



Forord

Denne oppgaven ble utført hos forskningsgruppen for meieriteknologi og matkvalitet ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven utgjør 30 studiepoeng og er det avsluttende arbeidet i min mastergrad i Matvitenskap, retning Produksjon og utvikling av næringsmidler. Arbeidet ble utført i perioden januar til mai 2015, og alt praktisk arbeid er utført ved IKBM.

Jeg vil gi en stor takk til min hovedveileder professor Judith Narvhus og medveileder professor emeritus Terje Sørhaug. Alle diskusjonene vi har hatt og de gode og konstruktive tilbakemeldingene dere har gitt, har vært uvurderlig og gjort denne oppgaven mulig. Jeg setter stor pris på deres engasjement og all hjelpen jeg har fått.

Jeg er også svært takknemlig for den gode mottakelsen, oppfølgingen og all dyrebar hjelp fra personalet på laboratoriet; Kari Olsen, Ahmed Abdelghani, May Helene Aalberg og øvrige. Stor takk til både ansatte og medstudenter for alt hyggelig samvær og støtte. Takk til NMBU for fem flotte og lærerike år.

I tillegg vil jeg takke Askild Holck ved Nofima som skaffet til veie bakteriestammene benyttet i denne oppgaven. Avslutningsvis takk til TINE SA for økonomisk støtte til gjennomførelse av oppgaven.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2015

Sarah Louise Amundsen

Sammendrag

Melk er et biologisk og næringsrikt produkt spesielt utsatt for mikrobiell forringelse dersom det ikke håndteres på best mulig måte. En type psykrotrofe bakterier som ofte forbindes med mikrobiell ødeleggelse og nedsatt kvalitet i melk og andre meieriprodukter, er *Pseudomonas fluorescens*. Bakteriearten er allestedsværende, har evne til å formere seg ved lave temperaturer og mange av dem kan produsere varmemestabile ekstracellulære enzymer, slik som proteinaser og lipaser. Disse enzymene angriper og degraderer henholdsvis proteiner og fett, og kan gi melken uønskede endringer i blant annet fysiske egenskaper, utseende, smak og lukt.

Trender i meieriindustrien de siste tiårene, slik som effektivisering og sjeldnere henting, har blant annet medført forlenget kjølelagring av ubehandlet melk. Dette bidrar til at disse bakteriene får økte muligheter til vekst og enzymproduksjon, der altså spesielt sistnevnte kan by på problemer, til tross for pasteurisering. I tillegg vil også kontaminering av melk etter pasteurisering være problematisk. I denne studien var det derfor ønskelig å undersøke vekst, metabolsk aktivitet og eventuell proteolytisk aktivitet i melk under lagring ved tre ulike temperaturer, hos to ulike stammer av *P. fluorescens*. Dette skulle om mulig ses i sammenheng med hva som er tilfelle i praksis i meieriindustrien.

I denne studien viste begge de to *P. fluorescens*-stammene ATCC 13525 og ATCC 17400 å gi god vekst i UHT-melk, både ved 4, 7 og 22 °C. Sistnevnte stamme viste i tillegg kraftig proteolyse, hovedsakelig av kaseinprotein ved inkubasjon ved 22 °C. Proteinaserne var relativt varmemestabile. I melken med vekst av stamme B ved 22 °C var det også mulig å observere de største forandringene i innhold av organiske syrer, frie aminosyrer og flyktige stoffer. Det ble klart at både temperatur og stamme var av betydning for mønsteret som utartet seg i melken. Dette understreket hvordan det hele veien bør etterstrebes å redusere kontamineringsgraden og holde temperaturen lav, og at god hygiene er avgjørende i alle trinn der melk produseres og behandles.

Abstract

Milk is a biological and nutritious product particularly susceptible to microbial degradation if not handled properly. One type of psychrotrophic bacteria often associated with microbial spoilage and impaired quality in milk and other dairy products, is *Pseudomonas fluorescens*. The specie is omnipresent, has the ability to multiply at low temperatures, and many of them may produce heat stable extracellular enzymes such as proteinases and lipases. These attack and degrade proteins and fats respectively, which can lead to undesirable changes in milk, for example in physical properties, appearance, taste and smell.

Trends in the dairy industry in recent years, such as efficiency and less frequent retrieval, have resulted in prolonged cold storage of untreated milk. This means that these bacteria have increased opportunities for growth and enzyme production, where especially the latter can cause problems, despite pasteurization. In addition, contamination of the milk after pasteurization can be problematic. In this study, it was desirable to investigate growth, metabolic activity and proteolytic activity in milk during storage at three different temperatures, by two different strains of *P. fluorescens*. If possible, this was supposed to be seen in relation to the practice in the dairy industry.

In this study both the two *P. fluorescens* strains ATCC 13525 and ATCC 17400 showed good growth in UHT milk, both at 4, 7 and 22 °C. The latter strain also showed strong proteolysis, mainly of casein protein by incubation at 22 °C. The proteinases were fairly heat stable. In milk with growth of strain B at 22 °C it was also possible to observe the biggest changes in the content of organic acids, free amino acids and volatiles. It became evident that both temperature and strain were important for the pattern that evolved in the milk. This points out the importance to strive to reduce the degree of contamination and keep a low temperature, and that good hygiene is crucial at every stage where milk is produced and processed.

Innhold

Forord	1
Sammendrag	2
Abstract	3
1. INTRODUKSJON.....	7
1.1 Råstoffet melk	7
1.2 Kontaminering og mikrobiell vekst.....	8
1.3 Forandringer i mikroflora.....	9
1.4 Psykrotrofe bakterier	10
1.5 <i>Pseudomonas</i>	12
1.6 Hydrolytiske enzymer	13
1.7 Kvalitet, ødeleggelse og kontroll.....	18
1.8 Hensikt	20
2. MATERIALER OG METODER	21
2.1 Bakteriestammer, prøvemateriale og dyrkningsforhold	21
2.2 For-tester av stammene	22
2.3 Inokulering og inkubasjon av melk, vekst og uttak.....	23
2.4 Mikrobielle og kjemiske analyser	25
2.4.1 Vekst av <i>Pseudomonas</i> i melk.....	25
2.4.2 Analyse av flyktige forbindelser (HSGC)	25
2.4.3 Analyse av organiske syrer og karbohydrater (HPLC)	26
2.4.4 Analyse av frie aminosyrer (HPLC).....	28
2.4.5 Analyse av flyktige stoffer (TDGCMS).....	29
2.5 Protein- og peptidanalyse (CE)	30
2.6 Kjeldahl-analyse av nitrogen- og proteininnhold i to utvalgte melkeprøver.....	31
2.7 Proteinaseaktivitet og peptidanalyse (CE).....	32
3. RESULTATER	35
3.1 Vekst av <i>Pseudomonas</i> i melk.....	35
3.2 Flyktige forbindelser (HSGC).....	37
3.3 Organiske syrer og karbohydrater (HPLC)	37
3.4 Frie aminosyrer (HPLC).....	42
3.5 Flyktige stoffer (TDGCMS).....	49
3.6 Protein og peptidanalyse (CE).....	52
3.7 Kjeldahl-analyser av nitrogen- og proteininnhold.....	59
3.8 Proteinaseaktivitet og peptidanalyse (CE).....	60
4. DISKUSJON	69
4.1 Vekst av <i>Pseudomonas</i> i melk.....	69

4.2 Metabolisme av <i>Pseudomonas</i> i melk	72
4.3 Organiske syrer.....	73
4.4 Flyktige forbindelser (HSGC og TDGCMS)	74
4.5 Protein- og peptidanalyse (CE)	77
4.6 Frie aminosyrer.....	84
4.7 Kjeldahl-analyser av nitrogen- og proteininnhold.....	85
4.8 Proteinaseaktivitet og peptidanalyse (CE).....	86
4.9 Oppsummering og avslutning.....	88
5. Videre arbeid	90
6. Referanser.....	91

Vedlegg på USB: totalt 6 stk.

1. Vekstkurver med rådata
2. HSGC, flyktige stoffer
3. HPLC, organiske syrer og karbohydrater
4. HPLC, frie aminosyrer
5. TDGCMS, flyktige stoffer
6. Kjeldahl-analyse, nitrogen- og proteininnhold

1. INTRODUKSJON

1.1 Råstoffet melk

Kumelk, så vel som melk fra andre pattedyr, er opprinnelig ment som en komplett næring som skal sørge for tilstrekkelig vekst i løpet av det nyfødte avkommets første levetid. Melk er av den grunn et komplekst sammensatt og svært næringsrikt stoff.

Den nøyaktige sammensetningen vil av naturlige årsaker variere noe, men ifølge Walstra et al. (2014) består fersk kumelk (ikke melk fra syke kuer, råmelk eller lignende) omtrentlig og hovedsakelig av 87,1 % vann, 4,6 % laktose, 4,0 % fett og 3,3 % protein, i tillegg til mindre mengder salter, organiske syrer, nitrogenholdige komponenter, vitaminer og andre komponenter. Fettet foreligger i melkeserumet som relativt store fettglobuler med en tynn ytre membran. Melk er derfor en olje-i-vann-emulsjon (Walstra et al. 2014).

Melkeproteinet består hovedsakelig av 80 % kaseinprotein (omtrent 27 g/L) og 20 % myseprotein (fra 4 til 7 g/L). Kaseinproteinene klassifiseres etter aminosyresammensetningen som α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein, og forholdet mellom dem er henholdsvis 3:1:3:1.

Kaseinproteinene foreligger i melken i en kolloidsuspensjon av proteinkomplekser kalt miceller. Micellene inneholder i tillegg uorganisk kalsium og fosfat som stabiliserer strukturen, i tillegg til vann og svært små mengder enkelte andre komponenter (delvis nedbrutt β -kasein, enzym, andre salter). Mens kaseinmicellene feller ut ved pH 4,6 og 20 °C, forblir myseproteinene løselige i melken i globulær molekylform. Myseproteinene, eller serumproteinene, består av hovedsakelig av β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serumalbumin og immunoglobiner (McKellar 1989; Walstra et al. 2014).

Fersk melk er også et biologisk aktivt produkt med en rekke naturlig iboende enzymer. Melken er i hovedsak steril når den skilles ut fra kuas melkekjertler (med mindre dyret har en infeksjon), men vil allerede i juret kontamineres noe med bakterier som har entret spenekanalene. De vanligste typene av forurensingsbakterier forbundet med jurets indre er *Staphylococcus ssp.*, *Micrococcus* og *Corynebacterium bovis*. Bakterietallet i melken rett etter hygienisk mekanisk melking vil variere fra ku til ku, og kan ligge på alt fra nesten ingen ting til så mye som 15.000 CFU/mL (der CFU = «colony-forming units»/kolonidannende enheter) (Bylund 2003; Muir & Banks 2003; Quigley et al. 2013; Walstra et al. 2014).

1.2 Kontaminering og mikrobiell vekst

Etter at melken har forlatt juret og under videre bearbeiding vil graden av kontaminering vanligvis øke. I følge Walstra et al. (2014) vil bakterietallet i fersk melk fra friske kuer vanligvis ligge under 100 CFU/mL gitt aseptisk melking, og i blandet melk etter god hygienisk melking på rundt 10.000 CFU/mL eller lavere. Er derimot hygienestandarden dårlig, kan bakterietallet nærme seg så mye som en million CFU/mL melk.

Kilder til bakteriene i melk fra friske dyr kan være mange, slik som fôr, jord og møkk, i tillegg til spener og jur som nevnt. Å sørge for at jur og andre hudoverflater til enhver tid er så rene som mulig er derfor vesentlig, og understreker viktigheten av å vedlikeholde god hygiene og renslighet i fjøset. Den største graden av kontaminering stammer gjerne fra melke- og lagringsutstyr på gården og fra utstyr under transport til meieriet. Den viktigste årsaken er utilstrekkelig rengjorte overflater i utstyret, hvor til og med svært små gjenværende melkeforekomster kan fungere som grosted, spesielt for psykrotrofe bakterier. Rester av melk (og vaskevann) vil fort kunne inneholde 10^9 bakterier per mL, noe som betyr at bakterietallet i 100 L fersk melk vil øke med hele 10.000 CFU/mL dersom den kontamineres med bare 1 mL melkerester (Hantsis-Zacharov & Halpern 2007; McPhee & Griffiths 2002; Walstra et al. 2014).

Pasteurisering eller annen type varmebehandling på meieriet skal i hovedsak inaktivere bakterier som er til stede i melk, men ofte inntreffer rekontaminering av melken i ulik grad. Biofilm kan være en slik vedvarende kilde til kontaminering i meieriindustrien og stammer ofte fra mangelfull rengjøring. Begroing av slike «samfunn» av bakterier i utstyret kan være vanskelig både å oppdage og bli kvitt. Pasteurisering vil heller ikke være tilstrekkelig for å drepe varmem stabile bakteriesporer som kan ha havnet i melken, og kan i motsetning heller føre til aktivering av sporene. Disse kan ha evnen til å vokse frem i kjølelagret melk etter varmebehandling dersom de stammer fra psykrotrofe bakterier. Enkelte typer bakterier er dessuten termotolerante, noe som innebærer at de i større grad tåler høye temperaturer og dermed kan overleve visse typer varmebehandling (Quigley et al. 2013; Samaržija et al. 2012; Simões et al. 2010; Walstra et al. 2014).

I tillegg til å være et næringsrikt medium, har melk også høy vannaktivitet og relativ nøytral pH. Dette medfører gode vekstforhold for mange typer mikroorganismer (Quigley et al. 2013). I følge Bylund (2003) grupperes gjerne bakterier med evne til å vokse i melk som

melkesyrebakterier, koliforme bakterier, smørsyrebakterier, propionsyrebakterier og forråtnelsesbakterier. Det er også svært mange bakterier som *kan* finnes i melk, men som forekommer mer tilfeldig. Disse har ofte begrensede vekstmuligheter og vil utkonkurreres.

Næringsstoffene bakteriene har behov for kan være direkte tilgjengelige for dem, eller må i større eller mindre grad først brytes ned for å kunne utnyttes som næring. Enkelte bakterier klarer for eksempel ikke å benytte laktose som energikilde, mens andre krever frie aminosyrer som nitrogenkilde, noe som dermed kan medføre helt ulik metabolsk aktivitet fra bakterier til bakterie (Quigley et al. 2013; Walstra et al. 2014). Dette er også årsaken til at mange bakterier, spesielt forråtnelsesbakterier, produserer forskjellige typer ekstracellulære enzymer. Eksempler er proteinaser og lipaser som kan hydrolysere henholdsvis proteiner og fett i flere ledd til mindre og mindre komponenter. Slik sørger bakteriene for å gjøre de næringsstoffene som er nødvendige for egen vekst tilgjengelige for seg selv (Bylund 2003).

Mikrofloraen i råmelk kan ifølge Quigley et al. (2013) være svært kompleks, og sammensetningen vil kunne variere avhengig av blant annet årstid og fôrtype, geografisk opprinnelse, besetningens laktasjonsstadier og praksis for melking og rengjøring som utøves på gården, for å nevne noe. Den samme utfyllende artikkelen viser også til en rekke studier som har blitt gjort for å undersøke både mikrofloraen til stede i melk og mulige kilder til disse bakteriene, og samtidig at en stor andel av bakterieartene som har blitt detektert ved hjelp av nyere DNA-sekvenseringsteknologier i disse studiene ennå ikke er isolert og karakterisert. Dette understreker altså den bakterielle mangfoldigheten i og rundt melk, og at denne er mye større enn tidligere antatt.

1.3 Forandringer i mikroflora

Kort tid etter melking som er gjennomført under gode betingelser for hygiene, har studier vist at den dominerende floraen i råmelken består av Gram-positive bakterier av slektene *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* og *Corynebacterium*. Psykrotrofe bakterier er opprinnelig ikke en del av jurets mikrobiota og utgjør vanligvis mindre enn 10 % av overnevnte flora i fersk melk. De psykrotrofe bakteriene stammer fra kontaminering under og etter melking, og å unngå dette i praksis er vanskelig (McPhee & Griffiths 2002; Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997).

Sammensetningen av melkens mikroflora vil imidlertid ikke være konstant, men dynamisk og vil over tid kunne forandre seg. Spesielt endret, og bedret, den bakterielle kvaliteten seg fra og med 1950-tallet da kjøling og kjølelagring av melk ble implementert som obligatorisk prosesseringstrinn i forbindelse med behandling av melk i industrialiserte land (Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997). Fremdeles kjølelagres melk, både under lagring før behandling, under transport, håndtering og prosessering, på utsalgssted og hjemme hos konsument, og det fokuseres på å opprettholde en ubrutt kjølekjede. Trenden som har utviklet seg i meieriindustrien siden har også innebåret en utvidet lagringstid, både på gården, under transport og på meieriet. Dette skyldes blant annet sentralisering av meieriene og sjeldnere henting, som igjen skyldes økonomiske årsaker (Adams et al. 1976; Humbert et al. 1985).

I Norge ser man de samme trendene, illustrert blant annet i TINE SAs årsrapporter. Her vises det for eksempel til at selskapet ved inngangen av 2015 hadde 31 meierier, mens at det 10 år tidligere hadde over 50 produksjonsanlegg. TINE viser også til nødvendighetene med effektivisering og bedre ressursutnyttelse, og knytter også nedgangen i meierier med nedgangen i antall produsenter. Det bekreftes at det i senere tid har blitt færre og større melkebruk med både flere kyr per gård og økt produksjon per ku, og at TINE derfor til stadighet må legge om og effektivisere inntransporten av melken. Norsk landbrukspolitikk etterstreber dessuten å tilrettelegge for bosetting og bevaring av kulturlandskap og landbruk i distriktene, og på grunn av Norges geografi må det dermed påberegnes en del transport for å frakte råvarer over lengre distanser (fra produksjonssted til bearbeiding), slik som melk fra gårdene til meieriene. I TINE SAs siste årsrapport påpeker selskapet selv også hvordan de er med på å påvirke det ytre miljøet og klimagassutslippet i negativ retning grunnet en økende transportvirksomhet, men at de stadig jobber med nye strategier og tiltak for blant annet å redusere utslipp og gjøre distribusjonen mer klimavennlig (TINE SA 2005; TINE SA 2012; TINE SA 2014).

1.4 Psykrotrofe bakterier

Med innføring av kjølelagring forbedret melkens holdbarhet seg vesentlig da vekst av mesofile og termofile bakterier ble begrenset, og dermed også blant annet forekomsten av uønsket syring av melkesyrebakterier (Law 1979). En lagringstemperatur på rundt 4 °C fører imidlertid til en seleksjon for en psykrotrof flora. Det skjer en endring i den mikrobielle sammensetningene da Gram-positive og -negative psykrotrofe bakterier som er til stede i

melken får muligheten til å vokse frem og dermed erstatter den opprinnelige dominante Gram-positive mesofile floraen. Uavhengig av graden av psykrotrof kontaminering, kan en psykrotrof flora likevel bli dominerende i melk innen 24 timer ved 4 °C. I kjølelagret ubehandlet melk vil denne floraen kunne utgjøre rundt 70 til mer enn 90 % av den totale mikrobiologiske populasjonen (Lafarge et al. 2004; Quigley et al. 2013; Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997).

Betegnelsen psykrotrof betyr kuldetolerant, og benyttes om bakterier som har evne til vekst og reproduksjon ved 7 °C eller lavere, uavhengig av bakterienes optimumstemperatur (som gjerne ligger mellom 20 og 30 °C). Denne evnen skyldes at bakteriene har mulighet for å endre fettsyresammensetningen i cellemembranen, slik at fluiditeten, og dermed også aktiviteten deres, opprettholdes selv om temperaturen synker. Psykrotrofe bakterier ser dessuten ut til bedre å tåle miljøforandringer, og man tror at deres intracellulære organisering gjør dem mer robuste mot kulde. I tillegg vil lav temperatur føre til mer løselig oksygen, noe som disse bakteriene utnytter godt (Birkeland 1987; Bylund 2003; Samaržija et al. 2012).

Psykrotrofe bakterier forekommer de fleste steder i naturen, slik som i jord, vann, vegetasjon og på dyr, og noen få kan også finnes i luft. Fordi de fleste i tillegg har evnen til å feste seg til faste overflater, spesielt rustfritt stål, er det disse bakteriene som ofte danner biofilm, til tross for vask og desinfeksjon (McPhee & Griffiths 2002; Samaržija et al. 2012; Simões et al. 2010).

En rekke studier har blitt gjort for å undersøke mikrofloraen i kjølt ubehandlet melk i den første tiden etter melking (0-48 timer). Hantsis-Zacharov og Halpern (2007) viste i sin studie at psykrotrofe bakterier isolert fra kjølelagret melk besto av både Gram-positive og -negative bakterier tilhørende de sju taksonomiske klassene *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteria* og *Sphingobacteria*. De tre førstnevnte klassen utgjorde en dominerende andel av de totale funnene. I samme studie fant de også at rundt 20 % av isolatene så ut til å være nye arter. De mest forekommende Gram-negative bakterieslektene har vist seg å være *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* og *Flavobacterium* (Hantsis-Zacharov & Halpern 2007; Lafarge et al. 2004; Raats et al. 2011).

1.5 *Pseudomonas*

Pseudomonas er den bakterieslekten som vanligvis er forbundet med og dominerer når ødeleggelse av kjølelagret ubehandlet eller pasteurisert melk inntreffer. For eksempel viste Adams et al. (1975) at 70-90 % av de isolerte bakteriene fra ubehandlet melk lagret ved 4 °C i en uke var av denne slekten, mens Craven og Macauley (1992) i sine studier viste at tilsvarende tall var 87 % i pasteurisert melk (Chen et al. 2003; McPhee & Griffiths 2002; Sørhaug & Stepaniak 1997).

Pseudomonader er Gram-negative, stavformede, aerobe bakterier som beveger seg ved hjelp av polare flageller. Slekten har høy genetisk diversitet og er metabolsk allsidig, og fordi slike bakterier også er tilpasningsdyktige og klarer å overleve i mange forskjellige miljøer, finnes de «overalt». De er ikke-fermentative, men katalase- og ofte oksidase-positive. Som de fleste andre psykrotrofe bakterier har også disse evne til å feste seg til og leve på faste overflater, som for eksempel på redskap og utstyr. Sammenlignet med andre bakterier er i tillegg generasjonstiden kort, til tross for temperaturer på 0 til 7 °C (så kort som under 4 timer). I studier gjort av Mayerhofer et al. (1973) viste for eksempel generasjonstiden til *P. fluorescens* P26 seg ved 4, 10 og 21 °C å være henholdsvis 10, 5,5 og 4,5 timer. Også Lebert et al. (1998) undersøkte gjennomsnittlig generasjonstid hos et utvalg av *P. fluorescens* og *P. fragi* under vekst på kjøttmedium, og fant at ved 7, 16 og 25 °C (og vannaktivitet a_w lik hhv. 0,970, 0,987 og 1) lå denne på rundt henholdsvis 9,5, 2 og 0,7 timer. Enkelte av artene i slekten har også den laveste teoretiske minimumsveksttemperatur (-10 °C). Ved lave temperaturer er *Pseudomonas*' lag-fase kort, mens den stasjonære fasen kan være svært lang. Dette gjør at bakteriene kan overleve lenge i melkerester (McPhee & Griffiths 2002; Samaržija et al. 2012; Scatamburlo et al. 2015; Simões et al. 2010; Sørhaug & Stepaniak 1997).

I næringsmiddelindustrien er *Pseudomonas* altså en type bakterier spesielt forbundet med kontaminering og utilstrekkelig renhold. Ytterligere forverrende er det dessuten dersom bakteriene som er til stede i melkerester som blandes inn i ny, fersk melk, er i ferd med å gå inn i eksponentiell vekstfase. Dette vil avhenge av hvor langt bakteriene har kommet i lagfasen (tilpasningsfase), men kan ofte være realistisk med tanke på blant annet intervallene melk hentes i på gården. Samtidig skal det også sies at selv om hygienen er svært god, er det som tidligere nevnt nesten uunngåelig at det i praksis likevel forekommer noe kontaminering med små bakteriemengder. Blant annet kan sprekker, overganger, pakninger og dårlig

designet anlegg bidra til vanskeligere vask og mindre effektiv desinfeksjon (McPhee & Griffiths 2002; Sørhaug & Stepaniak 1997).

Pasteurisering eller annen type varmebehandling praktiseres når melken ankommer meieriet og innebærer å utsette melken for en gitt temperatur i en gitt tid. En vanlig type behandling er HTST (high-temperature, short-time) hvor temperatur-tid-kombinasjonen er 72 °C i 15 sekunder. Den viktigste hensikten er som tidligere nevnt å redusere antallet kvalitetsforringende og/eller sykdomsfremkallende bakterier. Dette medfører en forlenget holdbarhet og at melken er trygg for forbruker å konsumere (Quigley et al. 2013).

Selv om pasteuriseringen dreper *Pseudomonas* ssp. og andre psykrotrofe bakterier, er det likevel disse bakteriene som vanligvis isoleres fra pasteurisert melk. Dette skyldes rekontaminering etter pasteurisering, og kan forekomme i forbindelse med blant annet tapping. I følge MCPhee og Griffiths (2002) er *Pseudomonas fluorescens* en dominerende art i forbindelse med ødeleggelse av både ubehandlet og pasteurisert melk. Også denne finnes både i jord og vann, og navnet stammer fra artens evne til å produsere det fluoriserende pigmentet pyoverdin (McPhee & Griffiths 2002; Samaržija et al. 2012).

Ifølge Sørhaug og Stepaniak (1997) vil rekontamineringsmengden av psykrotrofe bakterier korrelere bedre med melkens holdbarhet, enn det totale bakterietallet i nylig pasteurisert melk. Graden av rekontaminering er derfor en viktig begrensende faktor med tanke på holdbarhet. I artikkelen deres illustreres dette med et eksempel på hvordan rekontaminering med kun 1 CFU/mL *Pseudomonas* spp. teoretisk sett kan føre til en kvalitetsødeleggende mengde på $3 \cdot 10^7$ CFU/mL i løpet av bare 10 dager, dersom generasjonstiden ved 4 °C er 9,4 timer.

1.6 Hydrolytiske enzymer

Flere arter av slekten *Pseudomonas* og de fleste andre psykrotrofe bakterier har evnen til å produsere og skille ut hydrolytiske enzymer. Ulike typer enzymer kan bryte ned viktige bestanddeler i melk, og én bakterieart kan ofte produsere flere forskjellige slike enzymer. Dette er som nevnt for at bakterien skal skaffe seg tilstrekkelig med riktige typer næringsstoffer for vekst. I forbindelse med kvalitetsforringelse og økonomiske tap knyttet til meieriprodukter er spesielt hydrolytiske varmemestabile enzymer produsert av *Pseudomonas* ssp. og *Bacillus* ssp, slik som proteinaser, lipaser og fosfolipaser, et hovedproblem (McKellar 1989; Samaržija et al. 2012).

Om bakterier har evne til å produsere ekstracellulære enzymer, og i så fall hvilke(n), vil også være stammeavhengig. Samtidig vil også mengdene av enzym som produseres avhenge av en rekke faktorer som regulerer enzymproduksjon. Blant annet vil bakteriens vekstfase, tilgangen til næring, pH, temperatur og tilstedeværelse av oksygen være av betydning (Juffs et al. 1968; McPhee & Griffiths 2002). Ulike resultater for når i vekstfase maksimal enzymproduksjon inntreffer har blitt rapportert. Enkelte studier har funnet at dette skjer tidlig i log-fase parallelt med vekst, men flertallet viser heller til at dette skjer i sen logaritmsk fase og/eller tidlig stasjonær fase, eller i kulturer som har nådd 10^8 CFU/mL (Chen et al. 2003). I følge Sørhaug og Stepaniak (1997) vil ekstracellulære enzymer skilles ut hovedsakelig på slutten av log-fase, mens Juffs et al. (1968) i sine studier viste hvordan proteolytisk aktivitet ikke nødvendigvis er proporsjonal med vekst hos flere arter av *Pseudomonas*. Dette ser ut til å være avhengig av blant annet stamme og vekstmedium (McKellar 1989). Mange studier har blitt gjort, og for ulike stammer av *P. fluorescens* har det flere ganger blitt vist at høyest proteinaseproduksjon inntreffer ved temperaturer (15-20 °C) lavere enn temperaturene som gir den høyeste bakterieveksten (25-30 °C). Blant annet viste Gügi et al. (1991) etter undersøkelser av en stamme av *P. fluorescens*, at maksimal proteinaseproduksjon for denne bakterien inntraff ved 17,5 °C, og at denne aktiviteten da var dobbelt så høy som ved både 8 °C og 30 °C (Gügi et al. 1991; Juffs et al. 1968; McKellar 1982).

I motsetning til melkens iboende enzymer og *Pseudomonas*-bakteriene selv, er de bakterielle enzymene som oftest svært varmostabile. Dette innebærer at de bakterieproduserte enzymene i stor grad forblir aktive, til tross for varmebehandling. Akkurat som hos bakteriene som produserer dem, kan også enzymene fungere ved lave temperaturer (Cempírková & Mikulová 2009; Law 1979; McPhee & Griffiths 2002; Samaržija et al. 2012).

Etter pasteurisering (72 °C i 15 sekunder) vil gjerne rundt 60-70 % av aktiviteten bevares hos enzymer produsert av *Pseudomonas* ssp.. Også til tross for sterilisering av melk, der temperaturen melken utsettes for er vesentlig høyere (f.eks. 138 °C i 2 sekunder eller 149 °C i 10 sekunder), er det påvist hvordan et stort antall av enzymene er i stand til å forbli aktive. Så mye som 30-40 % av aktiviteten kan bestå etter slik sterilisering (Samaržija et al. 2012).

De fleste artene av *Pseudomonas* produserer én type proteinaser. Disse er typiske sink-metalloenzymer med nøytral eller basisk optimums-pH (~7 eller 8-9), og vanligvis med molekylmasse rundt 40-50 kDa. McKellar (1989) viser i tillegg til flere studier som påpeker at enzymene også er aktive ved pH 6 og ved temperaturer på 4 °C, at pI kan variere mye (5,1 til

8,8) og at de er monomerer bestående av én enkelt polypeptidkjede. De har et høyt innhold av hydrofobe aminosyrer og mangler sulfhydrylgrupper, som vil si at de derfor ikke danner interne svovelbroer. Optimumstemperaturen ligger gjerne ved 30 til 45 °C, mens ved temperaturer som overskrider 50-60 °C vil de ikke lenger være aktive. Proteinaser fra *P. fluorescens* er den mest tallrike gruppen av proteinaser fra psykrotrofe bakterier, men samtidig inkluderer den likevel de enzymene med størst homologi (Chen et al. 2003; Sørhaug & Stepaniak 1991).

Christen og Marshall (1984) undersøkte i sin studie utvalgte egenskaper hos *P. fluorescens* P27 isolert fra melk, og fant lignende resultater. De rapporterte at proteinaseaktiviteten var høy ved pH 6 til 8, men høyest ved pH 6, og at optimumstemperaturen for samme proteinase var nær 37 °C. Aktiviteten var fortsatt relativt høy ved 5 °C, og ble svakt redusert ved temperatur like over 45 °C. De undersøkte også effekten av ulike medier, og observerte at typene av medier som ble benyttet her ikke hadde effekt på proteinasens aktiveringsenergi. Det de imidlertid så var at bakteriestammen ga endring i medienes pH mens den vokste, og at pH-en i alle de tre mediene økte til omtrent samme verdi, selv om start-pH var ulik for de tre. Forfatterne foreslår at årsaken kan være at bakterien produserte dekarboksylaseenzym, som har evnen til å hydrolysere den høye konsentrasjonen av aminosyrer som var til stede i mediene til aminer (Christen & Marshall 1984).

En annen *P. fluorescens*-stamme, AR-11, ble undersøkt av Alichanidis og Andrews (1977), som fant at aktiviteten hos bakteriestammens ekstracellulære proteinase var optimal rundt 35-37 °C og at den fortsatt var relativt aktiv ved lav temperatur. I denne studien ble det rapportert at 33 % av den maksimale aktiviteten fremdeles ble uttrykt ved 4 °C, og 72 % ved 20 °C. Også Mayerhofer et al. (1973) har karakterisert egenskaper hos en stamme av *P. fluorescens* kalt P26, og fant at optimale forhold for enzymproduksjon ved bakterievekst i dette forsøket var i BHI-buljong ved pH 7,5 og temperatur på 21 °C. For denne stammen og ved disse forholdene var proteinaseproduksjon ved 21 °C klart overlegen produksjon ved både 10, 32 og 37 °C.

De aller fleste proteinaser produsert av *Pseudomonas* ssp. er ekstremt varmestabile, og enkelte kan til og med være stabile selv etter at melk har vært varmet opp til og holdt ved 100 °C i 30 minutter. Høye temperaturer over tid vil kunne eliminere en del av de aktive enzymene, men så kraftige og/eller vedvarende varmebehandlinger av melk vil uansett mest sannsynlig føre til uakseptabelt og ødelagt produkt. Dette bekreftes blant annet av Alichanidis og Andrews (1977), som gjorde studier på varmeinaktivering av isolert proteinase fra *P.*

fluorescens, og fant at varmebehandling med høy temperatur (130 °C i 25 sekunder, 140 °C i 17 sekunder eller ved 150 °C i 8,5 sekunder) før inkubering ved 35 °C med substrat, ga 50 % inaktivering. Mayerhofer et al. (1973) rapporterte at proteinase produsert av *P. fluorescens* P26 krevde hele 9 minutter ved 120 °C for 90 % reduksjon i aktivitet.

