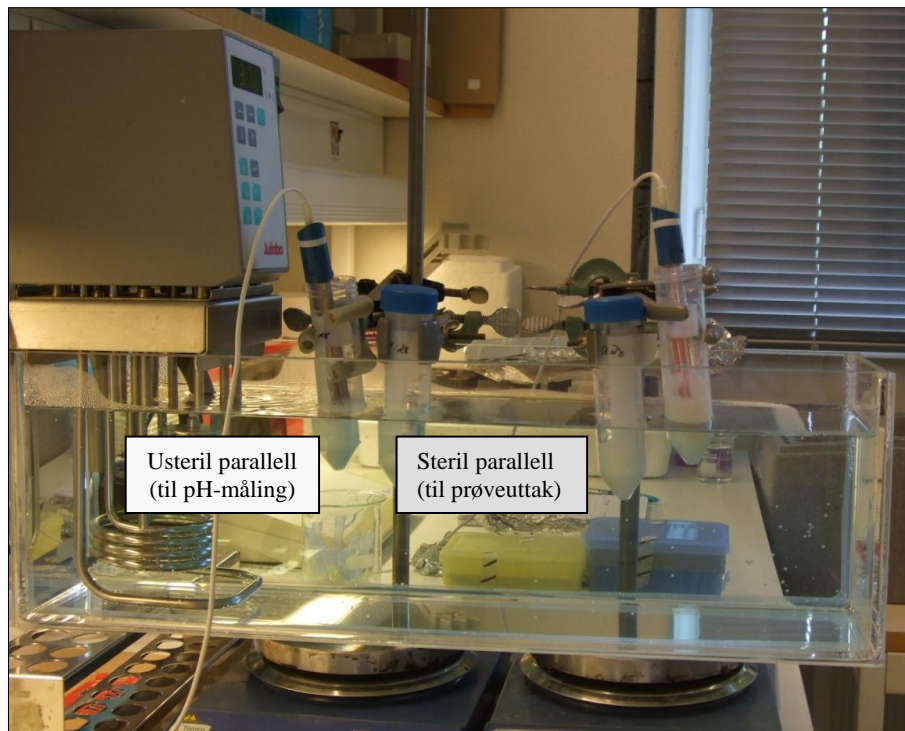
Til kunstig fordøyelse ble det benyttet ferske overnattkulturer av de sju ulike melkesyrebakteriestammene. Ett døgn i forkant av fordøyelsen ble kulturene podet (1 % poding) over fra reagensrør til 40 ml vekstbuljong i sterile falconrør, og inkubert ved optimal veksttemperatur. Kulturene var på forhånd ompodet tre ganger i 9,9 ml buljong. De to propionsyrebakteriestammene ble podet (2 %) over i 40 ml buljong 2 døgn i forkant av fordøyelsen.

#### ***3.4.1.2. Human mage- og tarmsaft***

For å best mulig simulere normale fordøyelsesforhold ble det benyttet mage- og tarmsaft fra friske mennesker, skaffet til veie i forbindelse med et samarbeidsprosjekt mellom forskningsgruppen til Gerd Vegarud ved IKBM og Sykehuset Østfold. Mage- og tarmsaften var tappet fra 14 personer i 2009, og deretter blandet for å utjevne individuelle forskjeller i blant annet pH og enzymaktivitet. Saften ble oppbevart i frossen tilstand før bruk. Mengde mage- og tarmsaft som ble benyttet ble beregnet av Alessio Tamburello, med utgangspunkt i enzymaktivitet på 19,2 U/ml for magesaften og 12,9 U/ml for tarmsaften, etter en prosedyre oppgitt av Gerd Vegarud (Tamburello 2010).

#### ***3.4.1.3. Prosedyre***

For å kunne oppnå sterile forhold, samt kontinuerlig måling av pH i bakteriekulturen under fordøyelsen ble det benyttet to parallelle prøver/oppsett for hver bakteriestamme. En usteril parallell ble benyttet til undersøkelse av mengde saltsyre (HCl) og natriumhydroksid (NaOH) som måtte tilsettes for å oppnå ønsket pH-verdi i prøvene under fordøyelsen, samt for kontroll av pH underveis. Den sterile og usterile parallellen ble behandlet på nøyaktig samme måte, og det ble antatt at deres pH-verdi var tilnærmet lik underveis i fordøyelsen. Figur 7 viser utstyrsoppsettet som ble benyttet.



Figur 7: Oppsett av kunstig fordøyelsessystem. Her ved fordøyelse av sju ukers modnet ost.

Det ble overført 11 ml av overnattekulturene til to sterile reagensrør. Bakteriecelelene ble sentrifugert ned (KUBOTA 2010, Kubota Corp, Tokyo) ved 3500 rpm, i 30 minutter. Supernatanten ble fjernet, og cellene ble resuspendert i 11 ml steril Ringers løsning. 10 ml av celleduspensjon ble overført til to sterile falconrør som videre ble plassert i vannbad ved 37 °C. Suspensjonen ble blandet godt under hele forsøket ved hjelp av sterile magnetrørere.

pH i bakteriekulturen ble så raskt som mulig senket til 3, ved tilsetning av 1M HCl (Merck, Darmstadt, Tyskland). Mengde HCl som var nødvendig å tilsette ble funnet i den usterile parallellen. Det ble tatt ut nullprøve av bakteriekulturen fra den sterile parallellen før nødvendig mengde HCl ble tilsatt. Eventuell umiddelbar effekt av pH på bakterievekst ble undersøkt ved prøveuttak fra bakteriekulturen etter 5 minutter.

Etter fem minutter ble det tilsatt magesaft (0,328 ml) i de to parallelle prøvene. Effekt av utsettelse for pH 3 og magesaft i en time på bakterievekst ble undersøkt ved prøveuttak av bakteriekulturen etter 60 minutter. pH i bakteriekulturen ble deretter hevet til pH 7 ved tilsetning av 1M NaOH (Merck, Darmstadt, Tyskland). Mengde NaOH som var nødvendig å tilsette ble funnet ved utprøving i usteril parallell. Det ble i tillegg tilsatt tarmsaft (1,44 ml) til



den sterile parallellen. Effekt av utsettelse for tarmsaft i en time på bakteriestammens overlevelsessevne ble undersøkt ved prøveuttak fra steril parallell etter nye 60 minutter (120 minutter totalt etter forsøksstart). Det ble gjennomført tre gjentak av fordøyelsen av renkulturer for samtlige 9 bakteriestammer.

#### **3.4.1.4. Behandling av prøveuttak**

Prøveuttakene (0,5 ml) som ble foretatt ut underveis i forsøket, ble overført til sterile eppendorfrør, og plassert på is. Det ble (så raskt som mulig) overført 100 µl av hver prøve til reagensrør inneholdende 9,9 ml steril Ringers løsning. Ut i fra disse ble det laget standard fortynningsrekker, og prøvene ble sådd ut på petriskåler ved hjelp av innstøpning med passende agar. Skålene ble inkubert ved optimale vekstforhold i henhold til Tabell 3.

### **3.4.2. Kunstig fordøyelse av bakteriestammene i sju ukers ost**

#### **3.4.2.1. Uttak fra ost**

Det ble utført kunstig fordøyelse av osteprøver fra ost modnet i sju uker. Uttakene ble utført på samme måte som ved mikrobiologiske analyser. 11 gram ost ble overført til sterile omnimixere (Omni Int, Waterbury, CT, USA), tilsatt sterilt trinnatrium-sitratvann (99 ml, 48 °C). og mikset ved 4500 rpm i to minutter. Det ble overført 10 ml av hver osteprøve til to sterile falconrør. Falconrørene ble plassert i vannbad ved 37 °C, og prøvene ble blandet ved hjelp av sterile magnetrørere.

#### **3.4.2.2. Prosedyre**

Den kunstige fordøyelsen av ost ble utført på samme måte som beskrevet for rene bakteriekulturer. Ostens høye bufferkapasitet gjorde det nødvendig å benytte sterkere syre og lut (2M) for å unngå for stor fortynningseffekt ved pH-justeringen. Da det først ble antatt at det ikke skjedde store forandringer i bakterietallet i prøvene i løpet av de første fem minuttene, ble det ikke utført prøveuttak ved dette punktet i fordøyelsen for ost tilsatt *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D og *Lb. rhamnosus* GG. Det ble gjennomført tre gjentak av fordøyelsen av samtlige oster, unntatt for oster tilsatt *Lb. paracasei* 448 og 456 (av tidsmessige årsaker ble det kun gjennomført to gjentak av fordøyelsen av disse ostene).

### **3.4.2.3. Behandling av prøveuttak**

Prøvene som ble tatt underveis i fordøyelsen av ostene ble behandlet på samme måte som ved fordøyelse av vaskede celler fra renkulturer, jfr. avsnitt 3.4.1.4.

## **3.5. Statistisk analyse**

Det ble gjennomført variansanalyse (ANOVA) i MiniTab15 på data for utvikling av pH-verdi og tørrstoffinnhold i ostene under modning. Dette ble også gjort på data for bakteriestammens overlevelsessevne (endring i log kde/ml(g)) ved undersøkelse av probiotisk potensial og gjennom kunstig fordøyelse. Til analysene ble det benyttet General Linear Model (GLM), med parvise sammenlikninger ved bruk av Tukey's test med 95 % signifikansnivå. Modellene som ble brukt til analysen var:

### **3.5.1. pH-utvikling og endring i tørrstoff under modning av ostene**

Det ble undersøkt om type tilsatt bakteriestamme og fettinnhold hadde signifikant innvirkning på ostenes pH-verdi og tørrstoffinnhold ved tre tidspunkt under modningen (24 timer, 4 og 7 uker). Data fra hvert tidspunkt ble analysert hver for seg, hvor pH-verdi eller tørrstoff var responsvariable, og bakteriestamme og fettinnhold var klassifiseringsvariable.

### **3.5.2. In vitro undersøkelse av bakteriestammens syre- og galletoleranse ved 37 °C**

Det ble undersøkt om det var signifikant forskjell i de utvalgte bakteriestammens overlevelsessevne under ulike fordøyelseslignende forhold (inkubasjon ved 37 °C i normal vekstbuljong, i vekstbuljong med pH justert til 2 og 3, og i vekstbuljong tilsatt 0,3% gallesalt). Forskjeller i overlevelsessevne, i form av endring i log kde/ml(g) fra start til etter tre timers inkubasjon, ble undersøkt for de ulike forholdene hver for seg. I modellen som ble benyttet var responsvariabelen log endring, og klassifiseringsvariabelen var type bakteriestamme.

### 3.5.3. Undersøkelse av bakteriestammens overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem

For å unngå problemet med ulik startkonsentrasjon av bakteriestammene i renkultur, mager og helfet ost, samt for å oppnå uavhengige resultater, ble data for bakterienes overlevelsessevne delt i tre før statistisk analyse. Det ble valgt å se bort fra målepunktet fem minutter ut i fordøyelsen. Dette fordi data fra dette punktet var fraværende for 4 av 16 oster, samt at resultatene var omtrent sammenfallende med startpunktet i de ostene hvor målingen ble foretatt.

Til variansanalysen ble datasettet delt i tre på følgende måte;

- **Del 1:** Endring i log kde/ml(g) mellom tid 0 og 60 minutter ut i fordøyelsen. Viser effekt av en times inkubasjon i magesyre, pH 3 og 37 °C på overlevelse av bakteriekulturene.
- **Del 2:** Endring i log kde/ml(g) mellom 60 og 120 minutter i fordøyelsen. Viser effekt av tarmsaft og 37 °C på overlevelse av bakteriekulturene.
- **Del 3:** Endring i log kde/ml(g) mellom tid 0 og 120 minutter i fordøyelsen. Viser effekt av hele den kunstige fordøyelsen med human mage- og tarmsaft på overlevelse av bakteriekulturene.

Det ble undersøkt om det var signifikant forskjell på bakteriestammens gjennomsnittlige endring i log kde/ml(g) i samtlige medier (som vaskede celler fra renkultur, samt i mager og helfet ost). Data fra de tre delene ble kjørt hver for seg. I tillegg ble det undersøkt om det var signifikant forskjell i gjennomsnittlig endring i log kde/ml(g) for alle bakteriestammene i de ulike mediene (Ringers løsning, mager og helfet ost) mellom punktene. Eventuell interaksjonseffekt mellom bakteriestammer og medium ved hvert punkt og også undersøkt. I modellen som ble benyttet var dermed log endring responsvariabelen, og type bakteriestamme og medium var klassifiseringsvariable. I tillegg til variansanalysen ble det laget grafiske figurer over hovedeffekter, interaksjonseffekter og residualer (normalfordeling). Noen av disse er vist i resultatdelen, og de øvrige finnes i vedlegg.

## 4. Resultater

### 4.1. Ysting

#### 4.1.1. Mikrobiologiske analyser

For å kontrollere den mikrobielle statusen i ostene under ysting og modning ble det foretatt ulike mikrobiologiske analyser ved en rekke punkter under ystingsprosessen, samt av 24 timers, fire og sju ukers ost.

##### **4.1.1.1. Totalt antall mesofile, aerobe bakterier i ystemelk**

For å få en indikasjon på mikrobiologisk kvalitet, i form av totalt innhold av mesofile, aerobe mikroorganismer, i ystemelken ble det foretatt innstøpning av prøver av ystemelken på PCA. Det ble funnet et gjennomsnittsinhold på log 1,8 ( $\pm$  0,34) kde/ml i ystemelken. Ystemelk i karet hvor det ble ystet helfet ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 skilte seg ut med et totaltall på nærmere log 3 kde/ml. Lavest totaltall ble observert i ystemelk til mager ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1.

##### **4.1.1.2. Innhold av koliforme bakterier under ysting og modning av ostene**

For å kontrollere effekt av pasteurisering, hygiene underveis i ystingsprosessen, samt mikrobiell sikkerhet i moden ost ble det foretatt innstøpning med VRBA av prøver fra ulike punkter underveis i ystingsprosessen, 24 timers, fire og sju ukers ost. Innhold av koliforme bakterier under ysting og modning er vist i Tabell 8.

**Tabell 8: Innhold av koliforme bakterier (log kde/ml(g)) under ysting og modning av helfet (28 % fett) og mager (10 % fett) ost tilsatt *Lb. paracasei* 448 og *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.**

Dag	Kar	Tilleggs-kultur	Fett (%)	Yste-melk	1. myseavt.	2. myseavt.	Etter forpress.	Fersk ost (24 t)	Ut av Gj.bu (4 uker)	Etter modning (7 uker)
1	1	448	10	<1	<1	<1	<1	3,41	2,20	2,26
1	2	448	28	<1	<1	<1	<1	2,69	3,33	3,09
1	3	456	10	<1	<1	<1	<1	1,40	<1	<1
1	4	456	28	0,48	1,45	1,46	2,19	3,48	0,70	1,00
2	1	15D	28	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
2	2	15D	10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
2	3	LGG	28	<1	<1	<1	<1	0,48	0,70	<1
2	4	LGG	10	<1	<1	0,30	0,18	<1	1,00	<1
3	1	P203	28	<1	<1	<1	1,29	1,29	<1	<1
3	2	P203	10	<1	<1	<1	1,00	<1	0,70	<1
3	3	P303	28	<1	<1	<1	1,95	1,95	1,54	<1
3	4	P303	10	<1	<1	0,30	1,60	1,60	1,65	<1
4	1	Ar-1	28	<1	<1	<1	<1	2,74	0,70	<1
4	2	Ar-1	10	<1	<1	<1	<1	1,81	<1	<1
4	3	Bf-2	28	<1	<1	<1	<1	3,48	<1	<1
4	4	Bf-2	10	<1	<1	0,30	0,65	3,48	<1	<1

Det ble ikke observert koliforme bakterier i pasteurisert ystemelk ved ystingens start. Det var imidlertid en gjennomgående trend at ystemelken/ostemassen i ystekar fire ble reinfisert under i ystingen. Innholdet av koliforme bakterier økte underveis, og bakteriene ble spredt videre til de andre karene via utstyr som ble benyttet. Første ystingsdag ble det funnet koliforme bakterier allerede i ystemelka, og innholdet her var spesielt høyt. I oster produsert denne dagen, med unntak av oster fra ystekar tre, overlevde de koliforme bakteriene gjennom hele modningstiden.

De resterende ystingsdagene ble det først observert koliforme bakterier i ystekar fire ved andre myseavtapp, og etter 24 timer var bakteriene spredt til nesten samtlige oster. Oster fra tredje ystingsdag, tilsatt *Lb. plantarum* 15D og *Lb. rhamnosus* GG hadde lavest innhold av koliforme bakterier.

Under modningstiden ble innholdet av koliforme bakterier redusert i samtlige oster, med unntak av helfet ost tilsatt *Lb. paracasei* 448. Ferdig modnede oster (7 uker) var stort sett fri for koliforme bakterier, med unntak av ost fra tre kar første ystingsdag.

#### 4.1.1.3. Innhold av laktobasiller under ysting og modning av ostene

Innholdet av laktobasiller i tilleggskulturene som ble tilsatt ved første og andre ystingsdag ble kontrollert ved innstøpning av prøveuttak med LBS-agar. Utviklingen av tilleggskulturen (første og andre ystingsdag) og/eller NSLAB laktobasiller (tredje og fjerde ystingsdag) under syring og modning av ostene ble kontrollert på samme måte etter løpetilsetning, i 24 timers, fire og sju ukers ost. Resultatene er oppsummert i Tabell 9.

**Tabell 9: Innhold av laktobasiller (log kde/ml(g)) under ysting og modning av helfet (28 % fett) og mager (10 % fett) ost tilsatt *Lb. paracasei* 448 og *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.**

Dag	Kar	Tilleggs-kultur	Fett (%)	Tilleggs-kultur	Løpe-Tilsetning	Fersk ost (24 t)	Ut av gj.bu (4 uker)	Etter modning (7 uker)
1	1	448	10	8,90	6,51	8,63	8,31	8,25
1	2	448	28	8,85	6,58	9,04	8,19	8,19
1	3	456	10	9,09	6,79	8,61	8,15	7,73
1	4	456	28	9,06	6,78	9,00	7,96	7,87
2	1	15D	28	9,66	7,01	8,49	8,31	8,55
2	2	15D	10	9,50	6,89	7,86	8,19	8,17
2	3	LGG	28	8,61	6,71	8,80	8,20	7,25
2	4	LGG	10	8,65	6,61	8,89	7,96	8,29
3	1	P203	28		5,99	8,31	7,42	7,29
3	2	P203	10		5,98	8,18	7,49	7,28
3	3	P303	28		5,72	8,29	6,85	6,70
3	4	P303	10		5,88	8,15	7,39	7,40
4	1	Ar-1	28		<1	<1	<4*	4,12
4	2	Ar-1	10		<1	<1	5,36	5,27
4	3	Bf-2	28		<1	<1	<4*	3,04
4	4	Bf-2	10		<1	<1	4,78	5,41

\*Grunnet feilvurdering ved valg av fortynningsgrad kan ikke innhold av antall log kde/ml(g) oppgis mer nøyaktig.

Tilleggskulturer av laktobasiller tilsatt første og andre ystingsdag hadde et bakterietall på omtrent log 8,5-9,5 kde per ml. Disse ble tilsatt med en podeprosent på én, og etter løpetilsetning var det log 6,5-7 kde av laktobasiller per ml i samtlige ystekar. Innholdet av laktobasiller økte i ostemassen, og i 24 timers ost ble det funnet omtrent log 8,5- 9 kde/g ost. Modningsperioden medførte en liten nedgang i innholdet av laktobasiller i samtlige oster, med unntak av ostene tilsatt tilsatt *Lb. plantarum* 15D, og sju ukers ost inneholdt log 7-8,5 kde/g ost.

Oster framstilt tredje og fjerde ystingsdag ble ikke tilsatt laktobasiller, og ved punktet for løpetilsetning ble det observert omtrent log 6 kde av laktobasiller per ml ystemelk tilsatt propionsyrebakterier. Innholdet av laktobasiller i form av NSLAB økte under ystingen til i overkant av log 8 kde/gram ost i 24 timers osten. Modningstiden medførte nedgang i mengde laktobasiller, og etter sju ukers modning var innholdet i overkant av log 7 kde/gram ost. Helfet ost tilsatt *P. jensenii* INF P303 hadde et noe lavere endelig innhold av laktobasiller sammenlignet med de resterende ostetyperne tilsatt propionsyrebakterier. For ost fra fjerde ystingsdag (tilsatt laktokokker som syrekultur) ble det ikke observert innhold av laktobasiller før etter fire ukers modningstid. De helfete variantene av ostene hadde lavere innhold av laktobasiller sammenlignet med de magre. Etter sju ukers modning ble det observert i overkant av log 5 kde av laktobasiller per gram ost i de magre variantene, og mellom log 3 og 4 kde/gram ost i de helfete ostene.

#### **4.1.1.4. Innhold av laktokokker under ysting og modning av ostene**

Ostene ble tilsatt laktokokker i form av syrekultur (1 %) til ystemelka. Oster fra første til tredje ystingsdag ble tilsatt DL-kultur, mens det for oster fra fjerde ystingsdag kun ble benyttet en enkelt laktokokkstamme, i form av enten *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 eller Bf-2, som fungerte som syrekultur. Laktokokkinholdet ble fulgt fra ystemelk ved løpetilsetning til sju ukers modnet ost. Da laktokokkene som ble tilsatt ved ystingsdag fire vokste best ved 22 °C, ble det for disse ostene undersøkt for innhold av laktokokker som vokste både ved 22 og 30 °C. Innholdet av laktokokker i syrekulturen ble også undersøkt. Resultatene av undersøkelsene er oppsummert i Tabell 10.