En medvirkende årsak til at mye av aktiviteten bevares, kan være at kalsiumioner og melkeprotein skaper en viss stabiliserende effekt. De store mengdene protein og oppløst kalsiumsalt som finnes i melken vil dermed kunne føre til bedre beskyttelse mot både autoproteolyse (selvnedbrytning) og denaturering (utfolding av tredimensjonal struktur) av proteinasene. At både myse, kasein og spesielt melk hadde en signifikant beskyttende effekt sammenlignet med vann, bekreftes blant annet i studier tidligere omtalt gjort av Mayerhofer et al. (1973). Ett unntak kan ses ved temperaturvinduet 55-60 °C, hvor det har blitt registrert hvordan mange av proteinasene blir inaktive. Årsaken skyldes imidlertid at det dannes et enzym-kasein-kompleks i melken, og ikke autoproteolyse (Chen et al. 2003; McKellar 1989; McPhee & Griffiths 2002; Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997).

En konsekvens av aktive ekstracellulære proteinaser produsert av psykrotrofe bakterier i ellers steril melk, er koagulering eller dannelse av gel under lagring. Dette skjer som følge av proteinasenes evne til å hydrolysere κ -kasein, α_{S1} -kasein og β -kasein, som fører til fysisk destabilisering av det kolloidale systemet. Samtidig vil melkens lukt og smak forringes, og kan oppleves som blant annet uren, bitter og/eller gjæret. Proteinase har imidlertid lav aktivitet på ikke-denaturert myseprotein (McPhee & Griffiths 2002; Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997).

De bakterielle lipasene vil kunne hydrolysere melkefett til frie fettsyrer og føre til nedsatt fettkulestabilitet. Også disse komponentene resulterer i endret lukt og smak på melken, og vil kunne prege spesielt fettrike meieriprodukter. Fosfolipaser slik som lecitinase, er en gruppe hydrolyserende lipaser som er i stand til å ødelegge fettglobulmembranen. Når fosfolipasene hydrolyserer melkefett og lecitin, vil fett og frie fettsyrer lekke ut fra fettglobulene til melkens serum og der være tilgjengelig for andre lipaser. Destabiliserte fettglobuler vil i tillegg føre til redusert emulsjon. Meieriprodukter med økt innhold av frie fettsyrer kan oppleves som harske, urene, bitre og/eller med smak av såpe. Harskheten skyldes kortkjedede frie fettsyrer med kjedelengde på 4 til 8 karbonatomer, mens såpet, bitter og uren smak skyldes frie fettsyrer med medium kjedelengde (10-12 karbonatomer). De lengre fettsyrene med 14-18 karbonatomer vil derimot ikke gi smak. Det har blitt rapportert at forandring i smak blir

tydelig når konsentrasjonen av frie fettsyrer i melken overskrider mellom ca. 8,0 g/kg (medium kjedelengde, C8) til 27,5 mg/kg (kort kjedelengde, C4) (Samaržija et al. 2012).

Bakterietallet og den proteolytiske aktiviteten i melk trenger som tidligere beskrevet nødvendigvis ikke å samsvare med hverandre, og det er derfor behov for metoder for å påvise grad av proteolytisk aktivitet og slik kunne forutsi potensialet for ødeleggelse av melkeprodukter. Det finnes mange metoder og varianter for deteksjon av proteolytisk aktivitet fra psykrotrofe bakterier, med forskjellig sensitivitet, hurtighet, pålitelighet og anvendelse.

En av de eldre metodene er diffusjonsanalyse, hvor enzymaktivitet resulterer i klaringssoner på turbid melkeagar, kaseinagar eller lignende. Klaringssonene oppstår dersom enzymer, som er i stand til å hydrolysere og løse opp proteinet i agaren, er til stede i tilsatt prøve. Jo høyere enzymkonsentrasjon i prøvematerialet som testes, jo raskere og/eller større sone oppstår rundt kolonien under inkubering (McKellar 1989; Saran et al. 2007).

Det finnes også mange metoder som baserer seg på deteksjon av proteolytiske produkter fra proteinsubstrater. Først behandles prøven som skal undersøkes ved å fjerne eventuelt løselig substrat som ikke er degradert ved hjelp av felling med trikloreddiksyre (TCA), før filtrering eller sentrifugering av prøven for å separere vekk det utfelte substratet fra de løselige proteolytiske produktene. Deretter følger kvantitativ bestemmelse av enzymaktivitet ved å måle mengde nedbrutt substrat i TCA-løselig fraksjon. De proteolytiske produktene kan for eksempel detekteres direkte med UV-absorpsjon eller indirekte ved videre reaksjon med for eksempel ninhydrin (kolorimetrisk metode) eller fluoriserende reagenser (fluorimetrisk metode). Mengden av proteolytisk produkt gir et mål på mengden proteinase til stede. Et eksempel på en spektrofotometrisk metode som har blitt mye benyttet er Hulls metode, som baserer seg på kvantifisering av fritt tyrosin og tryptofan (Hull 1947). Andre metoder baserer seg på deteksjon av proteolytiske produkter fra proteinderivater. I disse tilfellene modifiseres proteinsubstratet før degradering av enzym inntreffer, for eksempel ved kovalent bundet farge (for eksempel azokasein), radioaktiv merking, protein merket med fluoriserende kjemikal eller protein merket med enzym (Anson 1938; Christen 1987; McKellar 1989).

Mange av metodene nevnt hittil har blitt forbedret og forandret med tiden og tilpasset etter behovene i hvert enkelt tilfelle, for eksempel den fluorimetriske metoden beskrevet av Francoeur et al. (2001). Blant annet påpeker McKellar (1981) at å avgjøre proteolysegrad

basert på mengde frigjort tyrosin, slik som i Hulls metode, er en lite sensitiv metode da proteolytiske nedbrytningsprodukter i melk kan mangle tyrosin. Til tross for stadige forbedringer er flere av metodene fremdeles tidkrevende og mangler høy sensitivitet. I senere tid har det derimot blitt utviklet og tatt i bruk immunologiske metoder, slik som RIA (radioimmunoassay) og ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Disse analysemetodene er relativt hurtige og sensitive, og skiller seg vesentlig fra de overnevnte da de måler mengde proteinase til stede og material-antigenisitet relatert til disse proteinasene (sammenhengen mellom antigen og antistoff). Et eksempel på en variant av en slik analysemetode er beskrevet av Matta og Punj (2000), som har vist hvordan det er mulig å utvikle typer av ELISA som kan benyttes for å detektere blant annet proteinaser produsert av *Pseudomonas* i melk.

Grad av og mønster i proteinnedbryting relatert til proteinaseaktivitet kan også undersøkes ved bruk av ulike varianter kapillærelektroforese (CE) og HPLC, som beskrevet av blant annet Heck et al. (2008), Glatz (2006) og Recio et al. (1996). Det finnes alltid fordeler og ulemper tilknyttet de forskjellige metodene, og hvilken som bør velges og er best egnet, må vurderes ut ifra hvert enkelt tilfelle. For deteksjon av lipaser og fosfolipaser er det også utviklet og benyttet en rekke metoder, mange av dem med de samme prinsippene som beskrevet ovenfor for analyse av proteinaseaktivitet (McKellar 1989).

1.7 Kvalitet, ødeleggelse og kontroll

Vekst av psykrotrofe bakterier eller sporer som germinerer i melk og andre meieriprodukter er en viktig årsak til at disse produktene får en uakseptabel kvalitet. De psykrotrofe bakteriene vil som beskrevet hovedsakelig kunne føre til både redusert protein- og fettkulestabilitet, økt svinn i produksjon av meieriprodukter og feil tilknyttet konsistens, tekstur, farge, smak og lukt (Birkeland 1987).

Ifølge Walstra et al. (2014) kan det være skadelig for et meieriprodukt dersom antallet psykrotrofe bakterier kommer opp i 10^5 per mL melk, mens smaksdefekter kan oppstå først når tallet overstiger 10^7 . Sørhaug og Stepaniak (1997) rapporterte i sin artikkel at ødeleggelse av pasteurisert melk inntreffer ved psykrotroftall på rundt 6-7,5 log CFU/mL, og som nevnt også hvordan disse grensene vil kunne nås relativt raskt når slik kontaminering først har funnet sted. Nøyaktig hvor store mengder som trengs før endringer i melken kan påvises, vil variere både mellom ulike slekter og ulike arter. I den forbindelse kan det faktisk se ut til

at antall bakterier ikke er like viktig som type bakterie. Da varmemestabile proteinaser og andre bakterielle ekstracellulære enzymer aktivitet i melk kan føre til både sensorisk og funksjonell ødeleggelse av melk både før og etter varmebehandling, betyr kvalitetsforringelse av melk altså nødvendigvis ikke at levende bakterier må være til stede når nedbrytning av melkens komponenter begynner og ødeleggelse til slutt inntreffer. Dette betyr også at melkens innhold av psykotrofe bakterier før varmebehandling og prosessering vil ha betydning for det ferdige produktets holdbarhet grunnet enzymproduksjon, og at lagringstiden til ubehandlet melk bør minimeres (McKellar 1989; Samaržija et al. 2012; Sørhaug & Stepaniak 1997).

Uansett krever dette at det i meieriindustrien til enhver tid fokuseres på god hygiene og GMP («god tilvirkningspraksis»), og illustrerer hvordan grunnlaget for god kvalitet legges allerede på gården. McKellar (1989) påpeker dessuten at kunnskapen om de miljømessige og ernæringsmessige faktorene som påvirker psykotrofe bakteriers enzymproduksjon ennå er begrenset, og for å redusere og/eller eliminere disse typene enzym i meieriprodukter kan det derfor være nyttig med et større fokus på nettopp å skaffe slik kunnskap.

Næringsmiddelindustrien ønsker å stimulere til produksjon av råvarer med kvalitet i tråd med deres behov, og i dag har derfor meieriindustrien i mange land implementert ordninger der leverandørene får betalt avhengig av melkens kvalitet. I Norge blir all melk som mottas på meieriene kontrollert og analysert for blant annet celletall, totaltall, innhold av medisinerester og for unormal lukt eller smak. I tillegg til å sikre trygg melk av god kvalitet, gir slik kontroll faktiske retningslinjer som leverandørene kan forholde seg til. TINE SA opererer med gradering av mottatt rå melk, der klassifiseringen kan resultere i pristillegg eller –trekk til produsenten ved henholdsvis ekstra god og (svært) dårlig kvalitet. En rekke kriterier må oppfylles for at melken skal kunne mottas og benyttes til menneskekonsum, og er beskrevet i TINEs kvalitetsregelverk fra 1.1.15. For at melken skal kunne kalles elitemelk og gi pristillegg til TINE SAs leverandører, må den blant annet oppfylle krav både om celletall på 230.000 celler/mL eller lavere, og bactocount-tall på 100.000 BC/mL eller lavere. Meieriet vil ikke ta imot melk dersom et av disse tallene når eller overskrider 400 000 celler/mL eller BC/mL (Barbano et al. 2006; *TINE SAs kvalitetsregelverk* 2015). TINE SA benytter BactoCount for utregning bakterietall i kumelk, og omregningsfaktoren til CFU/mL som det opereres med i Norge er 5 (3,3 internasjonalt). Etter norsk omregning betyr dette at bakterietallene må være lik eller lavere 20.000 CFU/mL for elitemelk, og at melken ikke tas imot dersom tallet når eller overskrider 80.000 CFU/mL (Haug 2014).

1.8 Hensikt

Hensikten i denne oppgaven var å undersøke vekst og metabolsk aktivitet i melk over tid ved tre ulike temperaturer, hos to ulike stammer av *P. fluorescens*. Proteolytisk aktivitet av ekstracellulære proteinaser var av særlig interesse. Stammene ATCC 13525 og ATCC 17400 ble benyttet. Bakterieartens generelle mønstre skulle studeres, men de to stammene skulle også sammenlignes med hverandre for å se mulige likheter og forskjeller mellom stammer av samme art. Det var ønskelig å gjøre oppgaven tilnærmet faktiske forhold, for eksempel med tanke på inokulerte bakteriemengder, inkubasjonstemperaturer og –tider, for dermed også å kunne relatere funnene til meieriindustrien i praksis.

2. MATERIALER OG METODER

2.1 Bakteriestammer, prøvemateriale og dyrkningsforhold

To stammer av *Pseudomonas fluorescens* ble benyttet i forsøket: A) *P. fluorescens* ATCC 13525, og B) *P. fluorescens* ATCC 17400, der begge var blitt dyrket frem på *Pseudomonas* CFC agar på skål ved 22 °C i to døgn og levert fra A. L. Holck fra Nofima, Ås, Norge.

Podemateriale fra hver av stammene ble inokulert i rør med steril næringsbuljong (tillaget etter oppskrift for Nutrient Broth fra Oxoid, Hampshire, England, med ingrediensene Lab-Lemco-pulver, gjærekstrakt, Pepton og natriumklorid fra samme leverandør, autoklavert ved 121 °C i 15 minutter i Getinge autoklav, Oslo, Norge) og inkubert aerobt ved 22 °C i 24 timer. Deretter ble stammene igjen podet om til næringsbuljong i mengde tilsvarende 1 % (vol:vol, 0,05 mL:5 mL) og på ny inkubert aerobt ved 22 °C i 24 timer.

Bakteriekonsentrasjonen i hver kultur ble bestemt ved hjelp av platespredning. Det ble tillaget 10-ganger fortynningsrekke i rør med 9 mL steril Ringers løsning (tillaget fra Ringer tablett, Merck, Darmstadt, Tyskland) for hver stamme. Fra egnede fortynninger (-4, -5, -6 og -7) ble 0,1 mL spredt ut i parallell på skåler med steril, ferdigstøpt PCA (Plate Count Agar, Oxoid). Skålene ble inkubert ved 30 °C i 24 timer før registrering av antall fremvokste kolonier ble gjort på tellbare skåler. For å finne de to kulturenes bakteriekonsentrasjon, ble et vektet gjennomsnitt regnet ut basert på de skålene fra hver kultur som hadde et antall kolonier på mellom 30 og 300 stykk. Videre ble igjen prosessen for ompodning og inkubering repetert, slik at stammene var podet om totalt tre ganger med 24 timers intervaller.

For å sikre at det samme podematerialet ville bli benyttet i forsøkets tre deler, ble alt podematerialet som skulle benyttes til inokulering av melk opparbeidet på forhånd, fordelt i mange mindre enheter i passende mengde og konsentrasjon, og fryst ned. På grunnlag av platespredningene ble bakteriekonsentrasjonene for stamme ATCC 13525 og ATCC 17400 beregnet til å være henholdsvis $\sim 10^7$ og $\sim 10^8$ bakterier i 24-timers kultur. Stamme ATCC 17400 ble fortynnet i Ringers løsning (Merck) én gang (vol:vol, 1 mL:9 mL). Begge kulturene skulle dermed inneholde 10^7 bakterier per mL, og hver av kuturene ble videre fortynnet 100 ganger ved at 1 mL kultur ble overført til en flaske inneholdende 100 mL steril 15 % glyserol-næringsbuljong-blanding (forhold 50 mL:50 mL 30 % glyserol tillaget fra 85 % glyserol, Merck og sterilt vann, og næringsbuljong fra Nutrient Broth, Oxoid, tillaget som tidligere

beskrevet) (vol:vol, 1 mL:100 mL). De to glycerol-buljong-blandingene podet med hver sin bakteriestamme ble deretter overført til sterile eppendorfrør i mengder på 1,2 mL (totalt ca. 45 rør per stamme). Eppendorfrørene skulle etter denne prosedyren inneholde en bakteriekonsentrasjon på 10^5 bakterier, slik at senere prosedyre for inokulasjon av melk ville gi en ønsket startmengde av bakterier på ~ 3 log CFU/mL.

Fra et rør fra hver stamme ble det umiddelbart tillaget fortynningsrekke (-1, -2 og -3-fortynning) og gjort platespredning i parallell på PCA (-2, -3 og -4-fortynning) med påfølgende inkubering ved 30 °C i 24 timer. Dette ble utført for å kunne bekrefte vellykket fortynning og at eppendorfrørenes endelige bakteriekonsentrasjon virkelig var på 10^5 bakterier per mL, som planlagt. De resterende eppendorfrørene ble fryst ned og oppbevart ved -80 °C frem til bruk. 24 timer etter nedfrysing ble i tillegg ett rør fra hver stamme tint opp og igjen kontrollert for faktisk bakteriekonsentrasjon, ved å utføre fortynning, platespredning og inkubasjon som utført som beskrevet ovenfor ved test av ufryste rør.

For hver av de to stammene ble det tillaget og fryst ned tre Stock-kulturer, hvert rør bestående av 625 µL kultur og 625 µL 85 % glyserol (Merck). Stock-løsningene ble fryst ned og lagret ved -80 °C.

2.2 Før-tester av stammene

Før hovedforsøket ble de to stammene undersøkt med konfirmerende tester. Det ble utført Gram-farging etter Grams metode og mikroskopering av Gram-preparat (Leica DM750, Tyskland), og mikroskopering av våtpreparat (Leica). Våt- og Gram-preparatene viste for begge stammene henholdsvis stavformede bakterier i bevegelse, og rosafargede, stavformede bakterier som følge av Gram-negativitet.

Videre ga testing med 3 % kaliumhydroksid (Merck) et seigt prøvemateriale, som bekrefter Gram-negative bakteriestammer. Boblende/brusende prøvemateriale som følge av kontakt med 3 % hydrogenperoksid (Merck) bekreftet at bakteriene i de to kulturene også er katalasepositive. Ved testing med oksidasestrips (Microbiology Bactident Oxidase, Merck) som ga blått resultat, ble det vist at bakteriene fra begge stammene også er oksidasepositive. Avslutningsvis viste stammene seg i tillegg som fluoriserende på *Pseudomonas* CFC agar under UV-lys.

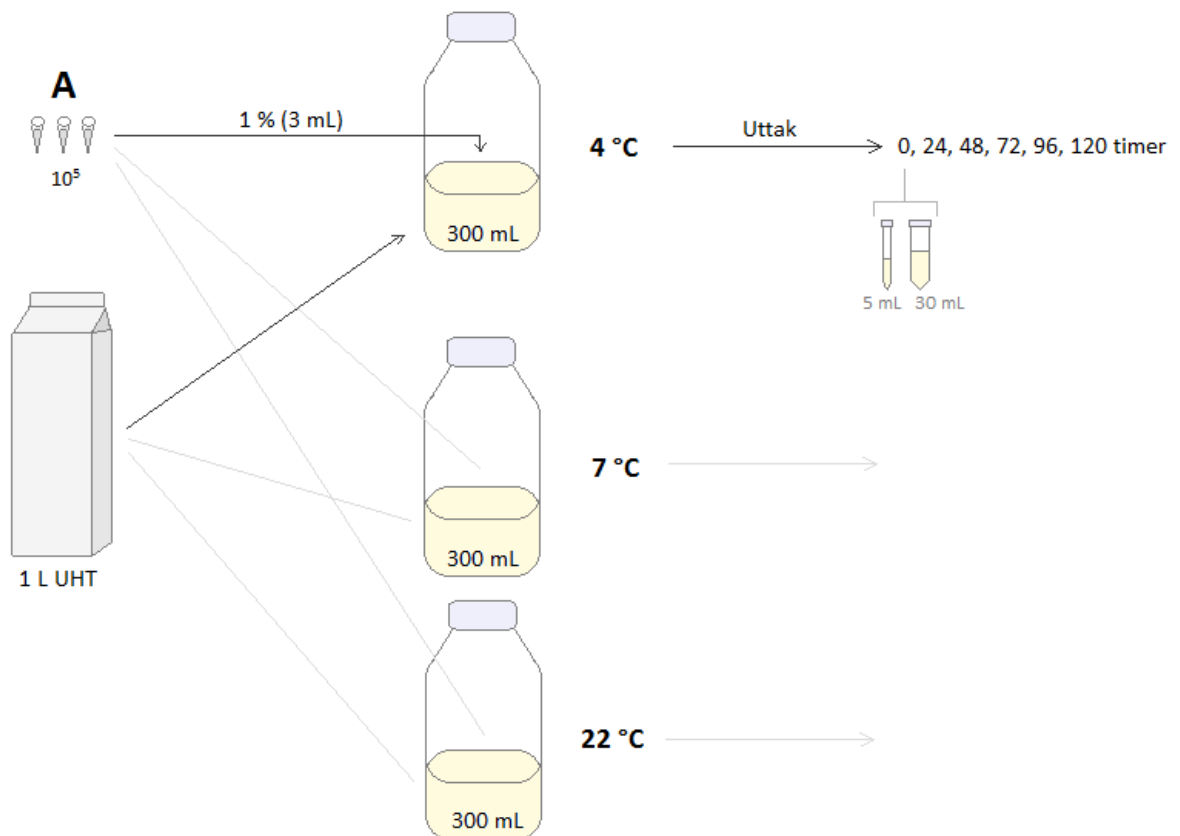
Det ble også undersøkt om de to 24-timer gamle bakteriekulturene viste evne til å proteolyserer melk. Hver stamme ble fortynnet og overflatespredt på melkeagar (-6, -7 og -8-fortynning), som var tillaget ved å blande steril, temperert Nutrient agar fra Oxoid, med temperert steril UHT-melk (Tine Langtidsholdbar Lettmelk) i forhold 1:10. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 3 døgn. Klaringssoner rundt fremvokste kolonier av stamme ATCC 17400 bekreftet proteolyse av melkeprotein grunnet bakterieproduserte, ekstracellulære proteinaser.

2.3 Inokulering og inkubasjon av melk, vekst og uttak

UHT-melk, Langtidsholdbar Lettmelk (1,2 % fett) produsert av Tine Meierier Østlandet, ble mottatt direkte fra leverandør i 1-liter Elopak Pure-Pak-kartonger. All melken benyttet var fra samme batch (best før 29.04.15), og ble lagret ved 4 °C frem til bruk.

Vekstforsøket ble utført i triplikate, og hver del av triplikaten innebar poding av melk med de to stammene ATCC 13525 («A») og ATCC 17400 («B»), aerob inkubasjon ved tre gitte temperaturer og regelmessig prøveuttak i totalt 120 timer. UHT-melk som skulle podes med én av bakteriestammene og benyttes som vekstmedium, ble tatt ut fra den samme 1-liter-kartongen og overført i mengder på 300 mL til tre sterile 1-L-glassflasker. Videre ble melken i de tre flaskene for den enkelte stammen direkte inokulert med bakteriekultur fra nylig opptinte eppendorfrør, i mengde tilsvarende 1 % (vol:vol, 3 mL:300 mL) for å oppnå en bakteriekonsentrasjon på $\sim 10^3$ bakterier i melken i hver flaske. De seks flaskene med melk podet med en av de to stammene ble deretter raskt fordelt på og overført til de tre temperaturene 4, 7 og 22 °C for inkubasjon (én flaske per stamme til hver sin temperatur: A + B ved 4 °C, A + B ved 7 °C og A + B ved 22 °C). To ganger daglig og ved prøveuttak, ble flaskene ristet grundig for hånd for å forsikre aerobt miljø. Under inkubering var korker noe løsnet opp slik at luft kunne slippe ut og inn av flaskene.

0-prøver ble tatt ut fra både én A- og én B-flaske umiddelbart etter poding. Videre prøveuttak ble gjort 5 ganger med 24-timers tidsintervall etter poding, det vil si 24, 48, 72, 96 og 120 timer etter poding, fra samtlige 6 flasker. Det ble også tatt ut blindprøve av upodet melk. Se **Figur 2.3.1** for skisse av forsøkets oppsett.



Figur 2.3.1: Oversikt over oppsett av forsøk for stamme A. Tilsvarende prosedyre ble gjort for stamme B, og for hver av forsøkets tre deler.

Ved uttak ble eventuell forandring i melkas utseende og lukt registrert. Alle prøver ble tatt ut sterilt, og hver av disse besto av ca. 30 mL og 5 mL prøvemateriale overført til henholdsvis 50- og 15-mL-Nunc rør. Totalt ble det tatt ut 33 ulike prøver i hver del av forsøket: én blindprøve, én nullprøve for hver av de to stammene første dag, og deretter 3 uttak hver dag (grunnet tre ulike temperaturer) over 5 dager for hver av de to stammene (totalt 16 uttak per stamme). For mikrobiell undersøkelse ble 1 mL prøvemateriale tatt direkte ut fra hver 30-mL-prøve og umiddelbart benyttet til fortykning og platespredning, før Nunc-rørene raskest mulig ble fryst ned og lagret ved -20 °C for senere prøveopparbeiding og analyser.

Andre og tredje del av triplikaten ble utført på nøyaktig samme måte som første del, med eneste forskjell at enkelte av de kjemiske analysene i del 2 og 3 ble gjort av et mindre, men representativt utvalg av alle prøvene tatt ut (se utdypende beskrivelser av analyser under 2.4).

2.4 Mikrobielle og kjemiske analyser

2.4.1 Vekst av *Pseudomonas* i melk

De mikrobielle undersøkelsene av bakteriemengder i alle prøver tatt ut i forsøket ble umiddelbart utført etter uttak. Dette for å sikre at prøvenes sammensetning ikke rakk å endre seg vesentlig etter uttak, før mikrobiologiske og kjemiske analyser.

Fra hver 30-mL-prøve ble det tillaget fortynningsrekker ved at 1 mL prøve ble overført til 9 mL steril Ringers løsning (Merck) (vol:vol, 10-ganger fortynning til -1. fortynning), innholdet i fortynningsrøret blandet godt, og deretter videre fortynninger. Fra utvalgte, passende fortynninger ble 0,1 mL spredt ut i duplikat på skåler med steril næringsagar (Nutrient Agar, Oxoid). Dette medførte ytterligere 10 ganger fortynning på skål.

Skålene ble inkubert ved 30 °C i 24 timer, før antall kolonier på hver skål ble talt.

Beregninger ble gjort ut i fra skåler med antall kolonier mellom 30 og 300, for å gi et mest mulig sikkert estimat på bakteriekonsentrasjon i den gitte prøven. Utreknet konsentrasjon av bakterier i hver prøve ble uttrykt som kolonidannende enheter per milliliter prøve (CFU/mL), og omgjort til \log_{10} CFU/mL. Resterende prøvemateriale i Nunc-rørene ble raskest mulig etter uttak fryst ned ved - 20 °C for oppbevaring frem til utførelse av kjemiske analyser.

Ulike kjemiske analyser ble utført etter fullføring av hvert delforsøk. Prøvene tatt ut ble derfor som nevnt i mellomtiden fryst ned og holdt ved - 20 °C. Prøvene ble tint ved 4 °C over natt (~ 16-20 timer) før prøveopparbeiding og kjøring av analyser.

2.4.2 Analyse av flyktige forbindelser (HSGC)

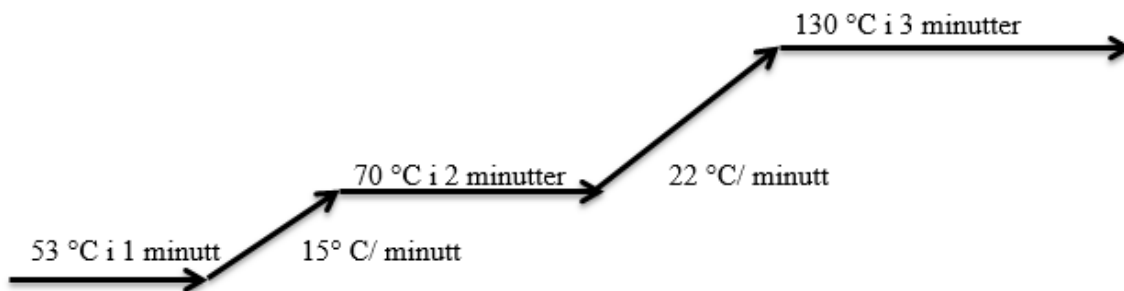
Kvantifisering av flyktige forbindelser ble gjennomført i alle prøveuttakene av melk fra del 1 av forsøket. Prøvene ble analysert ved bruk av headspace gas chromatography (HSGC), en metode tidligere beskrevet av Narvhus et al. (1998).

Prøvene ble godt blandet før innveining (ved bruk av en Mettler PM480 Delta Range Balance, Mettler Toledo, Norge) av 10,00 g i headspace-flasker (Machery Nagel, Dueren, Tyskland). Headspaceflaskene ble forseglet med teflonbelagt septa med aluminiumring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Prøvene ble plassert i en Teledyne Tekmar HT3 automatisk headspace sampler med et 6890 GC system (Agilent Technologies) og en

flammeioniseringsdetektor. Programvaren som ble benyttet var Open LAB EZChrom (Agilent Technologies).

Som bæregass ble det benyttet helium (Aga, Norge) med en total flow på 11,1 mL/min. Vilråene for headspaceflaskene var 60 °C med en forvarmingstid på 30 minutter, og deretter miksing i 5 minutter ved setting fem. Headspaceflaskene var trykksatt til 10 PSIG i 1.50 minutter før injeksjon, der injeksjonstiden var på 1.00 minutt.

En CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland) ble benyttet for separering av komponentene. Kolonnen hadde en lengde på 25 m, med indre diameter på 0,53 mm og filmtykkelse på 5,0 µm. Temperaturprogrammet benyttet under analysen er fremstilt i **Figur 2.4.1**.



Figur 2.4.1: Analysens temperaturprogram viser hvilke temperaturer og tider som ble anvendt.

De flyktige komponentene ble separert basert på komponentenes ulike flyktighetsgrad og affinitet til kolonnens stasjonære fase. Identifisering og kvantifisering av de ulike forbindelsene ble gjennomført ved kalibrering med standardløsninger med kjent konsentrasjon av følgende komponenter: acetaldehyd, diacetyl, etylacetat, 2-butanon, 2-heksanol, 2-metylbutanal, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanal, 3-metylbutanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol (Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, 1-butanol, 1-propanol, 2-butanol og 2,3-pentadion (Merck) (Narvhus et al. 1998).

2.4.3 Analyse av organiske syrer og karbohydrater (HPLC)

Innhold av organiske syrer og karbohydrater ble analysert i alle prøvene tatt ut fra forsøket tre deler. Analysen ble gjennomført ved bruk av high pressure liquid chromatography (HPLC) etter en metode av Marsili et al. (1981), som beskrevet av Narvhus et al. (1998) med noen modifikasjoner.

Prøvene ble godt blandet før 1,00 g ble veid (Mettler Toledo) ut i syrevaskede 10 mL Belcorør. Prøvene ble tilsatt 2,5 mL ionebyttet vann, 200 µL 0,5 M H₂SO₄ (Merck) og 8 mL acetonitril (Merck). Etter tilsetning av acetonitril ble prøvene umiddelbart ristet for hånd, deretter ble de satt i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 minutter. Prøvene ble sentrifugert i romtemperatur i 10 minutter ved 3400 rpm i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan). Supernatanten ble tatt opp i en 10 ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A.) og deretter filtrert med 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør (Agilent Technologies, USA). Prøven ble forseglet med Chromacol 8-SV plastkork med Chromacol 8-ST101 septa. 25 µL av prøven ble injisert i HPLC-instrumentet.

Etter opparbeidelse ble prøvene analysert ved hjelp av en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) oppvarmet til 32 °C. For beskyttelse av kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en for-kolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories). Kolonnen var koblet til en Perkin Elmer serie 200 pumpesystem (Perkin Elmer, Waltham, MA), en Perkin Elmer Series 200 autosampler (Perkin Elmer) og en Perkin Elmer LC 101 kolonneovn (Perkin Elmer). Den mobile fasen som ble benyttet var 5 mM H₂SO₄ (Merck), med en hastighet på 0.4 mL/min.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var laktose, glukose og galaktose (Merck) og av organiske syrer ble sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsninger. Karbohydratene ble detektert ved hjelp av en Perkin Elmer Serie 200 RI-detektor (Perkin Elmer), mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en Perkin Elmer Serie 200 UV/VIS-detektor (Perkin Elmer) (Marsili et al. 1981).

2.4.4 Analyse av frie aminosyrer (HPLC)

Identifisering og kvantifisering av frie aminosyrer ble gjennomført i alle prøvene som ble tatt ut fra forsøkets tre deler. Analysene ble gjennomført ved bruk av High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), en metode beskrevet av Bütikofer og Ardö (1999) og Moe et al. (2013) med noen modifikasjoner.

Ved opparbeidelse av prøvene ble 5,00 g veid inn i et 15 mL sterilt Nunc-rør og tilsatt 5,00 mL indre standardløsning (0,4 $\mu\text{mol/mL}$ L-norvalin (Sigma-Aldrich) i 0,1 M HCl (Merck)). Prøvene ble mikset i omlag 1 minutt på MS1 Minishaker (Ika, Staufen, Tyskland) og satt i en vendemaskin MultiRS-60 BIOSAN (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 15 minutter. De ble deretter sentrifugert (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) i 40 minutter ved 3400 rpm og en temperatur på 4 °C. Det ble tilsatt 0,6 mL 4 % trikloreddiksyre (Merck) til 0,6 mL av supernatanten i et 1,5 mL eppendorfrør og blandingen ble mikset i en minishaker (Gene 2, Scientific Industries, New York, NY) før de ble satt på is i 30 minutter. Prøvene ble sentrifugert i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 15600 x g i 5 minutter ved 4 °C. Hver prøve ble overført til en 10 mL steril sprøyte (Becton Dickinson S.A.) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A.) og deretter filtrert med 0,2 μm cellulose acetat-filter (VWR, USA) over i nye sterile eppendorfrør. 50 μL av dette ble overført til et HPLC-rør og lagt på fryser før analysering (-20 °C). Resten av prøven i eppendorfrøret ble lagret på fryser som backup.

Før separering ble prøvene tilsatt 350 μL boratbuffer (0,4 M med pH 10,2, Agilent Technologies, Tyskland). Separeringen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument bestående av utstyret Agilent 1200 serie pumpe (Agilent Technologies, Singapore), Agilent 1200 serie autoinjektor (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie kolonneovn (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie termostat (Agilent Technologies) og en Agilent 1200 serie fluorescensdetektor. Programvaren som ble benyttet var Open LAB EZChrom (Agilent Technologies). Før injisering ble prøvene derivatisert, 5 μL prøve ble mikset med 5 μL OPA-løsning (Agilent Technologies), reaksjonstiden var 0,15 minutter før injisering. 10 μL av hver prøve ble injisert i instrumentet og analysert med en XTera RP 18 kolonne (150 x 4.6 mm; Waters, Milford, MA) ved hjelp av to mobile faser, A (30 mmol/L natrium-acetat-trihydrat (Merck), 0,1 mmol/L titriplex III (Merck), pH 7,2 og 0,25 % tetrahydrofuran (Merck) og B (100 mmol/L natrium-acetat-trihydrat (Merck) og 0,53 mmol/L titriplex III (Merck) pH 7,2, tilsatt 80 % acetonitril (Merck)). Kolonnen holdt en temperatur på 42 °C og hastigheten på

mobilfasen var 0,7 mL/min. Gradienten på mobilfasen var fra 3,3-20,7 % B i 13 minutter, 20,7-30 % B i 12 minutter og 30-100% B i 4 minutter.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. De kjente aminosyrene var L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-asparagin, L-serin, L-glutamin, L-histidin, glycin, L-treonin, L-citrullin, L-arginin, L-alanin, GABA, L-tyrosin, L-valin, L-metionin, L-norvalin, L-isoleucin, L-fenylalanin, L-tryptofan, L-leucin, L-ornitin og L-lysin løst i 0,1 M HCl (Merck) (Bütikofer & Ardö 1999; Moe et al. 2013).

2.4.5 Analyse av flyktige stoffer (TDGCMS)

Tilstedeværelse av flyktige stoffer ble undersøkt i utvalgte prøver tatt ut fra forsøkets tre deler. De flyktige forbindelsene ble analysert ved bruk av Thermal Desorber Gas Chromatography Mass Spectrometry (TDGCMS).

Prøvene ble godt blandet før innveining av 10,00 g i al-skåler (volum 106 ml, Plus Pack As, Odense DK). Skålene ble plassert i et mikroemmisjonskammer (Micro-Chamber/Thermal Extractor M-CTE250, Markers International Ltd. Llantrisant, UK). De flyktige forbindelsene ble oppkonsentrert over på adsorbentør, Tenax TA/Carbograph 1TD (Markers International). Adsorbentrørene ble videre plassert i et automatisk termisk desorpsjonsinstrument (Thermal Desorber, TD-100, Markers International), med et 7890B GC system (Agilent Technologies Inc. Wilmington, De, USA) og koblet til MS Systems, 5975 inert XL Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Som bæregass ble det benyttet helium grad 6.0 (Aga) med en flow på 1 mL/min. Programvaren som ble benyttet var Masshunter GC/MS Acquisition B.07.00.1413 (Agilent Technologies).

Oppkonsentrering av de flyktige komponentene i prøven over på adsorbentør, ble gjort i mikroemmisjonskammeret ved 50 °C i 20 minutter, og med en N₂-flow på 50 mL/min. Videre ble adsorbentrøret overført til et automatisk termisk desorpsjonsinstrument. Her ble prøven desorbert fra røret ved 280 °C, 10 minutter og N₂-flow 30 mL/min over på en elektrisk kjølefelle (Peltier cell) som holdt minus 10 °C. Prøven ble videre desorbert fra kjølefella, hvor temperaturøkningen var 100 °C/s til 280 °C, holdetid 3 min. og split 10 mL/min., til kolonnen. De flyktige komponentene ble separert på en DB-WAXETR GC kolonne (Agilent

Technologies). Kolonnen hadde en lengde på 30 m, med indre diameter på 0,25 mm og filmtykkelse på 0,5 μm . GC-temperaturprogrammet var som følger: 35 °C, 3 min; økning med 5 °C min^{-1} til 40 °C, 2 min; økning med 15 °C min^{-1} til 70 °C, 2 min; økning med 10 °C min^{-1} til 130 °C; økning med 10 °C min^{-1} til 160 °C, 3 min; økning med 30 °C min^{-1} til 200 °C, 15 min. Komponentene ble detektert med en 5975 inert XL Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Massespektrometerets parametere var elektronisk ioniserings mode (70eV), ionekildetemperatur på 230 °C og kontinuerlig skanning i masseområdet m/z 33-400. Software programmet som ble benyttet var MassHunter GC/MS Acquisition B.07.00.1413. Identifikasjon av de flyktige komponentene ble gjort ved hjelp av NIST 11-database (Agilent Technologies).

2.5 Protein- og peptidanalyse (CE)

Identifisering av proteiner og peptider ble gjennomført i utvalgte A-prøver og alle B-prøver fra del 3 av forsøket. Uttak ble gjort fra prøvene som var tatt ut til 15 mL Nunc-rør og lagret ved - 20 °C, og som hadde blitt tint i kaldt vann like før prøveopparbeidelse fant sted.

Analysene ble gjennomført ved bruk av kapillærelektroforese (Capillary electrophoresis (CE) Liquid Chromatography), en metode beskrevet av Heck et al. (2008) og Mestawet et al. (2014) med noen modifikasjoner.

Sample buffer og run buffer ble tillaget som beskrevet av Ribeiro et al. (2000) og Heck et al. (2008). I volumer på 5 mL av disse bufferne ble det tilsatt henholdsvis 13,1 og 7,5 mg DTT (DL-Dithiolthreitol, Sigma-Aldrich).

Prøveopparbeidelse ble gjort ved å blande 600 μL tint prøvemateriale med 900 μL sample buffer i eppendorfrør. Prøvene ble deretter mikset og satt på orbitalrister (PSU-20i, Biosan, Latvia) i romtemperatur i 1 time, før sentrifugering ved romtemperatur i en Eppendorf 5415D Sentrifuge (Eppendorf) ved 5000 x g i 5 minutter. Hver prøve ble overført til en 1 mL steril sprøyte (Becton Dickinson S.A.) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A.) og deretter filtrert med 0,45 μm PVDF-filter (Millex, Carrigtwohill, Irland) over i CE Sample vials-flasker (Agilent Technologies) i mengde på ~ 100 μL .

Kapillærelektroforesen ble kjørt i en Agilent G1600AX (Agilent Technologies), og programvaren benyttet var 3D CE Chemstation (Agilent Technologies). Separasjon ble utført ved bruk av en HPCE standard kapillær (Agilent Technologies) med dimensjon 56 cm x 50

µm i.d.. Separasjon skjedde ved 45 °C og lineær spenningsgradient fra 0 til 25 kV i 3 minutter. Ved start og før kjøring av hver prøve ble det utført for-kondisjonering av kapillæren som innbar «flushing» (vasking) av kapillæren i 5 minutter med 0,1 M NaOH (Agilent Technologies), 5 minutters venting og «flushing» i 5 minutter med run buffer. Injisering av prøvene skjedde ved anoden ved et trykk på 34,5 mbar i 20 sekunder, og UV-deteksjon av proteiner og peptider foregikk ved 214 nm (Heck et al. 2008; Mestawet et al. 2014).

2.6 Kjeldahl-analyse av nitrogen- og proteininnhold i to utvalgte melkeprøver

Undersøkelse av nitrogeninnhold ble gjort i to utvalgte B-prøver (0-prøve og 120 timer ved 22 °C, hver av dem en blanding av prøvemateriale både fra del 2 og 3) for å kvantifisere og sammenligne innholdet av nitrogen og protein. Prøvene ble analysert ved bruk Kjeldahl-analyse, en metode beskrevet av i IDF 20 (IDF 2001).

Totalnitrogen (TN):

Prøveopparbeidelse ble gjort ved å veie ut ca. 0,50 g prøvemateriale i Kjeldahl-rør, i triplikat for hver av de to prøvene (totalt 6 rør). Nøyaktig innveide mengder ble notert.

Ikke-protein-nitrogen (IPN):

Prøveopparbeidelse av hver prøve ble gjort ved å veie ut ca. 5,00 g prøvemateriale i en 100 mL Erlenmeyerkolbe, og nøyaktige mengder notert. Det ble videre tilsatt 10 % triklorediksyre (TCA) (Merck), helt til det totale innholdet i kolben nådde en mengde på ca. 25,00 g. Nøyaktig innveid mengde ble notert. Hver løsning ble deretter filtrert gjennom et filterpapir (White ribbon filter, Whatman/GE Healthcare, Tyskland) over i en flaske. Ca. 5,00 g av filtratet ble veid inn i et Kjeldahl-rør, i triplikat for hver prøve (totalt 6 rør), og nøyaktig innveide mengder notert.

Ikke-kasein-nitrogen (IKN):

Prøveopparbeidelse av hver prøve ble gjort ved å veie ut ca. 10,00 g prøvemateriale i en 100 mL Erlenmeyerkolbe, og nøyaktige mengder notert. Hver prøve ble så tilsatt 10 mL destillert vann og varmet opp til 35 °C i vannbad. Det ble så tilsatt av 1 mL 10 % (vekt:vol) eddiksyre (Merck), og etter ytterligere 5 minutter ble det tilsatt 1 mL 1 N Natriumacetat (Merk). Kolbene ble deretter overført til is for avkjøling. pH i hver prøveløsning ble målt ved hjelp av et kalibrert pH-meter (PHM210 Standard pH Meter, Radiometer Analytical, Frankrike) og

justert ned til 4,6 ved gradvis tilsetning av 10 % eddiksyre (Merck) under omrøring med magnet på magnetrører (VMS Advanced C4, VWR, England). Videre ble hver prøveløsning (ca. 25,00 g) overført til hver sin nye 100 mL Erlenmeyerkolbe, og eventuelle prøverester i kolbene også overført ved hjelp av litt destillert vann. Nøyaktig vekt av hver prøveløsning ble notert. Hver løsning ble deretter filtrert gjennom et filterpapir (White ribbon filter, Whatman/GE Healthcare, Tyskland) over i flaske. Ca. 2,00 g av filtratet ble veid inn i et Kjeldahl-rør, i triplikat for hver prøve (totalt 6 rør), og nøyaktig innveide mengder notert.

Hvert av Kjeldahl-rørene, inkludert to blank-rør uten prøve (totalt 20 rør i alt), ble avslutningsvis tilsatt en tablett Kjeltab (Kjeltabs Auto, Thompson & Capper, Cheshire, England) og 3 mL 96 % svovelsyre (Merck).

Oppslutning og analysering:

Blokken med Kjeldahl-rørene ble overført til en Digestor 2520 (Tecator, Foss, Danmark) hvor rørene ble kokt ved 420 °C i 1 time og 15 minutter. Etter endt oppslutning ble rørene kjølt ned i 15 minutter.

Videre ble hvert rør analysert i en Kjeltec 8400 destilleringsenhet (Tecator, Foss). Titer for hver prøve ble notert og benyttet for å regne ut gjennomsnittlig prosent TN, IPN og IKN for hver prøve. Disse verdiene og Kjeldahl-faktor for melk (bestemt til være 6,38 (Walstra et al. 2014)) ble videre brukt for utregning av innhold av totalt protein ((TN-IPN) · 6,38), myseprotein ((IKN-IPN) · 6,38) og kasein (totalt protein - myseprotein) (IDF 2001).

2.7 Proteinaseaktivitet og peptidanalyse (CE)

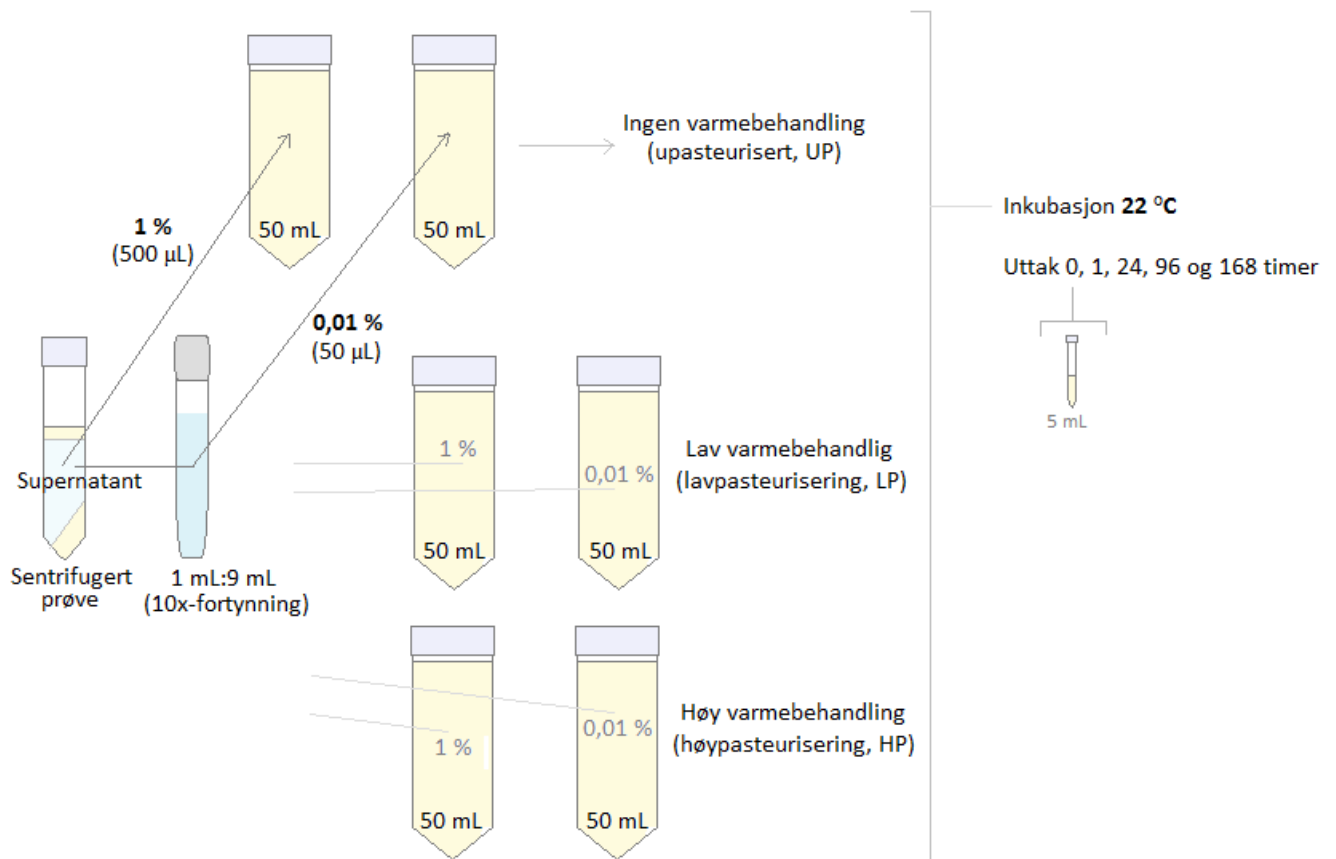
For å undersøke tilstedeværelse av ekstracellulære proteinaser og deres aktivitet og varmfølsomhet, ble én utvalgt prøve undersøkt nærmere. Dette var prøven tatt ut av melk som var podet med stamme B (ATCC 17400) og inkubert ved 22 °C i 120 timer, fra del 2 av forsøket.

Et 15 mL Nunc-rør med 5 mL opptint prøvemateriale ble sentrifugert (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) i 15 minutter ved 10000 rpm og en temperatur på 4 °C for å spinne ned kasein og bakterier til pellet. Supernatanten ble tatt ut med en 10 mL steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en steril metallkanyle (Acufirm V2A, Tyskland) og deretter sterilfiltrert med 0,2 µm Filtropur S 0,2 sprøytefilter (Sarstedt,

Nümbrecht, Tyskland) over i et sterilt 15 mL Nunc-rør. 1 mL av den sterilfiltrerte supernatanten ble overført til 9 mL steril Ringers løsning (Merck) for 10-ganger fortynning.

Seks 50-mL Nunc-rør ble tilsatt 50 mL steril UHT-melk (Tine Meierier Østlandet). Tre av rørene ble podet med 0,01 % supernatant (vol:vol, 50 µL 10-ganger fortynnet supernatant til 50 µL melk), og de resterende tre med 1 % (vol:vol, 500 µL uforynnet supernatant i 50 mL melk).

To av rørene podet med ulik podemengde ble videre lav-pasteurisert i vannbad (Grant Instruments, Cambridge, England) ved 65 °C i 30 minutter, mens to andre rør ble høy-pasteurisert i vannbad (GFL, Burgwedel, Tyskland) ved 95 °C i 5 minutter. De to resterende rørene ble ikke varmebehandlet. Se **Figur 2.7.1** for oversikt over forsøkets oppsett.



Figur 2.7.1: Oversikt over oppsett av proteinaseforsøk.

Umiddelbart etter poding ble 0-prøve tatt ut av de to rørene som ikke ble varmebehandlet (UP). Like etter poding, 0-prøveuttak og eventuell varmebehandling med påfølgende rask nedkjøling ble alle rørene inkubert ved 22 °C. Prøveuttak ble igjen gjort fra de to rørene som ikke ble varmebehandlet 1, 24, 96 og 128 timer etter poding, mens uttak fra de resterende fire rørene (LP og HP) ble gjort 1, 24, 96 og 128 timer etter endt varmebehandling. Alle prøver ble etter uttak umiddelbart fryst ned og lagret ved - 20 °C frem til analysering.

Alle prøveuttakene, totalt 19 stykk, ble analysert ved bruk av kapillær elektroforese (CE), med nøyaktig samme fremgangsmåte og metode benyttet som beskrevet i avsnitt 2.5.

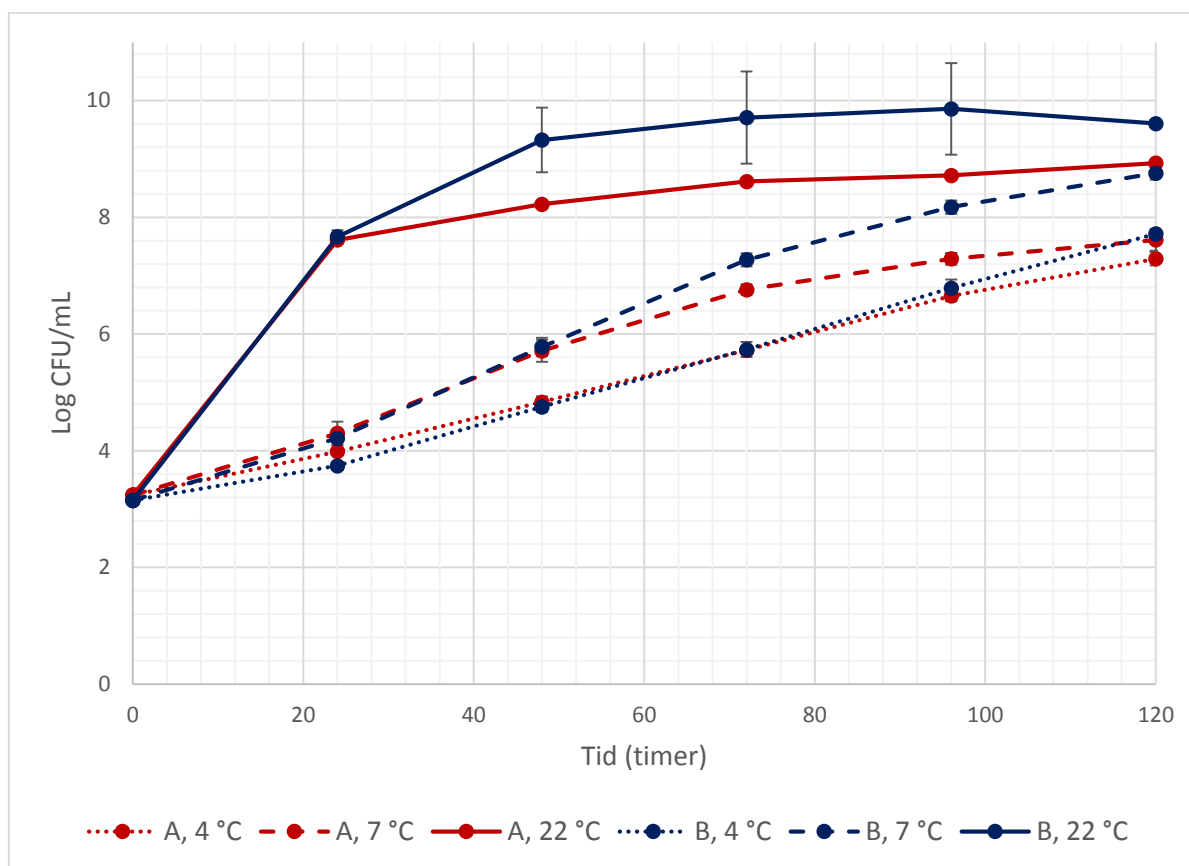
3. RESULTATER

Hovedforsøket i denne oppgaven startet med et vekstforsøk med de to stammene av *P. fluorescens* som skulle gi både vekstkurver og prøvemateriale til videre analyser. Deretter fulgte henholdsvis analyser av organiske syrer og karbohydrater, frie aminosyrer og flyktige stoffer. For nærmere undersøkelse av proteolyse i melk ble det deretter utført kapillærelektroforese (CE), med påfølgende Kjeldahl-analyse for å understøtte enkelte funn fra CE. Avslutningsvis ble det utført proteinaseforsøk i melk med enzym fra stamme B og igjen benyttet kapillærelektroforese.

3.1 Vekst av *Pseudomonas* i melk

Veksten av to ulike bakteriestammer i UHT-melk under lagring ved tre ulike temperaturer ble undersøkt ved at prøver ble tatt ut av melken ved gitte tidsintervall etter inokulering, fortynnet og spredt ut på skåler. Etter inkubasjon ble antall fremvokste kolonier på ulike fortynninger registrert og benyttet for å estimere bakteriekonsentrasjonen (gitt i CFU/mL) i melken ved de gitte tidspunktene prøvene ble tatt ut.

Vekstforsøket ble utført i triplikate og gjennomsnittlige bakteriekonsentrasjoner ble beregnet ut fra de tre forsøkene (Vedlegg 1). Resultatene fra bakterieveksten er fremstilt grafisk i form av logaritmiske vekstkurver i **Figur 3.1.1**.



Figur 3.1.1: Utviklingen av bakterievekst (gitt i log CFU/mL) av stamme A = ATCC 13525 (rødt) og B = ATCC 17400 (blått) i UHT-melk lagret ved 4, 7 og 22 °C (hvh. prikkete, stiplede og heltrukne linjer) i løpet av 120 timer (5 døgn). Gjennomsnitt av tre gjentak.

Grafene bekrefter hvordan melk ser ut til å ha vært et svært godt vekstmedium for disse bakteriene da bakterietallene økte fra opprinnelig podemengde på $\sim 10^3$ CFU/mL (log 3) til opp til mellom log 7 og log 9 etter kun 5 døgn. Hvor høy hastighet bakteriene vokste ved ble i stor grad påvirket av inkubasjonstemperaturen. Det vises tydelig at 22 °C i dette tilfellet var en mer optimal temperatur enn både 7 og 4 °C, da bakteriekonsentrasjonen ved førstnevnte temperatur økte raskere for begge stammene. Ved 22 °C ser det også ut til at begge stammer hadde rukket å nå stasjonær fase allerede etter 48 timer. Samtidig illustrerer grafene hvordan stamme B under disse forholdene hadde en noe kraftigere vekst enn stamme A, da denne stammen ved temperaturene 22 og 7 °C over tid nådde høyere konsentrasjoner av bakterier. Ved 4 °C var vekstforløpet hos de to stammene relativt likt, og steg etter 24 timer jevnt videre med ca. 1 log per døgn.

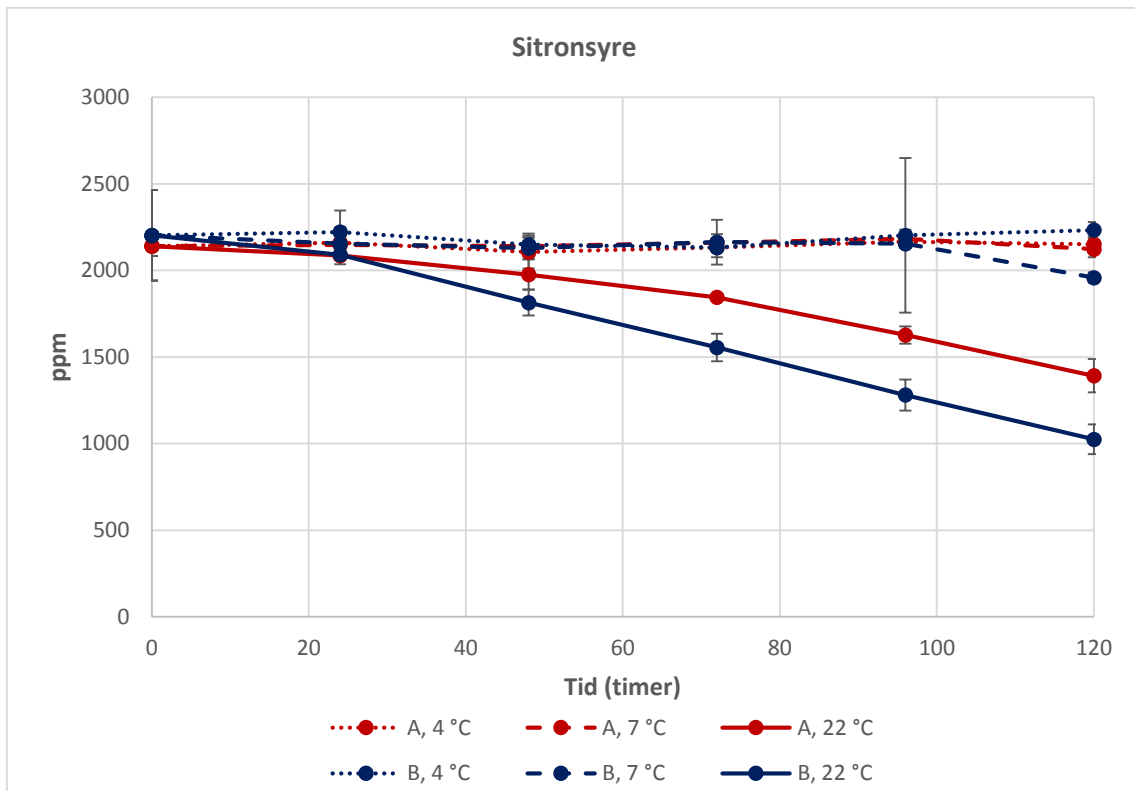
I løpet av inkubasjonstiden skjedde enkelte merkbare forandringer i noen av melkeprøvene. Etter 72 timer hadde melk som inneholdt B-stamme ved 22 °C tydelig skilt seg i to faser; et øvre vannaktig, svakt gult sjikt og et nedre hvitere sjikt. Her hadde det skjedd destabilisering av kasein, og det kunne ses små, hvite klumper i melken. Lukten var også forandret til mer uren og fremmed. Endret lukt ble også mer og mer merkbart i de andre melkeprøvene mot inkubasjonens slutt.

3.2 Flyktige forbindelser (HSGC)

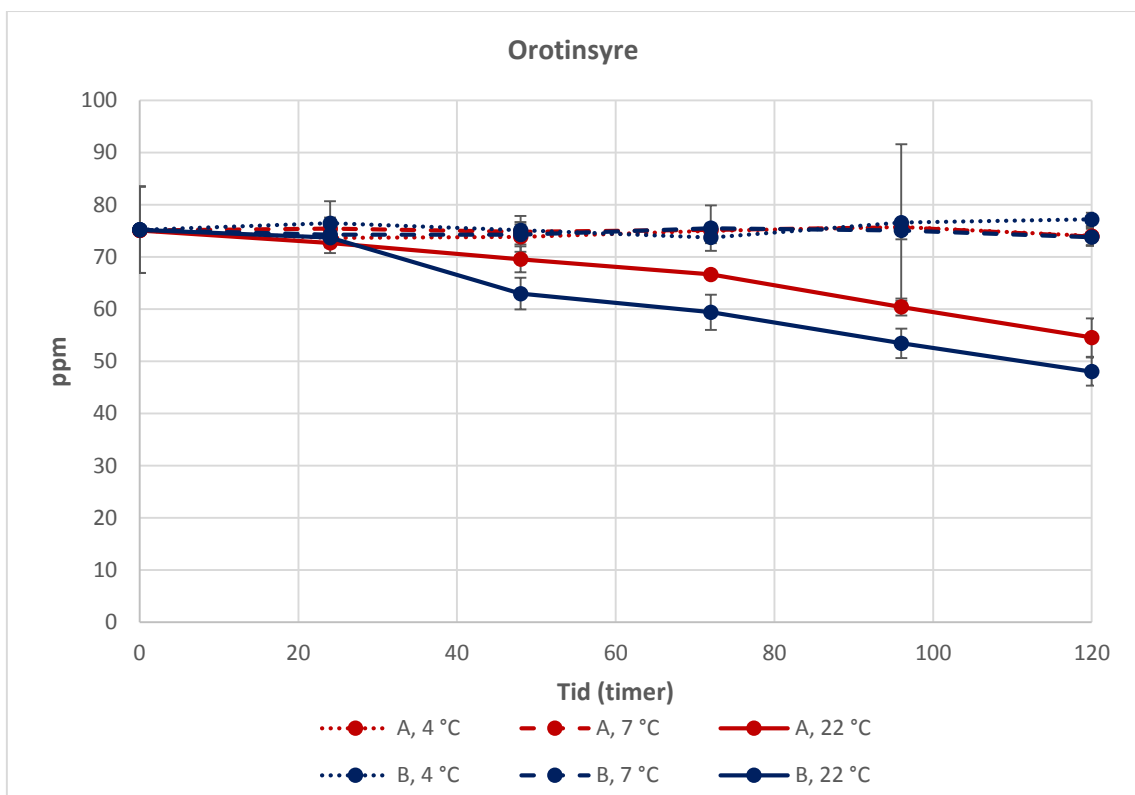
Innholdet av flyktige forbindelser i alle prøver tatt ut fra del 1 av forsøket ble kvantifisert ved bruk av HSGC. Resultatene viste generelt ingen eller svært lave mengder detektert av de ulike stoffene det ble analysert for og heller ingen store forandringer i disse mengdene over tid, hverken for stamme A eller B ved noen av de tre temperaturene (se Vedlegg 2). Analysen ble dermed ikke utført på prøver tatt ut i del 2 og 3.

3.3 Organiske syrer og karbohydrater (HPLC)

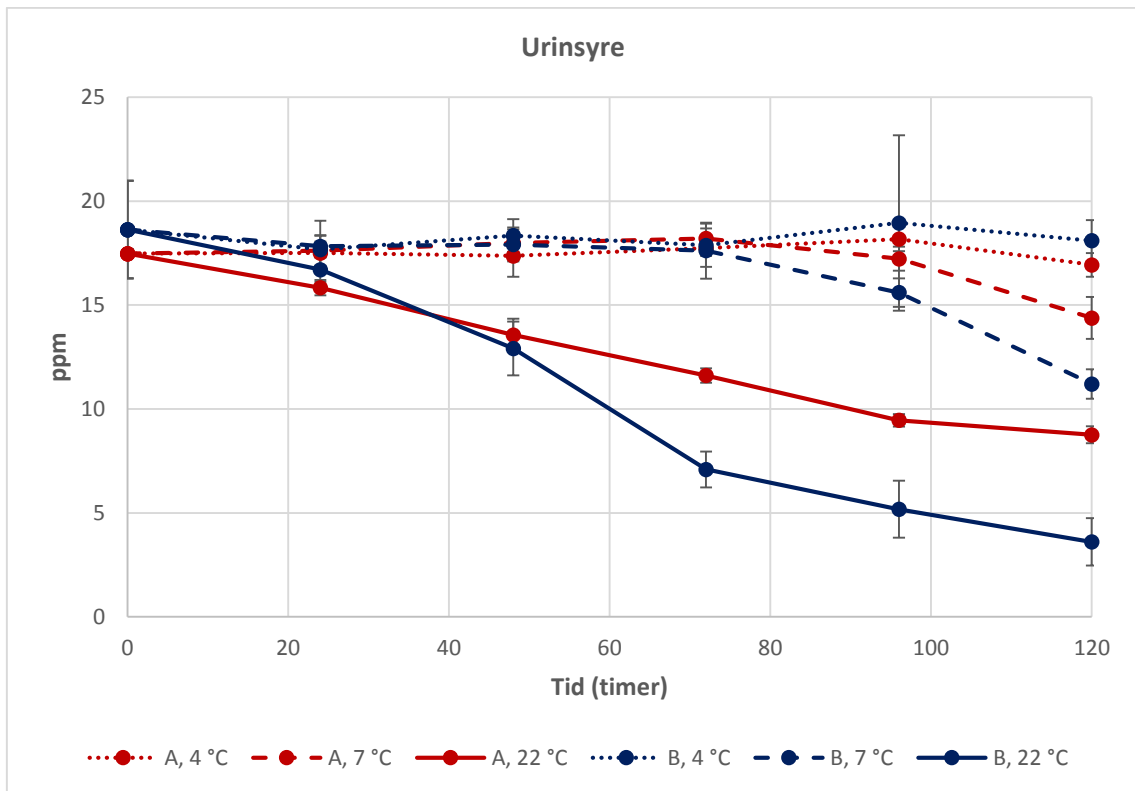
Ved bruk av HPLC ble det utført analyse av innholdet av organiske syrer og karbohydrater i samtlige prøver fra alle tre delene av forsøket. Gjennomsnittlige verdier (gitt i ppm) av de ulike stoffenes mengder ved de gitte tidene ble beregnet (Vedlegg 3). Resultatene er presentert grafisk i **Figur 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4 og 3.3.5** og viser utviklingen av hvert stoff i de ulike melkeprøvene over tid. Stoffe som ikke ble detektert eller der det ikke skjedde vesentlige forandringer over tid, er ikke presentert.