Tabell 10: Innhold av laktokokker (log kde/ml(g)) under ysting og modning av helfet (28 % fett) og mager (10 % fett) ost tilsatt tilsatt *Lb. paracasei* 448 og *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

Dag	Kar	Tilleggs- kultur	Fett (%)	Syre- kultur	Løpe- Tilsetning	Fersk ost (24 t)	Ut av gj.bu (4 uker)	Etter modning (7 uker)
1	1	448	10		6,87	8,87	8,42	8,47
1	2	448	28		6,73	9,43	8,25	8,05
1	3	456	10		6,91	8,68	8,65	7,48
1	4	456	28		6,82	9,49	7,77	7,39
2	1	15D	28		7,21	9,42	8,19	8,04
2	2	15D	10		7,22	8,30	8,68	8,51
2	3	LGG	28		6,64	9,16	8,85	8,45
2	4	LGG	10		6,82	8,78	8,63	8,46
3	1	P203	28		6,71	9,22	7,09	6,98
3	2	P203	10		6,63	8,78	8,15	7,25
3	3	P303	28		6,56	9,17	6,43	6,19
3	4	P303	10		6,72	8,76	7,96	7,79
4	1	Ar-1	28			>7,48*	6,97	6,39
4	2	Ar-1	10			>7,48*	5,18	7,08
4	3	Bf-2	28			>7,48*	6,48	6,07
4	4	Bf-2	10			>7,48*	7,10	5,15
4	1	Ar-1'	28	8,01	6,59	8,77	7,12	6,60
4	2	Ar-1'	10	8,04	6,67	9,21	7,20	7,18
4	3	Bf-2'	28	8,92	7,15	8,92	6,53	6,10
4	4	Bf-2'	10	8,99	7,09	9,29	5,24	5,06

\*Grunnet feil valg av fortynningsgrad kan ikke bakterietall (log kde/ml(g)) oppgis mer nøyaktig.

'Inkubert i anaerobe kar ved 22 °C.

Syrekulturene av *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene hadde et bakterietall på log 8-9 kde/ml. Etter løpetilsetning ble det påvist omtrent likt antall laktokokker i ystekarene tilsatt kommersielle og "egne" syrekulturer, og innholdet lå mellom log 6,5-7,2 kde/ml.

I 24 timers osten var innholdet økt til i underkant av log 9,5 i helfete oster, og i underkant av log 9 kde/gram ost i magre varianter for ost tilsatt kommersielle syrekulturer. For ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammer var laktokokkinholdet omtrent det samme som i de resterende ostene, men her var det magre varianter som hadde størst bakterietall.

Modningstiden medførte en reduksjon i antall laktokokker i samtlige ostetyper. For de fleste ostene var nedgangen størst de fire første ukene av modningstiden. Generelt ble det observert noe større reduksjon i laktokokkinhold i ostene fra tredje og fjerde ystingsdag, tilsatt henholdsvis tilleggs-kulturer av propionsyrebakteier og syrekulturer av *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammer, sammenlignet med de resterende ostene. For ost tilsatt laktobasiller og



propionsyrebakterier som tilleggskulturer var nedgangen i laktokokkinhold under modning kraftigst i fete ostevarianter. Mager ost tilsatt *Lb. plantarum* 15D skilte seg ut ved å vise en liten økning i antall laktokokker fra 24 timers til sju ukers ost. Størst total nedgang av laktokokker i modningsperioden ble observert for ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

#### 4.1.1.5. Innhold av propionsyrebakterier under ysting og modning av oster fra tredje ystingsdag

Ostene fra tredje ystingsdag ble tilsatt to ulike stammer av propionsyrebakterier som tilleggskulturer i tillegg til starterkulturene. Innholdet av propionsyrebakterier ble fulgt fra tilleggskultur til ferdig modnet ost. Resultatene av undersøkelsene er oppsummert i Tabell 11.

**Tabell 11: Innhold av propionsyrebakterier (log kde/ml(g)) under ysting og modning av helfet (28 % fett) og mager (10 % fett) ost tilsatt *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 og *P. jensenii* INF P303 som tilleggskultur.**

Dag	Kar	Tilleggs- Kultur	Fett (%)	Tilleggs- kultur	Løpe- tilsetning	Fersk ost (24 t)	Ut avgj.bu (4 uker)	Etter modning (7 uker)
3	1	P203	28	9,52	7,19	9,24	9,23	9,36
3	2	P203	10	9,51	7,21	8,90	9,05	9,13
3	3	P303	28	9,40	7,02	9,09	9,14	9,15
3	4	P303	10	9,37	7,07	8,88	8,88	8,94

I tilleggskulturene ble det funnet et innhold av propionsyrebakterier på omtrent log 9,5 kde/ml. Etter tilsetting av tilleggskulturene (1 %) var mengde propionsyrebakterier i overkant av log 7 kde/ml i ystemelken ved løpetilsetning. Ystingsprosessen medførte en økning i antall propionsyrebakterier, og i 24 timers ost lå innholdet på i overkant av log 9 kde/gram i helfete oster, og i underkant av log 9 kde/gram i mager varianter. Modningstiden hadde liten effekt på overlevelsen av propionsyrebakterier i ostene. Etter sju ukers modning ble det funnet i overkant av log 9 kde/gram i samtlige oster, med unntak av i mager ost tilsatt *P. jensenii* INF P303, som inneholdt i underkant av log 9 kde av propionsyrebakterier per gram ost.

## 4.1.2. Kjemiske analyser

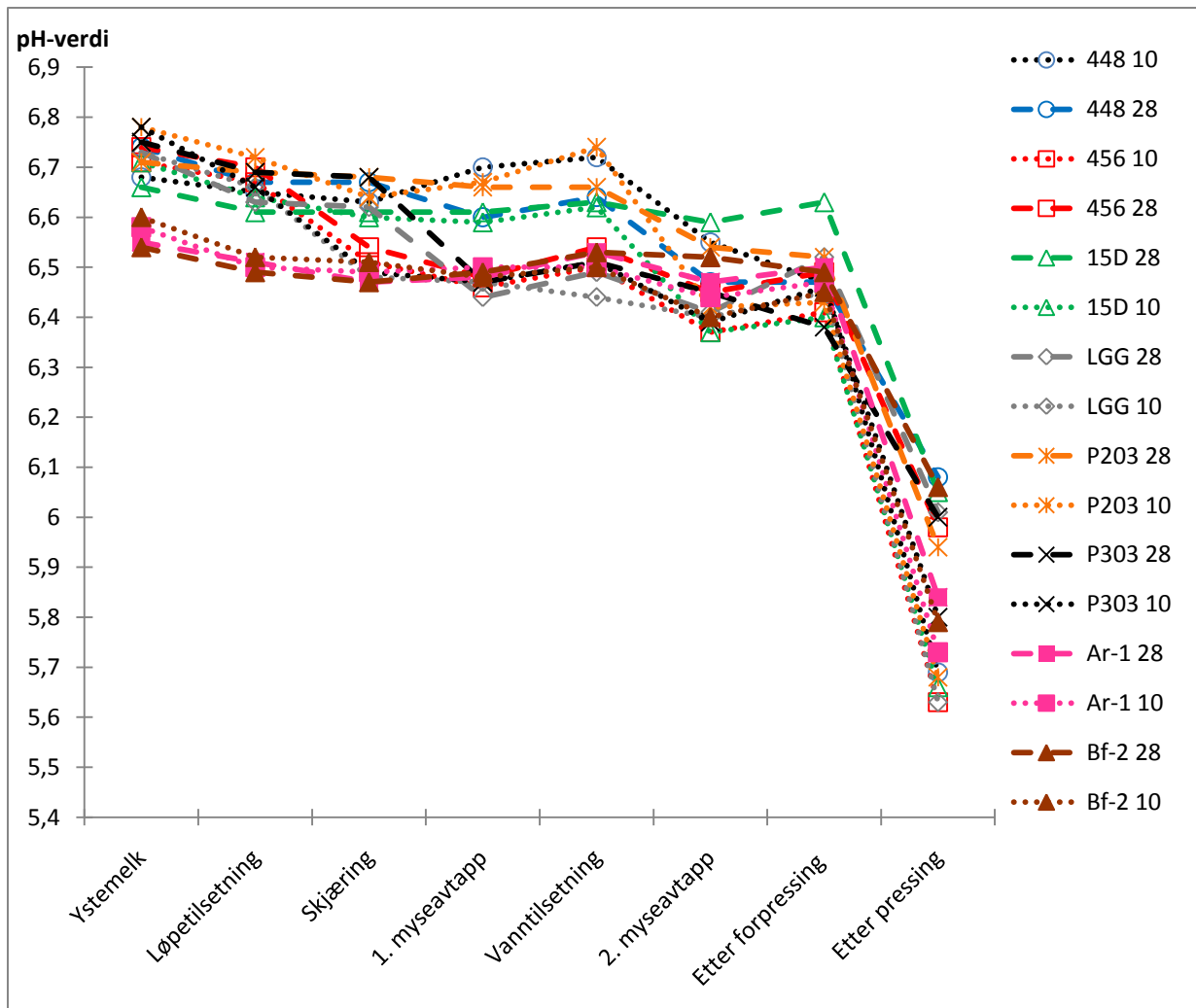
### 4.1.2.1. pH-utvikling under ysting

For å kontrollere at syrningen gikk som ønsket i ystekarene ble det foretatt pH-målinger ved en rekke punkter underveis i ystingsprosessen. pH-utviklingen i de ulike ystekarene er framstilt i Figur 8. Det ble undersøkt om tilsatt bakteriekultur og fettinnhold hadde statistisk signifikant effekt på målte pH-verdier i ostene etter pressing og under modning. Resultatene, i form av p-verdier, er oppsummert i Tabell 12.

Tabell 12: Effekt av tilsatt bakteriestamme og fettinnhold på pH-verdi i ostene etter pressing og under modning, i form av p-verdier funnet ved variansanalyse, General Linear Model.

Måletidspunkt	Effekt av tilsatt bakteriestamme (p-verdi)	Effekt av fettinnhold (p-verdi)
Etter pressing	0,311	0,588
Fersk ost (24 timer)	0,000	0,086
Ut av gjæringsbu (4 uker)	0,004	0,780
Etter modning (7 uker)	0,026	0,282

Tabellen viser at det ble påvist at tilsatt bakteriestamme hadde signifikant effekt på pH-verdi i fersk (24 t) og modnet ost (4 og 7 uker), men ikke etter pressing. Fettinnholdet i ostene hadde ikke signifikant effekt på pH-verdien ved noen av de fire målepunktene.

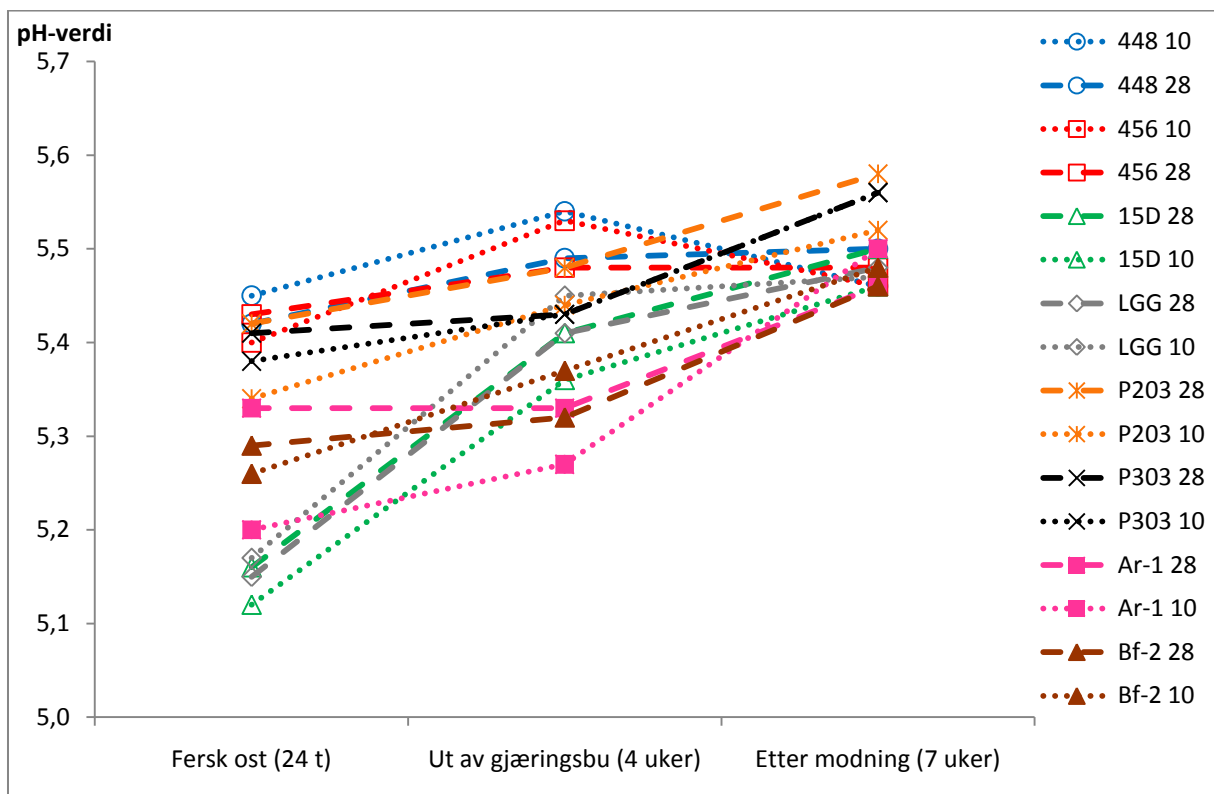


Figur 8: pH-utvikling underveis i ysteprosessen ved framstilling av helfet (28 % fett) og mager (10 % fett) ost tilsatt *Lb. paracasei* 448 og *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

pH-utviklingen under ystingen var omtrent lik i samtlige ystekar. Det ble observert en relativt jevn nedgang i pH-verdi i ystekarene. Ved fjerde ystingsdag, da *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og Bf-2 ble benyttet som syrekulturer, ble det observert en noe lavere pH i ystemelka sammenlignet med de resterende ystingsdagene. pH i disse ystakarene fortsatte å ligge i nederste del av grafen gjennom hele ystingsprosessen. Generelt gikk syrningen noe raskere i ystekarene med de magre variantene av ostene, og det ble observert lavere pH-verdi i magre ostevarianter sammenlignet med helfete etter pressing. Forskjellen mellom magre og helfete oster var minst framtrædende i osten tilsatt propionsyrebakterier. De magre variantene av ost tilsatt *Lb. paracasei* 456 og *Lb. rhamnosus* GG hadde lavest, og helfet ost tilsatt *Lb. paracasei* 448 hadde høyest pH etter pressing. Det ble ikke påvist statistisk signifikant effekt av tilsatt bakteriekultur eller fettprosent på pH i ostene etter pressing ( $p > 0,05$ ), jfr. Tabell 12.

#### 4.1.2.2. pH-utvikling under modning av ostene

Da pH-verdien er viktig for ostenes sensoriske og mikrobiologiske kvalitet ble pH-utviklingen i ferdig ost fulgt og målt etter 24 timers, fire og sju ukers modning. Resultatene er framstilt i Figur 9.



**Figur 9:** pH-utvikling under modning av helfet (28 % fett) og mager (10 % fett) ost tilsatt *Lb. paracasei* 448 og *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

Det ble observert en økning i pH i samtlige oster under modningen. Det var større variasjon i pH mellom ferske oster sammenlignet med mellom ferdigmodnede. pH -utviklingen var forskjellig i de ulike ostene under modningen. Til tross for at variasjonen i pH var mindre etter sju uker enn i fersk ost, var forskjellen signifikant mellom oster tilsatt de ulike bakteriestammene ved samtlige tre målepunkter. Fettinnholdet hadde ikke signifikant effekt på pH i ostene under modning.

I fersk ost tilsatt *Lb. plantarum* 15D og *Lb. rhamnosus* GG ble det observert signifikant lavere pH sammenlignet med i de resterende ferskeostene. Høyest pH-verdi blant de ferske ostene ble funnet i ost tilsatt *Lb. paracasei* 448 og 456, og ost tilsatt propionsyrebakterier. Ost tilsatt *Lb.*

*paracasei* 448 hadde signifikant høyere pH ( $p < 0,05$ ) sammenlignet med ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og Bf-2, mens *Lb. paracasei* 456 kun hadde signifikant høyere pH enn oster tilsatt Ar-1-stammen.

Etter fire ukers modning var variasjonen i pH mellom ostene noe mindre enn etter 24 timer. Høyest pH ble observert i magre varianter av ost tilsatt *Lb. paracasei* 448 og 456. Ost tilsatt disse bakteriestammene hadde signifikant høyere pH ( $p < 0,05$ ) sammenlignet med ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og Bf-2. Lavest pH i fire ukers ost ble funnet i ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, og disse ostene hadde i tillegg signifikant lavere pH ( $p < 0,05$ ) enn ost tilsatt propionsyrebakterier.

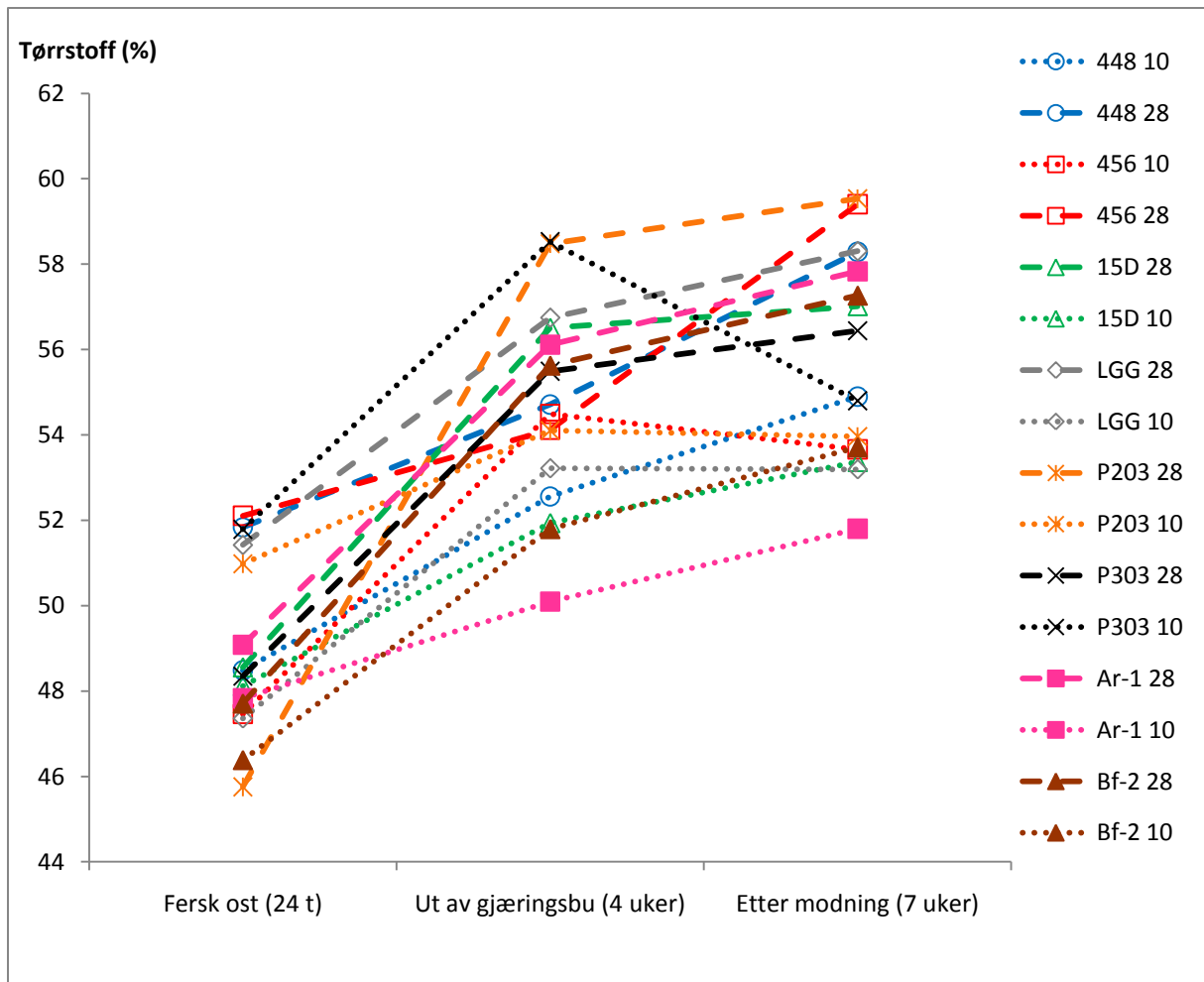
I ferdig modnet ost var variasjonen i pH mindre enn ved tidligere tidspunkt under modningen. Høyest pH ble observert i oster tilsatt propionsyrebakterier, men det ble ikke påvist statistisk signifikant forskjell i pH mellom disse og de resterende ostene. Dette skyldtes trolig at det var større forskjell i pH mellom mager og helfet ost tilsatt *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 enn mellom mager og helfet ost tilsatt de andre bakteriestammene. Generelt ble det observert høyere pH-verdi i helfete oster sammenlignet med magre varianter av ferdig modnede oster tilsatt samme bakteriestamme. For ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammer var situasjonen motsatt.

#### 4.1.2.3. Endring i tørrstoffinnhold i ostene

Da ostens tørrstoff har betydning for tekstur og mikrobiologisk overlevelse, ble tørrstoffinnholdet fulgt og målt etter 24 timers, fire og sju ukers modning av ostene. Resultatene er framstilt i Figur 10. Det ble undersøkt om tilsatt bakteriekultur og fettinnhold hadde statistisk signifikant effekt på tørrstoffinnhold i ostene under modning. Resultatene, form av p-verdier, er oppsummert i Tabell 13.

Tabell 13: Effekt av tilsatt bakteriekultur og fettinnhold på tørrstoffinnhold (%) i ostene under modning, i form av p-verdier funnet ved variansanalyse, General Linear Model.

Måletidspunkt	Effekt av tilsatt bakteriekultur (p-verdi)	Effekt av fettinnhold (p-verdi)
Fersk ost (24 timer)	0,890	0,540
Ut av gjæringsbu (4 uker)	0,588	0,041
Etter modning (7 uker)	0,572	0,000



**Figur 10:** Tørrstoffinnhold (%) under modning av helfete (28 % fett) og magre (10 % fett) oster tilsatt tilsatt *Lb. paracasei* 448 og *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

Det ble observert en økning i tørrstoffinnhold under modningsperioden for samtlige oster. Størst økning i tørrstoffinnhold forekom de fire første ukene av modningsperioden. Mager ost tilsatt *P. jensenii* INF P303 skilte seg ut, ved at det ble målt betydelig høyere tørrstoffinnhold i denne osten etter fire uker sammenlignet med etter sju uker. Sannsynligvis er måleresultatet etter sju uker feil.

Variasjonen i tørrstoffinnhold i ostene var omtrent like stor ved samtlige målepunkter. Tilsatt bakteriekultur hadde ikke signifikant effekt på tørrstoffinnhold i ostene ved noen av målepunkter under modningsperioden. Under modning ble fettinnhold avgjørende for tørrstoffinnholdet i ostene. Etter fire og sju ukers modning var effekten signifikant, og magre oster hadde signifikant lavere tørrstoffinnhold sammenlignet med helfete.

Helfet ost tilsatt *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 hadde lavest tørrstoffinnhold etter 24 timer, og høyest tørrstoffinnhold etter sju ukers modning av samtlige oster.

#### 4.1.2.4. Fettinnhold i ystemelk og ferdig modnet ost

For å kontrollere at ønsket fettinnhold var oppnådd i ostene ble det foretatt målinger av fettinnhold i tørrstoff i ferdig modnede oster (sju uker). Analyseresultatene er framstilt i Tabell 14.

**Tabell 14: Fettinnhold (%) i helfet (28 % fett) og mager (10 % fett) ferdig modnet ost (7 uker) tilsatt *Lb. paracasei* 448 og *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.**

Dag	Kar	Tilleggskultur	Fett i ost (%)	Målt fett i tørrstoff (%)
1	1	448	10	25,64
1	2	448	28	45,91
1	3	456	10	27,21
1	4	456	28	44,12
2	1	15D	28	45,92
2	2	15D	10	26,77
2	3	LGG	28	46,15
2	4	LGG	10	26,42
3	1	P203	28	51,06
3	2	P203	10	26,77
3	3	P303	28	48,21
3	4	P303	10	28,87
4	1	Ar-1	28	43,95
4	2	Ar-1	10	25,64
4	3	Bf-2	28	43,19
4	4	Bf-2	10	26,49

Fettinnholdet i ostene var omtrent som tilsiktet. Gjennomsnittlig innhold av fett i tørrstoff var 26,73 prosent for magre oster, og 46,06 prosent for helfete. Variasjonen var noe mindre mellom magre varianter (st.avvik  $\pm 1,02$ ) sammenlignet med mellom helfete (st.avvik  $\pm 2,57$ ).

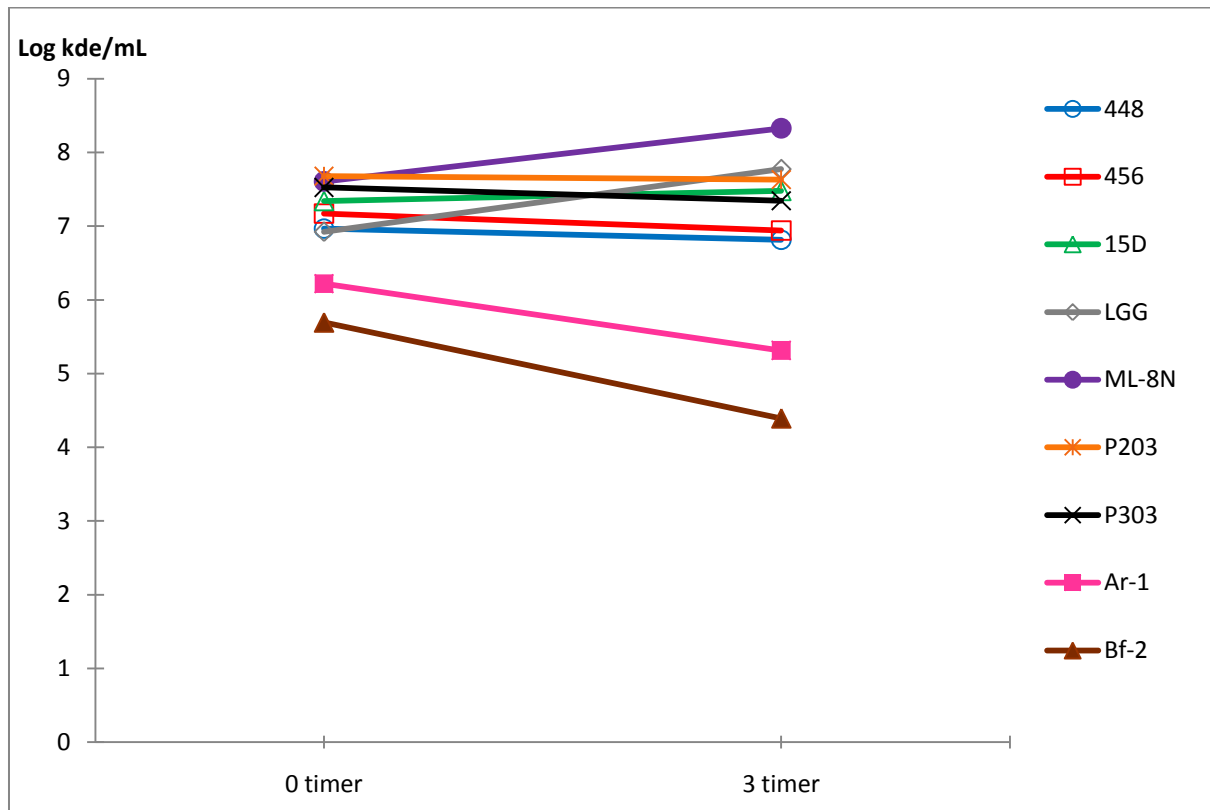
## 4.2. Bakteriestammenes syre- og galletoleranse ved 37 °C

Da et essensielt krav til probiotiske mikroorganismer er at de må overleve de harde forholdene som råder i fordøyelsessystemet, ble de utvalgte melkesyre- og propionsyrebakteriestammenes toleranse for fordøyelsesliknende forhold undersøkt *in vitro*. Bakteriene ble utsatt for tre timers inkubasjon ved 37 °C, i henholdsvis normal buljong, buljong med pH justert til 2 og 3, samt buljong tilsatt 0,3 % gallesalt. Deres overlevelsessevne, i form av endring i log kde/ml, ved de ulike forholdene ble undersøkt, og resultatene er oppsummert i Figur 11-14.

Det ble undersøkt om det var statistisk signifikant forskjell i overlevelsessevnen til bakteriestammene. Forskjellen var signifikant ( $p < 0,0001$ ) ved samtlige av de fordøyelsesliknende forholdene.



## 4.2.1. Overlevelsessevne ved 37 °C

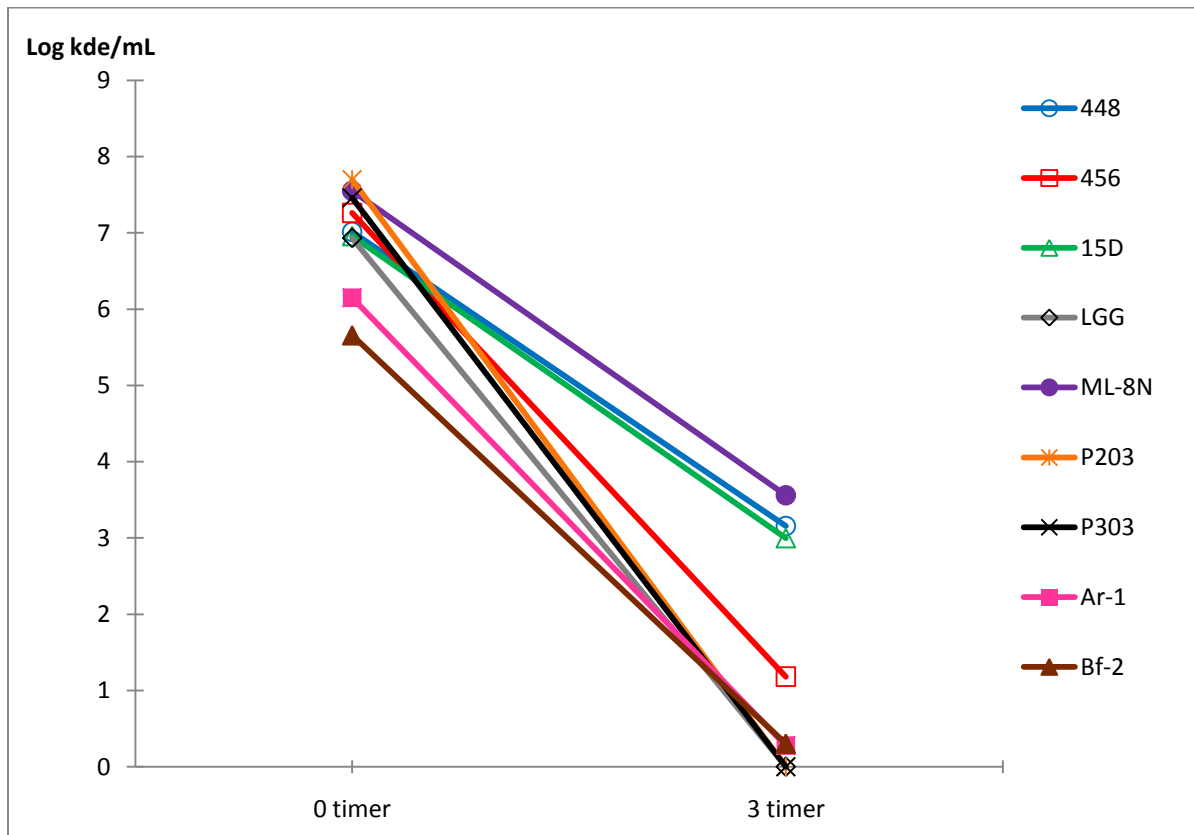


Figur 11: Overlevelsessevne i form av endring i bakterietall (log kde/ml), etter tre timers inkubasjon ved 37 °C i normalt vekstmedium, for renkulturer av *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

Ved inkubasjon i normalt vekstmedium, ble det observert noe høyere startkonsentrasjon av samtlige bakteriestammer (~ log 7-8 kde/ml) i forhold til *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene (~ log 6 kde/ml). De fleste bakteriekulturene så ut til å overleve godt ved 37 °C, og viste ingen betydelig nedgang i bakterietall. De to stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* skilte seg ut ved å ha dårligere overlevelsessevne sammenlignet med de resterende bakteriestammene.

Størst nedgang i log kde/ml ble observert for *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2-stammen. Denne stammen hadde signifikant ( $p < 0,05$ ) større nedgang i antall log kde/ml sammenlignet med samtlige bakteriestammer, med unntak av *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1. For *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 var nedgangen signifikant større enn for *Lb. rhamnosus* GG og *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N. I tillegg hadde *Lb. rhamnosus* GG signifikant bedre overlevelsessevne sammenlignet med *Lb. paracasei* 456.

## 4.2.2. Syretoleranse – pH 2 ved 37 °C

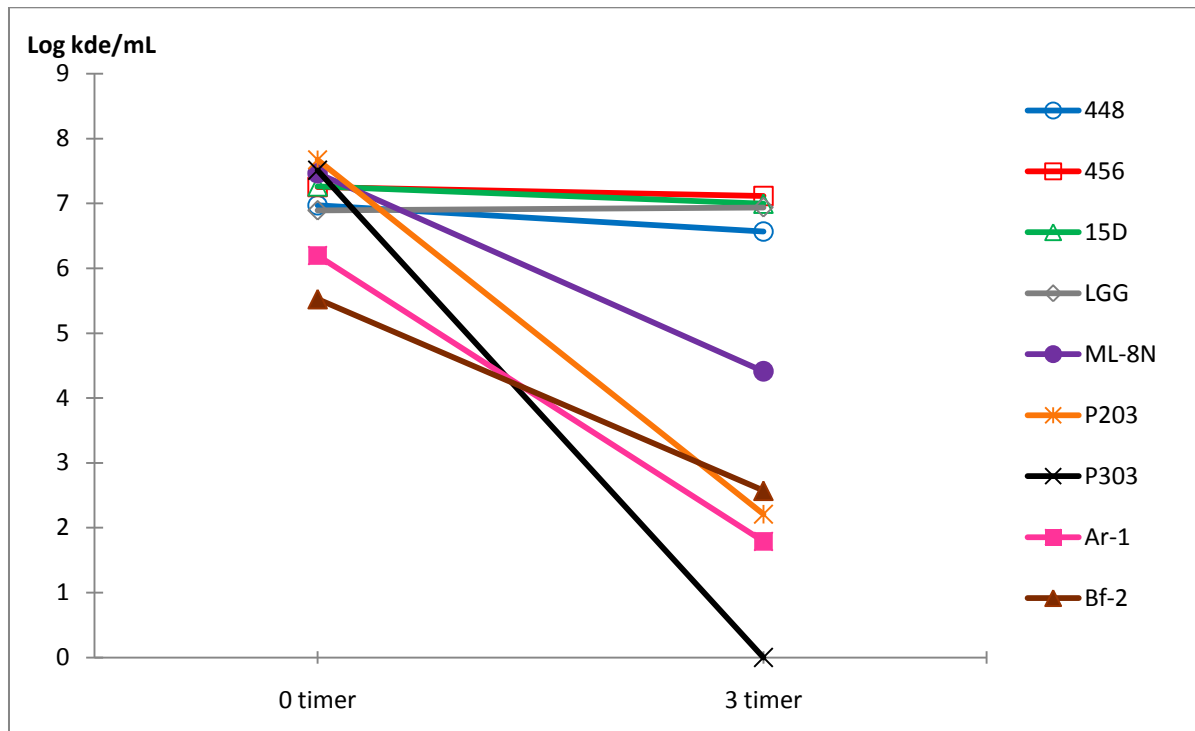


Figur 12: Overlevelsessevne i form av endring i bakteriemengde (log kde/ml), etter tre timers inkubasjon ved 37 °C i vekstmedium med pH justert til 2, for renkulturer av *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

Kombinasjonen 37 °C og pH 2 i vekstmediet utgjorde de hardeste vekstforholdene for samtlige av de undersøkte bakteriestammene, jfr. Figur 12.

Det ble observert en kraftig nedgang i antall kde/ml for alle ni bakteriestammer. Etter tre timers inkubasjon ved disse forholdene viste *Lb. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 og *P. jensenii* INF P303 ingen evne til vekst på agar, mens *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene kun gjorde det så vidt. Best overlevelsessevne hadde *Lb. paracasei* 448, *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N og *Lb. plantarum* 15D, og forskjellen var signifikant ( $p < 0,05$ ) i forhold til propionsyrebakteriestammene og *Lb. rhamnosus* GG.

#### 4.2.3. Syretoleranse – pH 3 ved 37 °C

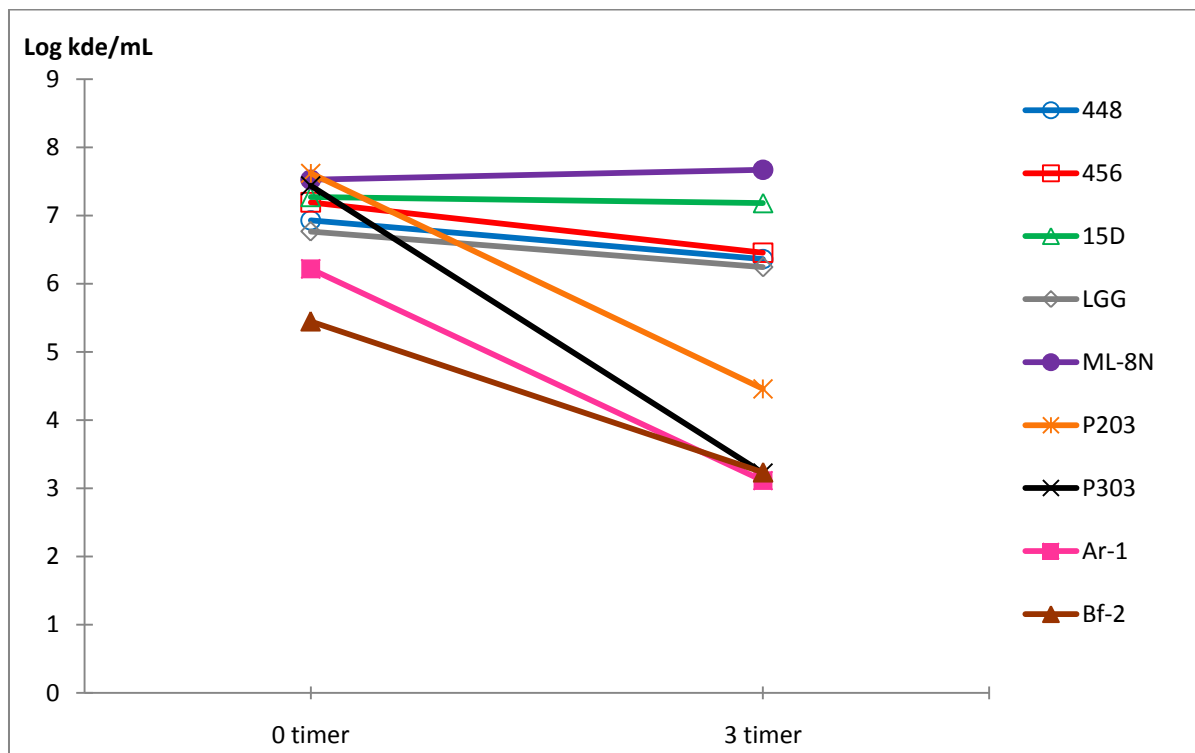


Figur 13: Overlevelsessevne i form av endring i bakteriemengde (log kde/ml) etter tre timers inkubasjon ved 37 °C i vekstmedium med pH justert til 3, for renkulturer av *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

Inkubasjon ved 37 °C i vekstmedium med pH justert til 3 viste store forskjeller i overlevelsessevnen til de ulike bakteriestammene, jfr. Figur 13. Laktobasillene overlevde svært godt, og det ble kun observert en liten nedgang i antall kde/ml etter tre timers inkubasjon. Deres overlevelsessevne var signifikant ( $p < 0,05$ ) bedre enn for *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 og *P. jensenii* INF P303. For *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 ble det observert en noe dårligere overlevelsessevne sammenlignet med laktobasillene, med en påvist en nedgang på omtrent log 3 kde/ml. Forskjellen var imidlertid ikke signifikant ( $p > 0,05$ ),

Startkonsentrasjonen var betydelig lavere for *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene enn for de resterende bakteriekulturene, og de overlevde noe bedre enn propionsyrebakteriene selv om bakterietallet var relativt lavt etter tre timers inkubasjon. En av propionsyrebakteriestammene, *P. jensenii* INF P303, var udyrkbart og hadde signifikant ( $p < 0,05$ ) dårligere overlevelsessevne enn samtlige andre bakteriestammer.

## 4.2.4. Galletoleranse ved 37 °C



Figur 14: Overlevelsessevne i form av endring i bakteriemengde (log kde/ml) etter tre timers inkubasjon ved 37 °C i vekstmedium tilsatt 0,3 % gallesalt for renkulturer av *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456, *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, *P. jensenii* INF P303, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2.

Ved inkubasjon ved 37 °C i vekstmedium tilsatt 0,3 % galle var overlevelsen noe bedre for de fleste bakteriestemmene sammenlignet med i pH -justert medium, jfr. Figur 14. Unntakene var tre av laktobasillstammene, *Lb. paracasei* 448 og 456 samt *Lb. rhamnosus* GG. Disse hadde en noe større nedgang i logtall (0,5-1 logenheter) i 0,3 % gallesalt enn ved pH 3.

Det ble observert en liten nedgang i log kde /ml for laktobasillene etter tre timer, mens det for *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N- stammen ble registrert en liten økning. Propionsyrebakterier og *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene hadde dårligst overlevelsessevne i vekstmedium tilsatt gallesalt. Forskjellen i overlevelsessevne var signifikant ( $p < 0,05$ ) mellom disse stammene og *Lb. plantarum* 15D og *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N. Propionsyrebakteriene startet med høyere log kde/ml, men hadde noe dårligere overlevelsessevne sammenlignet med laktokokkene. *P. jensenii* INF P303-stammen hadde dårligst overlevelsessevne under disse forholdene av samtlige av de undersøkte bakteriestammene.

### **4.3. Bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom kunstig fordøyelsessystem**

#### **4.3.1. Statistisk analyse av bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem**

Det ble undersøkt om det var signifikante forskjeller i bakteriestammenes overlevelsessevne i samtlige medier (Ringers løsnings, mager og helfet ost) gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Effekt av type tilsatt bakteriestamme og medium på overlevelsessevne, i form av endring i logtall (log kde/ml(g)), mellom tre ulike tidspunkt i fordøyelsen, samt interaksjonseffekt mellom de to forsøksfaktorene ble undersøkt.

De tre utvalgte tidspunktene for måling av endring i logtall i den kunstige fordøyelsen var før og etter inkubasjon i magesaft (0 til 60 minutter ut i fordøyelsen), før og etter inkubasjon i tarmsaft (60 til 120 minutter ut i fordøyelsen), samt mellom fordøyelsens start og slutt (0 til 120 minutter), og resultatene er oppsummert i Tabell 16. Signifikante forskjeller i bakteriestammenes gjennomsnittlige overlevelsessevne (overlevelse i samtlige medier) ved de tre tidspunktene er markert med ulike bokstaver ved resultatene for renkulturer.

Tabell 15: Overlevelsessevne, i form av endring i logtall (log kde/ml(g)), for de ulike bakteriestammene mellom tre utvalgte tidspunkt (i magesaft, i tarmsaft og gjennom hele fordøyelsen) i det kunstige fordøyelsessystemet i ulike medier (Ringers løsning, mager og helfet ost). Ulike bokstaver ved gjennomsnittsverdiene angir signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) i bakteriestammens gjennomsnittlige overlevelsessevne i samtlige medier ved hvert tidspunkt.