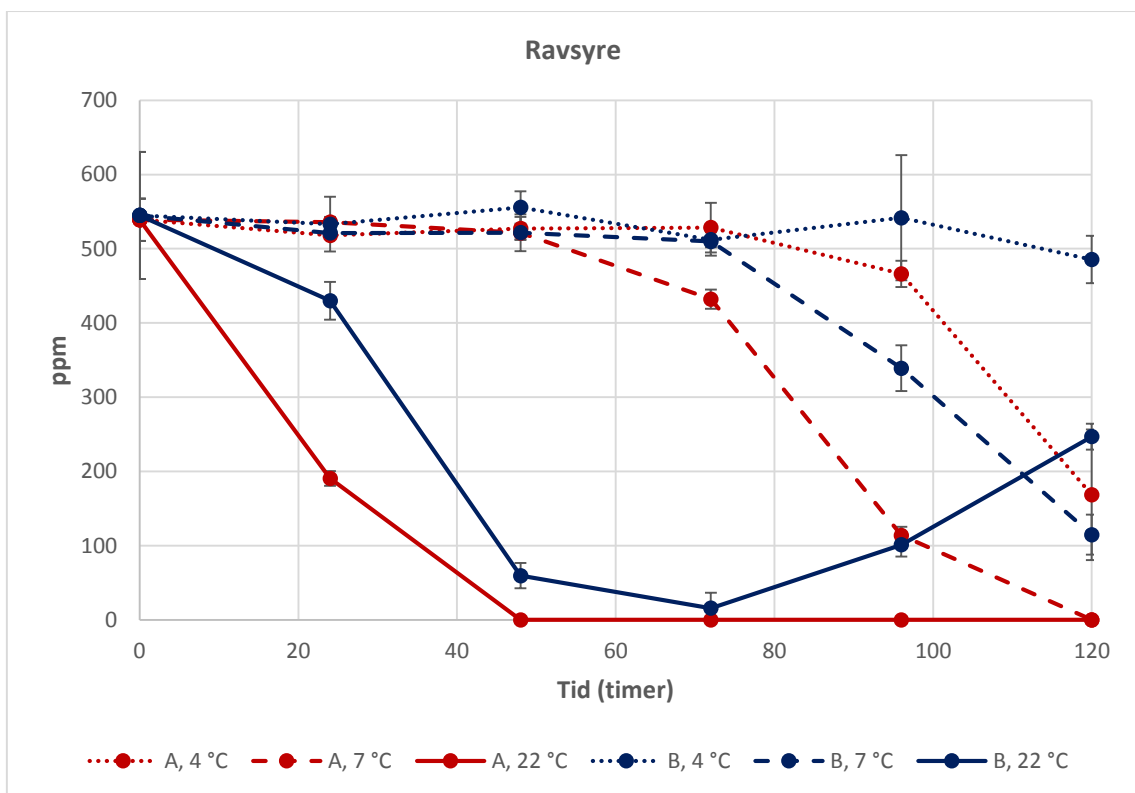
Figur 3.3.1. Utvikling av sitronsyre (gitt i ppm) i hver av de seks melkeprøvene beskrevet i Figur 3.1.1 over tid. Gjennomsnitt av tre gjentak. Analyse med HPLC etter metode av Marsili et al. (1981).



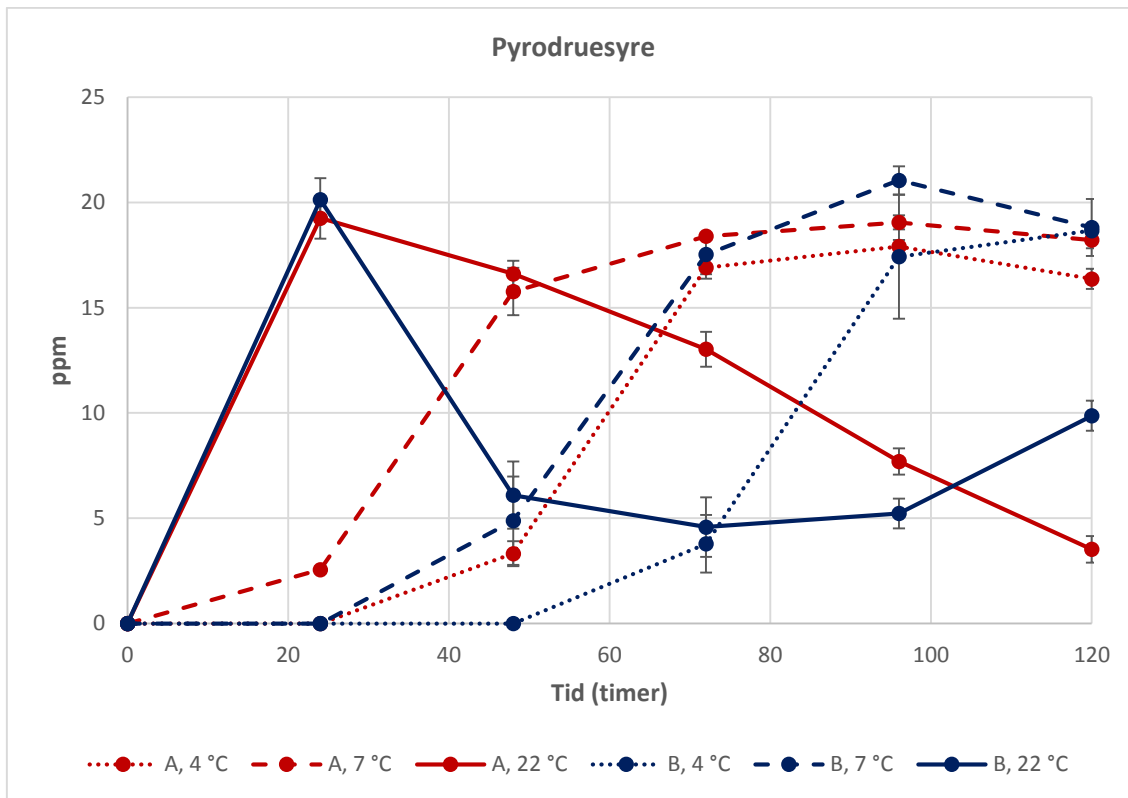
Figur 3.3.2. Utvikling av orotinsyre (gitt i ppm) i hver av de seks melkeprøvene beskrevet i Figur 3.1.1 over tid. Gjennomsnitt av tre gjentak. Analyse med HPLC etter metode av Marsili et al. (1981).



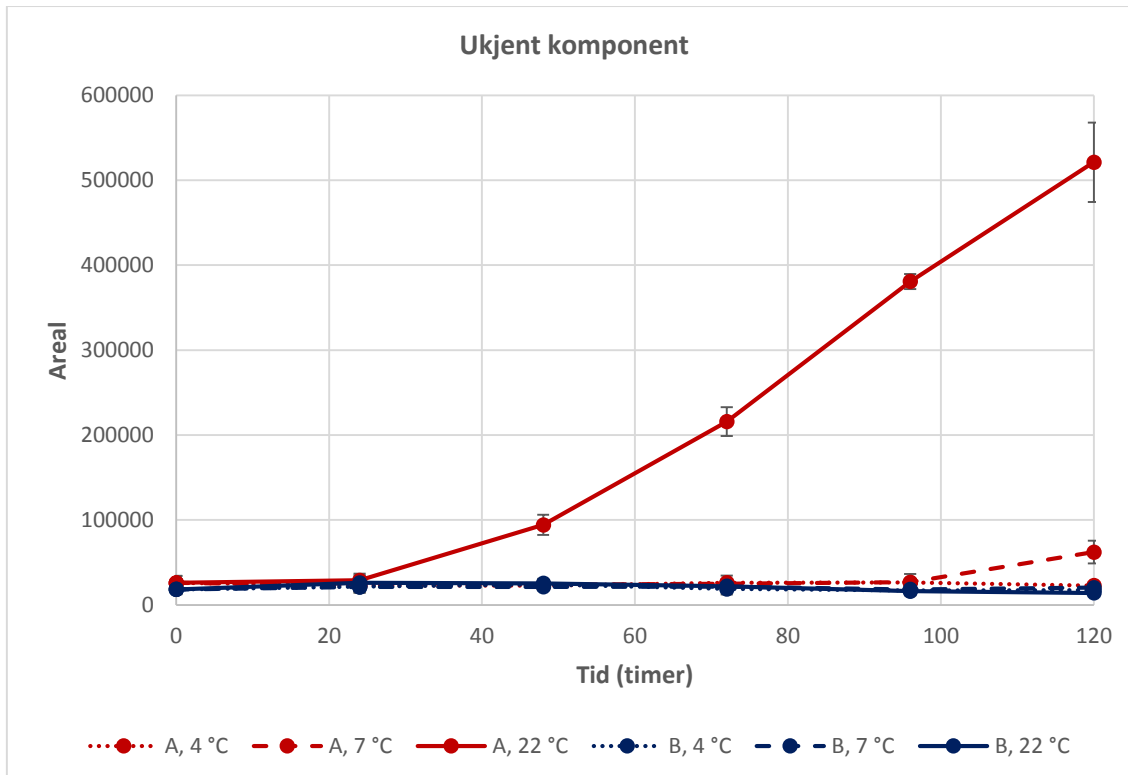
Figur 3.3.3. Utvikling av urinsyre (gitt i ppm) i hver av de seks melkeprøvene beskrevet i Figur 3.1.1 over tid. Gjennomsnitt av tre gjentak. Analyse med HPLC etter metode av Marsili et al. (1981).



Figur 3.3.4. Utvikling av ravsyre (gitt i ppm) i hver av de seks melkeprøvene beskrevet i Figur 3.1.1 over tid. Gjennomsnitt av tre gjentak. Analyse med HPLC etter metode av Marsili et al. (1981).



Figur 3.3.5. Utvikling av pyrodruesyre (gitt i ppm) i hver av de seks melkeprøvene beskrevet i Figur 3.1.1 over tid. Gjennomsnitt av tre gjentak. Analyse med HPLC etter metode av Marsili et al. (1981).



Figur 3.3.6. Utvikling av en ukjent organisk komponent (areal) i hver av de seks melkeprøvene beskrevet i Figur 3.1.1 over tid. Gjennomsnitt av tre gjentak. Analyse med HPLC etter metode av Marsili et al. (1981).

De ulike grafene viser at det har skjedd visse forandringer i innholdet av organiske syrer i de ulike prøvene over tid. Trenden var at mest endring inntraff i melken inkubert ved 22 °C, og i disse prøvene at forandringer gjerne var noe større hos stamme B enn A.

Felles for stoffene sitronsyre, orotinsyre og urinsyre (**Figur 3.3.1-3.3.3.**) var at de alle var tilstede i melken ved start, men at de ved 22 °C for begge stammene begynte å avta i mengde etter rundt 24 timer. Det ser ut til at mengde urinsyre begynte å avta etter 72 timer også i A og B ved 7 °C, og muligens også så vidt etter 96 timer i A og B ved 4 °C. En svak nedgang i sitronsyre kan også ha skjedd etter 96 timer i B ved 7 °C. I alle de resterende prøvene av disse tre stoffene ser det ut til at mengdene forble de samme over tid. Selv om grafene og mønsteret i utvikling så nokså likt ut for disse tre stoffene, er det verdt å legge merke til at mengdene av de ulike stoffene var svært forskjellige (y-akse).

Ravsyre (**Figur 3.3.4**) var også til stede i melken ved start, men mengdene avtok raskt i A og B ved 22 °C. I A har stoffet avtatt så mye etter 48 timer at det ikke lenger kan detekteres. Også i B har mengden avtatt svært mye etter 72 timer, men her kan det i motsetning observeres at mengden av stoffet begynte å øke igjen. Gradvis reduksjon i mengde av ravsyre kan også ses ved 7 og 4 °C, men inntraff senere jo lavere temperatur og saktere i B enn A.

Pyrodruesyre (**Figur 3.3.5**) kunne opprinnelig ikke detekteres i melken ved start, men trenden var at mengdene økte i både A og B ved alle tre temperaturer. Ved 22 °C skjedde økningen raskt de første 24 timene, før mengdene deretter avtok, noe raskere i B enn A. Økning i mengder skjedde saktere ved 7 °C, og enda saktere ved 4 °C, men for begge temperaturene steg mengden noe raskere i A enn B. Det ser ut til at mengdene i prøver ved 4 og 7 °C rakk å nå et maksimum ved 96 timer.

Flere av stoffene analysert for ble ikke detektert i noen av prøvene, slik som melkesyre, maursyre, propionsyre, DL-pyroglutaminsyre, eddiksyre, glukose og galaktose, mens innholdet av laktose var relativt likt i alle prøvene og forandret seg ikke vesentlig over tid.

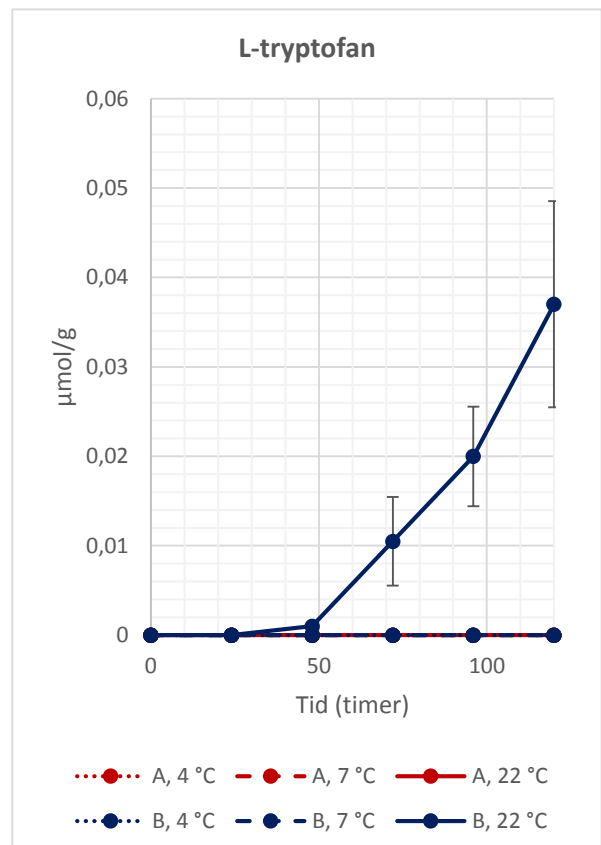
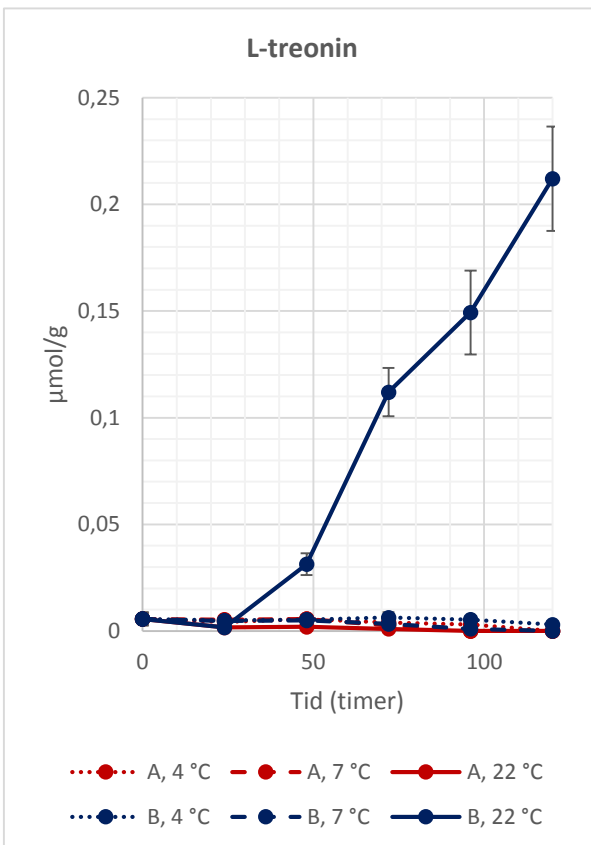
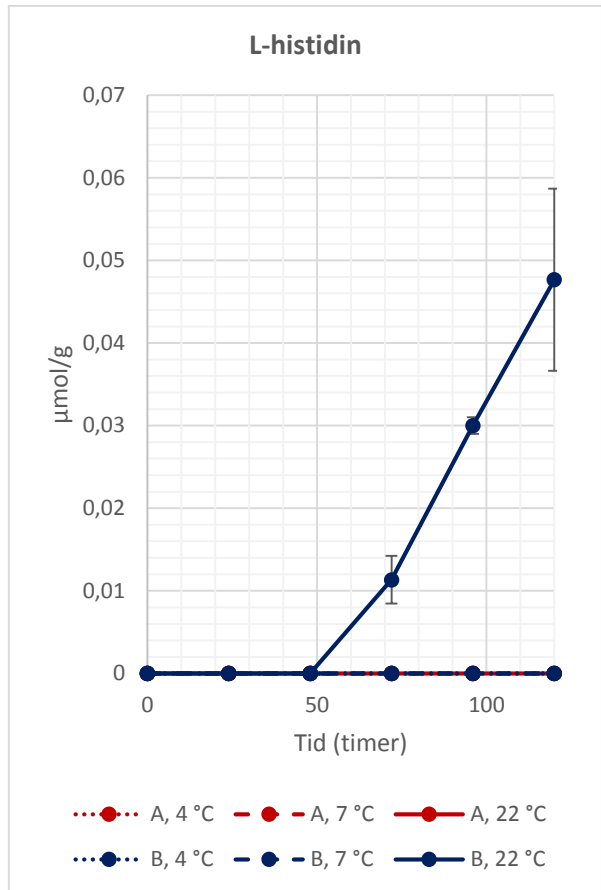
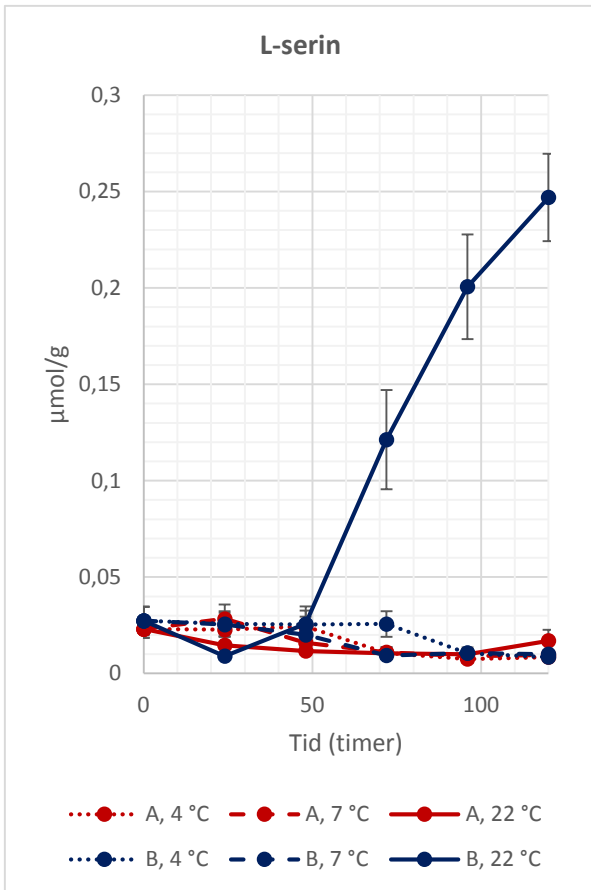
Ut fra analyseresultatene ble det oppdaget tilstedeværelse av en ukjent komponent (**Figur 3.3.6**). Ut ifra grafen kan det se ut som at stoffet opprinnelig var til stede i melken ved start. I melk med A ved 22 °C begynte forekomsten etter 24 timer gradvis å øke. Også i melk med A ved 7 °C etter 120 timer skjedde det en økning av dette stoffet. Den økende trenden kunne

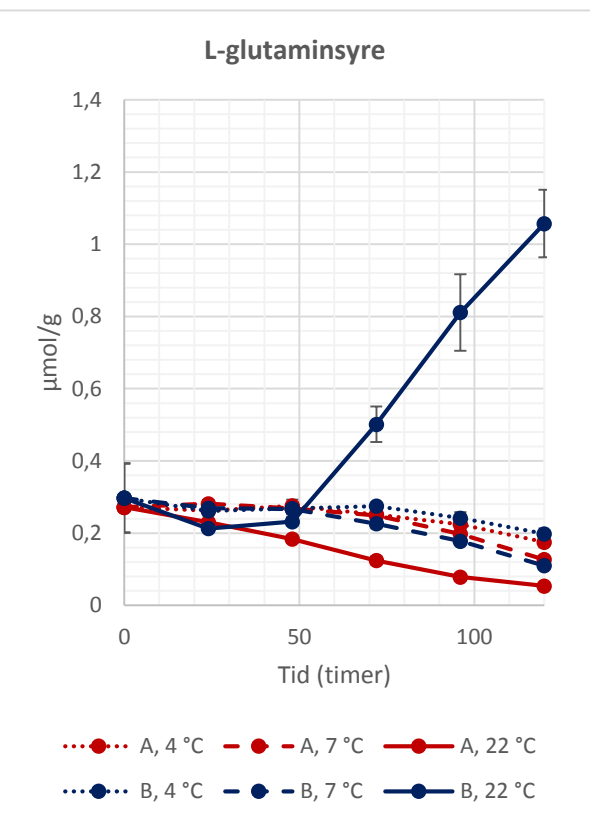
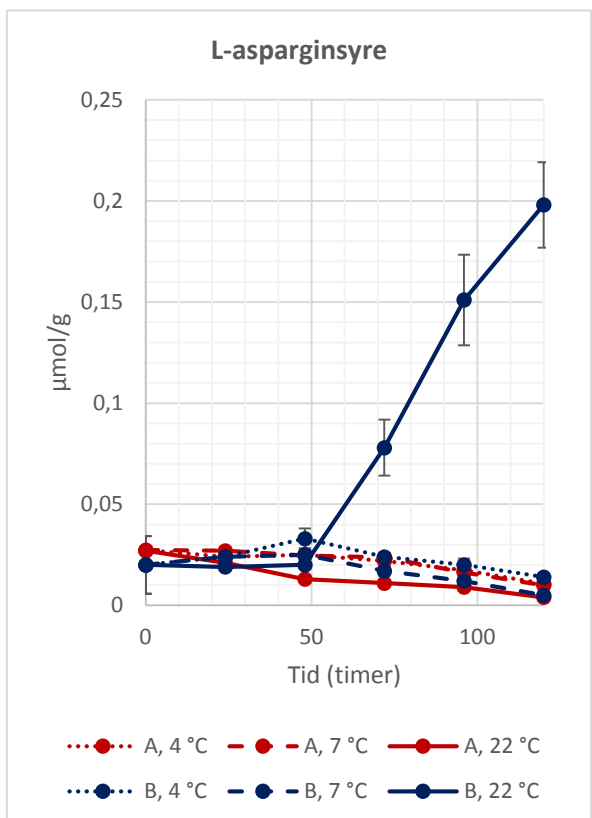
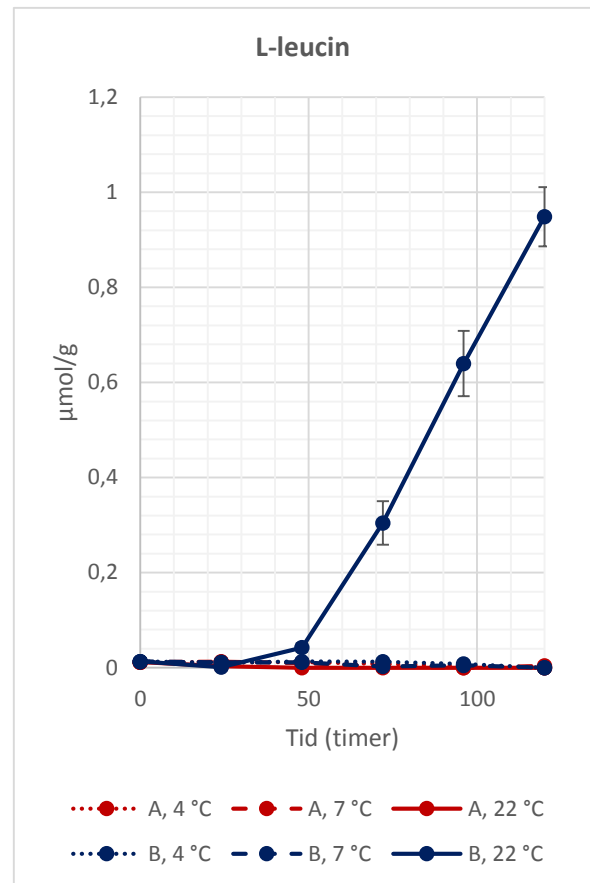
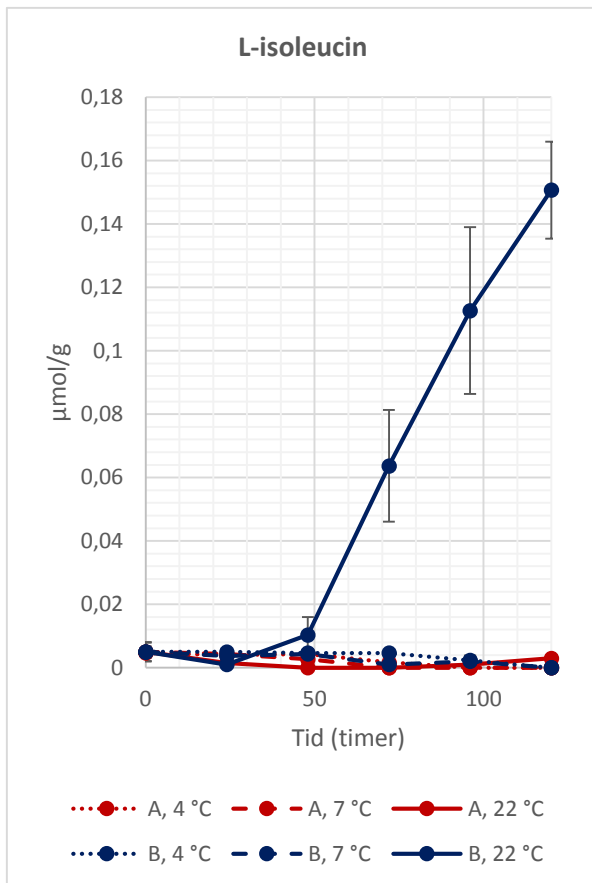
ikke observeres i de andre prøvene. Da stoffet var ukjent var det ikke mulig å beregne hvilke mengder arealene tilsvarte.

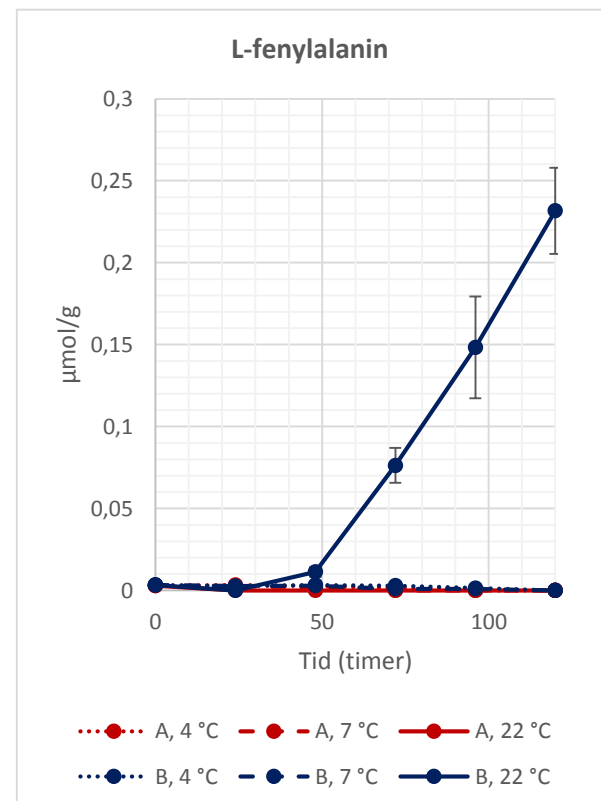
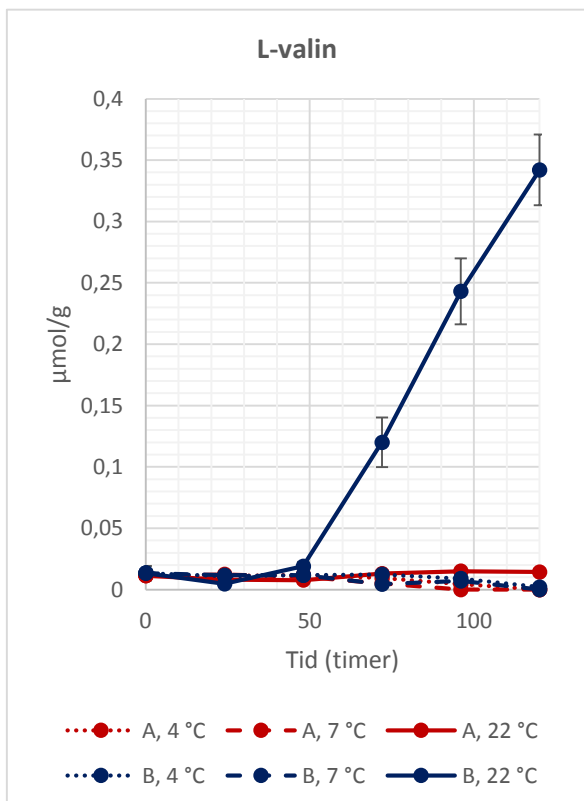
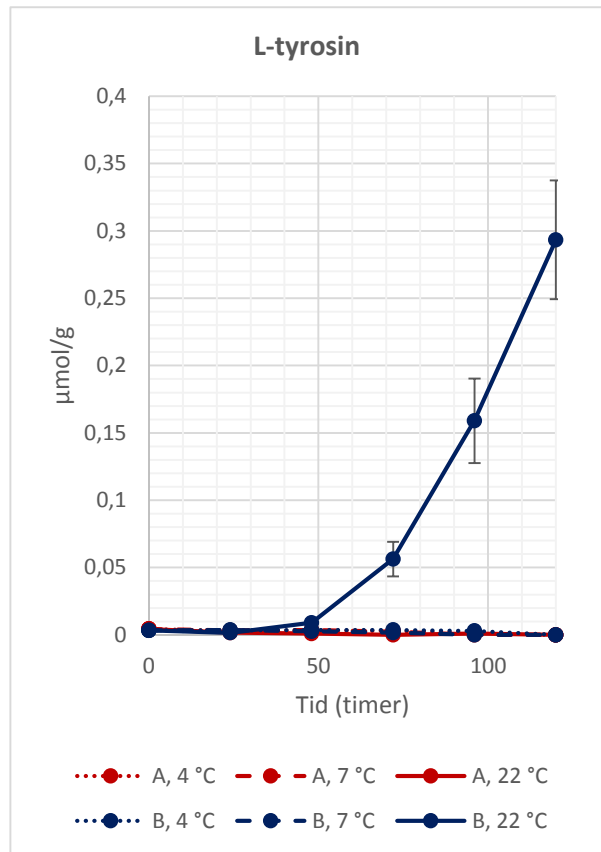
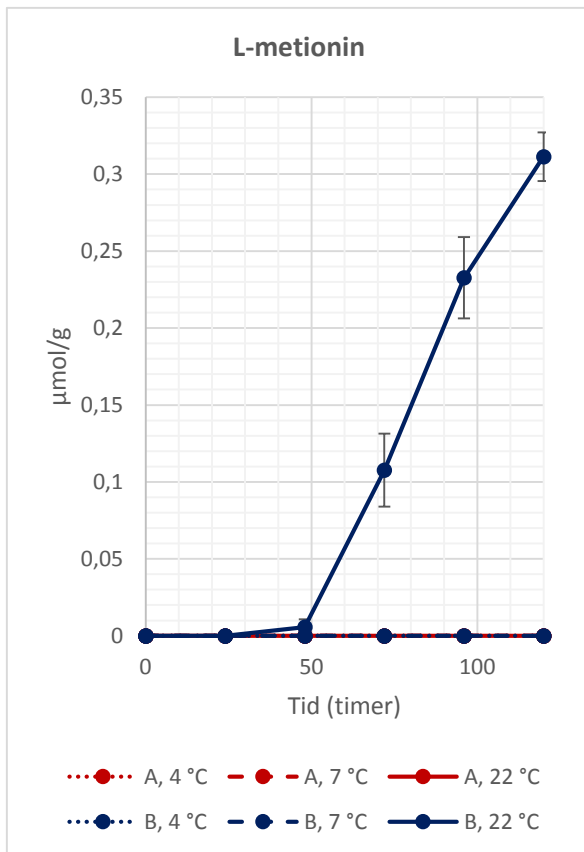
3.4 Frie aminosyrer (HPLC)