Bakteriestamme	Medie	Log endring		
		Magesaft (0 til 60 min)	Tarmsaft (60 til 120 min)	Hele fordøyelsen (0 til 120 min)
<b>448</b>	Renkultur	0,04	-1,02	-0,98
	Ost 10 %	-0,87	-0,44	-1,31
	Ost 28 %	-1,47	-0,97	-2,43
	<i>Gj.snitt</i>	-0,77 <sup>a</sup>	-0,81 <sup>abd</sup>	-1,57 <sup>a</sup>
<b>456</b>	Renkultur	-0,01	-0,70	-0,70
	Ost 10 %	-1,69	-0,98	-2,67
	Ost 28 %	-1,30	-0,35	-1,65
	<i>Gj.snitt</i>	-1,00 <sup>ab</sup>	-0,67 <sup>abd</sup>	-1,67 <sup>a</sup>
<b>15D</b>	Renkultur	-0,08	-0,99	-1,06
	Ost 10 %	-1,42	-0,27	-1,70
	Ost 28 %	-1,06	-0,10	-1,71
	<i>Gj.snitt</i>	-0,85 <sup>a</sup>	-0,45 <sup>abd</sup>	-1,49 <sup>a</sup>
<b>LGG</b>	Renkultur	-0,02	-3,14	-3,16
	Ost 10 %	-1,97	-0,44	-1,61
	Ost 28 %	-2,44	-0,90	-3,10
	<i>Gj.snitt</i>	-1,48 <sup>b</sup>	-1,49 <sup>bc</sup>	-2,62 <sup>b</sup>
<b>P203</b>	Renkultur	-0,17	-0,79	-0,98
	ost 10 %	-0,96	-0,38	-1,34
	Ost 28 %	-1,45	-1,06	-2,51
	<i>Gj.snitt</i>	-0,86 <sup>a</sup>	-0,74 <sup>abd</sup>	-1,61 <sup>a</sup>
<b>P303</b>	Renkultur	-1,37	-4,85	-6,03
	Ost 10 %	-0,92	-0,48	-1,40
	Ost 28 %	-1,22	-1,85	-3,06
	<i>Gj.snitt</i>	-1,17 <sup>ab</sup>	-2,39 <sup>c</sup>	-3,50 <sup>bd</sup>
<b>Ar-1</b>	Renkultur	-5,19	0,85	-4,34
	Ost 10 %	-6,28	0,88	-5,40
	Ost 28 %	-4,12	-0,96	-5,08
	<i>Gj.snitt</i>	-5,20 <sup>c</sup>	0,26 <sup>d</sup>	-4,94 <sup>c</sup>
<b>Bf-2</b>	Renkultur	-7,61	3,02	-4,60
	Ost 10 %	-1,28	-1,53	-2,82
	Ost 28 %	-3,34	-0,79	-4,13
	<i>Gj.snitt</i>	-4,08 <sup>d</sup>	0,23 <sup>d</sup>	-3,85 <sup>d</sup>

Det ble påvist signifikant forskjell mellom bakteriestammens gjennomsnittlige overlevelsessevne, i form av endring i antall log kde/ml(g), ved samtlige tre tidspunkt i den kunstige fordøyelsen ( $p < 0,05$ ).

I magesaft skilte *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene seg ut ved signifikant dårligere gjennomsnittlig overlevelsessevne sammenlignet med de resterende bakteriestammene ( $p < 0,05$ ). Bf-2-stammen hadde i tillegg signifikant dårligere gjennomsnittlig overlevelsessevne enn Ar-1 ( $p < 0,05$ ). Til tross for at *Lb. rhamnosus* GG hadde signifikant bedre overlevelsessevne enn *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene, var overlevelsesevnen signifikant dårligere enn for de tre bakteriestammene med best overlevelsessevne; *Lb. paracasei* 448, *Lb. plantarum* 15D og *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 ( $p < 0,05$ ).

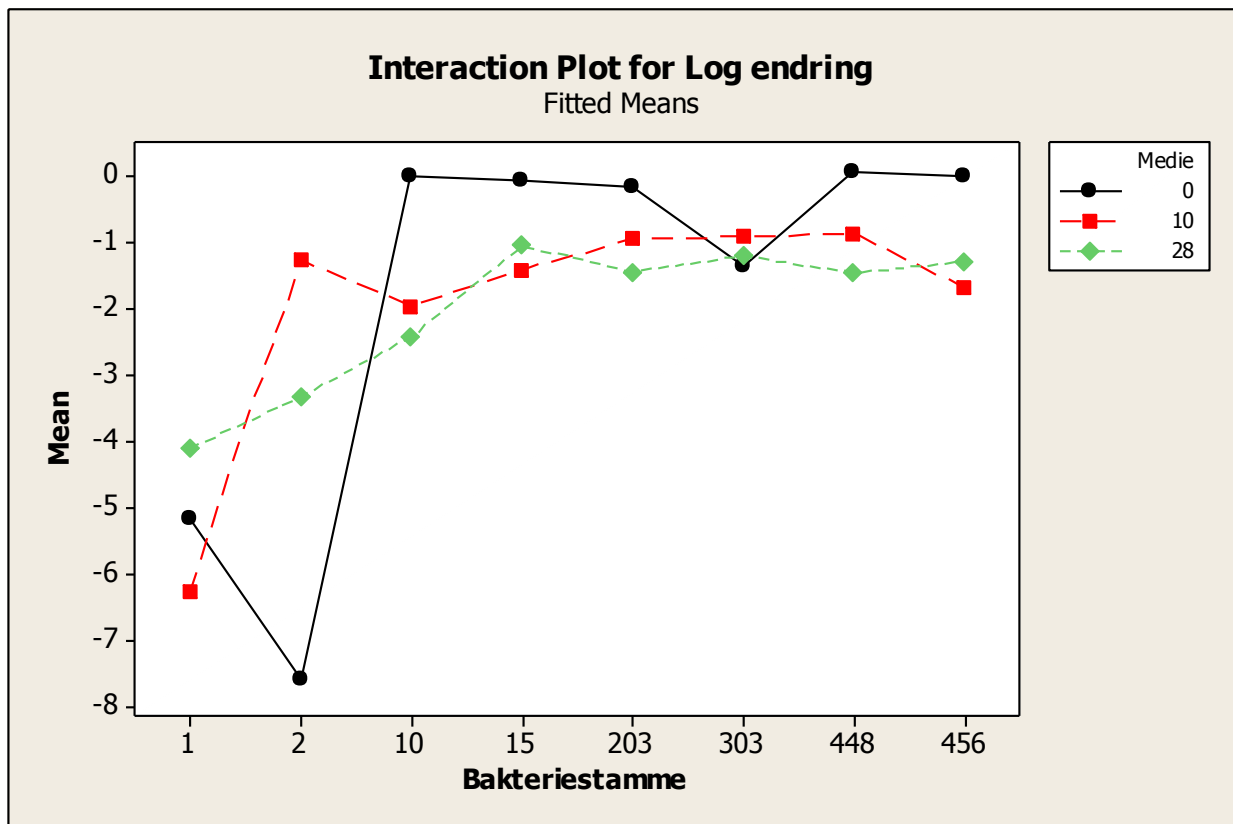
I tarmsaft ble det påvist signifikant dårligere gjennomsnittlig overlevelsessevne for *Lb. rhamnosus* GG og *P. jensenii* INF P303 sammenlignet med de resterende bakteriestammene. *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og Bf-2 var de eneste bakteriestammene med positiv endring i logtall (log kde/ml(g)) etter inkubasjon i tarmsaft. Deres overlevelsessevne var imidlertid ikke signifikant bedre enn for *Lb. paracasei* 448 og 456, *Lb. plantarum* 15D eller *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203. Inkorporering i mager ost medførte best gjennomsnittlig overlevelsessevne for bakteriestammene i tarmsaft, men den var ikke signifikant bedre enn i helfet ost og Ringers løsning ( $p > 0,05$ ).

Hele fordøyelsen sett under ett (del 3) viste signifikant forskjell mellom bakteriestammene med hensyn på gjennomsnittlig overlevelsessevne ( $p < 0,05$ ). Best overlevelse ble påvist for *Lb. paracasei* 448 og 456, *Lb. plantarum* 15D og *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, og denne var signifikant bedre enn for *Lb. rhamnosus* GG, *P. jensenii* INF P303, og *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og Bf-2 ( $p < 0,05$ ). Dårligst overlevelsessevne hadde *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, med signifikant dårligere gjennomsnittlig overlevelsessevne enn samtlige av de resterende bakteriestammene ( $p < 0,05$ ).

Det ble vist signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) mellom mediene med hensyn på endring i logtall (log kde/ml(g)) når hele fordøyelsen ble sett under ett (del 3). Inkorporering av bakteriestammene i mager ost medførte best gjennomsnittlig overlevelsessevne for bakteriene gjennom hele den kunstige fordøyelsen. Mager ost medførte signifikant bedre overlevelsessevne enn inkorporering i helfet ost ( $p < 0,05$ ), men mellom mager ost og renkultur var forskjellen ikke signifikant.

Det var signifikant ( $p < 0,05$ ) interaksjonseffekt mellom type bakteriestamme og medie på endring i logtall (log kde/ml(g)) ved samtlige av de tre utvalgte målepunktene i den kunstige

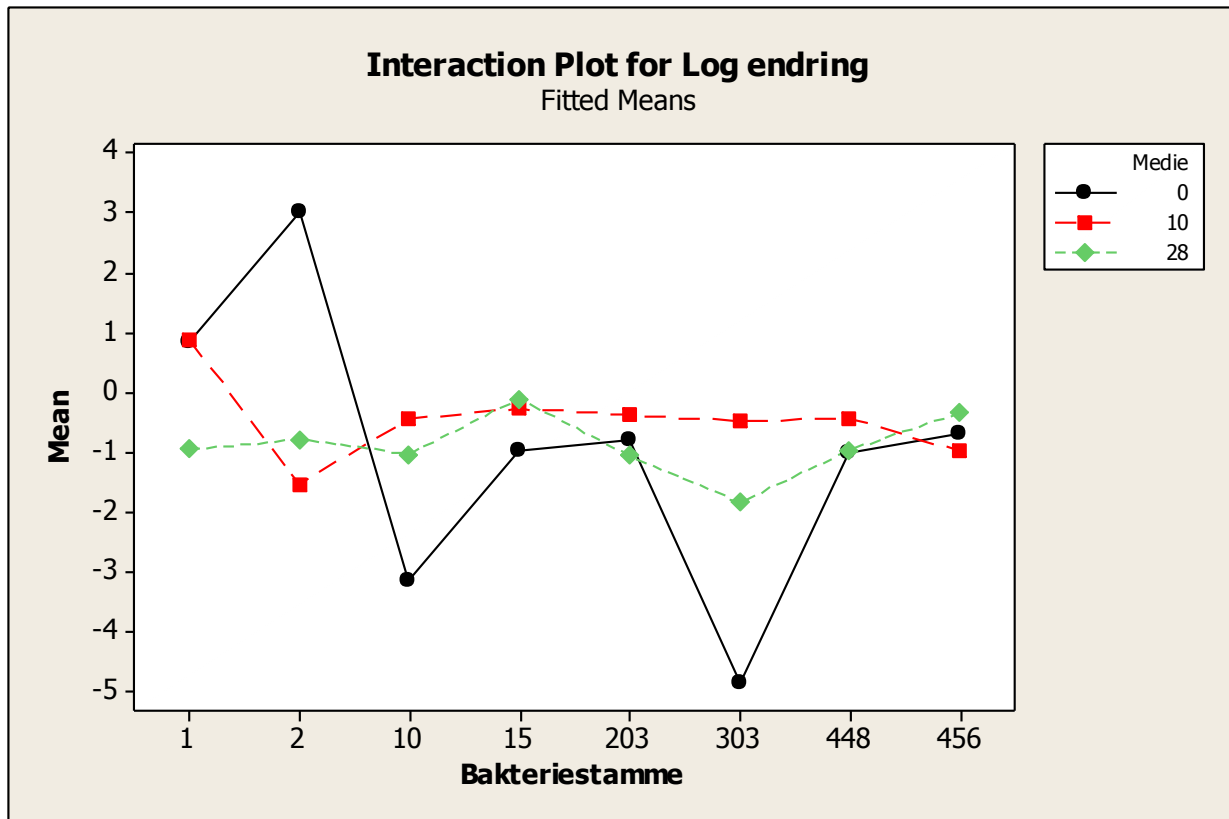
fordøyelsen. Dette viste at bakteriestammene hadde forskjellig overlevelsessevne i de tre ulike mediene under de ulike delene av fordøyelsen, jfr. Figur 15-17.



Figur 15: Interaksjonsplot for effekt av type bakteriestamme og medie på bakterienes overlevelsessevne (endring i log kde/ml(g)) i magesaft (0 til 60 minutter av fordøyelsen). Medier: 0 = vaskede celler i Ringers løsning, 10 = mager ost, 28 = helfet ost. Bakteriestammer: 1 = *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, 2 = *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2, 10 = *Lb. rhamnosus* GG, 15 = *Lb. plantarum* 15D, 203 = *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, 303 = *P. jensenii* INF P303, 448 = *Lb. paracasei* 448, 456 = *Lb. paracasei* 456.

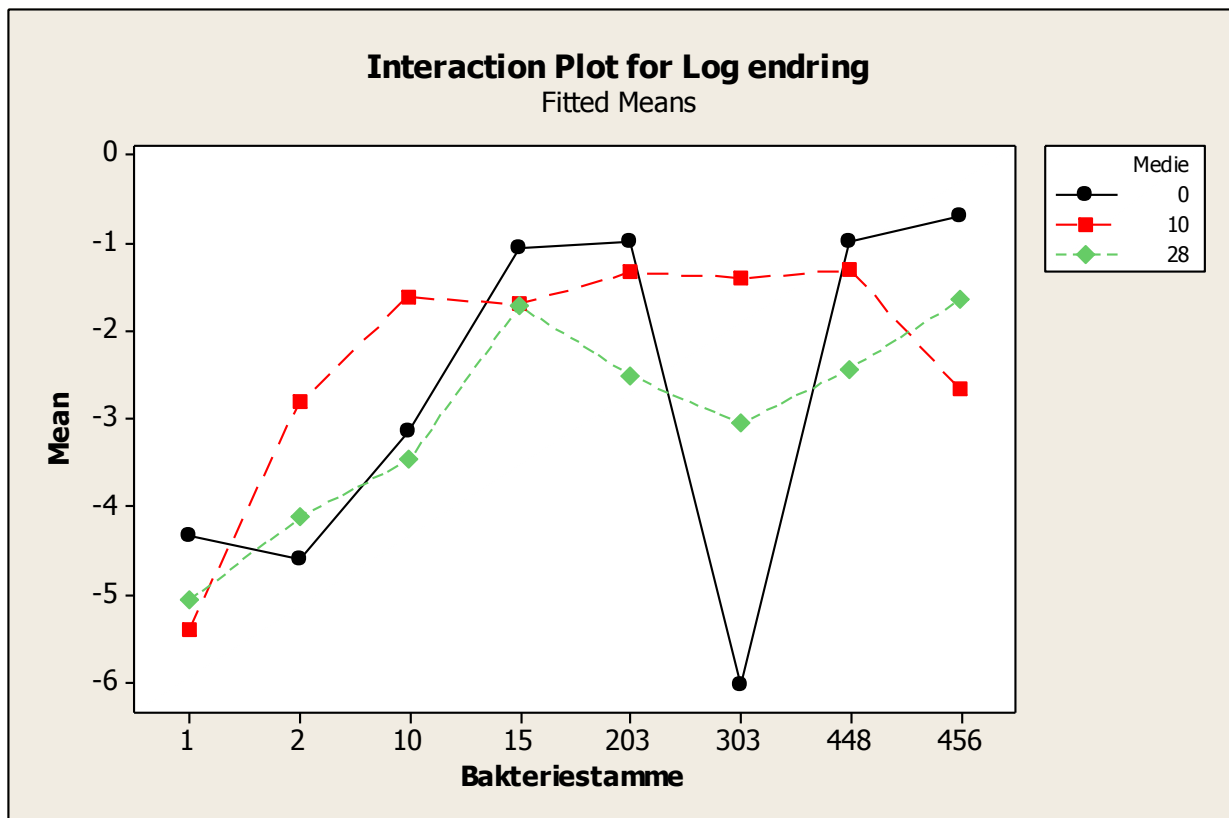
Signifikant interaksjonseffekt mellom type bakteriestamme og medie i magesaft skyldtes hovedsakelig at *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene i motsetning til de fleste bakteriestammene ikke overlevde best som vaskede celler i Ringers løsning. Ar-1-stammen overlevde best i helfet ost, mens Bf-2-stammen overlevde best i mager. For *P. jensenii* INF P303 var overlevelsessevnen omtrent lik i samtlige medier ved dette tidspunktet.





Figur 16: Interaksjonsplot for effekt av type bakteriestamme og medie på bakterienes overlevelsessevne (endring i log kde/ml(g)) i tarmsaft (60 til 120 minutter av fordøyelsen). Medier: 0 = vaskede celler i Ringers løsning, 10 = mager ost, 28 = helfet ost. Bakteriestammer: 1 = *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, 2 = *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2, 10 = *Lb. rhamnosus* GG, 15 = *Lb. plantarum* 15D, 203 = *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, 303 = *P. jensenii* INF P303, 448 = *Lb. paracasei* 448, 456 = *Lb. paracasei* 456.

Signifikant interaksjonseffekt mellom type bakteriestamme og medie i tarmsaft skyldes hovedsakelig at *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2-stammen hadde best overlevelse som vaskede celler i Ringers løsning. Dette som følge av at bakteriene som ikke var dyrkbare etter inkubasjon i magesaft viste evne til å vokse på agar etter inkubasjon i tarmsaft.



Figur 17: Interaksjonsplot for effekt av type bakteriestamme og medie på bakterienes overlevelsesevne (endring i log kde/ml(g)) gjennom hele den kunstige fordøyelsen (0 til 120 minutter). Medier: 0 = vaskede celler i Ringers løsning, 10 = mager ost, 28 = helfet ost. Bakteriestammer: 1 = *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, 2 = *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2, 10 = *Lb. rhamnosus* GG, 15 = *Lb. plantarum* 15D, 203 = *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203, 303 = *P. jensenii* INF P303, 448 = *Lb. paracasei* 448, 456 = *Lb. paracasei* 456.

Signifikant interaksjonseffekt mellom type bakteriestamme og medie gjennom hele fordøyelsen skyldes hovedsakelig at kun halvparten av bakteriestammene overlevde best i renkultur. I tillegg medførte inkorporering i mager ost bedre overlevelse sammenlignet med inkorporering i helfet ost for fem av åtte bakteriestammer. Størst forskjell i overlevelsesevne i de ulike mediene hadde *P. jensenii* INF P303, og forskjellen var størst mellom mager ost (best overlevelse) og i Ringers løsning (dårligst overlevelse).

### 4.3.2. De enkelte bakteriestammenes overlevelse gjennom kunstig fordøyelse

Det var ønskelig å sammenligne overlevelsessevnen til bakteriestammene i de ulike mediene gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Effekten av de ulike trinnene i fordøyelsen (inkubasjon i mage- og tarmsaft), vist ved utvikling i bakteriestammenes log kde/ml(g), er oppsummert i Figur 18-25 nedenfor. Overlevelsen til de enkelte bakteriestammene som vaskede celler løst i Ringers løsning, samt i mager og helfet ost er samlet i hver sin figur.

#### 4.3.2.1. Generelle kommentarer

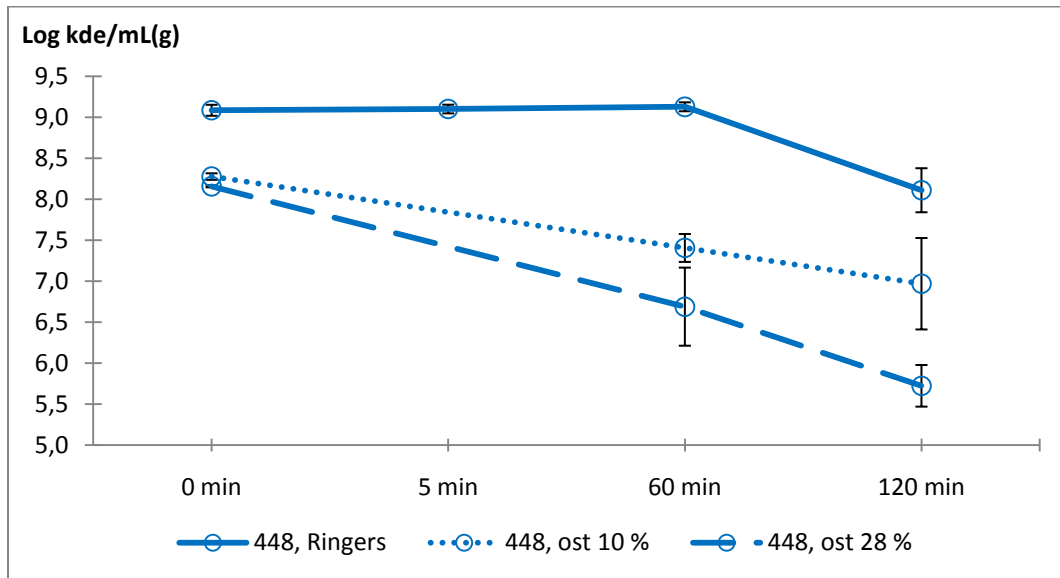
Til tross for at ost alltid vil inneholde en viss mengde ulike typer laktobasiller i form av NSLAB, ble det her antatt at innholdet av laktobasiller som ble påvist i ostene hovedsakelig var av tilleggskulturen som ble tilsatt. Da melka ble mikrofiltrert før ysting, samt at laktobasillene som ble tilsatt som tilleggskulturer hadde et bakterietall på over log 5-6 ved løpetilsetning, går en ut i fra at tilleggskulturene var de dominerende laktobasiller under modning av ostene.

Generelt var det en høyere startkonsentrasjon av bakteriestammene fra renkultur sammenlignet med inkorporert i ost. For vaskede celler fra renkultur løst i Ringers løsning medførte andre del av den kunstige fordøyelsen en større reduksjon i logtall (log kde/ml(g)) sammenlignet med første del. Dette var tilfellet for de fleste bakteriestammene, med unntak av *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene hvor situasjonen var motsatt.

De fleste laktobasillene, med unntak av *Lb. rhamnosus* GG, overlevde svært godt, og bedre enn de resterende bakteriestammene gjennom den kunstige fordøyelsen. Det var forskjell på hvilket medium som medførte best overlevelsessevne for de enkelte bakteriestammene gjennom den kunstige fordøyelsen.

Det var en gjennomgående trend at standardavvikene ved målepunktene ble større utover i fordøyelsen.