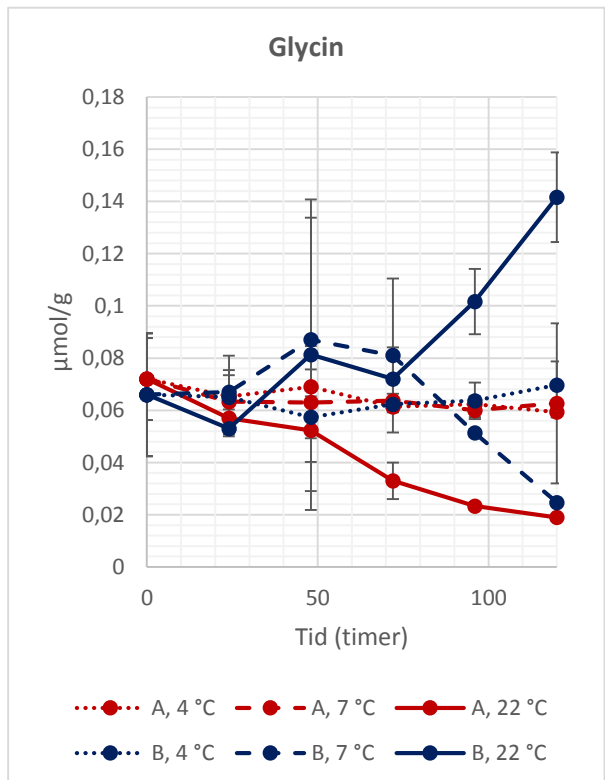
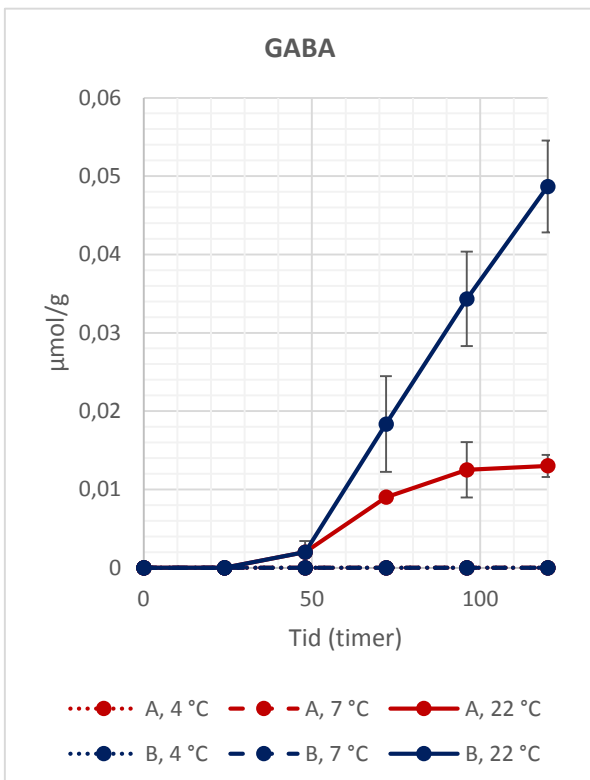
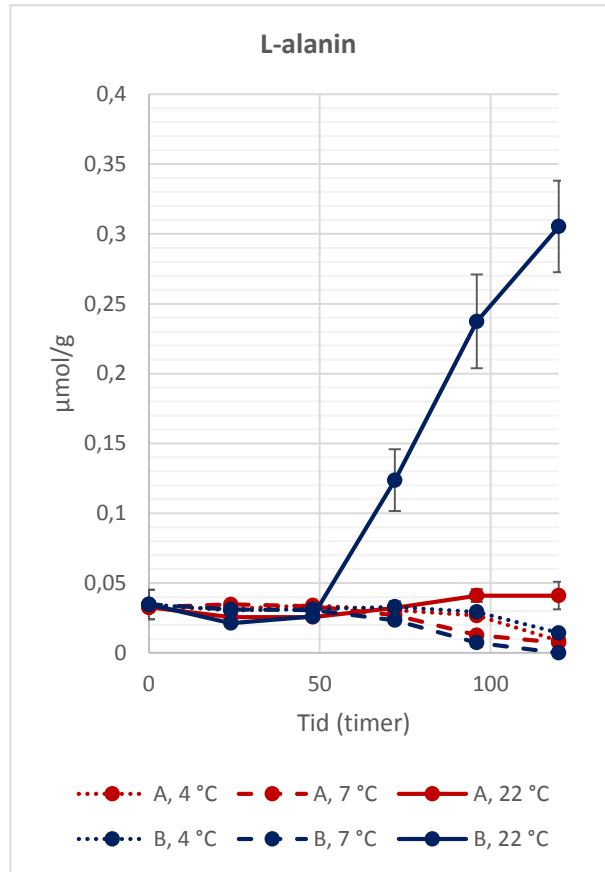
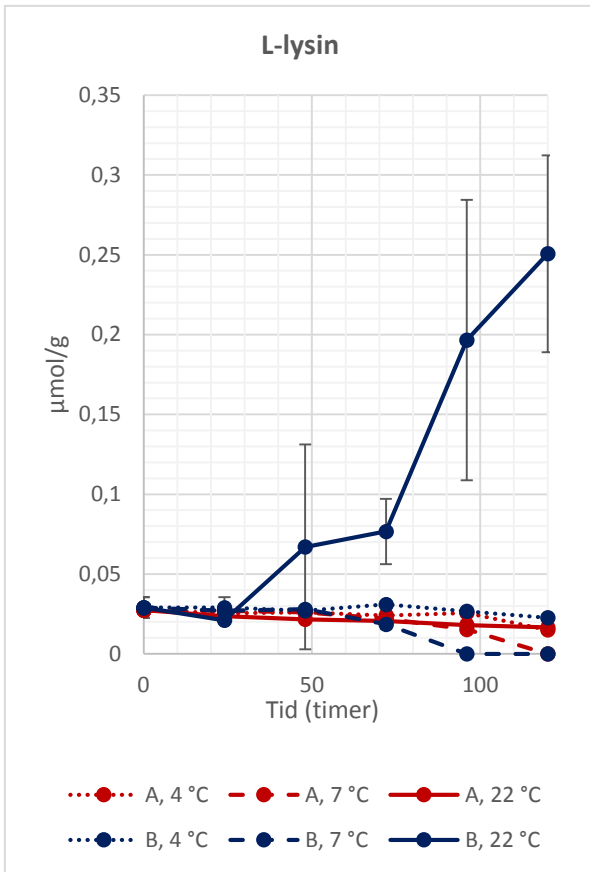
Tilstedeværelse av frie aminosyrer og eventuelle mengder i alle prøver tatt ut fra hver av de tre delene av forsøket ble undersøkt ved hjelp av HPLC. Gjennomsnittlige verdier (gitt i $\mu\text{mol/g}$) av de ulike stoffenes mengder ved de gitte tidene ble beregnet (Vedlegg 4).

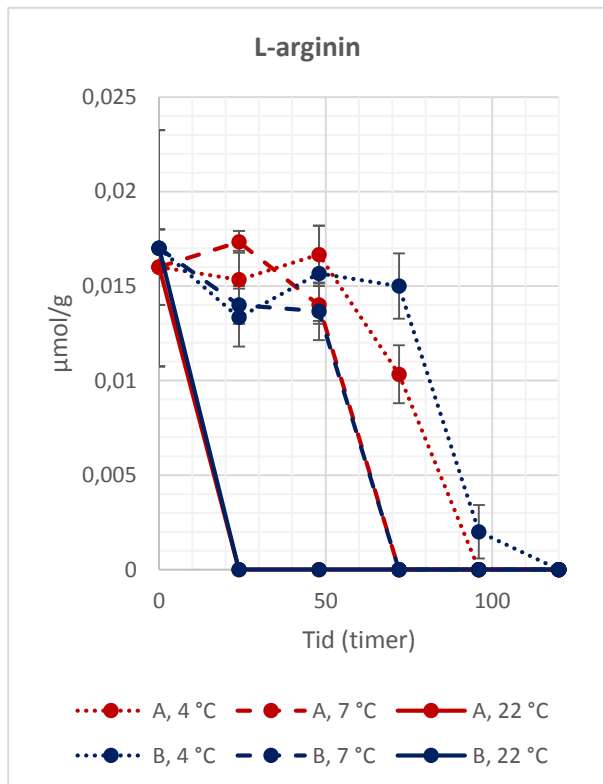
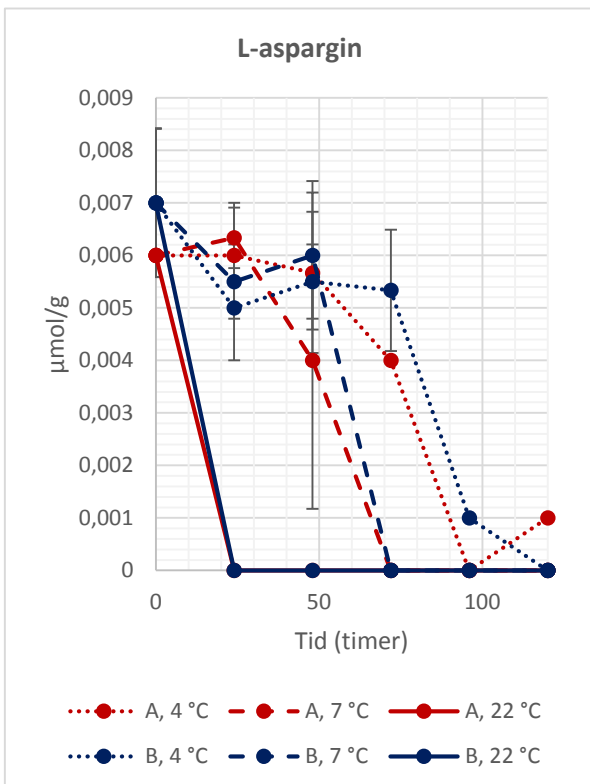
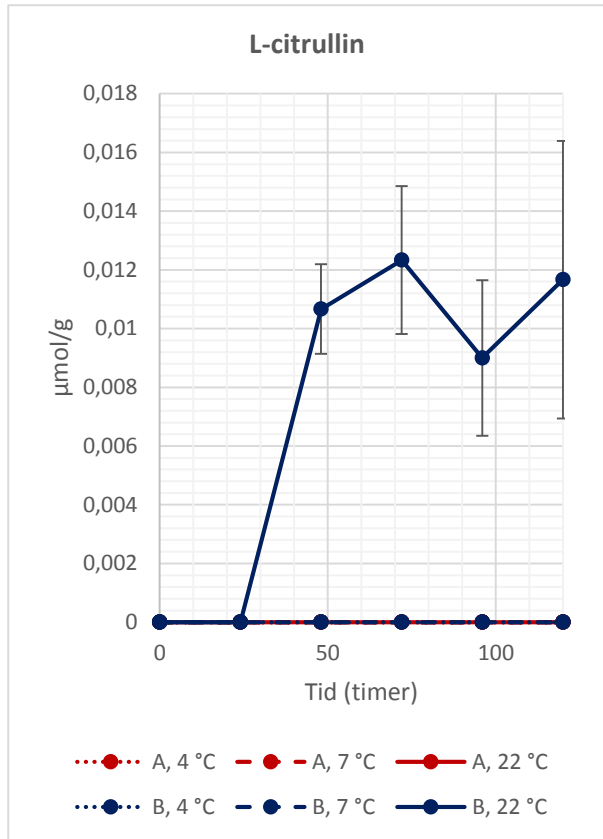
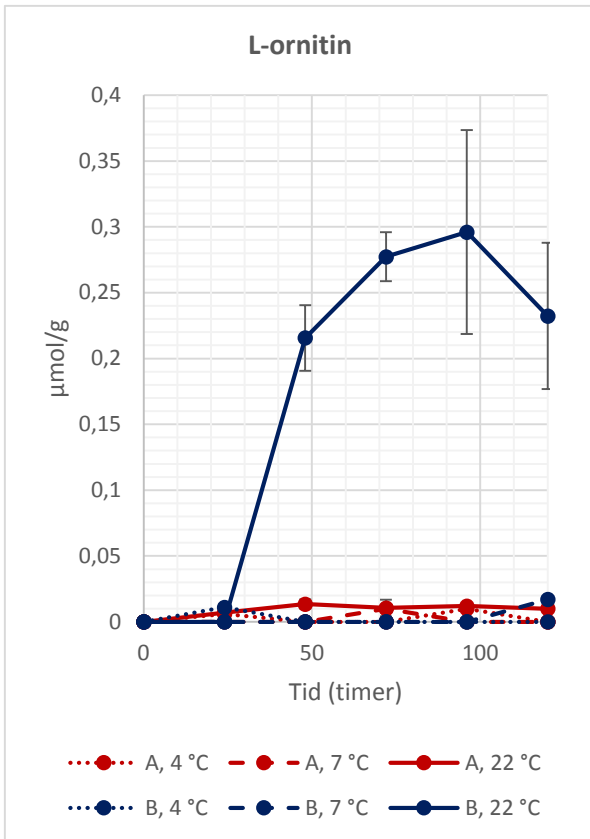
Resultatene er presenter grafisk i **Figur 3.4.1-3.4.21** og viser mengdeendring av hver aminosyre i de ulike melkeprøvene over tid. Det gjøres oppmerksom på at konsentrasjoner av de ulike aminosyrer ble funnet til å være svært forskjellige. Derfor er y-aksen tilpasset mengde for hvert syre.

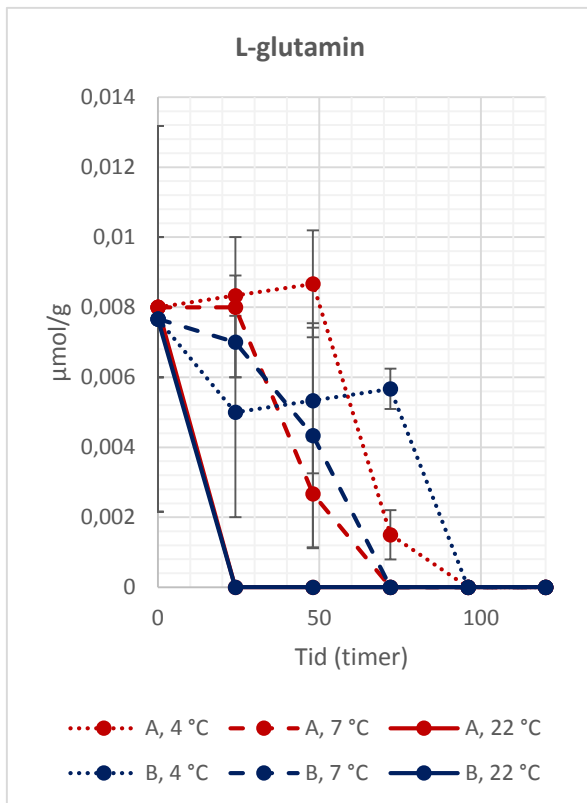












Figur 3.4.1 til 3.4.21. Utvikling av mengder av hver enkelte frie aminosyre (gitt i $\mu\text{mol/g}$) i hver av de seks melkeprøvene beskrevet i Figur 3.1.1 over tid. Gjennomsnitt av tre gjentak. Analyse med HPLC etter metode av Bütikofer og Ardö (1999) og Moe et al. (2013) med noen modifikasjoner.

Enkelte trender kan observeres i grafene over innholdet av forskjellige aminosyrer i de ulike prøvene over tid. **Figur 3.4.1 til 3.4.14** presenterer resultatene for aminosyrene L-serin L-histidin, L-treonin, L-tryptofan, L-isoleucin, L-leucin, L-asparginsyre, L-glutaminsyre, L-metionin, L-tyrosin, L-valin, L-fenylalanin, L-lysin og L-alanin, og viser at synlige endringer spesielt skjedde i melk med B-stamme ved 22 °C. I denne melken skjedde det en gradvis økning i mengder av alle de overnevnte aminosyrene etter rundt 48 timer. I de resterende melkeprøvene holdt derimot disse mengdene seg tilnærmet konstant. Også grafen over GABA (**Figur 3.4.15**) viser tilsvarende økning for B 22 °C, men her forekom det i tillegg også en svak økning for A-stamme ved 22 °C.

For glycin (**Figur 3.4.16**), som var til stede i små mengder ved start, skjedde det tilsvarende svak økning for B 22 °C, mens det for B 7 °C og A 22 °C i motsetning ser ut til å ha skjedd en reduksjon etter henholdsvis 72 og 48 timer. Resultatene for glycin har imidlertid også store standardavvik, som betyr at det er knyttet en viss usikkerhet til disse, og at det bør utøves forsiktighet i forbindelse med å si noe bestemt om mulig mønster.

L-ornitin og L-citrullin (**Figur 3.4.17** og **3.4.18**) er også aminosyrer som økte i mengde for B 22 °C, men hvor disse mengdene flatet ut og etter ca. 96 og 72 timer deretter avtok noe. For disse kan det mot slutten av inkubasjonstiden observeres økning i standardavvik, som igjen betyr en økt usikkerhet rundt akkurat disse resultatene.

For aminosyrene det ble analysert for i denne studien var det svært få av dem som opprinnelig hadde tilstedeværelse i melken. Det største unntaket som ble påvist ved tiden 0 var L-glutaminsyre. L-asparagin, L-arginin og L-glutamin (**Figur 3.4.19-3.4.21**) viste alle også å være i melken ved start, men i svært små mengder. For disse stoffene var trenden derimot at mengdene avtok, helt til de ikke lenger kunne detekteres. Her kan det også observeres at temperatur hadde en effekt, da nedgangen skjedde hurtigst i 22 °C og senest i 4 °C.

Som ved tilfellet for organiske syrer og karbohydrater, bør det også her nok en gang påpekes at mengdene detektert varierte mye mellom de forskjellige aminosyrene (ulike maksimalverdier på y-akser). For enkelte aminosyrer var de største detekterte mengdene likevel veldig lave sammenlignet med andre aminosyrer. Til tross for ulike mengder, så likevel flere av dem ut til å ha fulgt de samme trendene som beskrevet.

3.5 Flyktige stoffer (TDGCMS)

Analyser av flyktige stoffer ble utført i prøver fra utvalgte tider fra del 1, 2 og 3 ved bruk av TDGCMS. Ut i fra den semikvantitative bestemmelsen basert på arealet av toppene registrert, er det valgt å presentere tilstedeværelsen av de stoffene som hadde en matchfaktor på mer enn 70 % og/eller hvor det så ut til å ha skjedd en forandring over tid (Vedlegg 5). For mer oversiktlige resultater ble tallene dividert med en faktor på 1000. Resultatene er fremstilt i

Tabell 3.5.1.

Tabell 3.5.1. Relativt innhold (areal) av flyktige stoffer i 0-prøve og i melk, podet med stamme A eller B, etter 120 timer ved 4, 7 eller 120 °C. Alle tall er dividert med en faktor på 1000 for å gi mer oversiktlige resultater med mindre tall. Forsøk i triplikat (D1, D2, D3), og der n.d. = «not detected»/ikke detektert. Analyse med TDGCMS-metode.

Stamme	Stoff	0-prøve			4 °C, 120 timer			7 °C, 120 timer			22 °C, 120 timer		
		D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Ketoner:													
A	Aceton	3095	4132	1898	2000	1403	1054	1387	1589	1406	393	820	795
B		1773	3438	2727	2243	3937	2469	5289	1453	2222	3755	1965	2278
A	2-pentanon	776	383	782	607	1014	798	583	834	838	992	2013	1104
B		920	617	279	27	497	431	596	268	118	1396	2202	1203
A	2-heptanon	349	n.d.	429	139	349	283	316	203	475	136	387	181
B		419	2	216	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	60	330	123
A	2-butanon	3762	2979	3440	2638	2186	2473	1310	1418	1875	n.d.	n.d.	n.d.
B		3106	3448	2134	1785	3217	2505	3423	2196	n.d.	2104	2628	1834
A	Metyl- isobutyl keton	74	10	81	51	44	46	49	n.d.	43	15	97	56
B		27	57	6	36	n.d.	47	36	n.d.	n.d.	83	72	165
Aldehyder:													
A	Nonanal	149	798	175	n.d.	465	n.d.	302	238	311	79	471	158
B		158	488	164	104	108	20	n.d.	79	n.d.	n.d.	219	101
A	Oktanal	n.d.	76	9	n.d.	73	n.d.	n.d.	116	9	n.d.	133	n.d.
B		n.d.	96	21	n.d.	60	13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alkoholer:													
A	3-metyl-1- butanol	n.d.	n.d.	127	128	207	109	102	93	128	92	226	109
B		n.d.	12	n.d.	n.d.	88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1449	7039	5381
A	4-penten-2- ol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	336	n.d.	n.d.	n.d.	642	1668	784
A	3-metyl-3- buten-1-ol	210	n.d.	248	388	430	294	171	140	122	194	312	189
B		167	121	93	80	398	148	372	329	179	215	525	211
A	Isopropyl- alkohol	124	n.d.	450	2426	7786	4024	2826	3613	1873	6907	13375	15339
B		361	286	197	220	n.d.	336	683	388	n.d.	642	1668	784
A	Trans-3- caren-2-ol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	291	284
Hydrokarboner:													
A	Pentan	445	n.d.	429	535	n.d.	583	330	n.d.	236	138	151	102
B		580	212	92	13	96	174	533	208	162	364	154	272
A	Oktan	308	108	n.d.	138	254	302	368	283	303	n.d.	271	120
B		421	283	309	96	439	141	n.d.	168	43	123	221	53
A	Dekan	536	325	456	n.d.	61	n.d.	356	8	347	218	19	98
B		433	n.d.	203	n.d.	42	n.d.	n.d.	91	n.d.	n.d.	n.d.	123

A	Tridekan	9	14	26	47	15	4	7	6	33	n.d.	82	n.d.
B		10	21	5	2	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A	4-metyl-heptan	158	n.d.	177	n.d.	193	68	187	204	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B		267	231	114	117	225	78	n.d.	n.d.	24	n.d.	77	n.d.
A	2-etoxy-2-metyl-propan	515	330	315	348	492	324	428	501	389	426	489	452
B		514	406	118	230	292	228	452	453	n.d.	233	735	417
A	2-metoxy-2-metyl-propan	78	n.d.	68	n.d.	38	93	n.d.	92	50	56	121	70
B		73	63	n.d.	45	67	n.d.	102	64	n.d.	79	164	59
A	2-hepten	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	65	173	60
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	122	104	20	298	1151	520
A	2,4-dimetyl-1-hepten	148	163	184	n.d.	188	77	n.d.	n.d.	n.d.	20	150	n.d.
B		215	275	102	58	246	n.d.	38	121	n.d.	n.d.	n.d.	70
A	4-nonen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29	n.d.	24
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	170	n.d.
A	Cis-3-nonen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	224	n.d.	n.d.	n.d.	69	n.d.	218
A	2-metyl-1-propen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3995
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3968	n.d.	n.d.	18	732	222	137
A	2-metyl-1-penten	390	278	522	268	565	488	291	371	475	206	339	266
B		399	471	128	200	395	349	163	174	103	117	465	183
A	(E)-2-buten	n.d.	n.d.	n.d.	128	n.d.	116	n.d.	n.d.	n.d.	247	122	330
B		n.d.	304	n.d.	139	321	322	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A	(Z)-2-buten	n.d.	952	n.d.	n.d.	138	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	451	263	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A	2-metyl-4-[(3-metyl-2-butenyl)oxy]-1-buten	n.d.	320	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	140	122	n.d.	312	n.d.
B		n.d.	n.d.	93	80	n.d.	n.d.	372	329	n.d.	n.d.	525	n.d.
Svovelforbindelse:													
A	Dimetyl-sulfon	18	107	14	15	30	25	33	44	27	10	98	148
B		15	n.d.	40	25	215	26	102	44	75	65	36	50
Karboksytsyre:													
A	Oktansyre	47	n.d.	39	8	n.d.	9	28	n.d.	19	34	n.d.	26
B		36	n.d.	43	45	54	42	34	165	91	33	n.d.	n.d.
Lakton:													
A	Dihydro-3,5-dimetyl-2(3H)-furanon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28	n.d.	266	n.d.	343

Resultatene viser at en rekke flyktige stoffer ble detektert ved hjelp av denne analysen. Mange av disse ser ut til at naturlig var til stede i melken, mens andre ser ut til å ha blitt dannet og/eller ha økt i mengde over tid. Det kan også se ut til at temperaturen har hatt betydning for om et stoff avtok eller økte i mengde. Det antydes at de største forandringene hadde skjedd ved 22 °C. Det er i tillegg mulig å se enkelte forskjeller mellom de to stammene i utviklingen som har skjedd.

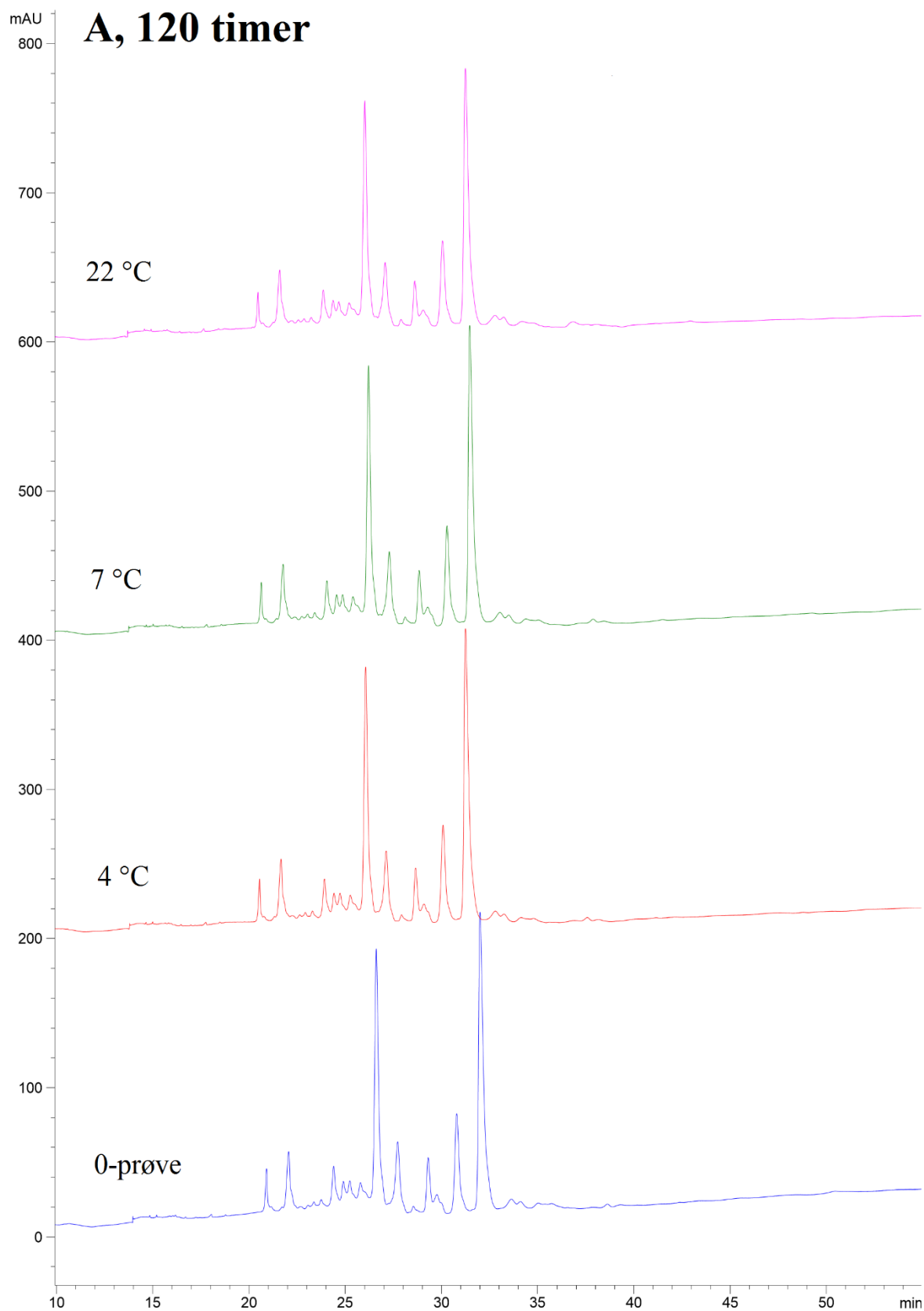
Av de 31 utvalgte stoffene presentert i resultatene, viste i hvert fall 13 av disse seg å være til stede i melken ved start, mens andre så ut til å være mer variabelt til stede. Dette er både ulike typer ketoner (blant annet aceton, pentanon, butanon), aldehyder (oktanal, nonanal), en alkohol (isopropylalkohol), hydrokarboner (propan, pentan, heptan, oktan, dekan, buten, hepten, penten) og en karboksylsyre (oktansyre). Mange av disse så ikke ut til å forandre seg særlig over tid, men heller at de forble til stede i melken over tid. En nedgang så imidlertid ut til å ha skjedd i mengdene av både 2-butanon og dekan i melk med vekst av stamme A ved 22 °C, og i mengden av tridekan i melk med vekst av stamme B ved 22 °C. Mengden av 2-pentanon i melk med A ved 22 °C kan se ut til at økte.

Flere nye stoffer som ikke kunne påvises i nullprøvene, ble detektert i noen av melkeprøvene etter inkubasjon. Disse ser ut til å ha blitt dannet spesielt ved 22 °C, og særlig ved vekst av stamme B, slik som nye varianter av propen og nonen, furanon, pentenol og carenol. Varianter av nonen og hepten ble i tillegg også dannet ved vekst av stamme A ved 22 °C.

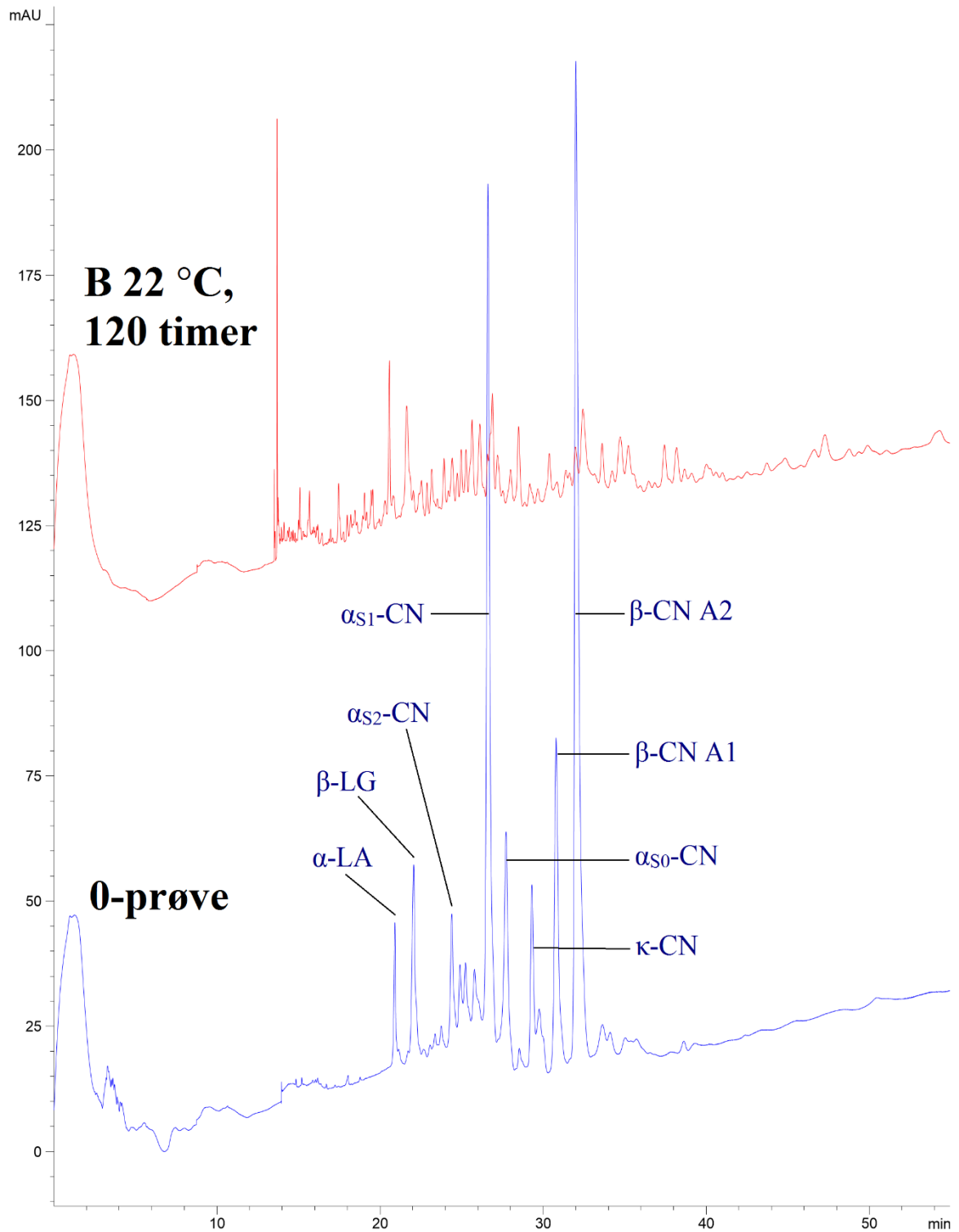
Resultatene viser en del variasjon i detekterte relative mengder, og det er dermed usikkert hvor pålitelige resultatene virkelig er. For eksempel kan det av og til observeres stor forskjell i mengdene av et stoff mellom triplikatene for samme type melk. Det er usikkert om enkelte av variasjonene skyldes analysemetoden eller om det er de faktiske forholdene i hver enkelt melkeprøve som gjenspeiles i resultatene.

3.6 Protein og peptidanalyse (CE)

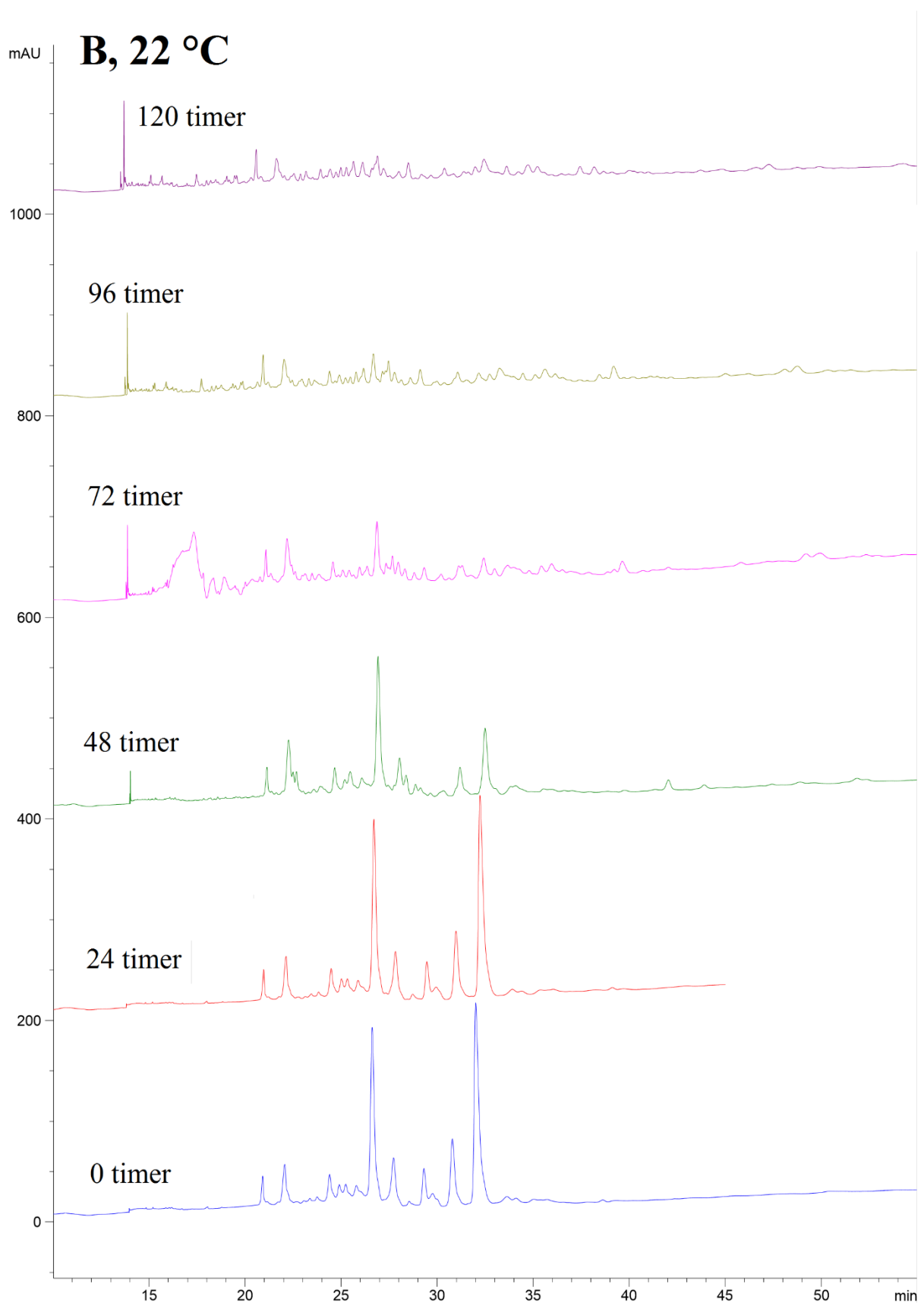
Av alle B-prøver og utvalgte A-prøver tatt ut under forsøkets tredje del ble det utført kapillærelektroforese (CE) for undersøkelse av protein- og peptidinnhold. Resultatene er presentert som kapillærelektroferogrammer i **Figur 3.6.1-3.6.5**.



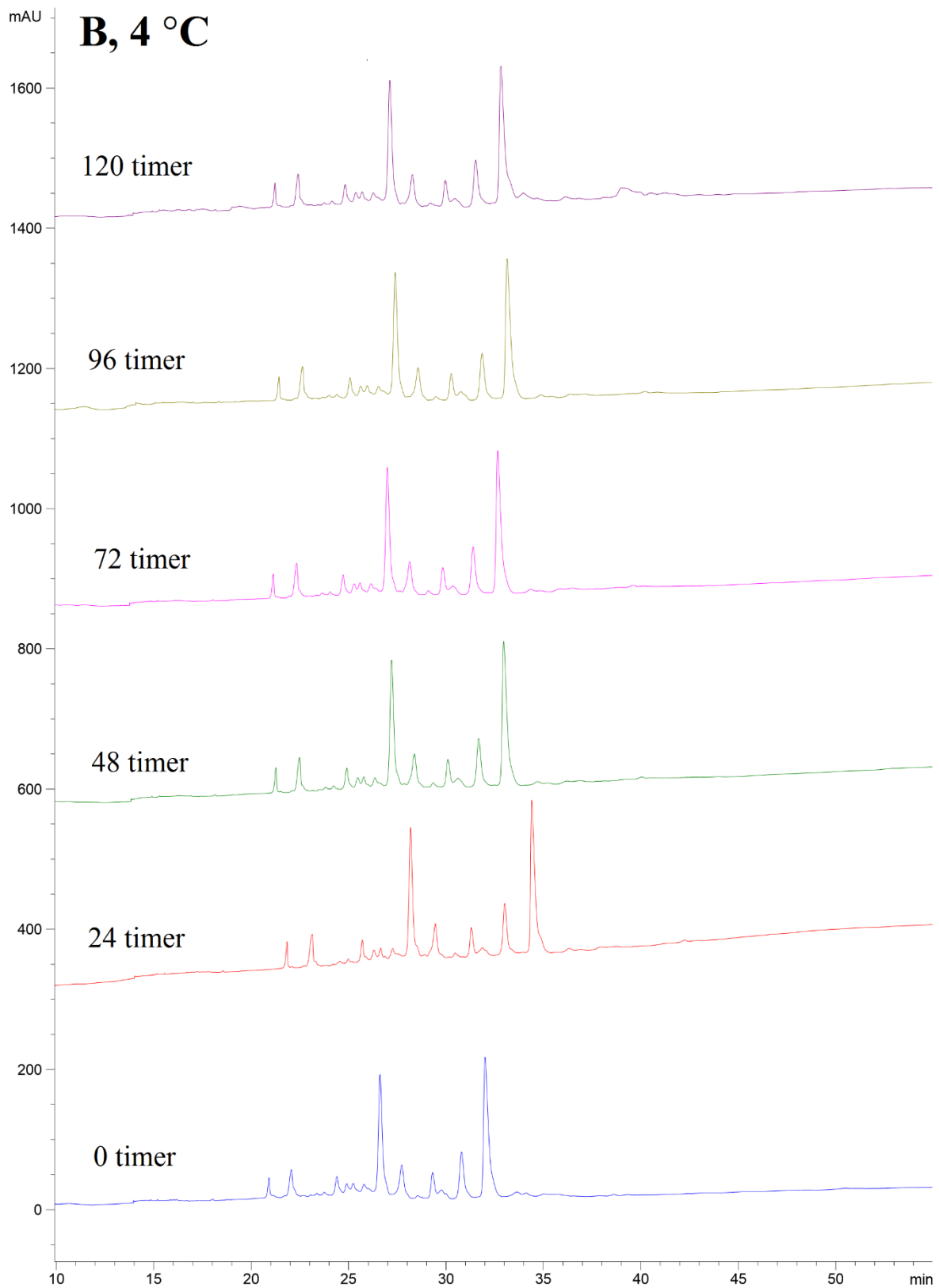
Figur 3.6.1. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og prøver av A-120 timer for 4, 7 og 22 °C jf. Figur 3.1.1. X-akse viser retensjonstid (minutter), mens y-akse viser absorbans (mAU). Analyse etter metode av Heck et al. (2008) og Mestawet et al. (2014) med noen modifikasjoner.



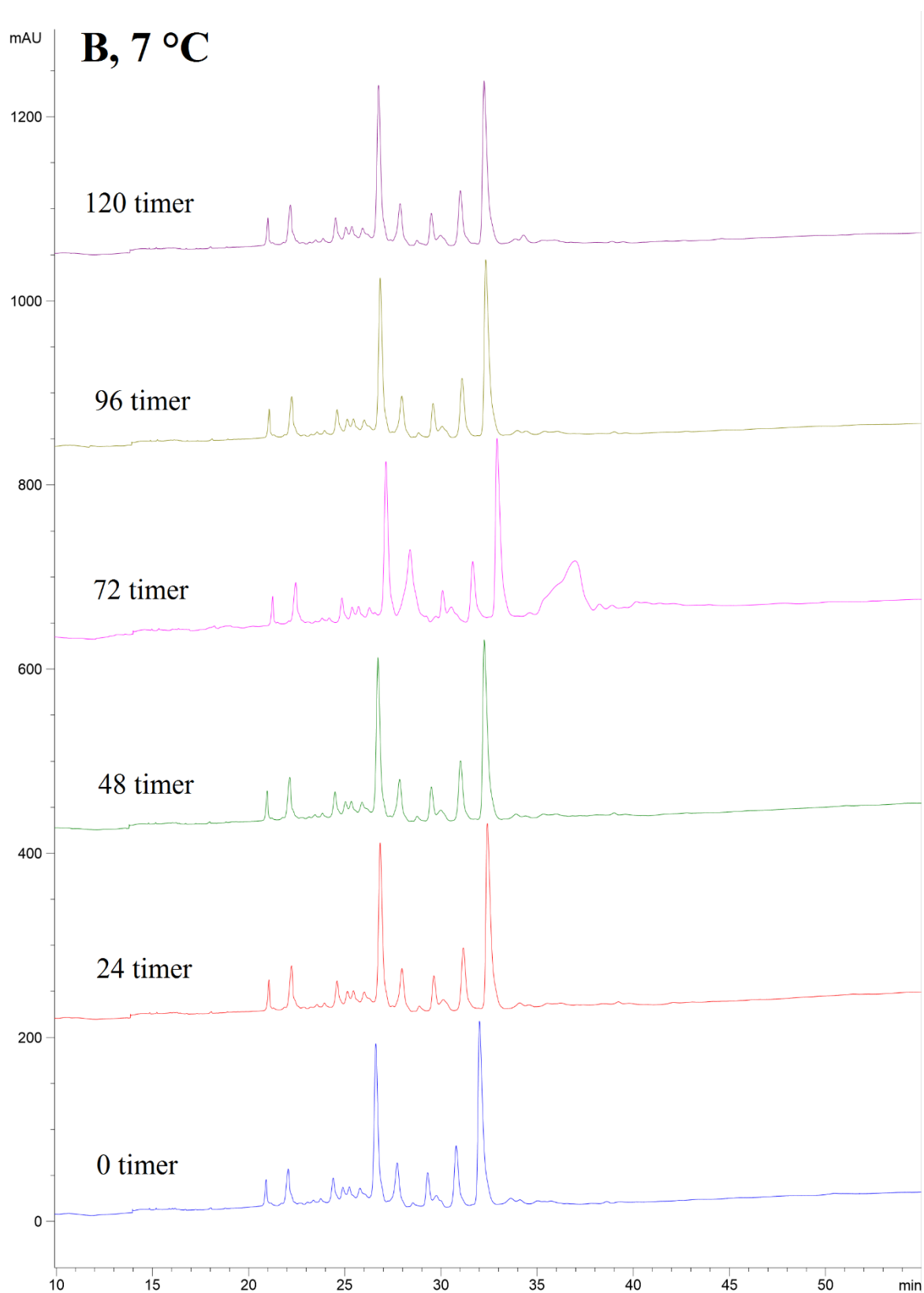
Figur 3.6.2. Kapillærelektroferogram av ytterpunktene 0-prøve og B-22-120 jf. Figur 3.1.1. Hvilke proteiner de ulike toppene i 0-prøven tilsvarer, i henhold til Heck et al. (2008), er markert. Forklaring til forkortelser: α-LA: α-laktalbumin, β-LG: β-laktoglobulin, α_{S2}-CN: α_{S2}-kasein, α_{S1}-CN: α_{S1}-kasein, α_{S0}-CN: α_{S0}-kasein, κ-CN: κ-kasein, β-CN A1: β-kasein A1 og β-CN A2: β-kasein A2.



Figur 3.6.3. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og utviklingen av protein- og peptidmønster i B 22 °C over tid jf. Figur 3.1.1.



Figur 3.6.4. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og utviklingen av proteinmønster i B 4 °C over tid jf. Figur 3.1.1.



Figur 3.6.5. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og utviklingen av proteinmønster i B 7 °C over tid jf. Figur 3.1.1.

Figur 3.6.1 presenterer resultatene fra CE av ytterpunktene 0-prøve og melkeprøver med stamme A ved 4, 7 og 22 °C etter 120 timer. Ved sammenligning av 0-prøvens graf med de tre andre grafene i elektroferogrammet kan det ikke observeres synlig forskjell. De ulike toppene i grafen for 0-prøven representerer proteinfraksjoner i den aktuelle melken, og alle disse toppene var bevart helt intakte og med tilnærmet samme retensjonstid etter 120 timer ved alle de tre temperaturene. Dette betyr at det ser ut til at det ikke har skjedd noen forandring i proteininnhold ved forsøkets slutt for denne stammen, og det er derfor rimelig å anta at det heller ikke har skjedd forandringer underveis.

Hvilke melkeproteiner de ulike toppene i 0-prøven ble antatt å være, i henhold til Heck et al. (2008), er presentert i **Figur 3.6.2**. Her er også resultatet for melk med B ved 22 °C etter 120 timer presentert, for tydelig å illustrere at store endringer hadde skjedd. Mønsteret i 0-prøven som proteinsammensetningen i denne melken ga, kan ikke gjenkjennes ved B, 22 °C og 120 timer. Forandringene i proteinmønster som har skjedd over tid i B-stamme ved 22 °C vises i **Figur 3.6.3** som gradvis forandring i kurvens topper. Her kommer det frem hvordan de enkelte toppene som var til stede ved start, over tid stadig ble mindre og mindre, samtidig som nye topper dukket opp.

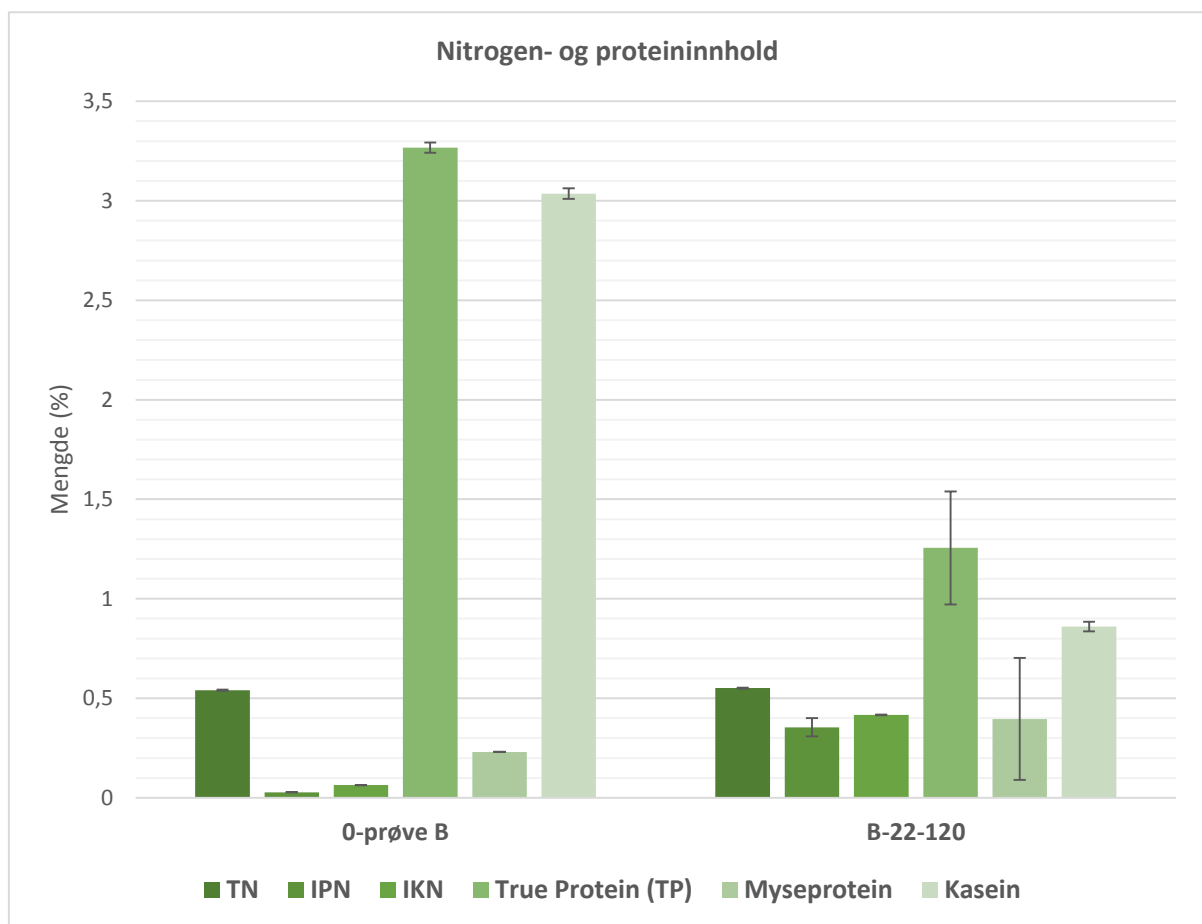
Denne kraftige proteinnedbrytningen som fant sted for B ved 22 °C kunne derimot ikke observeres ved 4 eller 7 °C (**Figur 3.6.4** og **3.6.5**). Her forble kurvene ved begge temperaturer tilnærmet uendret over tid. Kun en svak reduksjon av toppen som tilsvarende β -kasein A2 så ut til å ha skjedd ved 7 °C etter 120 timer. Ved 4 °C var det vanskelig å kunne se noen forandring i det hele tatt.

Som det går frem i figurene presentert for kapillærelektroforesen, er aksene for hver kurve i hvert enkelt elektroferogram slått sammen til én sammenhengende akse som viser absorbans (milliabsorbansenhet, mAU) fra 0 til maks. Maksverdi varierer fra figur til figur. Det påpekes imidlertid at kurvene innenfor samme figur har samme skala, den eneste forskjellen mellom dem er at startpunktet på Y-aksen er forskjøvet oppover. Årsaken til dette er å unngå uoversiktlig overlapp av kurvene i det samme elektroferogrammet. X-aksene viser toppenes retensjonstid (minutter), og i enkelte av figurene er ikke hele tiden før kurvene dukker opp inkludert (det vil si x-akse starter ikke alltid ved 0), men det er i stedet zoomet inn på det tidsområdet som faktisk viser proteinmønsteret og er av interesse. Alle kurvene innenfor samme figur har imidlertid helt samme x-akse og er ikke forskjøvet i forhold til hverandre. I enkelte av figurene kan det i tillegg observeres kurver med ujevne baselinjer eller som

inneholder enkelte forstyrrelser, men dette ses det bort i fra at det har hatt en betydning for trendene disse resultatene viser.

3.7 Kjeldahl-analyser av nitrogen- og proteininnhold

For å understøtte funnene fra kapillærelektroforesen ble det utført Kjeldahl-analyser på to utvalgte prøver; én nullprøve og én B-prøve ved 22 °C og 120-timer. Totalnitrogen (TN), Ikke-protein-nitrogen (IPN) og Ikke-kasein-nitrogen (IKN) ble analysert og beregnet, og basert på disse funnene ble innholdet av totalt protein, myseprotein og kaseinprotein estimert (Vedlegg 6). De ulike typene nitrogen- og proteininnhold i de to prøvene er presentert som søylediagram i **Figur 3.7.1**.



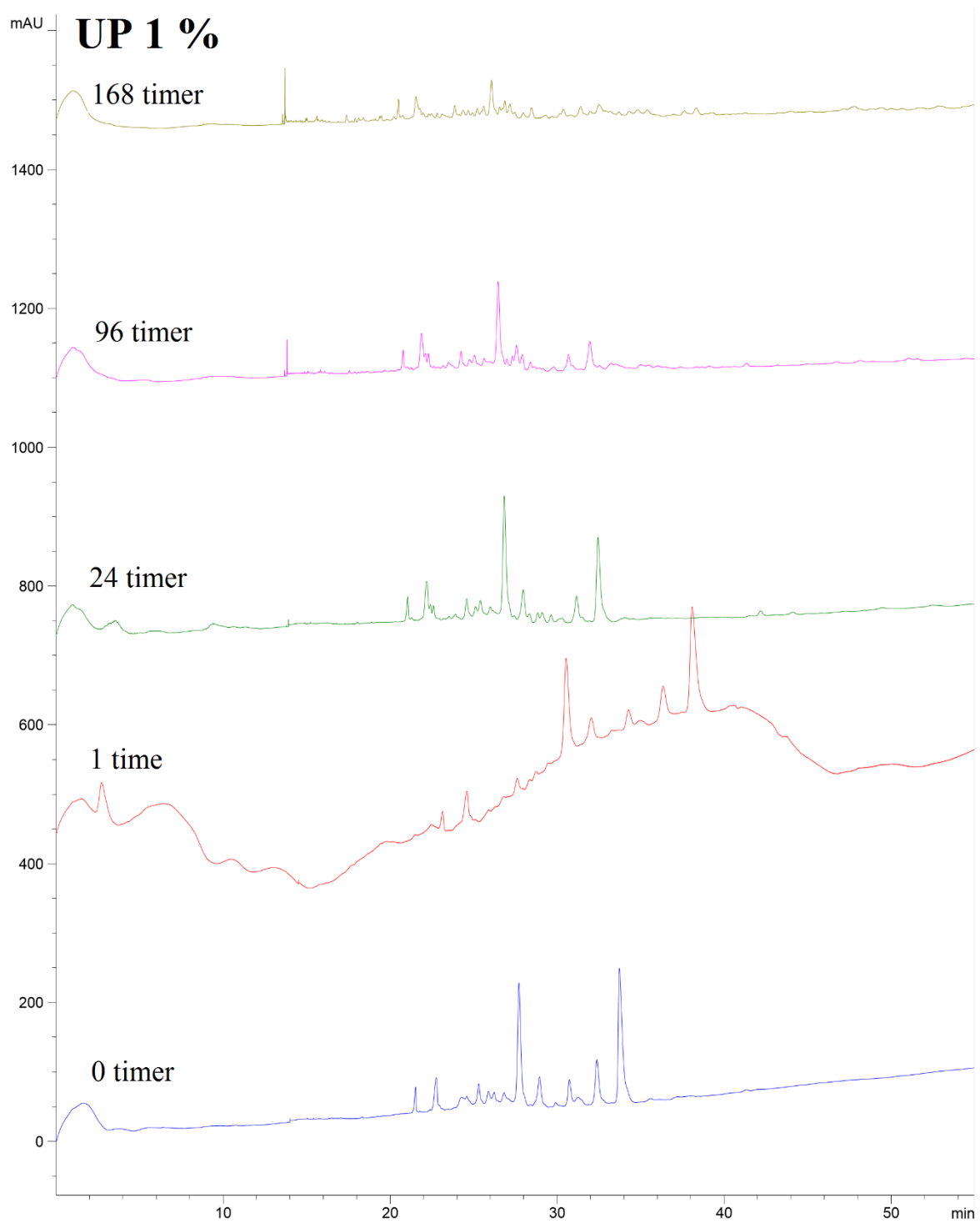
Figur 3.7.1. Kjeldahl-analyse for nitrogeninnhold og beregnede proteininnhold (gitt i %) i 0-prøve og B-22-120 jf. Figur 3.1.1. TN: totalnitrogen, IPN: ikke-protein-nitrogen, IKN: ikke-kasein-nitrogen, TP: true protein/totalprotein, Myseprotein, Kasein. Separering av fraksjoner etter metode fra IDF (2001).

Resultatene for 0-prøven viser at melken opprinnelig inneholdt ca. 3,27 % protein etter utregning med Kjeldahl-faktor. Dette stemmer godt overens både med melkens innholdsfortegnelse og med teorien, som begge sier at proteininnhold per 100 g skal være 3,3 g. Resultatene viser imidlertid noe høyt innhold av kasein (3,04 %), i forhold til teorien som oppgir at dette omtrentlig er 2,6 % (Walstra et al. 2014).

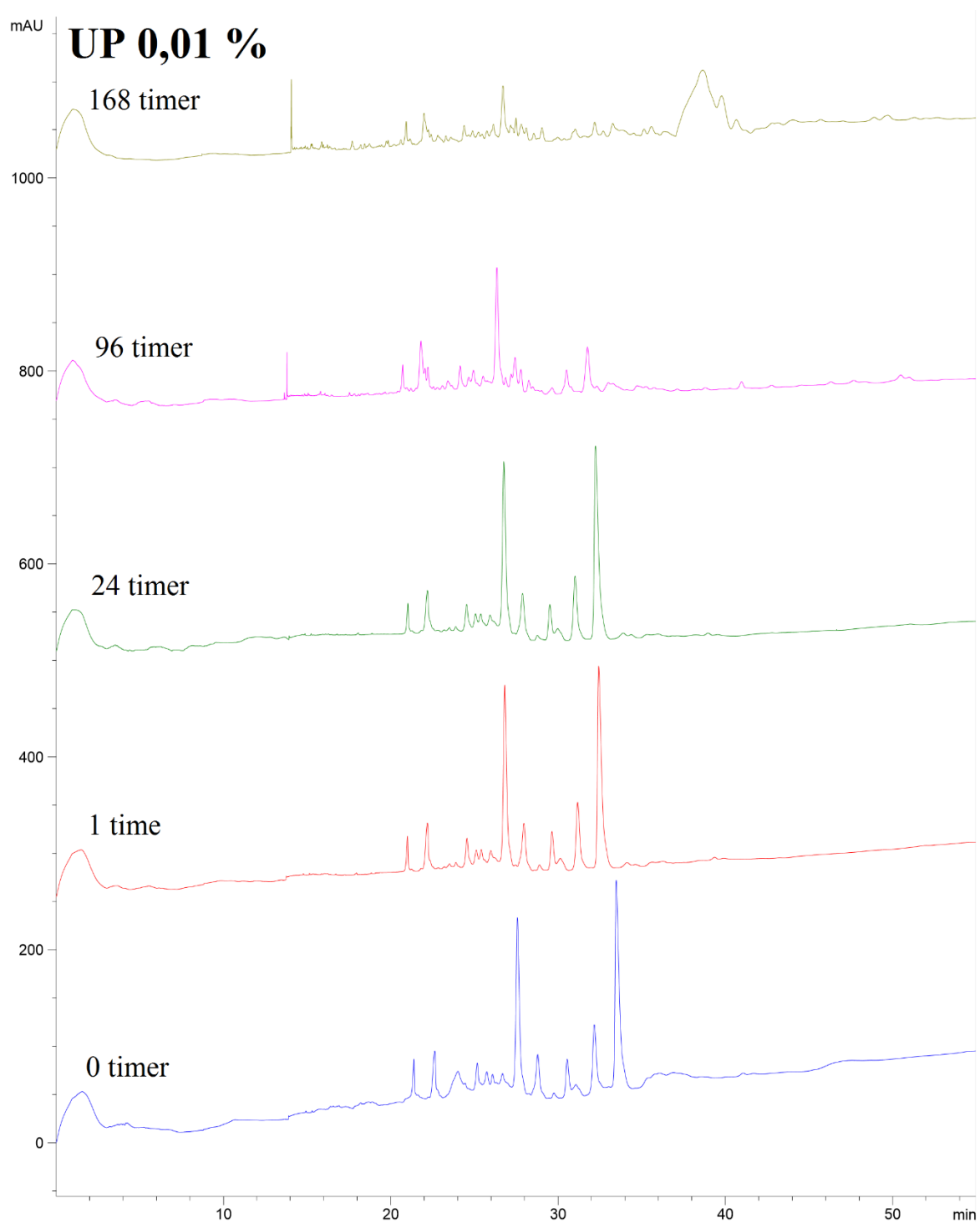
Sammenligning av resultatene for 0-prøve og B-22-120 bekrefter nedgang i andel totalprotein og kasein, som det også gikk frem av resultatene fra CE. Mengdene har etter 120 timer ved 22 °C blitt redusert til hhv. 1,26 og 0,86 %. Samtidig er innholdet av totalnitrogen tilnærmet det samme. Resultatene viser i tillegg at andelen IPN og IKN har økt.

3.8 Proteinaseaktivitet og peptidanalyse (CE)

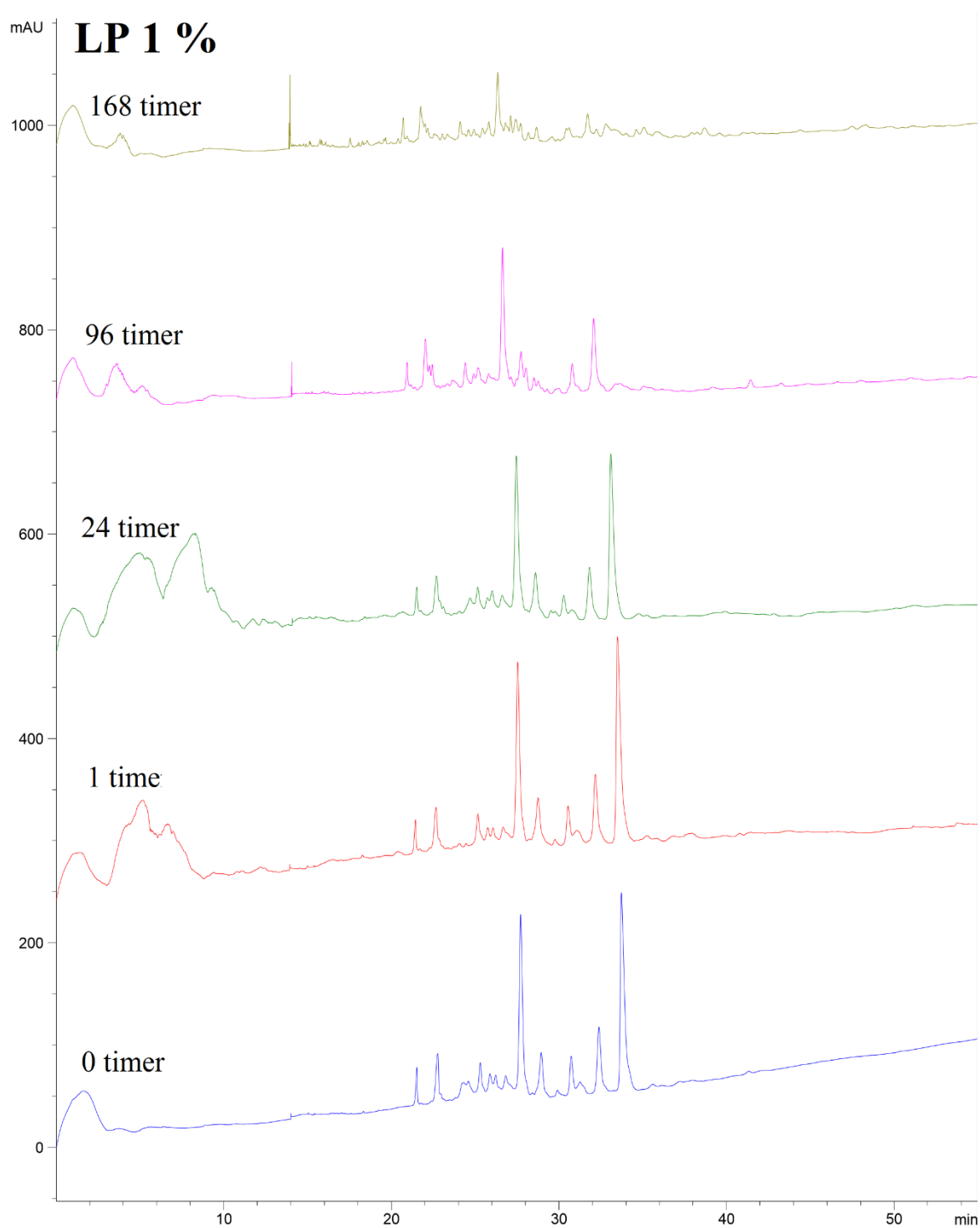
Aktiviteten til proteinase, isolert fra en utvalgt B-prøve fra del 3 av forsøket (22 °C, 120 t), ble undersøkt i melk. To ulike podemengder og tre typer behandling av podet melk ble benyttet, og uttak ble gjort ved gitte tider etter poding eller etter varmebehandling. På samme måte som ved peptidanalyse ble det gjort kapillærelektroforese (CE) av prøveuttakene, og resultatene er fremstilt som kapillærelektroferogrammer i **Figur 3.8.1-3.8.6**.