#### 4.3.2.2. Overlevelse av *Lb. paracasei* 448 i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem

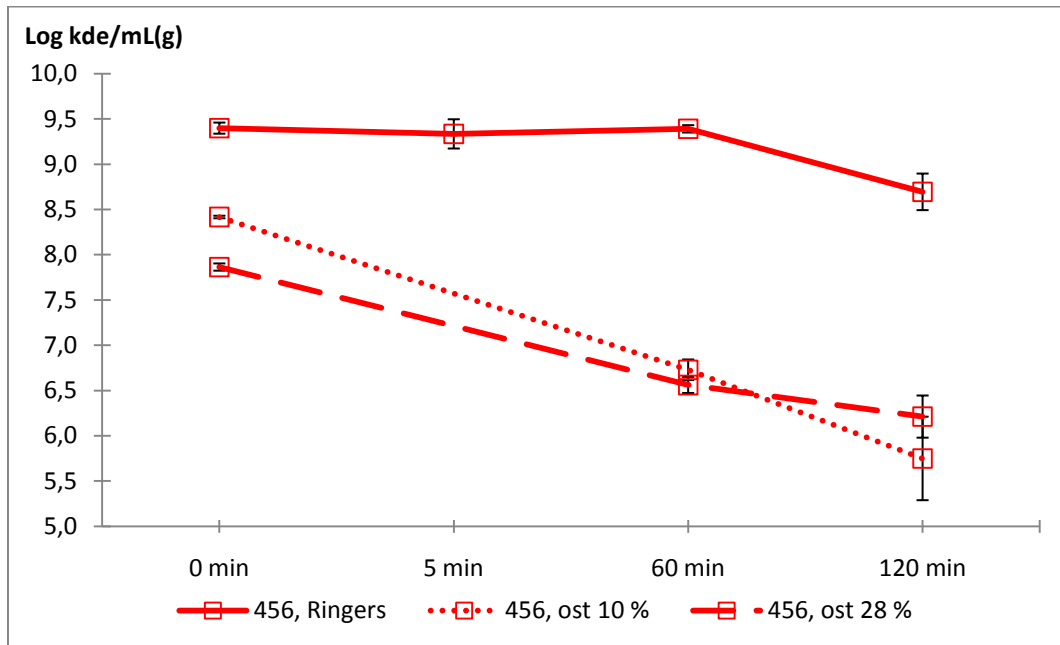


Figur 18: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), av *Lb. paracasei* 448- stammen i Ringers løsning, mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost gjennom kunstig fordøyelsessystem.

Vaskede celler fra renkultur av *Lb. paracasei* 448 løst i Ringers løsning viste god overlevelsessevne gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Etter en times inkubasjon ved 37 °C, pH 3 og tilsatt magesaft ble det observert så vidt høyere antall kde/ml enn ved fordøyelsens start. Den siste timen ved pH 7 og tilsetning av tarmsaft ble imidlertid bakterietallet noe redusert (~ log 1 kde/ml fordøyelseløsning).

Inkorporering i mager og helfet ost hadde ingen tydelig beskyttende effekt på overlevelsessevnen til *Lb. paracasei* 448. Bakterietallet gikk jevnt nedover underveis i fordøyelsen. Bakterienes overlevelsessevne var dårligere i ost enn i Ringers, og nedgangen i bakterietall under fordøyelsen var noe større for bakterier tilsatt i den helfete osten (~ log 2,4 kde/ml fordøyelseløsning) sammenlignet med i den magre osten (~ log 1,3 kde/ml fordøyelseløsning).

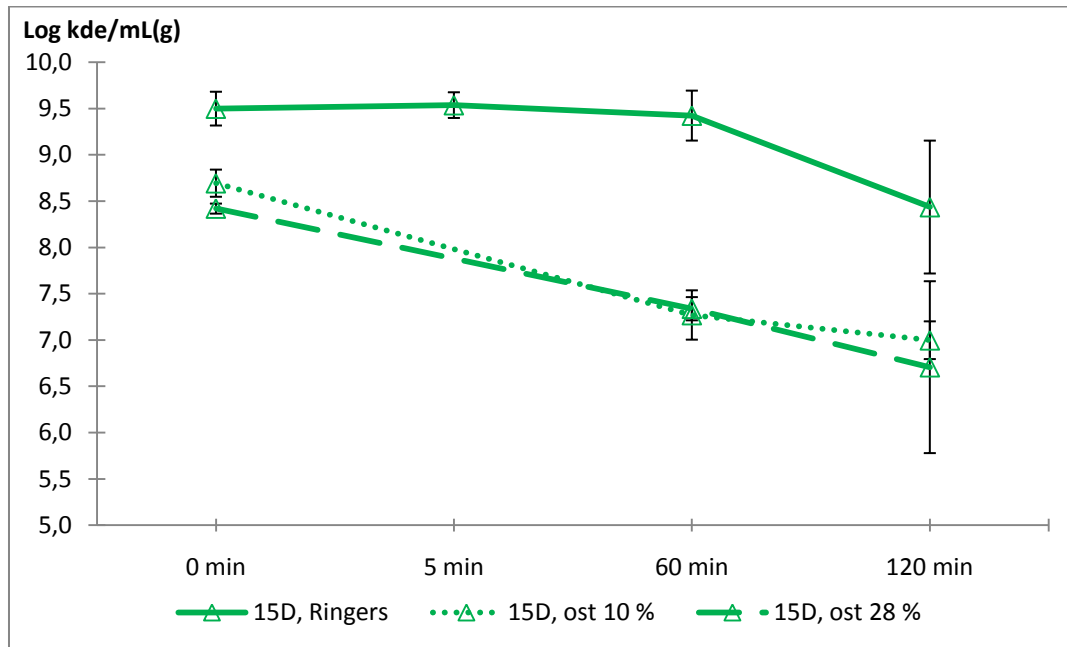
#### 4.3.2.3. Overlevelse av *Lb. paracasei* 456 i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem



Figur 19: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), av *Lb. paracasei* 456- stammen i Ringers løsning, mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost gjennom kunstig fordøyelsessystem.

Vaskede celler fra renkultur av *Lb. paracasei* 456 løst i Ringers løsning viste god overlevelsessevne, og innholdet av bakterier endret seg omtrent ikke den første timen i det kunstige fordøyelsessystemet. Etter endt fordøyelse var bakterietallet blitt redusert med i underkant av log 1 kde/mln fordøyelseløsning. Inkorporert i ost var overlevelsessevnen til laktobasillene dårligere sammenlignet med i Ringers løsning. Det ble observert en jevn nedgang av kde laktobasiller under hele fordøyelsen. Etter endt fordøyelse var bakterietallet blitt redusert med omtrent log 2,5 og log 1,5 kde/ml fordøyelseløsning av henholdsvis mager og helfet ost.

#### 4.3.2.4. Overlevelse av *Lb. plantarum* 15D i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem

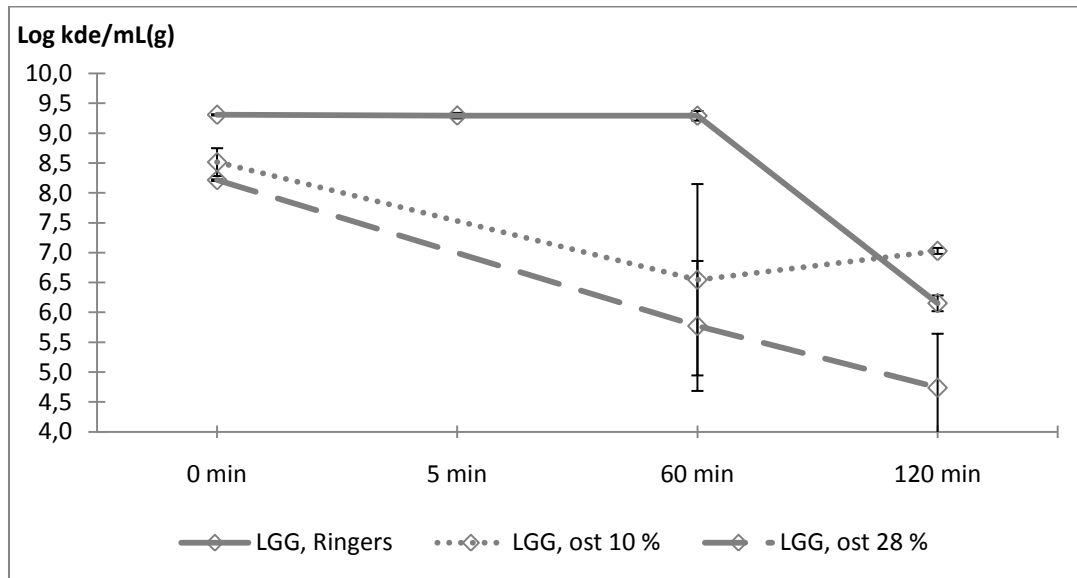


Figur 20: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), av *Lb. plantarum* 15D- stammen i Ringers løsning, mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost gjennom kunstig fordøyelsessystem.

Vaskede celler fra renkultur av *Lb. plantarum* 15D løst i Ringers løsning viste god overlevelsessevne gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Tydelig endring i bakterietall ble kun observert den siste timen av fordøyelsen. Gjennom det kunstige fordøyelsessystemet ble det observert en total nedgang i bakterietall på omtrent log 1 kde/ml fordøyelsesløsning .

Inkorporert i ost overlevde laktobasillene dårligere enn som vaskede celler fra renkultur gjennom fordøyelsessystemet. Det ble observert en jevn reduksjon i bakterietall underveis i fordøyelsen, og nedgangen var omtrent lik for bakterier i mager og helfet ost. Gjennom det kunstige fordøyelsessystemet ble det funnet en total nedgang i antall dyrkbare laktobasiller på omtrent log 1,7 kde/ml fordøyelsesløsning.

#### 4.3.2.5. Overlevelse av *Lb. rhamnosus* GG i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem



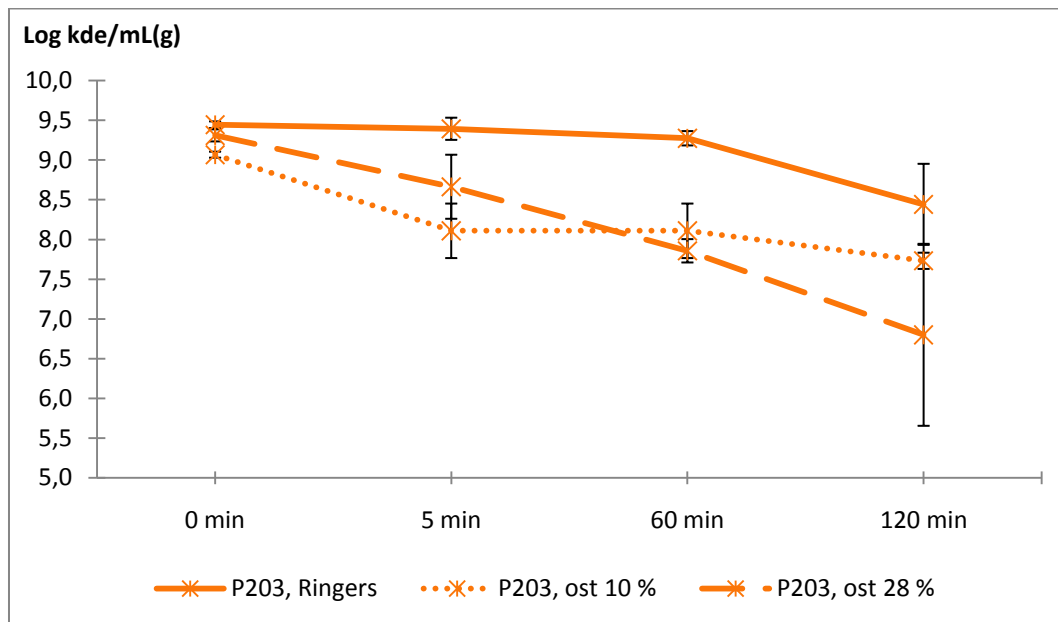
Figur 21: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), av *Lb. rhamnosus* GG- stammen i Ringers løsning, mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost gjennom kunstig fordøyelsessystem.

Vaskede celler fra renkultur av *Lb. rhamnosus* GG løst i Ringers løsning viste en relativt god overlevelsessevne gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Den første timen var bakterietallet stabilt, før det skjedde en tydelig reduksjon i antall bakterier i siste del av fordøyelsen. Dette var den av de fire utvalgte laktobasillstammene som viste dårligst overlevelsessevne gjennom den kunstige fordøyelsen, med en total reduksjon i bakterietall på i overkant av log 3 kde/ml fordøyelseløsning.

Gjennom den første delen av fordøyelsen så det ikke ut til at inkorporering i ost hadde fordelaktig effekt på overlevelsessevnen til laktobasiller gjennom systemet. Det ble observert en tydelig reduksjon i bakterietall i prøver av både mager (~log 2 kde/ml) og helfet ost (~log 2,5 kde/ml), men reduksjonen var størst i fet ost.

Etter endt fordøyelse ble det imidlertid observert høyere innhold av dyrkbare laktobasiller i prøver av mager ost sammenlignet med prøver av helfet ost, renkultur og mager ost etter halvveis gjennomgått fordøyelse. Inkorporering i mager ost medførte mindre reduksjon i bakterietall (~log 1,5 kde/ml) for laktobasillene, sammenlignet med inkorporering i helfet ost (~log 3,5 kde/ml) og for vaskede celler alene (~log 3 kde/ml).

#### 4.3.2.6. Overlevelse av *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem



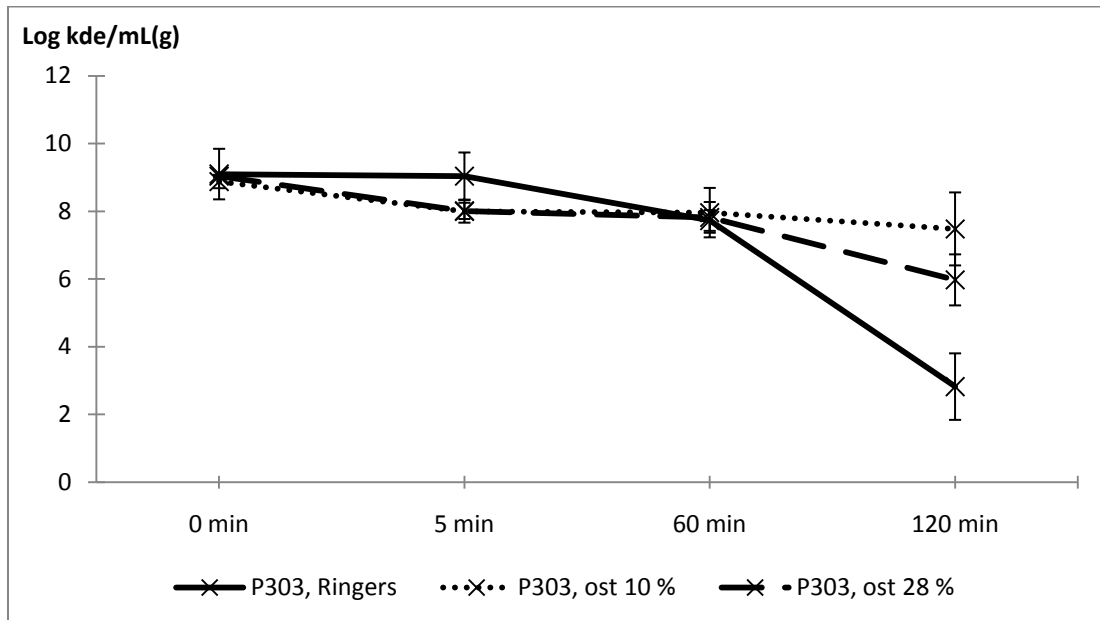
Figur 22: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), gjennom kunstig fordøyelsessystem av *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203- stammen i Ringers løsning mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost.

Vaskede celler fra renkultur av *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 løst i Ringers løsning viste en relativt god overlevelsessevne gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Det ble observert en jevn, liten reduksjon i bakterietall gjennom den første timen av fordøyelsen. Den siste timen var reduksjonen noe større, og total nedgang i bakterietall var i underkant av log 1 kde/ml fordøyelseløsning.

Det ble observert liten forskjell i bakterietall i ostene ved start sammenlignet med antall vaskede celler fra renkultur av *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 løst i Ringers løsning ved start. Inkorporering i ost medførte ikke bedre overlevelsessevne for bakteriene gjennom fordøyelsen sammenlignet med for vaskede celler alene. Reduksjonen i bakterietall var betydelig mindre i mager (~log 1,3 kde/ml) sammenlignet med i helfet ost (~log 2,5 kde/ml).



#### 4.3.2.7. Overlevelse av *P. jensenii* INF P303 i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem

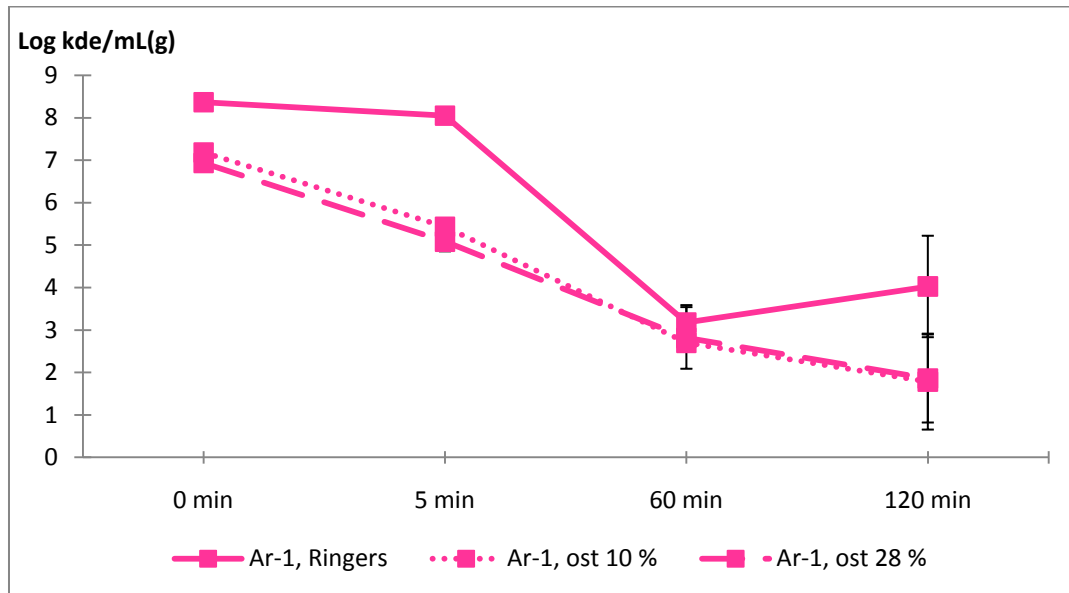


Figur 23: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), av *P. jensenii* INF P303- stammen i Ringers løsning, mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost gjennom kunstig fordøyelsessystem.

Vaskede celler fra renkultur av *P. jensenii* INF P303 løst i Ringers løsning viste dårligst overlevelsessevne gjennom det kunstige fordøyelsessystemet av samtlige av de undersøkte bakteriestammene. Spesielt var reduksjonen i bakterietall stor den siste timen var fordøyelsen, og total nedgang var på nesten log 6 kde/ml fordøyelseløsning.

Bakterietallet var omtrent likt i mager og helfet ost som antall vaskede celler fra renkultur av *P. jensenii* INF P303 løst i Ringers løsning ved start. For denne bakteriestammen medførte inkorporering i ost økt overlevelsessevne gjennom fordøyelsessystemet sammenlignet med for vaskede celler alene. Overlevelsessevnen var størst for bakterier tilsatt i mager ost, hvor total nedgang i bakterietall gjennom systemet var på omtrent log 1,4 kde/ml fordøyelseløsning. I helfet ost ble det observert en reduksjon i bakterietall på omtrent log 3 kde/ml fordøyelseløsning.

#### 4.3.2.8. Overlevelse av *L. lactis subsp. cremoris* Ar-1 i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem

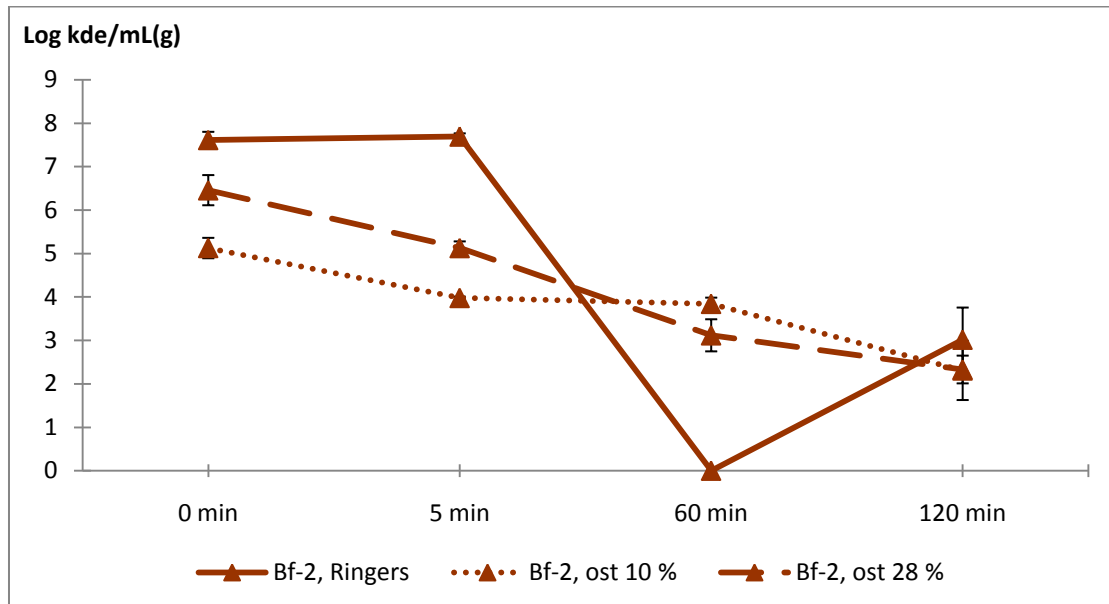


Figur 24: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), av *L. lactis subsp. cremoris* Ar-1- stammen i Ringers løsning, mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost gjennom kunstig fordøyelsessystem.

Vaskede celler fra renkultur av *L. lactis subsp. cremoris* Ar-1 løst i Ringers løsning viste relativt dårlig overlevelsessevne gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Det ble observert en kraftig reduksjon i antall dyrkbare celler etter en time av fordøyelsen (~log 5,2 kde/ml), og ved dette punktet var bakterietallet lavere enn etter endt fordøyelse (~log 4,3 kde/ml).

Dette ble ikke observert for laktokokker inkorporert i ost, hvor det foregikk en tydelig og jevn nedgang i bakterietall underveis i fordøyelsen. Inkorporering i ost medførte ikke økt overlevelsessevne gjennom fordøyelsessystemet, og reduksjonen i bakterietall i prøvene av mager og helfet ost var omtrent lik (i overkant av log 5 kde/ml).