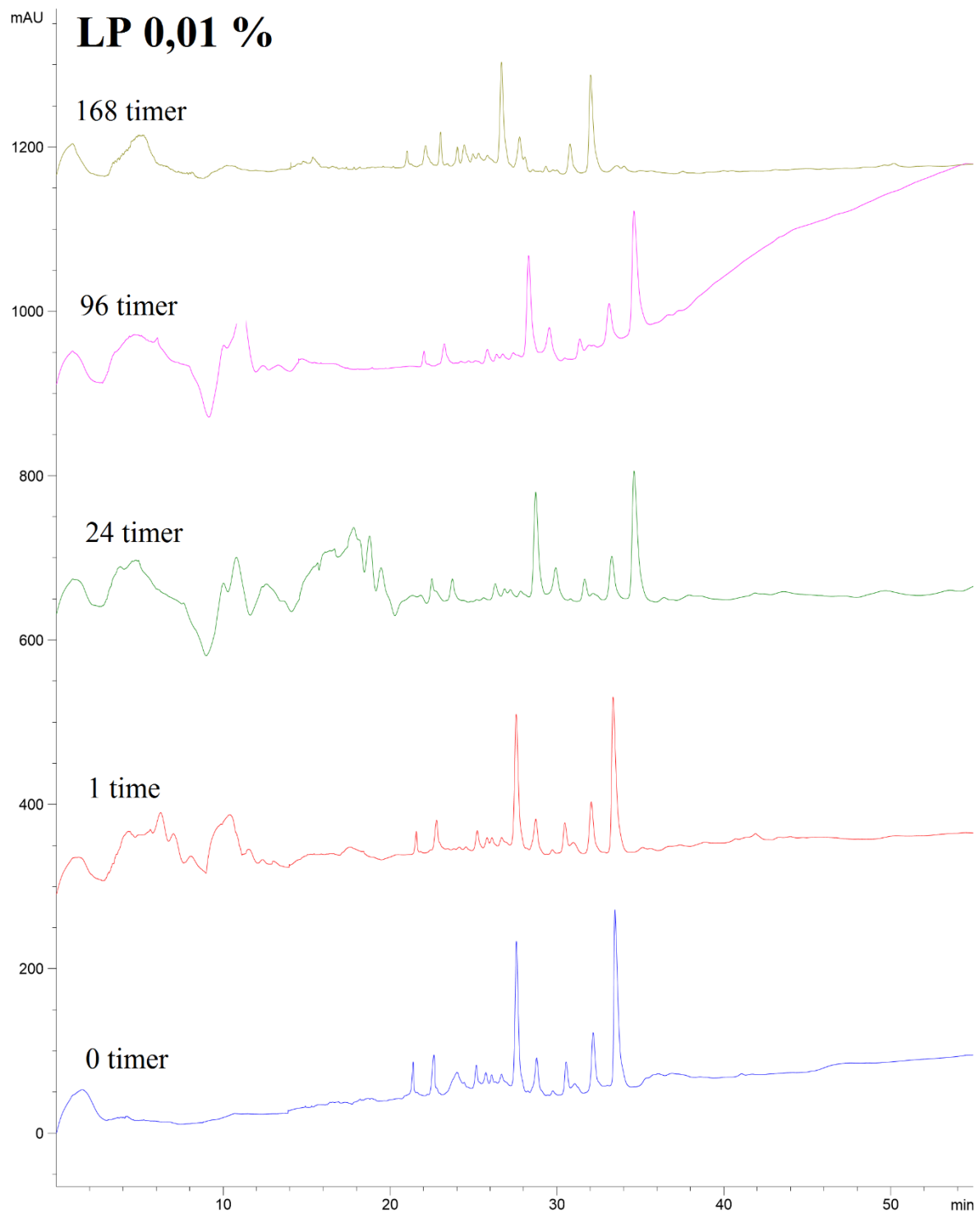
Figur 3.8.1. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og prøver tatt ut fra melk podet med 1 % proteinaseløsning og inkubert ved 22 °C (UP: uten pasteurisering).



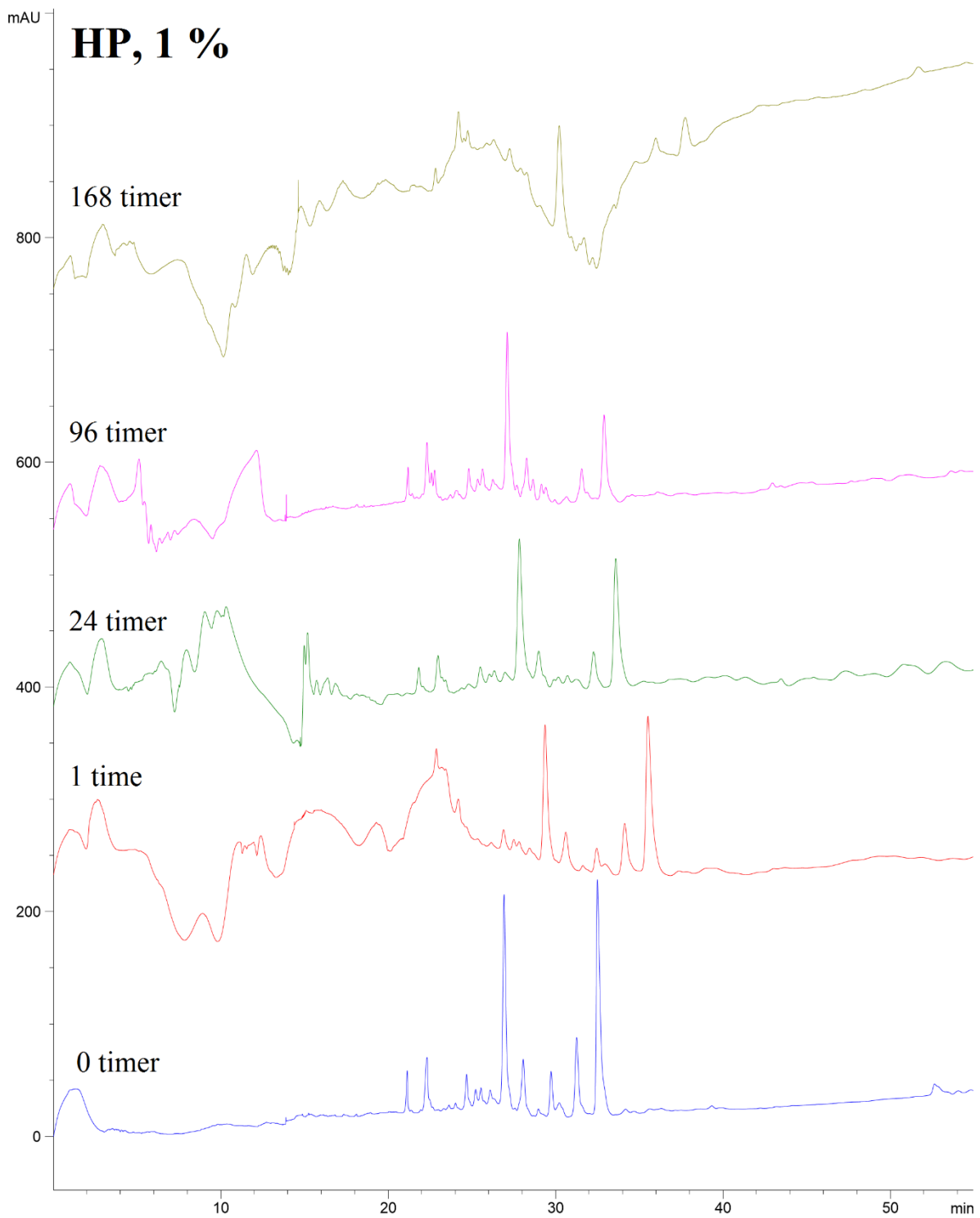
Figur 3.8.2. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og prøver tatt ut fra melk podet med 0,01 % proteinaseløsning og inkubert ved 22 °C (uten pasteurisering, UP).



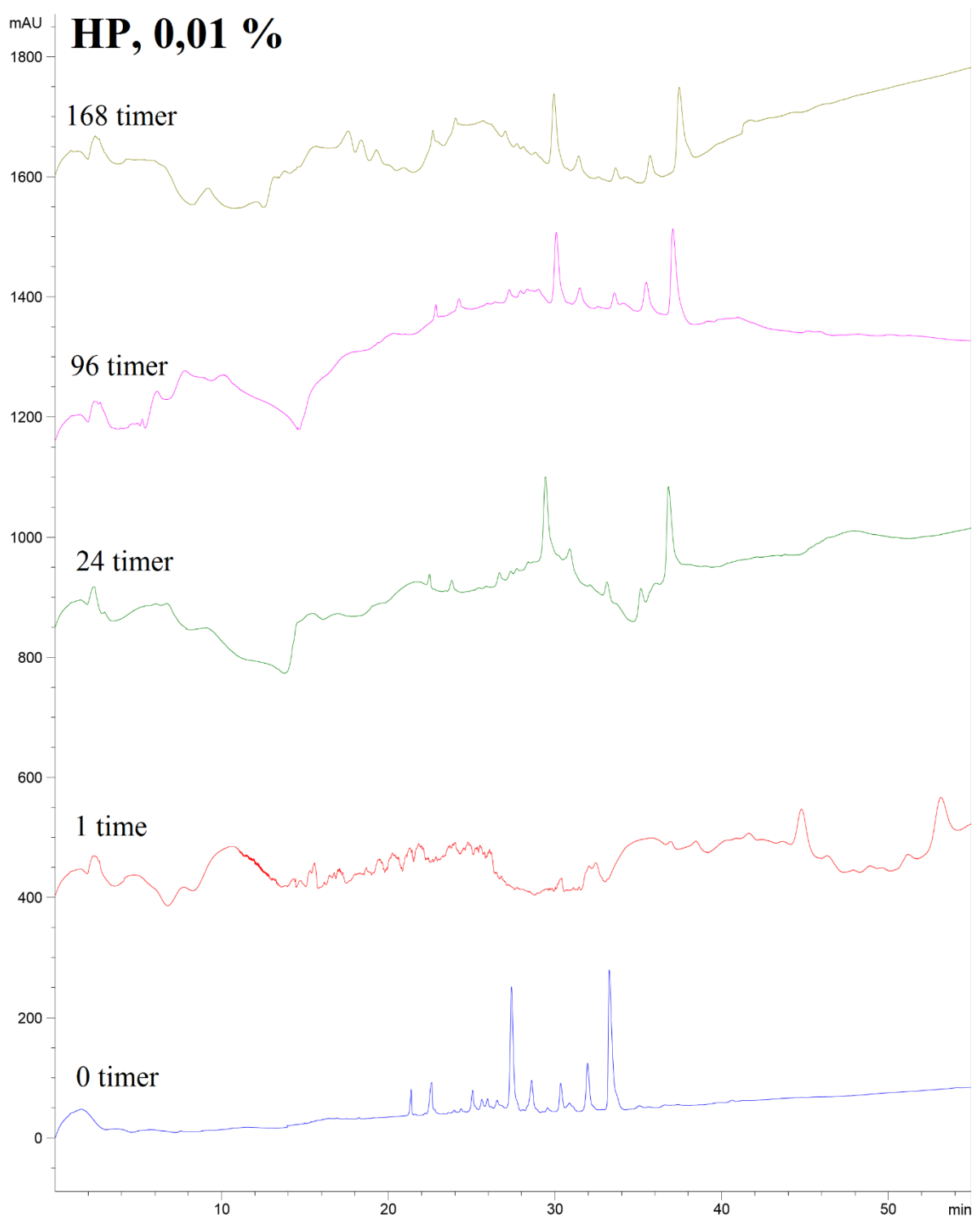
Figur 3.8.3. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og prøver tatt ut fra melk podet med 1 % proteinaseløsning, lavpasteurisert (LP) og inkubert ved 22 °C.



Figur 3.8.4. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og prøver tatt ut fra melk podet med 0,01 % proteinaseløsning, lavpasteurisert (LP) og inkubert ved 22 °C.



Figur 3.8.5. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og prøver tatt ut fra melk podet med 1 % proteinaseløsning, høypasteurisert (HP) og inkubert ved 22 °C.



Figur 3.8.6. Kapillærelektroferogram av 0-prøve og prøver tatt ut fra melk podet med 0,01 % proteinaseløsning, høypasteurisert (HP) og inkubert ved 22 °C.

I melken som ble tilsatt proteinaseløsning og deretter ikke varmebehandlet (UP), men satt direkte til inkubasjon (**Figur 3.8.1** og **3.8.2**), kunne det observeres tydelig nedbrytning av protein. Mange av toppene som var opprinnelig til stede i melken, som hver indikerte de ulike melkeproteinene som tidligere beskrevet, ble redusert i størrelse, mens mange nye topper dukket opp. Også nedbrytningsmønsteret over tid lignet mønsteret som tidligere observert, der toppene som indikert β -kasein A1 og A2 og κ -kasein ble redusert først. Samtidig dukket det opp særlig en ny topp med lav retensjonstid (~14 minutter), i tillegg til en rekke andre nye og ukjente topper (peptider). Heller ikke her så myseproteinene α -laktalbumin og β -laktoglobulin ut til å ha blitt degradert så mye, som indikert av de to toppene med retensjonstid på mellom 20 og 24 minutter. Det vises også reduksjon i α_{S1} - og α_{S0} -kasein, men ikke like mye og like fort som for β - og κ -kasein, da toppene for de førstnevnte proteinene fremdeles så ut til å til en viss grad være synlige også etter 168 timer (7 døgn).

Dette mønsteret var tydeligst i melken tilsatt 1 % løsning, hvor toppene ble redusert raskere enn i melken tilsatt 0,01 %. Etter 24 timer hadde det for eksempel skjedd større synlige forandringer i 1 % enn 0,01 %-melk. Likevel så det ut til at det samme skjedde i 0,01 %-melk som i 1 %-melk, bare at dette forløpet skjedde saktere.

Tilsvarende trend som i UP-melk kunne observeres i melken som ble lavpasteurisert (LP) (**Figur 3.8.3** og **3.8.4**) etter at proteinaseløsning ble tilsatt, men denne var lavere. Her ga imidlertid tilsats i 1 % mengde tydeligere mye mer utsalg enn 0,01 %-tilsetning. Ved den lave tilsetningen kunne alle de opprinnelige proteintoppene fremdeles ses etter 168 timer.

For resultatene presentert her gjelder som for tidligere nevnt for CE, at forekomsten av forstyrrelser og skeive baselinjer blir sett bort i fra. For melken som ble tilsatt proteinaseløsning og deretter høypasteurisert (HP) (**Figur 3.8.5** og **3.8.6**) er imidlertid disse forstyrrelsene store. Det er derfor vanskelig å si noe sikkert verken om eventuelt mønster i nedbrytning og enzymaktivitet eller varmebehandlingsens effekt. Det kan muligens se ut til at det også her har skjedd enn viss reduksjon først og fremst i mengde β -kasein A2 og kanskje også i mengde κ -kasein, ved 1 %-tilsetning. I resultatene for HP 0,01 %-melk var det ikke mulig å sammenligne kurvene og trekke ut hvilke eventuelle forandringer som har skjedd.

Under inkubasjon av melkeprøvene var det mulig å observere enkelte fysiske forandringer. Etter 96 timer hadde det blitt dannet en tydelig gel i begge UP-prøver, i tillegg til skarp, uren lukt. Et slags slim, eller en mindre fast gel, var ved samme tid dannet i LP 1 %- og HP 1 %-prøve. Ingen forandringer var synlige i HP og LP med 0,01 % tilsetning. De samme

observasjonene kunne ses etter 168 timer, og muligens var gelene i LP og HP 1 % blitt noe fastere. I prøver med gel var også lukten skarp, uren og fjøslignende, men skarpest i UP 1 % og 0,01 % og i LP 1 %.

4. DISKUSJON

4.1 Vekst av *Pseudomonas* i melk

I denne oppgaven ble det forsøkt å simulere forholdene slik melk utsettes for i tank på gården og gjennom transport fram til meieri. Fokuset var på vekst og bakteriell belastning representert ved de to bakteriestammene ATCC 13525 («A») og ATCC 17400 («B») av *Pseudomonas fluorescens*.

Melken benyttet i forsøket ble inokulert med bakteriemengder som ga en startkonsentrasjon i melken på like over log 3 ved tiden 0. Dette er mengder som det er mulig å oppnå i ubehandlet melk på gårdstanken ved gode hygieniske forhold ifølge Walstra et al. (2014). Haug og Hettasch (2014) viser for eksempel til at hele 50 % og 10 % av melkebrukene som benytter henholdsvis konvensjonell melkestall og melkerobot, leverer melk til TINE SA med gjennomsnittlige bakterietall under log 3,26 CFU/mL (1800 CFU/mL tilsvarende 9000 BC/mL).

Tidsaspektet som ble benyttet (lagring i 0 til 5 døgn) er også mye likt som i praksis, i tillegg til det aerobe miljøet. På denne måten er det derfor mulig å relatere funnene i vekstforsøket med faktiske forhold i forbindelse med psykrotrofe bakteriers vekstforløp i melk under lagring på gården, transport og lagring på meieri. Samtidig bør det tas i betraktning at podematerialet i dette forsøket besto av renkulturer av psykrotrofe bakterier, som ikke var like komplekst sammensatt som den mikrofloraen man vanligvis finner i ubehandlet melk. Som nevnt er det likevel psykrotrofe bakterier, og da særlig *Pseudomonas* spp., som oftest blir den dominerende bakterien i både upasteurisert og pasteurisert kjølelagret melk, og som er en av de største problemene tilknyttet bakteriell vekst og kvalitetsforringelse av melk. Forsøket kan imidlertid også ses i sammenheng med hvordan bakterievekst kan utarte seg ved postpasteurisering-kontaminering med *Pseudomonas* spp. (McPhee & Griffiths 2002; Sørhaug & Stepaniak 1997).

Resultatene viser hvordan vekstforløpet til bakteriestammene podet i melk er relatert til både lagringstid og -temperatur. Stammenes vekst var dessuten relativt kraftig og bakterietallet nådde over tid høye verdier, noe som bekrefter at melk er et godt egnet vekstmedium for disse bakteriene. At god vekst og høye bakterietall av psykrotrofe bakterier og av *P. fluorescens* kan oppnås i melk, er tidligere bekreftet blant annet i studier av henholdsvis Adams et al.

(1975) og Eie (1994). Førstnevnte påviste etter 7 dager ved 4 °C et bakterietall på 10 log CFU/mL, etter poding av steril melk med en utvalgt psykrotrof bakterie isolert fra melk i mengder som ga like under 3 log CFU/mL.

Raskest vekst fant sted ved inkubering ved 22 °C. Fra et bakterietall på ~ 3,15 log CFU/mL ved tiden 0, steg antallet opp til hele ~ 7,67 log CFU/mL etter kun 24 timer ved denne temperaturen, både for stamme A og B. Etter ytterligere 24 timer (totalt 2 døgn) flatet veksten ut og begge stammene nådde stasjonær fase. Her illustreres det samtidig at de to stammene skiller seg fra hverandre da maksimal bakteriekonsentrasjon oppnådd var noe ulik, nemlig ~ 9,8 og 8,7 log CFU/mL for henholdsvis stamme B og A (1 log høyere i B). Tilsvarende mønster, at stamme B hadde noe kraftigere vekst enn stamme A, kan også ses etter 2 døgn ved 7 °C og så vidt etter 4 døgn ved 4 °C. Etter 5 døgn kan det observeres at bakterietallet i all melken har overskredet 7 log CFU/mL. Akkurat som ved 22 °C, er tallene ved både 7 og 4 °C da høyere for B-stamme enn for A-stamme. Trendene i vekstforsøket er tydelige, men det bør tas i betraktning at platespredning, som denne undersøkelsen baserer seg på, kan være en noe unøyaktig og variabel metode. Blant annet kan det ses noe variasjon i bakteriemengde i de tre gjentakene nettopp for B ved 22 °C, noe som gir utslag i standardavvik.

Ved de to lave temperaturene, 4 og 7 °C, formerte begge de to bakteriestammene seg mye saktere enn ved 22 °C, men det kan også observeres en viss forskjell mellom veksten ved disse to temperaturene, til tross for at temperaturforskjellen mellom dem bare er 3 °C. Tilsvarende ble observert av Fajardo-Lira et al. (2000) som også undersøkte vekst av *Pseudomonas* ssp. inokulert i fersk melk, og som fant at bakterieveksten var synlig raskere ved 7 °C enn ved 4 °C. Det tok likevel en del lengre tid før bakterietallet ved disse to lavere temperaturene observert i denne studien overskred TINE SAs grenseverdi for stopp i mottak, som altså ligger på ~ 4,9 log CFU/mL (80 000 CFU/mL tilsvarende 400 000 BC/mL). Ved 7 °C tok det i underkant av 36 timer, mens ved 4 °C tok det rundt 56 timer. Ved 22 °C tok det derimot ikke mer enn ca. 10 timer. Disse funnene bekrefter hvordan lav temperatur reduserer bakterievekst som følge av at generasjonstiden blir lengre. Likevel viste det seg altså at *Pseudomonas* ssp. har relativt god evne til å fortsette veksten selv ved lave temperaturer, bare saktere.

Som beskrevet var bakterieveksten rask ved 22 °C, men til og med i melken der lavest vekst skjedde, B ved 4 °C og A ved 7 °C og 4 °C, viste bakterietallet seg å nå hele log 7 CFU/mL etter 5 døgn. Dette psykrotroftallet (~ 6-7,5 log CFU/mL) skal, ifølge blant annet Sørhaug og

Stepaniak (1997) og Champagne et al. (1994), være nok til at smaksdefekter oppstår og at kvaliteten i pasteurisert melk blir ødelagt. Under forsøket var det også mulig å merke at det over tid i varierende grad oppsto en uren, fjøslignende og skarp lukt, og at det kunne observeres tydelig endring i fysisk tilstand i melk med stamme B ved 22 °C. Dette illustrerer hvordan ødeleggelse kan inntreffe til tross for relativt lave lagringstemperaturer og korte lagringstider (faktorer nær praksis), avhengig av mengden av bakteriene som havner i melken.

Lagringstemperatur var i fokus i studier gjort av De Jonghe et al. (2011), som inkuberte fersk melk ved optimal og ikke-optimal lagringstemperatur for å se påvirkningen kjølelagring har på de psykrotrofe bakterienes vekst. Forsøket skulle simulere faktiske forhold frem til varmebehandling på meieriet. For optimal og ikke-optimal lagringstemperatur ble det benyttet henholdsvis 3,5 og 6 °C de fire første dagene (gårdstank), deretter 6 og 10 °C i 8 timer (transport) og avslutningsvis 6 og 10 °C i 24 timer (meieritank). Her viste det seg at vekst av *Pseudomonas* begynte i gårdstanken både ved optimal og ikke-optimal lagringstemperatur, og også at mengdeforskjellen mellom dem allerede på gårdstanken rakk å bli statistisk signifikant. Det ble også bekreftet at den videre økningen nedstrøms i meierikjeden var stor, og dessuten at forskjellen mellom bakterietallet ved de to lagringstemperaturene stadig ble større. Funnene gjort i dette forsøket stemmer godt overens med De Jonghes observasjoner, men i det aktuelle forsøket i denne oppgaven ble derimot de forskjellige melkeprøvenes temperaturer holdt konstante gjennom hele inkubasjonen. En annen forskjell er hvordan den psykrotrofe veksten i råmelk i De Jonghes forsøk viste seg å være relativt stabil rundt 4 log CFU/mL de første tre dagene gitt optimal temperatur, mens bakterietallet i dette forsøket begynte å stige allerede fra start. Her kan muligens forskjellen mellom råmelk og steril melk podet med kun én bestemt bakteriestamme ha hatt en effekt, i tillegg til de aktuelle bakterienes vekstfase og variasjon i vekstforløp mellom ulike arter og stammer av *Pseudomonas* (Chen et al. 2003). I vekstkurvene i dette forsøket er det ikke mulig å se noen tilpasningsfase (lag-fase), og det kan tenkes at denne heller ikke inntraff. Selv om nylig opptint podemateriale ble benyttet, kan det tenkes at disse bakteriene allerede var tilstrekkelig tilpasset vekst i melk da de ble fryst ned og/eller at frysing hadde stanset veksten i en tilstand som kunne føre til god vekst ved opptining igjen (McPhee & Griffiths 2002).

4.2 Metabolisme av *Pseudomonas* i melk

Pseudomonas-arter har et enormt metabolsk potensial, og mange metabolske veier har derfor opp gjennom tidene blitt studert nettopp ved hjelp av disse artene. Det finnes derfor mye data tilgjengelig som dekker et bredt spekter av bakteriens katabolske og biosyntetiske aktiviteter, men denne deknningen er ujevn. Enkelte metabolske veier («pathways») er studert og beskrevet i detalj av mange forskere over mange år, mens andre har bare blitt studert nok til å demonstrere at de finnes. Generelt er biosyntetiske veier studert mindre enn katabolske veier (Clarke & Richmond 1974).

Pseudomonas er aerobe organismer som benytter respirasjon som energigivende metabolisme. De benytter oksidative reaksjoner der molekylært oksygen er siste elektronakseptor, men enkelte av artene kan også alternativt fungere anaerobt ved hjelp av nitrat. De er verken fermentative eller fotosyntetiske, men er likevel svært allsidige da de kan benytte et stort antall av organiske forbindelser for å vokse, slik som karbohydrater, alkoholer, mettede og umettede fettsyrer, aminosyrer, aminer og amider. *Pseudomonas* er med andre ord en ikke-krevende bakterie, og kan derfor for eksempel leve i enkle saltmedier dersom ammoniumsalt er til stede som nitrogenkilde, i tillegg til en av mange mulige organiske forbindelser som karbonkilde. Bakterien kan selv syntetisere blant annet aminosyrer, purin og pyrimidin, nukleotider og alle små essensielle cellekomponenter ved behov (Clarke & Richmond 1974).

I mange tilfeller hvor studier har blitt gjort på *Pseudomonas*' katabolske veier og reguleringen av disse, har et enda større metabolsk potensial hos den studerte arten blitt funnet, enn hva som var forventet. I følge Sørhaug og Stepaniak (1991) kan *Pseudomonas* degradere mer enn 100 organiske forbindelser. Selv innen en enkelt stamme kan det finnes ulike metabolske veier for nedbrytning av en enkelt forbindelse. At det finnes flere alternative veier for den samme metabolitten gjør det vanskeligere å studere *Pseudomonas*' katabolisme. En mulig årsak til at forskere i ulike studier har meldt om ulike resultater for den samme *Pseudomonas*-arten, kan skyldes både disse alternative veiene og bruk av ulike stammer av samme art (Clarke & Richmond 1974).

4.3 Organiske syrer

Resultatene fra undersøkelse av innhold både av organiske syrer og frie aminosyrer viste enkelte forandringer. Ved siden av den gode veksten som ble observert, indikerer dette at pågående metabolsk aktivitet har skjedd.

Sitronsyre, ravsyre og pyrodruesyre er noen av intermediatene som inngår i sitronsyresyklus. Denne syklusen utgjør et essensielt metabolsk nettverk av både katabolske og anabolske reaksjoner i alle oksidative organismer. Vekstsubstrater slik som ulike karbohydrater, proteiner og fett brytes ned via mange trinn til CO₂ og H₂O, og ved hjelp av oksygen dannes energibærende komponenter som trengs til syntese og vekst. Det dannes i tillegg mange forløpere til nye stoffer som cellene har behov for i biosyntetiske prosesser, for eksempel aminosyrer (Mailloux et al. 2007). Sitronsyresyklus er sentral i metabolismen også hos *P. fluorescens*, og biosyntese av veldig mange viktige cellemetabolitter starter altså her. Ofte rekker ikke intermediatene i syklusen å hopes opp, da disse kontinuerlig fjernes etter hvert som de dannes, for å benyttes i videre biosyntese (Clarke & Richmond 1974). Orotinsyre og urinsyre inngår hovedsakelig i metabolisme forbundet med nukleotidsyntese og –degradering og nedbrytning av blant annet protein. Alle katabolske og biosyntetiske veier henger imidlertid i større eller mindre grad sammen og påvirker hverandre (Clarke & Richmond 1974; Reynolds et al. 1955).

At enkelte stoffer ikke ble detektert eller at mengder ikke forandret seg over tid, må derfor nødvendigvis ikke bety at stoffene ikke var til stede, ikke ble produsert eller ikke ble benyttet i videre metabolisme. *Pseudomonas* er som kjent en effektiv og allsidig bakterie med stort metabolsk potensiale, og det kan altså tenkes at enkelte stoffer ble benyttet videre umiddelbart etter at de ble dannet. Dette kan for eksempel være tilfelle for de organiske syrene undersøkt ved 4 og 7 °C, hvor forandringene tilsynelatende var minimale, men hvor veksten ifølge vekstkurvene var god, og siden forandringer faktisk kunne observeres ved 22 °C. Ingen deteksjon og/eller konstante mengder av noen av stoffene kan også tyde på at enkelte metabolske prosesser faktisk ikke inntraff. Det er sannsynlig at det for eksempel ikke skjedde produksjon av melkesyre fra nedbrytning av laktose eller dannelselse av propionsyre.

Sitronsyre, orotinsyre, urinsyre og ravsyre viste seg å være til stede i melken ved start, men mengdene avtok tydelig i melk ved 22 °C hvor veksten var kraftigst og behovet for næringsstoffer var størst. Pyrodruesyre ble ikke detektert i 0-prøve, men så derimot ut til å dukke opp over tid under bakterienes vekst, for deretter å avta igjen. At organiske syrer kunne bekreftes i melken ved start, var som forventet. Disse stammer ofte fra kuas blod eller er intermediater i metabolske prosesser i melkekjertelcellene, slik som urinsyre som inngår i proteinmetabolismen (Walstra et al. 2014).

Temperatur var av stor betydning for disse bakterienes vekst og metabolisme. De metabolske prosessene involvert i vekst skjedde raskere og/eller mer optimalt ved 22 °C, enn ved lavere temperaturer, slik som ved 7 og 4 °C. Også her ser det ut til at prosessene foregår raskere for stamme B enn A, som også ble observert i forbindelse med vekstkurvene.

Én stammeforskjell i metabolisme viste seg spesielt, da det ble funnet at mengden av en ukjent komponent til stede i melken økte ved vekst av stamme A. Det kunne ikke observeres at dette stoffet hopet seg tilsvarende opp i melk med stamme B. Analysen var imidlertid ikke i stand til å si noe om hvilket stoff dette var, og dermed heller ikke de bestemte mengdene.

4.4 Flyktige forbindelser (HSGC og TDGCMS)

Produksjon av flyktige forbindelser er ifølge Sørhaug og Stepaniak (1991) typisk for *Pseudomonas*. Ved undersøkelse av flyktige stoffer i samtlige melkeprøver fra del 1 ved hjelp av HSGC ble derimot ingen eller svært små mengder detektert, og ingen vesentlige forandringer observert. Metoden er ikke en veldig følsom analyse og kan ha vanskelig for å registrere svært små mengder og små forandringer, og vil nok derfor være bedre egnet for analyse av stoffer der større forandringer forekommer. Ut ifra HSGC-resultatene i denne studien kan det dermed ikke trekkes noen slutninger, annet enn at eventuelle mengder som forekom var meget små. Det kan derfor se ut til at omsetninger som kan gi flyktige forbindelser ikke var særlig aktive.

Tilstedeværelse og mengder av flyktige stoffer ble imidlertid også analysert med TDGCMS, en semikvantitativ metode som er mye mer følsom enn førstnevnte metode. Resultatene fra TDGCMS-analysen var i stand til å påvise at en rekke stoffer kunne detekteres i de forskjellige melkeprøvene, og at mange av dem var til stede i melken i utgangspunktet. Hvor

store mengder det var av de ulike stoffene er ikke mulig å si ut fra denne type analyse, men det er mulig å se hvordan tilstedeværelsen av stoffene utartet seg og eventuelle trender.

Som påpekt i resultatene så tilstedeværelsen av flere stoffer ut til å ha økt over tid, både av de stoffene detektert i nullprøve og de som ikke opprinnelig var til stede. Dette gjaldt spesielt i melk med vekst av stamme B ved 22 °C, men også for noen stoffer i melk med vekst av stamme A ved 22 °C. I begge disse prøvene med melk så det i tillegg ut til at tilstedeværelsen av noen få stoffer hadde gått ned og/eller forsvunnet. Andre stoffer så i motsetning ut til å i større eller mindre grad uforandret være til stede i alle prøvene.