#### 4.3.2.9. Overlevelse av *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 i ulike medier gjennom et kunstig fordøyelsessystem



Figur 25: Overlevelse, i form av endring i bakterietall (log kde/ml(g)), av *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2- stammen i Ringers løsning, mager (10 % fett) og helfet (28 % fett) ost gjennom kunstig fordøyelsessystem.

Vaskede celler fra renkultur av *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 løst i Ringers løsning viste, i likhet med celler av *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1, relativt dårlig overlevelsessevne gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Etter en times fordøyelse var ikke bakteriecellene dyrkbare på M17-agar. Etter endt fordøyelse ble det imidlertid observert omtrent log 3 kde/ml fordøyelseløsning. Total nedgang i bakterietall gjennom det kunstige fordøyelsessystemet var dermed i overkant av log 4,5 kde/ml fordøyelseløsning.

Inkorporering i ost medførte en jevnere nedgang i bakterietall under fordøyelsen, og dermed et høyere bakterietall etter en time sammenlignet med for vaskede celler alene. Etter endt fordøyelse var bakterietallet i prøver av ost så vidt lavere enn i Ringers løsning, men total nedgang i bakterietall gjennom fordøyelsen var likevel lavere. Inkorporering i mager ost medførte mindre reduksjon i bakterietall (~log 2,8 kde/ml), og i helfet ost omtrent lik reduksjon (~log 4,1 kde/ml), gjennom fordøyelsessystemet i forhold til for vaskede celler alene (~log 4,6 kde/ml).

## 5. Diskusjon

### 5.1. Ysting

#### 5.1.1. Mikrobiologiske analyser

##### ***5.1.1.1. Totalt antall aerobe, mesofile bakterier i ystemelk***

Ystemelka hadde en generelt god mikrobiell standard, med et gjennomsnittlig totalt antall aerobe, mesofile bakterier på godt under log 3 kde/ml. En uventet og uforklarlig observasjon var et betydelig høyere innhold av bakterier i ystemelk i et av ystekarene siste ystingsdag sammenlignet med i samtlige andre kar. I tillegg ble det funnet lavest totaltall i et av de andre ystekarene fra samme dag, som da skulle inneholde den samme ystemelka.

Disse observasjonene vitnet om at antall bakterier, og sammensetningen av mikrofloraen, er varierende i ystemelk. Dette kan skyldes en rekke faktorer, men råmelkskvaliteten, varmebehandling av melka og desinfisering av utstyr er spesielt avgjørende for bakterietallet i ystemelka. Plattetelling er i tillegg en metode som vanligvis ikke gir helt nøyaktige resultater, spesielt ved bruk av lite selektive medier som her.

##### ***5.1.1.2. Innhold av koliforme bakterier under ysting og modning av ostene***

For å oppnå god kvalitet på ystemelka ble denne pasteurisert og mikrofiltrert før ysting. Pasteurisering reduserer det totale bakterietallet i råmelka med omtrent 99,9 %, og minimerer risiko for overlevelse av patogene og kvalitetsødeleggende mikroorganismer som f.eks. *Clostridium tyrobutyricum*, samt koliforme og psykrotrofe bakterier. Mikrofiltrering benyttes for å fjerne forurensninger, og spesielt sporer fra melka slik at en unngår oppvekst av sporedannere som for eksempel *Clostridium*, og dermed såkalt ”late gas blowing”, forårsaket av anaerob metabolisme av laktat til butyrat og H<sub>2</sub> (Beresford & Williams 2004; Fox & McSweeney 2004; Walstra et al. 2006).

Pasteurisering dreper normalt sett koliforme bakterier (Walstra et al. 2006), og det var dermed verken forventet eller ønskelig å påvise slike bakterier ved rutinemessig hygienekontroll. Det ble imidlertid påvist koliforme bakterier underveis i ystingen ved samtlige ystingsdager, og første ystingsdag så tidlig som i ystemelka før tilsetning av syrekultur. Denne dagen var innholdet av koliforme i ostene også særdeles høyt.

Innholdet av koliforme bakterier kom sannsynligvis av en reinfeksjon av ystemelka eller ostemassen under ystingen. Det har blitt observert små hull i ystekar fire, og disse har blitt utpekt som den sannsynlige kilden til reinfeksjonen. Denne hypotesen styrkes av at det var i dette ystekaret de koliforme bakteriene først ble observert samtlige ystingsdager. Derfra har bakteriene sannsynligvis blitt spredd videre til de andre ystekarene via utstyr som ble brukt til skjæring og myseavtapp. Ved gode vekstforhold, dvs. med god tilgang på laktose (trege syrekulturer), samt gunstig temperatur og pH, kan koliforme bakterier med sin korte generasjonstid vokse til betydelige mengder under ystingen (Walstra et al. 2006). Årsaken til at det ble påvist koliforme bakterier så tidlig første ystingsdag er sannsynligvis at det ble benyttet noe mildere desinfeksjonsrutiner, samt at det tok betydelig lenger tid å få riktig syringstemperatur på ystemelka denne dagen. Det ble i tillegg observert spesielt høyt innhold av koliforme bakterier i 24 timers ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2. Årsaken til dette er ukjent.

I moden ost til konsum skal det ikke forekomme koliforme bakterier. Dette fordi noen av disse bakteriene kan medføre matforgiftning og dannelse av gjæraktig og uren (råtten, gassaktig) lukt og smak. Vekst av koliforme kan også medføre oppblåst ost (early blowing) som følge av produksjon av H<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> ved fermentering av laktose, og eventuelt citrat (Walstra et al. 2006).

Det var forventet at antall koliforme bakterier skulle gå kraftig ned under modningen som følge av ugunstige vekstforhold i osten, i form av liten tilgang på laktose, lav pH-verdi, relativt høyt saltinnhold og kjølelagring. Samtlige ferdig modnede oster var frie for koliforme bakterier, med unntak av tre oster fra første ystingsdag

Ved ystingsdag to til fire gjennomgikk ystekar og utstyr strengere desinfeksjonsregimer for å forsøke å minimere sjansen for reinfeksjon. Tiltakene var delvis vellykkede, da det til tross for at påvisning av koliforme bakterier underveis i prosessen, ikke fantes koliforme bakterier i ferdig modnet ost.

For å unngå oppvekst av koliforme bakterier i ostemassen kan det tas i bruk raske syrekulturer, slik at laktosen brukes opp og pH reduseres til under gunstig nivå for vekst av koliforme bakterier. Tidlig salting samt kjølelagring virker også hemmende på vekst av koliforme bakterier (Walstra et al. 2006). Slike tiltak må imidlertid tilpasses den enkelte ostetype, slik at ostenes sensoriske kvalitet (blant annet tekstur og utvikling av aroma) ikke blir skadelidende.

Det forekom noen uventede og uforklarlige observasjoner, som f.eks. påvisning av koliforme bakterier under ysting, og i ost etter fire ukers modning, men ikke i 24 timers ost for mager ost tilsatt *Lb. rhamnosus* GG og *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1. Dette viste at mikrobiell analyse av ost ikke er noen eksakt metode, og at metoden for deteksjon av koliforme bakterier ikke er helt nøyaktig.

### **5.1.1.3. Innhold av laktobasiller under ysting og modning av ostene**

Ost fra ystingsdag en og to ble tilsatt renkulturer av laktobasiller som tilleggskulturer i tillegg til syrekulturen, mens de resterende ostene ikke ble tilsatt laktobasiller. Dette gjenspeilet seg i mengden laktobasiller som ble påvist under ysting og modning. Ferske oster (24 timer) tilsatt laktobasiller hadde et innhold på omtrent  $10^7$ - $10^9$  kde/g, mens det ikke ble påvist laktobasiller i fersk ost tilsatt stammer av *L. lactis* subsp. *cremoris* som syrekulturer. I fersk ost tilsatt propionsyrebakterier som tilleggskultur ble det imidlertid påvist omtrent like store mengder laktobasiller som i ost fra ystingsdag en og to. Dette var noe uventet, da en kunne anta at nivået av NSLAB var omtrent likt ved ystingsdag tre og fire, samt at tilsetning av propionsyrebakterier i slike store mengder ville medføre økt konkurranse for laktobasillene. Årsaken til observasjonen er mest sannsynlig at propionsyrebakteriene til en viss grad var i stand til å vokse på LBS-agaren, og bidro til at innholdet av laktobasiller i ostene så høyere ut enn det i virkeligheten var.

Det påviste innholdet av laktobasiller i ost fra tredje og fjerde ystingsdag kan antas å hovedsakelig skyldes tilfeldige kontaminanter. Da ystemelka var både pasteurisert og mikrofiltrert kan en mulig kilde til laktobasiller være den kommersielle syrekulturen som ble tilsatt. Syrekulturen var udefinert, og det er blitt rapportert om at blant annet CHN19-kulturen fra Christian Hansen inneholder *Lb. danicus* (Kask et al. 2003). Dette harmonerer også med at det ble observert høyere innhold av laktobasiller i ost tilsatt kommersiell syrekultur og propionsyrebakterier som tilleggskultur, sammenlignet med oster kun tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* som syrekulturer.

En annen trolig kilde er utstyret som ble brukt under ystingen, og luften i ysteriet. Det er blitt påvist at luftbårne laktobasiller kan gjenfinnes i ost, og laktobasiller er blitt påvist på golv, i sluker og på utstyr i meierianlegg, hvor de blant annet er i stand til å lage og overleve i biofilm (Beresford & Williams 2004). Dette kan være forklaringen på innholdet av laktobasiller som ble påvist i ostene tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*.

Da NSLAB, spesielt laktobasiller og enterokokker, ikke hemmes i noen særlig grad av forholdene i osten kan de ofte vokse og formere seg under modning. Det er påvist at laktobasiller er i stand til å overleve i over 3 år i ost, ved en lagringstemperatur på 10 °C (Beresford & Williams 2004), og ved IKBM har det blitt funnet laktobasiller i ost som har blitt lagret i 6 år ved 4 °C (Skeie 2010). Det eneste som virker hemmende på deres vekst er rask avkjøling og lave lagringstemperaturer. Da laktobasiller i tillegg er i stand til å benytte andre energikilder enn laktose, var det forventet at innholdet av laktobasiller i ostene ikke skulle reduseres i noen særlig grad under modningen. I ostene ble det observert en nedgang på mindre enn en logenhet i løpet av sju ukers modning i oster tilsatt laktobasiller som tilleggskulturer. I ost tilsatt propionsyrebakterier var nedgangen noe større, mens i ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammer som syrekulturer var innholdet av laktobasiller høyere etter sju uker enn i fersk ost. Den observerte nedgangen kan skyldes konkurranse mellom ulike NSLAB og stammer av laktobasiller etter næring, samt at metabolske produkter og antimikrobielle forbindelser produsert av enkelte stammer kan virke forstyrrende på veksten av andre bakterier (Beresford & Williams 2004).

Ut i fra tidligere studier ble det antatt at innholdet av tilsatte og NSLAB laktobasiller generelt skulle være lavere i magre oster enn i helfete (Banks 2004). I denne oppgaven var den generelle trenden motsatt. Innholdet av laktobasiller var større i omtrent alle magre oster sammenlignet med helfete, både for de som var tilsatt laktobasiller og de som ikke var det.

#### **5.1.1.4. Innhold av laktokokker under ysting og modning av ostene**

Ystemelk i samtlige ystekar ble tilsatt laktokokker i form av syrekulturer. De tre første ystingsdagene ble det tilsatt kommersielle DL-kulturer, inneholdende både syre- og aromadannende laktokokkstammer. Siste ystingsdag ble det tilsatt en enkelt stamme i form av *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 eller Bf-2 i hvert ystekar.

Syrekulturer tilsettes i så store mengder til ystemelka at laktokokker vanligvis utgjør størsteparten av den mikrobielle floraen i ystemelk og fersk ostemasse. For å oppnå tilstrekkelig syreproduksjon og medførende pH-reduksjon i ystekarene er man avhengig av god og rask vekst av laktokokkene. Dette ble også observert i samtlige ystekar, selv om syreproduksjonen var noe langsommere enn ønsket, jfr. avsnitt for pH-utvikling under ysting og modning.

Det er vanlig at 24 timers ost inneholder mer enn  $10^8$  kde av syrekulturen per gram ost (Beresford & Williams 2004). Dette ble også observert her i samtlige oster. Da det ble benyttet feil fortynningsgrad ble nøyaktig antall dyrkbare laktokokker ved 30 °C ikke funnet for ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene, men antallet var høyere enn  $10^7$  kde/g ost. Tallene for dyrkbare laktokokker ved 22 °C indikerte at tallet sannsynligvis lå mellom  $10^8$ - $10^9$  kde/g.

De fleste laktokokker får dårligere overlevelsessevne under modning av ostene. Det er blitt observert utstrakt autolyse som følge av blant annet infeksjoner av bakteriofager, saltkonsentrasjon i osten og bakteriosiner (Beresford & Williams 2004). Det var dermed forventet at laktokokkinnholdet skulle synke i samtlige oster under modningsperioden. Dette ble også observert, og nedgangen var generelt størst i oster tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*, og minst i oster tilsatt laktobasiller som tilleggskulturer.

Årsaken til dette kan være at den kommersielle syrekulturen var noe mer konkurransedyktig, og hadde bedre overlevelsessevne under modning sammenlignet med de to *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene. Det er nødvendig at kommersielle syrekulturer har begrenset/kontrollert vekst og autolysegrad for å unngå for utstrakt proteolytisk aktivitet og dannelse av bitter smak i osten (Beresford & Williams 2004). Det ble også observert at ferdig modnede oster tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris* hadde spesielt skarp bitter smak.

#### **5.1.1.5. Innhold av propionsyrebakterier under ysting og modning av ostene**

Propionsyrebakterier tilsettes vanligvis som tilleggskulturer ved ysting av sveitsiske ostetyper. De tolererer godt relativt høye ettervarmingstemperaturer, og kan finnes i en mengde på omtrent  $10^8$ - $10^9$  i osten etter et par uker. Det er ikke noe som tyder på at propionsyrebakterier gjennomgår autolyse i noen særlig grad under modning (Beresford & Williams 2004). I dette forsøket ble propionsyrebakterier tilsatt ost ystet med Gouda-type teknologi. Da pH i ostene var over 5, og saltkonsentrasjonen skulle være under 5 % i vannfasen, var det forventet en relativt god overlevelse av propionsyrebakteriene (Walstra et al. 2006). Dette ble også påvist, da det ble observert en økning i antall propionsyrebakterier under hele modningsforløpet.



## 5.1.2. Kjemiske analyser

### 5.1.2.1. pH-utvikling under ysting og modning

Melk har vanligvis en pH-verdi på omkring 6,7 ved romtemperatur, men påvirkes av en rekke faktorer inkludert tilsetninger, konsentrasjon og oppvarming av melka (Walstra et al. 2006). I ystemelka ble det målt en pH på mellom 6,5-6,8, og ystemelka ved ystingsdag fire skilte seg ut med noe lavere pH-verdi sammenlignet med ystemelk fra de resterende dagene. Da all ystemelk ble behandlet på samme måte var årsaken til variasjonen i pH-verdi mest sannsynlig forskjeller i den kjemiske sammensetningen av råmelka de ulike ystingsdagene.

Under ystingen var det ønsket at syrekulturen produserte tilstrekkelig syre til at pH-verdien i ostemassen ble redusert til 5,2-5,3 (Skeie 2010). Det ble observert en reduksjon i pH-verdi i samtlige ystekar underveis, som følge av syrekulturens katabolisme av laktose til laktat. Tilstrebet pH-verdi ble oppnådd i fersk ost tilsatt *Lb. plantarum* 15D, *Lb. rhamnosus* GG, *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2. I de resterende ostene var pH litt høyere enn dette.

Syrningshastigheten var ikke lik i alle ystekar. Ved ystingsdag fire var pH-verdien lavere allerede i ystemelka, og dermed lå pH-verdien i disse ystekarene lavere sammenlignet med de resterende karene under hele ystingsprosessen. Det er mulig at *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene som ble benyttet som syrekulturer denne dagen hadde noe raskere syreproduksjon sammenlignet med den kommersielle syrekulturen. Det ble benyttet samme forbehandlingsmetoder for ystemelk og lik syringstemperatur i ystekarene. De tre første ystingsdagene ble det også tilsatt samme mengde og type syrekultur, og de observerte forskjellene i pH-verdi i disse ystekarene var små (ikke signifikante), og sannsynligvis tilfeldige.

Det ble påvist signifikant forskjell i pH-verdi i ostene under modningen på bakgrunn av type bakteriestamme som var blitt tilsatt. I fersk ost var pH-verdien signifikant lavere i oster tilsatt *Lb. plantarum* 15D og *Lb. rhamnosus* GG sammenlignet med de resterende ostene. Dette skyldtes nok kraftigere syreproduksjon i disse ostene.

Utstrakt proteolytisk aktivitet under modningstiden medfører økt innhold av NH<sub>3</sub> i osten. På bakgrunn av dette var det forventet en pH-økning i ostene under modningsperioden. Dette ble også observert, men pH-økningen var ikke like stor i alle ostene. Dette medførte at variasjonen i pH-verdi var mindre mellom ferdig modnet ost enn mellom fersk ost. Alle

ostene hadde en pH-verdi i overkant av det som er ønskelig i Gouda-type ost, nemlig pH 5,4 (Walstra et al. 2006).

I moden ost ble det observert høyest pH-verdi i ost tilsatt propionsyrebakterier. Dette kan skyldes propionsyrebakterienes evne til å omdanne laktat til propionsyre (propionat har lavere pKa enn laktat). Den noe lavere pH-verdien i mager ost tilsatt *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 førte imidlertid til at forskjellen i pH ikke var signifikant mellom ost tilsatt og ikke tilsatt denne tilleggskulturen.

Lavere pH i oster tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammer sammenlignet med oster tilsatt propionsyrebakterier var ikke uventet. Dette fordi bittersmaken på ostene tilsatt laktokokker tydet på opphopning av bitre peptider, og ikke fullført peptidolyse.

Generelt ble det observert lavere pH-verdi i magre oster sammenlignet med helfete tilsatt samme bakteriestamme. Årsaken til dette kan ligge i at ved ysting av magre oster ble det tilsatt mindre mengde vann mellom myseavtappene sammenlignet med ved ysting av helfet ost. Dette kan ha resultert i at mer av restlaktosen ble vasket ut av ostemassen til de helfete ostene slik at det ble mindre laktose tilgjengelig for fermentering til laktat.

#### **5.1.2.2. Endring i tørrstoffinnhold under modning**

Tørrstoffinnhold i fersk ost vil avhenge av mengde myse som er blitt drenert ut av ostemassen under ystingsprosessen. Ystingstekniske faktorer som påvirker syneresegraden er blant annet fastheten til gelen ved skjæring (for svak gel medfører noe saktere synerese), overflatearealet til ostekorna (jo større overflate, dess mer synerese), trykk (pressing under myse medfører økt synerese), surhet (raskere synerese ved synkende pH over pH 5,1), temperatur (økt synerese med økende temperatur så lenge temperaturøkningen ikke går for raskt), og sammensetning av ystemelk (jo høyere fettinnhold, dess høyere vanninnhold i fettfri ost). I tillegg kan aktiviteten til kalsiumioner, pH-verdi, proteininnhold og konsentrasjon av kolloidalt kalsiumfosfat i ystemelka påvirke syneresegraden (Walstra et al. 2006). I fersk ost ble det ikke påvist signifikant forskjell i oster verken på bakgrunn av tilsatt bakteriestamme eller av ostens fettinnhold. Noen av de ferske ostene hadde omtrent ønskelig tørrstoffinnhold (52 %), mens de resterende ostene hadde et tørrstoffinnhold i underkant av dette.

Dersom magre varianter framstilles på samme måte som helfete vil de magre ostene bli svært harde, siden parakaseinnettverket i gelen blir mye tettere når mindre fett inkluderes i det. Ved

framstilling av magre oster tilstrebes det derfor et høyere vanninnhold i osten sammenlignet med i helfete, gjennom manipulering av ettervarmingstemperatur, røringstid og temperatur (Banks 2004). Det var derfor både ønskelig og forventet at magre ostevarianter skulle ha høyere vanninnhold (lavere tørrstoffinnhold) enn helfete. Variasjonen mellom mager og helfet ost var imidlertid relativt liten, med unntak av for ost tilsatt *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203. Ferske oster tilsatt propionsyrebakterier var de eneste hvor tørrstoffinnholdet var høyere i mager ost enn i helfet.

I tillegg til mysedrenering og salting, vil vann fjernes fra osten ved fordamping under modning. Det var dermed forventet å observere et høyere tørrstoffinnhold i ostene underveis i modningsprosessen. Utviklingen i tørrstoffinnhold var som forventet i de fleste ostene. Tørrstoffinnhold økte fra fersk til ferdig modnet ost, men hvor i modningsforløpet (perioden 24 timer-4 uker eller 4-7 uker) den største endringen foregikk varierte noe. For mager ost tilsatt *P. jensenii* INF P303 ble det imidlertid målt betydelig høyere tørrstoffinnhold etter fire ukers modning sammenlignet med etter sju uker. Dette resultatet var ikke forventet, og mest sannsynlig ble det begått en feil under målingen etter fire eller sju ukers modning.

De tilsatte bakteriestamme hadde ikke signifikant effekt på tørrstoffinnholdet i ostene. Da ostene hadde lik diameter, og ble utsatt for identisk saltingsmetode og lagringsforhold under modning (temperatur, tid, luftfuktighet og –gjennomstrømming), kan de observerte forskjellene i tørrstoffinnhold mellom ost tilsatt ulike bakteriestammer skyldes naturlig variasjon mellom karene.

Ønskelig tørrstoffinnhold i ferdig modnet helfet ost er omtrent 58-60 %. Dette ble oppnådd i samtlige helfete oster, med unntak av ost tilsatt *P. jensenii* INF P303.

### **5.1.2.3. Fettinnhold i ferdig modnet ost**

I dette forsøket ble det tilstrebet en mengde fett i tørrstoff på omtrent 27,4 % i mager ost og 45 % i helfet ost (Skeie 2010). Fettinnholdet i osten styres ved standardisering av fettinnholdet i ystemelka. Det ble oppnådd omtrent ønsket fettinnhold i de fleste ostene, men for helfet ost tilsatt *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INF P203 var innholdet noe høyt. Variasjoner i målt fettinnhold kan skyldes unøyaktighet ved måling av fettinnhold i fløte og ystemelk under standardiseringen. I tillegg er metoden for måling av fett i tørrstoff relativt komplisert å gjennomføre på en nøyaktig måte.

### 5.1.3. Oppsummering ostekvalitet

Et av formålene med denne oppgaven var å undersøke om de utvalgte bakteriestammene ville egne seg ved framstilling av potensielt probiotisk ost – altså; om de ville overleve ysting og modning i tilstrekkelig antall, og ikke medføre for store avvik i forhold til ønsket kvalitet på osten. Det ble funnet at samtlige tilsatte bakteriestammer hadde en overlevelse på i overkant av log 6-9 kde/g ost etter sju ukers modning. Dermed var overlevelsen omtrent tilstrekkelig i forhold til kravet for probiotiske produkter om  $10^6$ - $10^7$  kde/ml(g) (Hayes et al. 2006). Propionsyrebakteriene var til stede i osten i størst antall, mens innholdet av laktokokker i osten var minst.

Det ble oppnådd omtrent ønsket pH-verdi, fett- og tørrstoffinnhold i ostene. Årsaken til at resultatene ikke ble helt ideelle kan like gjerne skyldes ystingstekniske faktorer og lagerbehandling, som de tilsatte syre- og tilleggskulturene. *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene hadde god nok syreproduksjon til å produsere tilstrekkelig mengde melkesyre under ystingen. Konsistensen i den magre osten var også noe bedre for disse ostene sammenlignet med magre oster tilsatt ulike laktobasiller og propionsyrebakterier som tilleggskulturer. Den noe mykere/bløtere konsistensen skyldtes mest sannsynlig produksjon av eksopolysakkarider hos *cremoris*-stammene. Disse bakteriestammene var imidlertid ikke så godt egnet for å benyttes som syrekulturer alene. Helfete oster fikk en for klissete konsistens, og samtlige av ostene hadde utpreget bittersmak mest sannsynlig som følge av utstrakt autolyse av syrekulturcellene, frigjøring av intracellulære proteaser og peptidaser, og påfølgende proteolyse.

## 5.2. Bakteriestammenes syre- og galletoleranse

Potensielt probiotiske bakterier må ha evne til å overleve gjennom fordøyelsessystemet, og nå et nivå på  $10^6$ - $10^8$  kde/g tarminnhold, for å kunne utøve helsemessig gunstig effekt (Kimoto-Nira et al. 2007). I fordøyelsessystemet er forholdene lite fordelaktige med tanke på mikrobiell vekst og overlevelse, og bakteriene må tolerere blant annet lav pH, mage- og tarmsaft, og galledalter. På grunnlag av kunnskap om forholdene som innkommende bakterier møter gjennom fordøyelsen har det blitt utarbeidet ulike *in vitro* metoder for å teste overlevelsessevnen til potensielt probiotiske bakterier gjennom fordøyelsesliknende forhold. Resultater av slike undersøkelser er beskrevet av blant annet (Charteris et al. 1998; Gaudana et al. 2010; Huang & Adams 2004; Kimoto-Nira et al. 2007; Maragkoudakis et al. 2006; Masco et al. 2007; Soumalainen et al. 2008).

I dette forsøket ble overlevelsessevnen til de ni utvalgte bakteriestammene undersøkt etter inkubasjon i vekstbuljong ved 37 °C, i pH 2 og 3 og i 0,3 % galle. Studiene referert ovenfor benyttet vaskede celler fra overnattekulturer, men av praktiske årsaker ble vekstbuljongen her direkte inokulert med overnattekulturer av bakteriestammene. Det ble antatt at tilsetning av så små mengder medium ikke ville medføre store endringer i forhold til justerte pH-verdier og konsentrasjon av galledalt.

En rekke tidligere studier har vist lovende resultater med tanke på overlevelsessevnen til en rekke potensielt probiotiske melkesyre- og propionsyrebakteriestammer under fordøyelsesliknende forhold. Til tross for de lovende resultatene har alle slått fast at probiotiske egenskaper er stammespesifikke. Det var dermed knyttet stor uvisshet til hva en kunne forvente fra undersøkelsen av de utvalgte bakteriestammenes probiotiske potensial.

### 5.2.1. Overlevelsessevne ved 37 °C

Etter tre timers inkubasjon ved 37 °C i normal vekstbuljong var det signifikant forskjell i overlevelsessevnen til de ni bakteriestammene. De to stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* hadde dårligere overlevelsessevne enn samtlige andre stammer, som enten overlevde godt eller vokste under disse forholdene. Denne observasjonen var ikke overraskende da *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene ble inkubert, og vokste bedre, ved 22 enn 30 °C. Stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* hadde også en lavere startkonsentrasjon sammenlignet med de resterende bakteriestammene, og det er mulig at overlevelsessevnen ble påvirket av dette.

### 5.2.2. Syretoleranse ved 37 °C

Kombinasjonen 37 °C og pH 2 i tre timer utgjorde de hardeste vekstforholdene for samtlige bakteriestammer. I likhet med tidligere studier medførte pH 2 en kraftig reduksjon i antall dyrkbare celler av de ulike bakteriestammene. Etter inkubasjonen var verken *Lb. rhamnosus* GG eller propionsyrebakteriene dyrkbare, og stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* vokste kun så vidt. For *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N, *Lb. plantarum* 15D og *Lb. paracasei* 448 ble det påvist signifikant bedre overlevelsessevne sammenlignet med de ikke-dyrkbare stammene. Ved pH 3 var overlevelsessevnen som forventet betydelig bedre for samtlige bakteriestammer, med unntak av *P. jensenii* INF P303. *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N hadde betydelig bedre overlevelsessevne enn propionsyrebakteriestammen, men forskjellen mellom toleranse for pH 2 og pH 3 var liten.

Laktobasillene viste best syretoleranse av de undersøkte bakteriestammene. Dette var ikke uventet ut i fra resultater vist av Maragkoudakis et al. (2006), hvor 29 undersøkte stammer av laktobasiller viste god toleranse for pH 3.

Laktokokkene hadde betydelig dårligere syretoleranse enn laktobasillene. En review-artikkel av Kimoto-Nira et al (2007) tok for seg det probiotiske potensialet for *Lactococcus* sp. Artikkelen rapporterte om varierende galletoleranse, og moderat overlevelse ved 37 °C, pH 2 i 90 minutter, og betydelig bedre overlevelse ved pH 3 for *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7. Laktokokkstammene som ble undersøkt i dette forsøket hadde dårligere syretoleranse enn *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7, men i likhet med denne stammen var toleransen bedre for pH 3 enn for pH 2.

En studie av Huang & Adams (2004) viste god overlevelsessevne hos 13 testede propionsyrebakterier i simulert magesaft ved pH 3. Soumalainen et al. (2008) viste også at tre stammer av *P. freudenreichii* hadde god toleranse for pH 3, men betydelig dårligere toleranse for pH 2. Det var dermed noe uventet at propionsyrebakteriene skulle vise dårligst syretoleranse av samtlige bakteriestammer. Overlevelsessevnen til *P. jensenii* INF P303-stammen var betydelig dårligere ved pH 3 sammenlignet med resultater fra liknende studier for en annen *P. jensenii*-stamme (Huang & Adams 2004).

### 5.2.3. Galletoleranse ved 37 °C

Mange laktobasiller, inkludert *Lb. rhamnosus* GG og stammer av *Lb. plantarum* og *Lb. paracasei*, har vist god toleranse for gallesalter (Charteris et al. 1998). Liknende resultater ble oppnådd av Maragkoudakis et al. (2006), som viste at 29 undersøkte stammer av laktobasiller hadde god overlevelse i 0,3 % galle. Det var derfor ikke uventet at laktobasillene, også i dette forsøket, hadde god toleranse for gallesalter. Deres galletoleranse var betydelig bedre enn samtlige andre undersøkte bakteriestammer, med unntak av *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N.

Da en review-artikkel av Kimoto-Nira et al. (2007) har rapportert om at noen laktokokker har god toleranse for galle (*L. lactis* subsp. *lactis* og *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), mens andre ikke har det (*L. lactis* subsp. *cremoris*), var det ikke overraskende at begge stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* hadde dårligere galletoleranse enn *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N.

Huang & Adams (2004) viste god overlevelsessevne hos 13 testede propionsyrebakterier i simulert tarmsaft tilsatt 0,3 % galle. I tillegg har Soumalainen et al (2008) vist at tre stammer av *P. freudenreichii* hadde god toleranse for 0,5 % galle. På bakgrunn av dette var det ikke forventet å observere at propionsyrebakteriestammene hadde dårligst galletoleranse av samtlige bakteriestammer.

### 5.2.4. Kommentarer til resultatene fra undersøkelse av syre- og galletoleranse

Dette forsøket bekreftet observasjoner fra tidligere studier som har fastslått at probiotiske egenskaper, inkludert syre- og galletoleranse, er svært stammespesifikke. Det ble også bekreftet at inkubasjon ved pH 2 medfører kraftig reduksjon i antall dyrkbare celler for de fleste bakteriestammer. Det er viktig å poengtere at det som ble undersøkt var bakteriestammenes syre- og galletoleranse ved 37 °C. Spesielt for *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene, som har lavest optimumstemperatur av de utvalgte stammene, hadde sannsynligvis temperaturen effekt på toleransegrensene. Dette er imidlertid forholdene som råder i fordøyelsessystemet, og forhold som potensielt probiotiske bakterier er nødt til å tolerere.

Bakteriestammene som viste best overlevelsessevne ved samtlige inkubasjonsforhold var laktobasillene. Det var interessant å observere at den dokumentert probiotiske *Lb. rhamnosus* GG-stammen hadde betydelig dårligere syretoleranse sammenlignet med de resterende laktobasillene.

Overlevelsessevnen til *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N var minst like god som laktobasillenes ved samtlige inkubasjonsforhold, spesielt ved pH 2. Unntaket var ved pH 3, hvor nedgangen i bakterietall for *L. lactis* subsp. *lactis* ML-8N kun var en logenhet mindre enn ved pH 2. Da det er sjelden at pH i magesekken er så lav som 2 (Huang & Adams 2004; Masco et al. 2007), kan det hende at toleranse for pH 3 er viktigere enn toleranse for pH 2 med tanke på probiotisk potensial.

På bakgrunn av den testede syre- og galletoleransen var verken propionsyrebakteriene eller *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene særlig lovende som potensielt probiotiske bakterier. Det var spesielt betenkelig at inkubasjon i normal vekstbuljong ved 37 °C medførte så betydelig nedgang i antall dyrkbare celler av laktokokkene. Det er tidligere blitt observert at bakteriestammens produksjon av eksopolysakkarider kan virke beskyttende ved ulike vekstforhold (Boke et al. 2010), men dette ble ikke funnet her.

Undersøkelsen av syre- og galletoleranse ble foretatt på nakne bakterieceller. Det er mulig at overlevelsessevnen gjennom fordøyelsesliknende forhold hadde vært bedre om bakteriecellene var blitt inkorporert i matvarer eller mikroinnkapslet. Det er blant annet foreslått at mikroinnkapsling i alginat-chitosan kapsler (Chávarri et al. 2010), eller sammen med prebiotika som kan utnyttes av de probiotiske bakteriene kan medføre økt overlevelsessevne og aktivitet (Saulnier et al. 2009). I dette forsøket ble det vist at inkorporering i ost kunne virke beskyttende for enkelte bakteriestammer gjennom et kunstig fordøyelsessystem.

Når det gjelder metoden som ble benyttet finnes det potensial for forbedring. Det hadde kanskje vært mer korrekt å teste syretoleranse ved pH 2,5, da dette sannsynligvis er den laveste pH-verdien som probiotika vil møte gjennom fordøyelsen. Da pH normalt ligger mellom 2,5 til 3,5 i magesekken (Huang & Adams 2004; Masco et al. 2007), burde en kanskje ha testet toleranse for både pH 2,5, 3 samt 3,5. Det kunne også ha vært interessant å foreta uttak ved flere punkter underveis i inkubasjonstiden, for å få en indikasjon på omtrent hvor lenge et ønskelig/tilstrekkelig nivå av dyrkbare celler opprettholdes ved de ulike forholdene.

Platetelling som metode for å finne antall dyrkbare celler er ikke en helt nøyaktig metode, og det må tas hensyn til de varierende resultater som metoden kan medføre. Det er vanskelig å fastslå om bakteriecellene er døde, eller om de fremdeles er levende men i en tilstand hvor de ikke kan kultiveres. Det kan også være vanskelig å finne riktig fortynningsrekke dersom en har ulik startkonsentrasjon av bakteriene ved gjentakene.



### 5.3. Bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem

For å undersøke overlevelsessevnen til bakteriestammene i fordøyelsesliknende forhold ble det satt opp et kunstig fordøyelsessystem som inneholdt blant annet mage- og tarmsaft fra friske personer. Dette var en ny metode som ble utviklet i samarbeid med Alessio Tamburello (Tamburello 2010). Metoden skilte seg fra tidligere prosedyrer, benyttet av blant annet av Maragkoudakis et al (2006) og Charteris et al. (1998), hvor det har blitt benyttet pH -justerte medier tilsatt pepsin eller pancreatin.

Resultater oppnådd av Maragkoudakis et al. (2008) viste varierende overlevelse hos 29 ulike stammer av laktobasiller ved inkubasjonsforhold som simulerte forholdene i magesekken (pH 2, tilsatt pepsin). Overlevelsessevnen varierte fra <1 til 2,3 logenheters reduksjon etter en times inkubasjon. Samtlige undersøkte stammer var imidlertid omtrent resistente mot pancreatin, og viste en reduksjon på mindre enn 1 logenhet etter 4 timers inkubasjon i pancreatin ved pH 8. Liknede resultater ble funnet av Charteris et al. (1998), da det ble observert at blant annet stammer av *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* og *Lb. rhamnosus* GG hadde begrenset toleranse for simulert magesaft (pH 2, pepsin, 1,5 timer). I simulert magesaft hadde *Lb. rhamnosus* GG dårligst overlevelsessevne, men i simulert tarmsaft (pH 8, pancreatin, 2 timer) var stammen derimot omtrent resistent mot forholdene.

Det har blitt framsatt flere hypoteser om at bakterier vil overleve bedre gjennom menneskers fordøyelsessystem dersom de er inkorporert i matvarer, sammenlignet med som nakne celler. Blant annet hos gris har forsøk vist bedre overlevelsessevne, i form av høyere fekalt innhold, av potensielt probiotiske bakterier blant dersom bakteriene inntas inkorporert i fermentert melk eller ost (da Cruz et al. 2009). Liknende resultater er også blitt funnet *in vitro* for overlevelsessevne gjennom simulerte fordøyelsesforhold for bakterier inkorporert i yoghurt eller ost (Gardiner et al. 1999; Heller et al. 2003; Makelainen et al. 2009). Foringsforsøk med mennesker har også vist god overlevelse av *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS gjennom fordøyelsessystemet når bakterien ble administrert i mysebasert frukt juice (Soumalainen et al. 2008).

Foreslåtte årsaker til den beskyttende evnen til meieriprodukter er deres bufferkapasitet, samt innkapsling av bakteriene i fett og proteinmatrikser. Da ost har høyere pH, bedre bufferkapasitet, høyere fettinnhold og fastere matriks enn yoghurtliknende produkter, antas det at inkorporering i ost kan medføre enda bedre beskyttelsessevne gjennom

fordøyelsessystemet for potensielt probiotiske bakterier (Makelainen et al. 2009; Ross et al. 2002). Denne antakelsen styrkes av blant annet av to foringsforsøk med griser, hvor det ble påvist høyere fekalt innhold av de undersøkte probiotiske bakteriene dersom de var inkorporert i ost sammenlignet med i yoghurt (Gardiner et al. 1999; Stanton et al. 1998).

På bakgrunn av denne kunnskapen var det forventet at de utvalgte bakteriestammene skulle overleve bedre gjennom det kunstige fordøyelsessystemet når de var inkorporert i ost enn som vaskede celler løst i Ringers løsning. Det var også forventet at helfet ost skulle gi bakteriene bedre beskyttelse overfor fordøyelsesforholdene sammenlignet med mager ost.

### **5.3.1. Bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom hele den kunstige fordøyelsen**

Det kunstige fordøyelsessystemet bestod av to deler. Det ble observert en signifikant forskjell i bakteriestammens gjennomsnittlige endring i bakterietall (bakterietall i samtlige medier) fra start til etter endt fordøyelse. Det var også signifikant forskjell i bakteriestammens overlevelsessevne i de ulike mediene gjennom hele den kunstige fordøyelsen.

Generelt ble det observert en relativt god overlevelsessevne for bakteriestammene gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* hadde dårligere overlevelsessevne sammenlignet med de andre bakteriestammene. Som vaskede celler fra renkultur hadde *Lb. rhamnosus* GG og *P. jensenii* INF P303 bedre overlevelsessevne enn *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammene, men dårligere overlevelsessevne enn de resterende bakteriestammene.

På bakgrunn av den observerte syre- og galletoleransen hos de ulike bakteriestammene var det forventet at propionsyrebakteriene og *L. lactis* subsp. *cremoris* -stammene skulle ha dårligst overlevelsessevne. Overlevelsessevnen til *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* INFP203 var dermed bedre enn forventet, mens overlevelsessevnen til *Lb. rhamnosus* GG, var dårligere enn forventet.

Stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* hadde noe lavere startkonsentrasjon i samtlige medier sammenlignet med de resterende bakteriestammene, og det er mulig at dette kan ha hatt medvirkende effekt i forhold til de observerte forskjellene i overlevelsessevne.

Bakteriestammene som hadde best gjennomsnittlig overlevelsessevne gjennom den kunstige fordøyelsen, overlevde best som vaskede celler fra renkultur løst i Ringers løsning, sammenlignet med inkorporert i ost. Inkorporering i ost medførte bedre overlevelsessevne for de bakteriestammene som totalt sett overlevde dårligst. Det var ingen gjennomgående trend i forhold til hvor i fordøyelsen (tidspunkt/forhold) eller hvilken fettprosent osten hadde, med tanke på hvor ostens beskyttende evne gjorde seg gjeldende.

### **5.3.2. Bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom første del av den kunstige fordøyelsen – i magesaft**

I første del av den kunstige fordøyelsen ble bakteriestammene utsatt for magesaft og en pH - verdi på 3, og disse forholdene hadde ulik effekt på bakteriestammenes overlevelsessevne. Vaskede celler fra renkultur av *L. lactis* subsp. *cremoris* hadde en betydelig større gjennomsnittlig nedgang i bakterietall sammenlignet med de resterende bakteriestammene. I forhold til bakteriestammenes observerte toleranse for pH 3 viste propionsyrebakteriene bedre overlevelsessevne, og *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 dårligere overlevelsessevne, gjennom det kunstige fordøyelsessystemet som nakne celler enn forventet. Overlevelsessevnen til de resterende stammene var omtrent som forventet.

Inkorporering i ost medførte bedre overlevelse for *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 gjennom den første delen av den kunstige fordøyelsen. I motsetning til det som var forventet, ga mager ost bedre beskyttelse enn helfet ost. For *L. lactis* subsp. *cremoris* Ar-1 medførte inkorporering i helfet ost noe bedre overlevelse, mens inkorporering i mager ost medførte dårligere overlevelsessevne sammenlignet med vaskede celler fra renkultur. Årsaken til de noe uventede resultatene kan ligge i metoden og hvordan osten ble preparert før undersøkelsene, jfr. avsnitt 5.3.4. Kommentarer.

### **5.3.3. Bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom andre del av den kunstige fordøyelsen – i tarmsaft**

I andre del av den kunstige fordøyelsen ble bakteriestammene utsatt for tarmsaft og en pH-verdi på omtrent 7. Forholdene medførte signifikante forskjeller i endring i logtall (kde/ml(g)) for bakteriestammene. Her var det *Lb. rhamnosus* GG og *P. jensenii* INF P303 som var mest

sensitive, og vaskede celler fra renkultur av disse stammene viste betydelig større gjennomsnittlig nedgang i bakterietall sammenlignet med de resterende bakteriestammene.

De fleste av bakteriestammene overlevde noe dårligere i andre del av den kunstige fordøyelsen sammenlignet med i 0,3 % gallesalt. Spesielt gjaldt dette *Lb. rhamnosus* GG. Overlevelsessevnen til *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* var noe bedre i tarmsaft enn forventet ut i fra stammens galletoleranse.

For de to stammene med dårligst overlevelse gjennom andre del av fordøyelsen, *Lb. rhamnosus* GG og *P. jensenii* INF P303, medførte inkorporering i ost bedre overlevelsessevne, og helfet ost hadde noe bedre beskyttelsessevne enn mager.

#### **5.3.4. Kommentarer til resultater fra undersøkelse av bakteriestammens overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem**

Resultatene fra undersøkelsen av bakteriestammens syre- og galletoleranse kan ikke sammenlignes direkte med bakteriestammens overlevelse gjennom første og andre del av den kunstige fordøyelsen. Inkubasjonstiden var to timer kortere i den kunstige fordøyelsen, men det ble i tillegg tilsatt mage- og tarmsaft. Det er vanskelig å anslå om reduksjoner i bakteriestammens overlevelsessevne skyldtes pH-verdien i miljøet og/eller fordøyelsesenzymer. Ut i fra de oppnådde resultatene kan det virke som om toleransen for ulike pH-verdier og fordøyelsesenzymer var stammespesifikk. Det er sannsynlig at den dårlige overlevelsen av nakne celler av *L. lactis* subsp. *cremoris* Bf-2 i første del av fordøyelsen skyldtes dårlig toleranse for enzymene i magesaften, og at *Lb. rhamnosus* GG hadde dårligere toleranse for enzymene i tarmsaften sammenlignet med for gallesalt.

De noe uventede resultatene kan skyldes metoden for undersøkelse av overlevelsen gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. Ostens bufferkapasitet kom ikke bakteriene til gode, da pH ble justert til 3 i ostesuspensjonen ved tilsetning av saltsyre. Kanskje hadde resultatene vært annerledes dersom vaskede bakterieceller og ost ble overført til magesaft, som om nødvendig hadde vært pH-justert før tilsetning. Dette var imidlertid ikke mulig å gjennomføre, på grunn av at kun en begrenset mengde magesaft var tilgjengelig.

Årsaken til at økt fettinnhold ikke så ut til å medføre økt beskyttelse for bakteriene gjennom fordøyelsen kan være at osten ble kjørt gjennom en Omnimixer slik at det ble oppnådd en homogen blanding. Det er sannsynlig at bakteriene må være innkapslet i fett for at de skal bli

beskyttet, og osten burde derfor ha blitt kjørt gjennom fordøyelsen i form av små klumper. Dette hadde vært mest likt en normal fordøyelsessituasjon, men medfører praktiske vanskeligheter dersom overlevelsessevnen til bakteriestammene skal undersøkes ved hjelp av platetelling.

Det er også blitt publisert en studie som for første gang viser at et magert pålegg har fungert godt som overføringsmedium for probiotiske bakterier. Den dobbeltblinde, plasebokkontrollerte intervensjonsstudien viste at både *Lb. reuteri* DSM 17938 og *Lb. rhamnosus* GG overlevde gjennom fordøyelsessystemet hos mennesker. Etter tre ukers daglig inntak av 20 gram av pålegget ble det påvist en signifikant økning i antall levende probiotiske bakterier som ble gjenfunnet i feces (Dommels et al. 2009). Disse resultatene indikerer at fettinnhold i overføringsmediet kanskje ikke er så avgjørende for overlevelsessevnen til probiotiske bakterier som først antatt.

Det var overraskende å observere at inkorporering i ost medførte større nedgang i logtall (log kde/ml(g) gjennom fordøyelsen sammenlignet med vaskede bakterieceller alene for de fleste bakteriestammene. En mulig forklaring på dette er at selv om bakteriene var dyrkbare etter sju ukers modning av ostene, kan det være at de var mer stressede og dårligere stilt overfor miljøforandringer enn bakterieceller fra overnattekulturer. Det er også mulig at enzymer fra mage- og tarmsaft medførte frigjøring av komponenter fra ostemassen som virket hemmende på bakterieveksten.

En viktige mulig feilkilde ved dette forsøket er mengden mage- og tarmsaft som ble benyttet. Mengden tilsatt her var noe vilkårlig, og beregnet på grunnlag av en utarbeidet prosedyre for fordøyelse av laktoferrin. Det ville sannsynligvis ha vært gunstig å forsøke å regne ut konsentrasjonen av mage- og tarmsaft som produseres under vanlige fordøyelsesforhold av ost.

Et annet svakt punkt ved metoden var at det var vanskelig å pipettere løsninger med utfelt kasein. Dette kan ha medført unøyaktigheter ved tillaging av fortynningsrekker.

#### 5.4. Oppsummering

Alle de utvalgte bakteriestammene var egnet for ysting i den forstand at de overlevde både ystingsprosessen og modningsperioden i stort antall ( $\log 10^6$ - $10^9$  kde/g). Ystingsprosessen ble ikke optimalisert med tanke på ostens spisekvalitet, og det ble dermed ikke foretatt sensorisk bedømmelse av ostekvaliteten. Resultatene av de kjemiske analysene var likevel omtrent som forventet og ønsket. Negative subjektive observasjoner som kan nevnes er imidlertid meget hard konsistens på magre oster, klissete konsistens på helfet ost tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*-stammer, samt utpreget bittersmak på samtlige oster tilsatt *L. lactis* subsp. *cremoris*.

Det var noen av de utvalgte bakteriestammene som skilte seg ut med tanke på probiotisk potensial. Bakteriestammene med generelt best overlevelsessevne både ved testing av syre- og galletoleranse, og gjennom den kunstige fordøyelsen var laktobasillene. Samtlige bakteriestammer ble kraftig hemmet ved pH 2. Stammene av *L. lactis* subsp. *cremoris* og propionsyrebakteriene virket lite lovende som probiotiske bakterier i forhold til overlevelsessevne gjennom fordøyelsesliknende forhold, spesielt som nakne celler.

Inkorporering i ost hadde ikke en like god beskyttende effekt overfor bakteriene gjennom den kunstige fordøyelsen som forventet. De fleste laktobasillene og *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* overlevde imidlertid godt som vaskede celler fra renkultur. Til tross for at en del av bakteriestammene overlevde best som vaskede celler, var overlevelsessevnen likevel ikke dårlig i ost. De fleste av de undersøkte bakteriestammene, med unntak av *L. lactis* subsp. *cremoris*, hadde en overlevelseshastighet på mer enn  $10^6$  kde/ml gjennom det kunstige fordøyelsessystemet. For bakteriestammene med dårligst overlevelsessevne virket også osten beskyttende i varierende grad.

Kort oppsummert var de oppnådde resultatene mest lovende med tanke på det probiotiske potensialet til laktobasillene. Disse bakteriestammene medførte gode oster med fin konsistens (helfete). Bakteriene overlevde bra under ysting og modning av ostene. Syre- og galletoleransen var relativt god, med unntak av toleransen for pH 2. Gjennom den kunstige fordøyelsen overlevde bakteriestammene godt som vaskede celler, og overlevelsen i mager ost var god for de fleste av disse stammene.

Til tross for lovende resultater er det viktig å huske at oppfyllelse av visse av de oppsatte kriteriene for probiotiske bakterier ikke er ensbetydende med at bakteriene faktisk er probiotiske. Overlevelsessevne gjennom menneskets fordøyelsessystem er en forutsetning, men ikke noe bevis for probiotisk effekt. Helseeffekter må bevises og bekreftes gjennom

velkontrollerte kliniske studier på mennesker, i tillegg til at virkningsmekanismer bør påvises. Dette er imidlertid tid- og ressurskrevende, og vanskelig å gjennomføre.

Resultatene viste at osten kunne være et godt overføringsmedium for de potensielt probiotiske bakteriene. Til tross for svakheter ved prøveopparbeidelsen, var overlevelsesevnen i ost til de fleste bakteriestammene gjennom fordøyelsessystemet relativt god. Dersom det blir påvist at ost er godt egnet for overføring av probiotiske bakterier til tykktarm bør det forsøkes å oppnå så høye konsentrasjoner som mulig av de probiotiske bakteriene i produktet. Dette fordi det anbefalte daglige inntaket av ost er lavere enn for fermenterte meieriprodukter, som følge av ostens relativt høye salt og fettinnhold (Heller et al. 2003).

Informasjonen som framkom gjennom dette forsøket kan vise seg nyttig fordi det ennå foreligger lite kunnskap om hvordan inntatte bakterier oppfører seg gjennom fordøyelsessystemet. Slike overlevelsestester kan være med på å kaste lys over bakteriestammers evne til å tolerere forholdene i fordøyelsessystemet, sannsynlige mengder av bakterier som må inntas for å oppnå helseeffekt, behov for beskyttende tiltak (som mikroinnkapsling eller inkorporering i næringsmidler), samt utbedring av eksisterende *in vitro* og *in vivo* metoder.

### 5.5. Videre undersøkelser

På veien videre vil det være naturlig å undersøke om resultatene i denne oppgaven er reproducerbare. Dersom det påvises liknende resultater i forhold til syre- og galletoleranse kan en begynne utsiling av bakteriestammer i forhold til lovende probiotiske egenskaper. Det kan også være fordelaktig å undersøke bakteriestammene for andre probiotiske egenskaper, som blant annet evnen til å feste seg/adhere til humane cellelinjer som Caco-2.

Metoden for den kunstige fordøyelsen var ikke optimal. Det vil være nødvendig å revidere denne før liknende forsøk settes i gang. En annen tilnæringsmåte for undersøkelse av egnetheten til ost som overføringsmedium for probiotiske bakterier kan være foringsforsøk med dyr (for eksempel gris) eller mennesker, og påfølgende sporing/identifisering av bakteriene i feces med molekylærbiologiske teknikker.

Modnet ost inneholder som regel en NSLAB- flora bestående av blant annet en rekke laktobasiller. Det vil derfor være interessant å undersøke om hovedandelen av laktobasiller i

ostene som undersøkes består av de tilsatte bakteriestammene eller av NSLAB ved bruk av molekylærbiologiske teknikker.

Til dags dato er det et begrenset antall studier som har påvist effekt av probiotiske bakterier inkorporert i ulike næringsmidler. Mulige synergistiske eller hemmende effekter som følge av tilstedeværelse av andre næringsstoffer er ennå ukjente. Det er sannsynlig at overføringsmedium og metode vil påvirke funksjonaliteten til de probiotiske bakteriene, og det vil være interessant å undersøke på hvilken måte. Dersom det påvises at inkorporering i ost faktisk reduserer overlevelsesevnen til bakteriestammene gjennom det kunstige fordøyelsessystemet etter at metoden er revidert, kan det være aktuelt å undersøke hva denne hemmende effekten skyldes, og om den er mulig å unngå.

## 6. Konklusjon

Samtlige åtte bakteriestammer overlevde i tilstrekkelig mengde ( $>10^6$  kde/g) under ysting og modning av ostene.

Av de utvalgte bakteriestammene var det *Lactobacillus paracasei* 448, *Lactobacillus paracasei* 456, *Lactobacillus plantarum* 15D og *Lactobacillus rhamnosus* GG som viste best probiotisk potensial, i form av overlevelsesevne ved fordøyelsesliknende forhold. Disse bakteriestammene hadde god overlevelsesevne ved pH 3 og i 0,3 % gallesalt. Gjennom kunstig fordøyelse var overlevelsesevnen for *Lb. paracasei* 448, *Lb. paracasei* 456 og *Lb. plantarum* 15D best som vaskede celler fra renkultur, mens *Lb. rhamnosus* GG overlevde best når den var inkorporert i helfet ost.

Osten var relativt godt egnet som overføringsmedium for de potensielt probiotiske bakteriene. De fleste av de undersøkte bakteriestammene overlevde relativt godt i ost gjennom det kunstige fordøyelsessystemet ( $>10^6$  kde/ml), og tre av stammene overlevde bedre gjennom systemet i ost enn som vaskede celler.



## 7. Litteraturliste

- Arai, S., Morinaga, Y., Yoshikawa, T., Ischiishi, E., Kiso, Y., Yamazaki, M., Morotomi, M., Shimizu, M., Kuwata, T. & Kaminogawa, S. (2002). Recent Trends in Functional Food Science and the Industry in Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66: 2017-2029.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. C. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, s. 1-66. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Baek, Y. B. & Lee, B. H. (2009). Probiotics and Prebiotics as Bioactive Components in Dairy Products. I: Park, Y. W. (red.) *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*, s. 287-310: Wiley-Blackwell.
- Banks, J. M. (2004). The technology of low-fat cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (4): 199-207.
- Beresford, T. & Williams, A. (2004). The Microbiology of Cheese Ripening. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology.*, s. 287-318. London: Elsevier Academic Press.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S. & Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (3): 278-285.
- BioMatrix Neuroceuticals. (2006). *Your First Line Immune Defense*. Tilgjengelig fra: [http://www.biomatrixone.com/support\\_mucosa.html](http://www.biomatrixone.com/support_mucosa.html) (lest 03.08.2010).
- Boke, H., Aslim, B. & Gulcin, A. (2010). The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yoghurt starter bacteria. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 62 (2): 323-328.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L. & Gerswin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44: 26-46.
- Bougle, D., Roland, N., Lebeurrier, F. & Arhan, P. (1999). Effect of Propionibacteria Supplementation on Fecal Bifidobacteria and Segmental Colonic Transit Time in Healthy Human Subjects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34 (2): 144-148.
- Brede, D. A., Faye, T., Stierli, M. P., Dasen, G., Theiler, A., Nes, I. F., Meile, L. & Holo, H. (2005). Heterologous Production of Antimicrobial Peptides in *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8077-8084.
- Casalta, E. & Montel, M. C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (3): 271-273.
- Chaia, A. P., Zarate, G. & Oliver, G. (1999). The probiotic properties of propionibacteria. *Le Lait*, 79 (1): 174-185.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. & Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (5): 759-768.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F. & del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, in press.
- Cogan, T. M., Beresford, T. P., Steele, J., Broadbent, N. P., Shah, N. P. & Ustunol, Z. (2007). Advances in Starter Cultures and Cultured Foods. *Journal of Dairy Science*, 90 (9): 4005-4021.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Salminen, S. & Sanz, Y. (2009). The Impact of Probiotic on Gut Health. *Current Drug Metabolism*, 10 (1): 68-78.

- da Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., de Souza, C. H. B., Faria, J. A. F. & Saad, S. M. I. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (8): 344-354.
- de Graaf, A. A. & Venema, K. (2008). Gaining insight into Microbial Physiology in the Large Intestine: A Special Role for Stable Isotopes. *Advances in Microbial Physiology*, 53: 73-170.
- de Vrese, M. & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Advanced Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111: 1-66.
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoreux, M., Amiot, J., Boutin, Y. & Roy, D. (2008). Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. *Current Issues of Molecular Biology*, 10: 37-53.
- Dommels, Y. E. M., Kemperman, R. A., Zebregs, Y. E. M. P., Draaisma, R. B., Jol, A., Wolvers, D. A. W., Vaughan, E. E. & Albers, R. (2009). Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the Human Gastrointestinal Tract with Daily Consumption of a Low-Fat Spread. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6198-6204.
- Duboc, P. & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11: 759-768.
- FAO/WHO. (1999). *CODEX GENERAL STANDARD FOR CHEESE*. CODEX STAN 283-1978. Tilgjengelig fra: [www.codexalimentarius.net/download/standards/175/CXS\\_283e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/175/CXS_283e.pdf) (lest 10.08.10).
- Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F. & Holo, H. (2002). An Antimicrobial Peptide Is Produced by Extracellular Processing of a Protein from *Propionibacterium jensenii*. *Journal of Bacteriology*, 182: 3649-3656.
- Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (2004). Cheese: An Overview. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*, s. 1-18. London: Elsevier Academic Press.
- Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. & Ross, R. P. (1999). Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 82 (7): 1379-1387.
- Gaudana, S. B., Dhanani, A. S. & Bagchi, T. (2010). Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and human origin. *British Journal of Nutrition*, 103: 1620-1628.
- Gill, H. & Prasad, J. (2008). Probiotics, Immunomodulation and Health Benefits. I: Bösze, Z. (red.) b. 606 *Bioactive Components of Milk*, s. 423-454. New York: Springer.
- Hasler, C. (2002). Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges - A Position Paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132: 3772-3781.
- Hayes, M., Coakley, M., O'Sullivan, L., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Murphy, J. J. & Ross, R. P. (2006). Cheese as a delivery vehicle for probiotics and biogenic substances. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61 (2): 132-141.
- Heller, K. J., Bockelmann, W., Schrezenmeir, J. & deVrese, M. (2003). Cheese and Its Potential as a Probiotic Food. I: Farnworth, E. R. (red.) *Handbook of Fermented Functional Foods*, s. 203-225. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Holo, H., Faye, T., Brede, D. A., Nilsen, T., Ødegård, I., Langsrud, T., Brendehaug, J. & Nes, I. F. (2002). Bacteriosins of propionic acid bacteria. *Lait*, 82: 59-68.
- Huang, Y. & Adams, M. C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91 (3): 253-260.

- IDF. (1982). *Cheese and processed cheese: Determination of the total solids content*. IDF Standard 4d. Brüssel, Belgia: International Dairy Federation.
- IDF. (1995). *Milk and milk products: Guidance on sampling*. IDF Standard 50c. Brüssel, Belgia: International Dairy Federation.
- IDF. (2008a). *Cheese - Determination of fat content - Van Gulik method*. IDF Standard 222. Brüssel, Belgia: International Dairy Federation.
- IDF. (2008b). *Milk - Determination of fat content*. IDF Standard 226. Brüssel, Belgia: International Dairy Federation.
- Isolauri, E., Salminen, S. & Ouwehand, A. C. (2004). Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2): 299-313.
- Jatila, H. (2009). *Probiotic cheese with Lactobacillus GG*. (Foredrag, Healthy Cheese Symposium 06.10.09, Drøbak).
- Kask, S., Adamberg, K., Orłowski, A., Vogensen, F. K., Møller, P. I., Ardö, Y. & Paalme, T. (2003). Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. *Food Research International*, 36: 1037-1046.
- Kavli AS Norge. (2010). *Produktark BioQ*. Tilgjengelig fra: [http://www.kavli.no/wps/wcm/resources/file/ebdad5493e4afb0/datablad\\_bioq.pdf](http://www.kavli.no/wps/wcm/resources/file/ebdad5493e4afb0/datablad_bioq.pdf) (lest 04.08.2010).
- Kimoto-Nira, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Fujita, Y., Okamoto, T., Suzuki, I., Tsuji, N. M., Kurisaku, J. I. & Ohmomo, S. (2007). *Lactococcus* sp as potential probiotic lactic acid bacteria. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, 41 (3): 181-189.
- Kwak, N.-S. & Jukes, D. J. (2001). Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*, 12: 109-117.
- Landbruks og matdepartementet. (2004). *FOR 1956-08-24 nr 9632:Forskrifter om tilvirking, merking og omsetning av ost*. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdato.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-19560824-9632.html> (lest 03.08.2010).
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utg. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 171-184.
- Lopez-Varela, S., González-Gross, M. & Marcos, A. (2002). Functional foods and the immune system: review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (Supplement 3): S29-S33.
- Makelainen, H., Forssten, S., Olli, K., Granlund, L., Rautonen, N. & Ouwehand, A. C. (2009). Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 19 (11): 675-683.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J. & Huys, G. (2007). In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*. *Journal of Dairy Science*, 90 (8): 3572-3578.
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*, s. 347-360. London: Elsevier Academic Press.

- Meile, L., Le Blay, G. & Thierry, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (3): 316-320.
- Mikelsaar, M., Mändar, R., Sepp, E. & Annuk, H. (2004). Human Lactic Acid Microflora and Its Role in the Welfare of the Host. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. C. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, s. 453-506. New York: Marcel Dekker Inc.
- Mozzi, F., Gerbino, E., Font de Valdez, G. & Torino, M. I. (2009). Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 56-64.
- Mäyrä-Mäkinen, A. & Bigret, M. (2004). Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. C. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, s. 175-198. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Nousiainen, J., Javanainen, P. & Setälä, J. (2004). Lactic Acid Bacteria as Animal Probiotics. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. C. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, s. 547-580. New York: Marcel Dekker, Inc.
- O'Toole, P. W. & Cooney, J. C. (2008). Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008: 1-9. Tilgjengelig fra: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2008/175285.html> (lest 03.08,2010).
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 57-62.
- Ohland, C. L., Wallace, K. & MacNaughton, K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298: G807-G819.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. & Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9: 43-52.
- Ouwehand, A. C. (2004). The Probiotic Potential of Propionibacteria. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. C. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, s. 159-175. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Parente, E. & Cogan, T. M. (2004). Starter Cultures: General Aspects. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*, s. 123-148. London: Elsevier Academic Press.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S. & Kim, H.-Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1171-1185.
- Prescott, L., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2005). *Microbiology*. 6. utg. New York: McGraw-Hill.
- Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K. & Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures - probiotic cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2): 71-78.
- Ruas-Madiedo, P., Haugenholtz, J. & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12: 163-171.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., M.-C., M., Robfroid, M. & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80 (Supplement 1): S147-S171.

- Saulnier, D. M. A., Spinler, J. K., Gibson, G. R. & Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 135-141.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T. & de Vos, W. M. (2005). Probiotics and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 204-211.
- Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. & Amann, R. (1995). Application of Molecular Methods for the Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 5 (1081-1094).
- Skeie, S., Kieronczyk, A., Eidet, S., Reitan, M., Olsen, K. & Østlie, H. (2008). Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagine and aspartate in a washed-curd cheese. *International Dairy Journal*, 18: 169-177.
- Skeie, S. (2010). (Personlig meddelelse).
- Soumalainen, T., Sigvart-Mattila, P., Mättö, J. & Tynkkynen, S. (2008). In vitro and in vivo gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. *International Dairy Journal*, 18 (271-278).
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. & Ross, R. P. (1998). Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8 (5-6): 491-496.
- Tallon, R., Bressollier, P. & Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154: 705-712.
- Tamburello, A. (2010). *Study of the probiotic potential of nine lactic acid bacteria as pure strains and in fermented milk*. Masteroppgave. Ås: Universitetet for miljø- og biovitenskap, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. 49 s.
- TINE SA. (2010a). *Biola Syrnet Melk*. Tilgjengelig fra: <http://tine.no/produkter/melk/syrnet-melk/6038.cms> (lest 04.08.2010).
- TINE SA. (2010b). *Cultura Naturell*. Tilgjengelig fra: <http://tine.no/produkter/melk/syrnet-melk/6040.cms> (lest 04.08.2010).
- van den Berg, G., Meijer, W. C., Düsterhöft, E.-M. & Smit, G. (2004). Gouda and Related Cheeses. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 2 *Cheese. Chemistry, Physiology and Microbiology*, s. 103-140. London: Elsevier Academic Press.
- Vasiljevic, T. & Shah, N. P. (2008). Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714-728.
- Verhagen, H., Vos, E., Francl, S., Heinonen, M. & van Loveren, H. (2010). Status of nutrition and health claims in Europe. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, in press.
- Walker, A., Goulet, O., Morelli, L. & Antoine, J. M. (2006). Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. *European Journal of Nutrition*, 45 (Supplement 1): I/1-I/18.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2. utg. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacists, Inc*, 67: 449-458.
- Winkler, P., Ghadimi, D., Schrezenmeir, J. & Kraehenbuhl, J.-P. (2007). Molecular and Cellular Basis of Microflora-Host Interactions. *The Journal of Nutrition* (Supplement): 756S-772S.

## Vedleggsliste

### **1. Resultater fra ysting.**

- Rådata, pH-utvikling under ysting og modning.
- Rådata, endring i tørrstoffinnhold under modning.
- Rådata, mikrobiologiske analyse.r
- Rådata, fettinnhold i moden ost.
- Rådata, statistikk (p- og  $r^2$ -verdier).

### **2. Resultater fra undersøkelse av bakteriestammenes probiotiske potensial**

- Rådata, undersøkelse av bakteriestammenes syre- og galletoleranse
- Rådata, undersøkelse av bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom et kunstig fordøyelsessystem.
- Rådata, statistikk (p- og  $r^2$ -verdier).

### **3. Statistisk analyse av resultater fra pH-målinger**

### **4. Statistisk analyse av resultater fra tørrstoffmålinger.**

### **5. Statistisk analyse av resultater fra undersøkelse av bakteriestammenes syre- og galletoleranse.**

### **6. Statistisk analyse av resultater fra undersøkelse av bakteriestammenes overlevelsessevne gjennom kunstig fordøyelsessystem.**