I følge Labows et al. (1980) har aerobe organismer potensiale til å danne en rekke unike flyktige metabolitter, i motsetning til de mer begrensede anaerobe organismene. Flyktige komponenter kan som beskrevet dannes i forbindelse med vekst av *Pseudomonas*, som har en bred metabolsk aktivitet, selv om produksjonen av slike stoffer i dette tilfellet ikke så ut til å være veldig stor. Samtidig er melk et biologisk produkt som av naturlige årsaker kan variere i komposisjon avhengig av blant annet faktorer som lagringstid og opprinnelse. Resultatene fra denne analysen viste seg dessuten av ukjente årsaker å være svært variable for enkelte stoffer, som gjør usikkerheten større. Det er derfor noe uklart akkurat hva som skyldes de ulike funnene i forbindelse med flyktige stoffer i denne studien, men enkelte lignende studier har noen foreslåtte forklaringer.

I følge Magan et al. (2001) har GCMS også tidligere blitt benyttet for kvantitativ deteksjon av flyktige markører som har blitt karakterisert som viktige ødeleggende mikrobielle metabolitter. Dette er blant annet stoffer som 3-metyl-1-butanol, acetaldehyd, eddiksyre, aceton, etanol, propan-2-ol og andre alkoholer.

Toso et al. (2002) kunne ved hjelp av GCMS headspace-analyse isolere og identifisere 42 flyktige komponenter fra fersk melk fra kuer som var fôret med enten høy, maissilo eller gressilo. Fra analysene viste det seg at den kjemiske klassen som var mest representativ var ketoner, etterfulgt av aldehyder, alkoholer og mindre mengder av hydrokarboner, svovelforbindelser, estere og terpentener. Det så også ut til at fôret hadde en viss innvirkning på forholdet mellom de ulike stoffene i den rå melken. Enkelte av stoffene påvist av Toso et al. (2002) ble også detektert i melkeprøver i denne studien, slik som både aceton, 2-pentanon, 2-heptanon og 2-butanon. De to førstnevnte stoffene viste seg å være til stede i alle prøvene, mens 2-heptanon derimot ikke kunne påvises i melkeprøvene med B ved 4 og 7 °C etter 120

timer. 2-butanon så ut til å ha forsvunnet i melk med A ved 22 °C etter 120 timer. Aceton har i noen få tidligere studier også blitt funnet å være en komponent til stede i fersk melk fra start, men har som nevnt også blitt ansett som et tegn på mikrobiell ødeleggelse (Toso et al. 2002).

Toso et al. (2002) forklarer at tilstedeværelse av aldehyder i melk kan skyldes hydrolyse av både lipider og aminosyrer, som gjerne gir henholdsvis rettkjedede og forgreinede aldehyder (for eksempel isobutanal, pentanal, heksanal, nonanal og 2-metyl-butanal, 3-metylbutanal). Nonanal var et aldehyd som også ble funnet i denne studien, og som så ut til å være i alle melkeprøvene. Det sies dessuten at produksjon av primære alkoholer sannsynligvis skyldes mikrobiell reduksjon av respektive aldehyder, men det påpekes at disse mest sannsynlig ikke bidrar til lukt- og smaksdefekter i fersk melk. Toso et al. (2002) isolerte blant annet alkoholen 3-metyl-1-butanol, som også ble detektert i denne studien. I melk med B ved 22 °C etter 120 timer så spesielt tilstedeværelsen av denne ut til å ha økt i mengde. Dette er som beskrevet en markør for mikrobiell ødeleggelse.

Toso et al. (2002) isolerte i tillegg svovelforbindelsen dimetylsulfon, og tilsvarende stoff ble detektert i alle prøver også i denne studien. Dette stoffet har blitt assosiert med den karakteristiske lukten til fersk melk, men kan ved høye konsentrasjoner føre til smaksdefekter. I den samme studien påpekes det at funnene deres ikke stemte overens med tidligere funn gjort av Moio et al. (1993), som i motsetning fant at den største gruppen av stoffer detektert i fersk melk var estere, etterfulgt av aldehyder og svært små mengder ketoner. Dette antar forfatterne at skyldes ulike metoder for analyse av flyktige komponenter (Toso et al. 2002).

En annen metode for deteksjon av flyktige stoffer i skummet melk ble benyttet i studiene gjort av Magan et al. (2001), som benyttet en elektronisk nese for å undersøke vanlig skummet melk og melk inokulert med ulike arter av bakterier (blant annet *P. fluorescens*) eller gjær. Disse studiene viste at det kan være mulig å skille melk med god kvalitet fra melk som inneholder kvalitetsforringende bakterier eller gjær, ved hjelp av deres metode og de påfølgende analyser som ble benyttet.

Også Urbach (1990) undersøkte produksjon av flyktige stoffer av bakterier i fersk melk kjølelagret ved 2 og 7 °C. I disse studiene ble det vist at flyktige karbonyler ble redusert til korresponderende alkoholer. Enkelte av disse karbonylene slik som aceton, var til stede i fersk melk i utgangspunktet, mens andre ble dannet fra de korresponderende aminosyrene (for eksempel 3-metylbutanal fra leucin). Under videre lagring ble alkoholene delvis esterifisert med flyktige syrer. Også her ble enkelte svovelforbindelser dannet, slik som dimetylsulfid og

2,4-ditiapentan. Studiene viste også at smaksdefekt og mengden av produserte flyktige stoffer var mye større ved 7 °C enn ved 2 °C ved samme bakterietall. På samme måte som hos Toso et al. (2002) ble det bekreftet at andelen av flyktige stoffer dannet, varierte med melkens opphav. Studien rapporterer en mulig sammenheng mellom flyktige stoffer fra kjølelagret melk og bakteriepopulasjon.

Ifølge Ansorena et al. (2001) og Labows et al. (1980) kan mange flyktige stoffer også dannes fra lipidoksidasjon. Dette kan være mulig at har skjedd også i dette forsøket, da melken benyttet inneholdt en liten andel fett (1,2 %). Som nevnt har ofte *Pseudomonas* og andre typer psykrotrofe bakterier evne til å produsere lipaser, men dette ble det ikke testet for hos stammene benyttet i denne studien. Dersom en eller begge stammer produserte lipaser, er det dermed mulig at enkelte av de flyktige komponentene som ble detektert og noe av lukten som kunne registreres, kunne skyldes lipidoksidasjon.

4.5 Protein- og peptidanalyse (CE)

Kapillærelektroforese (CE) har ifølge Veledo et al. (2005) og Heck et al. (2008) vist seg å være en rask og effektiv metode for analyse av proteiner i melk, og stadig forbedring av metoden har skjedd. Resultatene fra melkeprøvene der bakterievekst hadde foregått, viste tydelig at B-stamme var en proteinaseproduserende bakterie. Ved 22 °C forårsaket denne stammen en kraftig, men gradvis nedbrytning av melkeproteiner over tid. Dette kommer frem i hvordan mønsteret i kurvene forandrer seg med tiden, der enkelte av de opprinnelige toppene som representerer de ulike proteinene blir stadig mindre og mindre, samtidig som nye topper dukker opp. De første 24 timene ser ikke ut til å ha gitt vesentlig utslag i proteinsammensetning, men derimot har mange forandringer i mønsteret skjedd etter 48 timer, og ytterligere etter 72 timer. Den største synlige forskjellen som har skjedd etter 48 timer er at toppene som indikerer κ -kasein og β -kasein A1 og A2 har blitt redusert i størrelse, mens en ny, ukjent topp med lav retensjonstid har dukket opp. Videre har disse toppene blitt ytterligere redusert, inkludert blant annet toppen som indikerer α_{S1} -kasein, mens mange flere nye små topper med et bredt spekter av retensjonstider har dukket opp. Etter 120 timer var det kun toppene for myseproteinene α -laktalbumin og β -laktoglobulin av de opprinnelige toppene som fremdeles så ut til å være godt synlige, og dermed også i en viss andel fremdeles til stede.

De nye toppene som har dukket opp representerer de ulike peptidene som proteinene har blitt brutt ned til. Mange topper indikerer mange forskjellige peptider (Miralles et al. 2003). I følge Sørhaug og Stepaniak (1991) kan mange stammer av *Pseudomonas* spp. som vokser i melk ved 4 °C faktisk være i stand til å produsere nok proteinase til å hydrolysere all tilgjengelig kasein til løselige peptider. Til tross for det ugjenkjennelige mønsteret i denne studien, kan det være mulig at små mengder av enkelte av kaseinproteinene som var til stede ved start, fremdeles fantes i melken ved forsøkets slutt. Dette var det imidlertid ikke mulig å se ut fra siste kurve på grunn av alle toppene. Det ble dannet en helt ny protein- og peptidsammensetning på grunn av hydrolysen som fant sted, men det er umulig ut i fra resultatene fra denne analysen å si noe om akkurat hvilke peptider som har blitt dannet og hvilke av de ulike toppene disse representerer. Videre analyser trengs dersom det er ønskelig å finne ut mer om det bestemte peptidinnholdet. Dette illustreres også i studier gjort av Low et al. (2006), som ved hjelp av blant annet CE undersøkte proteolyse i melk forårsaket av ulike tilsatte enzymer. I nevnte studier fant man for eksempel at papain, en proteinase fra frukten papaya, ga et omfattende nedbrytningsmønster der det var umulig å skjelne noen av de opprinnelige kaseintoppene, altså svært lignende funnene i denne studien.

Proteiner inneholder mange forskjellige aminosyrer, og dette tillater de fleste proteinaser å kunne finne seter som passer med deres bindingsspesifisitet. Ofte vil de nøytrale proteinasene fra *Pseudomonas* ssp. angripe områder med stor andel av hydrofobe aminosyrer, mens de alkaliske proteinasene fra samme slekt ofte har bred spesifisitet. I følge teorien har de fleste ekstracellulære proteinaser fra psykrotrofe bakterier en melkekoagulerende egenskap, og de angriper fortrinnsvis kasein fremfor myseprotein. Det er spesielt proteinene κ -, α_{S1} -, og β -kasein som er mest utsatt for proteolyse, både av iboende proteinaser i melk og av mikrobielle proteinaser, grunnet deres åpne og tilfeldige ikke-helix-struktur (McKellar 1989; Sørhaug & Stepaniak 1991).

I følge Chen et al. (2003) har flere ulike studier funnet at β - og κ -kasein er mer utsatt for proteolyse enn α_{S1} -kasein. For eksempel undersøkte Miralles et al. (2003) effekten av proteolyse under lagring av ubehandlet melk med samme metode som i denne studien (CE), og kunne observere at toppene som representerte disse to kaseinene minket i størrelse først, samtidig som nye produkter ble dannet. Dette stemmer overens med observasjonene gjort i dette studiet for melk med stamme B ved 22 °C, der det tilsvarende mønsteret kunne ses. Også Mitchell og Marshall (1989) undersøkte den hydrolyserende evnen hos ekstracellulær

proteinase hos fire forskjellige stammer av *P. fluorescens*, og det kunne da nok en gang bekreftes stammevariasjon, fordi det kunne ses ulikheter i disse proteinasenes evne til å hydrolysere α -, β - og κ -kasein. Dette understreker at nedbrytningsmønsteret som ble observert i denne studien nødvendigvis ikke må arte seg på denne måten for alle proteinaser. Lignende studier har faktisk vist at forskjellige substrater, og til og med det samme substratet, har vist forskjellige spaltingssteder avhengig av det aktuelle enzymet og de bestemte forholdene. Det finnes derfor ingen absolutte, generelle regler for bestemte nedbrytningsmønstre (McKellar 1989).

Både miceller og løselige kaseiner i melk kan angripes, men de enkelte proteinasenes preferanse for spesielle kaseiner kan påvirkes av blant annet kaseinenes micellestatus. α_{S1} - og β -kasein kan ikke degraderes inni micellen, med mindre kolloidalt kalsiumfosfat (CCP) dissosierer, mens kappa-kasein derimot vil være mer tilgjengelig når det er i micellær form. I tillegg vil mengdene kasein som er i løst form påvirkes av melkens temperatur. Ved lavere temperaturer vil mer kasein være dissosiert fra micellene, noe som gjør disse kaseinene mer utsatt for proteolyse (McKellar 1989; Sørhaug & Stepaniak 1991).

I forbindelse med micellestruktur ligger også forklaringen på hvorfor proteolyse kan føre til at melken koagulerer, som observert i melk med B-stamme ved 22 °C. Kaseinmicellene er kolloidale partikler der κ -kaseinet har negativ ladning og er orientert på overflaten. Proteinase har chymosin-lignende aktivitet og degraderer dette proteinet til to peptider, der det ene peptidet med ladning (glukomakropeptid) dissosierer, mens det andre peptidet (para- κ -kasein) forblir knyttet til micellen. Micellene destabiliseres ved at de mister ladningen som holder dem løst og frastøtt fra hverandre, og begynner i stedet å aggregere (McKellar 1989; Sørhaug & Stepaniak 1991; Walstra et al. 2014).

Myseproteinene α -laktalbumin og β -laktoglobulin brytes generelt ikke ned av psykrotrofe bakteriers ekstracellulære proteinaser, i hvert fall ikke i samme grad som kaseinene. Så lenge myseproteinene ikke er denaturerte, er proteinasenes aktivitet på disse lav. Årsaken skyldes myseproteinenes sekundære og tertiære struktur, som blant annet gjør proteinene globulære. Som nevnt kunne det i melken med stamme B ved 22 °C i denne studien observeres at mye av toppene antatt å være myseproteinene forble uberørte av proteinase, til tross for ellers kraftig degradering av kasein. Over lengre tid kan det likevel skje at også myseproteinene begynner å degraderes, og da vil som oftest β -laktoglobulin være mer utsatt enn α -laktalbumin (McKellar 1989; Sørhaug & Stepaniak 1991).

At forandringer i proteinmønster begynte å bli synlig først etter 48 timer og ikke ved 24 timer, kan indikere at også bakterienes proteinaseproduksjon begynte like før 48 timer, men etter 24 timer. Da forandringene var enda større etter 72 timer kan det være tilfelle at proteinaseproduksjon og/eller tilstedeværelsen av proteinase var ytterligere økt. Samtidig kan det også være tilfelle at proteinaseproduksjon faktisk begynte tidlig, men at mengden enzym produsert var lav som følge av at bakterietallet også ennå var relativt lavt. Dette ville dermed gitt lite synlig utslag i proteinmønster.

Ved å sammenligne disse observasjonene med vekstkurven kan det ses at bakterienes produksjon av proteinaser, som ser ut til å ha begynt like før 48 timer ved 22 °C, tilsvarer sen logaritmisk eller tidlig stasjonær fase (ved høye bakterietall, ca. 9 log CFU/mL). Forskjellige studier har vist noe ulike resultater relatert til når i *P. fluorescens* vekstfase størsteparten av de ekstracellulære enzymene produseres og skilles ut. Noen av de som har kunnet observere enzymproduksjon tidlig i logaritmisk fase parallelt med bakterievekst, er blant annet Juffs et al. (1968) og Adams et al. (1975).

Slik som resultatene i dette forsøket derimot indikerer, observerte også blant annet McKellar (1982) proteinaseproduksjon hos en stamme av *P. fluorescens* i sen logaritmisk og tidlig stasjonær fase, både ved 20 og 5 °C. Det påpekes av forfatteren at en mulig årsak til forskyving i enzymproduksjon til senere stadier i vekstfase kan være bruk av en lett metaboliserbar karbonkilde, altså et optimalt vekstmedium der behovet for enzym dermed ikke er akutt. Som tidligere beskrevet kan dessuten variasjoner mellom bakteriestammer være en annen mulig årsak til ulike resultater, og da både forskjeller i total enzymproduksjon og i spesifikk produksjon per celle under tidlig vekstfase (Sørhaug & Stepaniak 1991).

Ekstracellulære varmeresistente proteinaser og lipaser produsert av psykrotrofe bakterier har opp gjennom tidene blitt mye studert, og det finnes derfor mye litteratur om blant annet isolering av og egenskaper hos disse. Antall bakterier både i fersk melk og i renkulturer korrelerer ofte dårlig med faktisk utskillelse av enzym, og kunnskapen om hvordan miljøet og de ernæringsmessige faktorene påvirker bakterienes enzymproduksjonen er, til tross for mye forskning, ikke komplett. I følge McKellar (1989) kan det å øke denne kunnskapen og ta i bruk egnede metoder for å begrense bakterienes enzymproduksjon være en måte å redusere og eliminere enzymenes skadeomfang i meieriprodukter (Sørhaug & Stepaniak 1991).

Juffs et al. (1968) understreker hvordan proteolytisk aktivitet hos *Pseudomonas* spp. er svært avhengig av mediet den vokser i, etter å ha undersøkt effekt av temperatur og næring på mengde og mønster i produksjon av proteolytiske enzymer. I nevnte studie viser forfatterne også til at syntese ikke nødvendigvis er assosiert med god bakterievekst. Både Sørhaug og Stepaniak (1991) og McKellar (1989) påpeker hvordan det ser ut til at energinivået i bakteriecellene er primærfaktoren som regulerer syntese og utskillelse av ekstracellulære enzymer. Reduserte energinivåer som følge av begrenset tilgang til næring, økt celletetthet og jern- eller oksygenbegrensninger kan føre til uttrykking og forsterking av slik syntese hos bakteriene. Proteinaseproduksjon i melk pleier ikke å fremmes på grunn av at tilgangen på karbon, nitrogen og fosfat er lav, men heller som følge av at det er essensielle faktorer for bakterievekst som er begrenset, og altså ikke faktorer som begrenser selve syntesen (McKellar & Cholette 1984).

Mange faktorer kan påvirke både bakterievekst og enzymproduksjon, og hvor stor effekten er på regulering- og utskillelsesmekanismer for enzymproduksjon kan variere. Det kan dessuten være interaksjoner mellom disse faktorene, noe som gjør det vanskeligere å si akkurat hvilke faktorer som bidrar i hvilken grad.

En miljøfaktor av betydning er blant annet temperatur. Syntese har vist seg å kunne foregå i et bredt temperaturområde, men maksimal proteinaseproduksjon av *P. fluorescens* ser vanligvis ut til å inntreffe i sjiktet rundt 20 °C, det vil si godt over kjølelagringstemperatur for melk, men under optimal veksttemperatur. Dette var også tilfelle i denne studien, der proteolyse var kraftig hos stamme B ved 22 °C. Det har også blitt påpekt at psykrotrofe bakteriekulturer med lavt antall celler og ved lav temperatur ofte kompenserer med høyere enzymaktivitet per celle. McKellar og Cholette (1984) mener samtidig at funnene i deres studie støtter observasjonen av at selve mekanismen for proteinaseproduksjon hos *P. fluorescens* var lik ved 5 og 20 °C. En annen observasjon som er gjort er at proteolyse har vist seg å bli forårsaket av en mindre populasjon av psykrotrof mikroflora i melk, enn populasjoner av renkultur av *P. fluorescens* (stasjonær fase nådd ved hhv. 10^7 og 10^9 CFU/mL). Ubehandlet melk inneholder dessuten varierende mengder av vekstfremmere, enzyminhibitorer og –indusere. McKellar (1982) fant blant annet at komponenter med lav molekylvekt (<5.000) fra skummet melk fremkalte proteinasesyntese i *P. fluorescens* (McKellar 1989; Sørhaug & Stepaniak 1991).

En annen faktor med betydning for regulering av ekstracellulære enzymer er ifølge McPhee og Griffiths (2002) bakterienes vekstfase og graden av celle-til-celle-kommunikasjon

(«quorum sensing»). *Pseudomonas* og andre gramnegative bakterier kan nemlig produsere en autoinducer som, når den er til stede i stor nok konsentrasjon, kan regulere uttrykk av flere gener på en gang. Dette inkluderer blant annet kontroll av de genene som er ansvarlig for syntese av ekstracellulære enzymer. Vekstfase er av betydning nettopp fordi slike terskelverdier av produsert autoinducer gjerne ikke nås før ved slutten av logaritmisk fase og begynnelsen av stasjonær fase (McPhee & Griffiths 2002).

Et annet tilfelle som påpekes av Clarke og Richmond (1974) er mulighetene for at også aktive intracellulære enzymer vil kunne frigjøres ved lysering av celler. Dette kan muligens øke graden av og endre mønsteret i degraderingen, og bør tas i betraktning at kan inntreffe over tid, spesielt under bakterienes dødsfase. I dette forsøket var nok derimot ikke inkubasjonstiden lang nok til at bakteriene nådde dødsfase, og ved 4 og 7 °C så det ikke ut til at bakteriene en gang hadde rukket å nå stasjonær fase ved forsøkets slutt (5 døgn). Som kjent vil nemlig *P. fluorescens*, etter å ha nådd maksimal celletetthet (stasjonær fase), kunne overleve tilnærmet uendret i melkekultur i veldig lang tid (Sørhaug & Stepaniak 1991).

Den store forandringen i proteinmønster observert for B-stamme ved 22 °C, kunne ikke ses ved verken 4 °C eller 7 °C. En viss nedbryting av β -kasein A2 ved 7 °C hadde skjedd, men ellers så det opprinnelige proteinmønsteret ut til å forbli intakt over tid. At proteinaseaktiviteten var høy ved 22 °C, men ikke ved 7 og 4 °C, betyr med andre ord at temperatur var av stor betydning. En temperatur på 22 °C er nærmere både optimal veksttemperatur og temperaturområder som ofte har vist å gi den høyeste proteinaseproduksjonen, sammenlignet med 4 og 7 °C, selv om bakterieveksten også ved de lave temperaturene var relativt god. I hvilken grad de store forandringene som inntraff i B-22 skyldes høy proteinaseproduksjon av bakteriene i melken, eller høy aktivitet grunnet proteinasenes optimumstemperatur, kan imidlertid ikke avgjøres ut fra disse resultatene alene. Det er på samme måte uvisst om årsaken til at ingen og svært lav proteinaseaktivitet kunne bevises i melk ved henholdsvis 4 og 7 °C skyldes ingen eller lav proteinaseproduksjon fra bakterienes side, eller om det skyldes at enzymene ikke var særlig aktive ved disse lave temperaturene. I forbindelse med proteinasenes temperaturoptima påpeker for eksempel Eie (1994) at proteolyse er en temperaturavhengig reaksjon som kan gi ulik proteolysegrad ved ulike temperaturer, selv om enzymmengden er den samme. McKellar (1989) viser til at mange funn tyder på at optimumstemperaturen hos en stor andel av proteinaser produsert av *Pseudomonas* ligger ved ca. 45 °C, men samtidig at mer enn 15 % av maksimal

enzymaktivitet ofte blir uttrykt ved så lav temperatur som 4 °C. Dersom dette også var tilfellet for proteinasene i denne studien, at de fremdeles innehar noe aktivitet ved lav temperatur, ville det kanskje også vært forventet noe mer synlig proteinnedbrytning i CE ved 4 og 7 °C. Da dette ikke kunne ses, kan dette antyde at proteinasene faktisk ikke var blitt produsert i særlig grad ved disse lave temperaturene. Dette kan også stemme med observasjoner av at størst proteinaseproduksjon hos *P. fluorescens* inntreffer rundt 20 °C, som allerede nevnt. Imidlertid noe motstridende fant McKellar (1982) at proteinaseproduksjon ved 5 °C fremdeles lå på så mye som 55 % av den maksimale produksjon som kunne ses ved 20 °C.

For stamme A kunne derimot ikke proteinnedbrytningen som inntraff i melk med stamme B ved 22 °C påvises i det hele tatt, til tross for at vekstforsøket bekreftet god vekst ved alle de tre temperaturene, og selv om det var mulig å se enkelte forandringer i innhold av organiske syrer og aminosyrer. Hos stamme A kunne det nemlig ikke observeres forandring i mønsteret av melkeprotein ved noen av de tre temperaturene over tid, heller ikke ved 22 °C.

Ved forsøket begynte det egentlig forventet å finne proteolytisk aktivitet også hos A-stamme, da denne var en kjent og veletablert stamme benyttet i tidligere forskning, og som der har vist å inneha denne egenskapen. For eksempel viste studier gjort av Martins et al. (2005) at denne stammen, *P. fluorescens* ATCC 13525, viste vekst og proteolyse både ved inkubasjon ved 7 °C i 10 dager og ved >26 °C i 48 timer. Også Clarke og Richmond (1974) viser til hvordan det er klare fordeler med å jobbe med slike godt kjente og veletablerte laboratoriestammer av bakterier, da det blant annet gjør mer intensivt arbeid mulig. Det påpekes imidlertid her at det for enkelte undersøkelser kan være nyttig å bruke nylig isolerte stammer fra naturlige kilder, på grunn av stammevariasjon og bevis som finnes for at gener for enkelte katabolske enzymer kan bæres på plasmider som lett kan mistes.

Det er ikke mulig å si akkurat hvorfor stamme A ikke uttrykte proteolytisk aktivitet i denne studien. Det er uklart om tilfellet var at genene for produksjon av ekstracellulære proteolytiske enzymer av en eller annen grunn ikke ble uttrykt, eller om bakterien faktisk ikke bar genene for denne egenskapen. Innledningsvis i denne studien ble det gjort enkelte undersøkelser og fortester av de to stammene. Det ble forsøkt å oppdrive flere stammer slik at de mest egnede kunne velges, men mangel på funn av levende kulturer og knapphet i tid førte til at det var disse to stammene som ble benyttet.

4.6 Frie aminosyrer

Det viste seg at enkelte av de frie aminosyrene det ble analysert for i melken var til stede allerede i utgangspunktet. I følge Walstra et al. (2014) er det vanlig å finne slike spormengder av frie aminosyrer i melk, og i tillegg også små peptider. Mengdene av de forskjellige syrene var som påpekt svært varierende og som oftest veldig små. Trenden var at det gjerne etter 1-2 døgn skjedde en svak og gradvis økning i mengdene av mange av disse frie aminosyrene i melk som var podet med stamme B og inkubert ved 22 °C. For de resterende melkeprøvene var denne trenden fraværende. Noen få stoffer forsvant imidlertid helt, også i B 22 °C.

Det er nærliggende å anta at den observerte økningen av mange av de frie aminosyrene i melk med vekst av B ved 22 °C kan forklares av proteolyse. Proteiner består av kjeder av aminosyrer, og ved bakteriell utskillelse av proteinase vil melkeproteinet kunne angripes og hydrolyseres til mindre peptidbiter og frie aminosyrer. Aminosyrene kan videre fungere som byggesteiner i andre metabolske prosesser i bakteriene. I følge McKellar (1989) kan for eksempel *P. fluorescens* benytte aminosyrer i minimale vekstmedier som kilde både til nitrogen og karbon, og de kan også stimulere til ekstracellulær proteinaseproduksjon. I følge Chen et al. (2003) er nemlig *Pseudomonas* ikke-krevende når det gjelder aminosyrer, og i motsetning til de biosyntetiske veiene, kan de katabolske veiene for en aminosyre være ulike i to forskjellige stammer av *Pseudomonas*. Dessuten kan mer enn en vei finnes innenfor den samme stammen.

Tidligere har proteinaseaktivitet i melk og andre meieriprodukter blitt målt som frigjort tyrosin. For eksempel har tyrosinnivåer blitt brukt som indikator på organoleptisk kvalitet av kjølelagret melk (Chen et al. 2003). Som observert i denne studien kunne det ses nettopp at mengdene av tyrosin økte med tid i melk med vekst av B ved 22 °C.

Mengden av frie aminosyrer økte stort sett ikke i noen av de andre melkeprøvene, til tross for god bakterievekst. Dette påpeker nok en gang at både temperatur og bakteriestamme vil kunne ha betydning for typer og grad av metabolisme som foregår i bakteriene, og spesielt for produksjon av og aktivitet hos proteinaser. Samtidig er det viktig å huske, ved sammenligning av stammenes metabolisme, at bakteriekonsentrasjonene ble målt logaritmisk. Dette betyr at bare én log forskjell i antall bakterier fører til at man kan forvente en forskjell i metabolisme på en tiendedel. Som beskrevet for organiske syrer, kan det også her ha vært tilfelle at enkelte frie aminosyrer hadde blitt dannet også der det tilsynelatende ikke skjedde noe, men at disse

ble benyttet direkte i videre metabolisme og derfor ikke rakk å samles opp til mengder som ga utslag. Resultater fra CE tydet derimot på at proteolyse i disse melkeprøvene faktisk ikke var tilfelle, og at peptider og frie aminosyrer altså ikke ble dannet, eller i hvert fall i svært små mengder.

4.7 Kjeldahl-analyser av nitrogen- og proteininnhold

Undersøkelsene av nitrogen- og proteininnhold i 0-prøve og i melk med vekst av B-stamme ved 22 °C etter 120 timer som ble gjort ved hjelp av Kjeldahls metode, styrket funnene fra kapillærelektroforesen. Resultatene viste nedgang i totalprotein og kasein, og økning i ikke-protein- og ikke-kasein-nitrogen. Dette indikerer at ekstracellulære proteinaser produsert av B-stamme har brutt ned store deler av proteinet i melken, og da spesielt kasein, slik at ikke-protein-nitrogen i form av nitrogenforbindelser og peptider har blitt frigjort.

Dette er i henhold til teorien, ifølge Chen et al. (2003), som viser til tidligere studier av blant annet Adams et al. (1975), Fairbairn og Law (1986) og Renner (1988), der proteolysegrad i lagret prosessert melk har blitt målt nettopp ved å undersøke nedgangen i kasein-nitrogen eller økningen i ikke-protein- og ikke-kasein-nitrogen. Disse endringene har dessuten også i studiene som nevnt, blitt knyttet til endringer i funksjonalitet, slik som mikrostruktur (for eksempel kaseinflokkulering) og økt viskositet i UHT-melk. Generelt fører bakterielle proteinaser til økning i ikke-protein-nitrogen og dannelse av para- κ -kasein, som forbindes med destabilisering av kaseinmicellene og koagulering av melk (Chen et al. 2003).

MikroKjeldahl-metoden som tidligere har blitt benyttet for slik undersøkelse av økning i ikke-protein-nitrogen i melk, har ifølge McKellar (1989) også blitt brukt for å finne mål på psykrotrof proteinaseaktivitet.

Resultatene viste også hvordan forholdet mellom myseprotein og kasein så ut til å være noe forskjøvet mot en større andel kasein enn hva som er forventet i melk. Som beskrevet innledningsvis i oppgaven er normalt dette forholdet henholdsvis 20:80, mens det ut fra denne analysen gikk frem å være omtrent 7:93. Tilsvarende forskyving ble observert av Bütikofer et al. (2006), men forfatterens forklaring er at årsaken til at andelen kasein tilsynelatende har økt, skyldes UHT-behandlingen melken har vært utsatt for. Deres studie viste at jo kraftigere varmebehandling av melk, jo større andel av myseproteinene denaturerer og binder til

kaseinmicellene, og vil dermed også felle ut sammen med kaseinfraksjonen. Det betyr at den virkelige andelen myseprotein var som før, men at en del av denne feilaktig har blitt medregnet som kasein.

McKellar (1981) foreslår dessuten at denaturering som følge av den høye temperaturbehandlingen UHT-melk utsettes for, kan føre til at nye enzymsubstratseter blir tilgjengelige på proteinmolekylene. Studier tyder nemlig på at pasteurisert melk er mer motstandsdyktig mot proteolyse enn UHT-melk. I McKellars egne studier viste tre isolater av *P. fluorescens* produksjon av enzymer som var dobbelt så aktive på UHT-melk, som på pasteurisert melk. Dette resulterte i at det blant annet kunne tilsettes større mengder enzym i den pasteuriserte melken enn i UHT-melken, før smaken tydelig endret seg. McKellar (1981) observerte også at mengden proteolyse nødvendig før smaksendring oppsto, varierte for enzymene fra de ulike stammene. I andre studier har kraftig varmebehandling (95 °C i 10 minutter) vist seg å øke fordøyeligheten av β -laktoglobulin, som i nativ form har globulær struktur og i utgangspunktet derfor er et dårlig substrat for proteolytiske enzymer (Maier et al. 2006).

Resultatene for melken med B-stamme viste i tillegg en tilsynelatende økning i myseprotein, men årsaken til dette er uklar. Andelen opprinnelig myseprotein i melk kan teoretisk sett ikke øke, som betyr at forklaringen muligens kan være relatert til egenskapene til modererte proteiner og peptider som dannes.

4.8 Proteinaseaktivitet og peptidanalyse (CE)

I analysen der bakteriefri melk tatt ut fra melk med vekst av B-stamme ved 22 °C ble tilsatt i UHT-melk i gitte mengder og deretter inkubert, ble det bekreftet tilsvarende nedbrytningsmønster av melkeprotein som ved analyse av melken fra hovedforsøket. Det kunne imidlertid observeres forskjeller i graden av proteolyse avhengig av podemengde og eventuell varmebehandling som melken ble utsatt for.

Tydeligst nedbrytning og også mest likt det tidligere mønsteret, kunne observeres i melk med høyest podemengde og som ikke ble varmebehandlet (UP 1 %). Her skjedde det reduksjon av toppen som indikerte β -kasein A2 allerede etter 24 timer. Ved podemengde på 0,01 % så degraderingen derimot ut til å ha skjedd saktere. Dette illustrerer nok en gang at mengden

enzym til stede var av stor betydning for hvor raskt degradering skjedde, men samtidig at til og med små mengder enzym kan være i stand til å degradere melkeprotein, bare over litt lenger tid. At podemengden vil være avgjørende for hvor fort proteolyse inntreffer bekreftes blant annet av Eie (1994).

Elektroferogrammene av melken som ble varmebehandlet (LP og HP) etter tilsetning av proteinaseløsning, inneholdt en del uforklarlige forstyrrelser som gjør det vanskeligere å si noe om mønsteret. Det kan likevel se ut til at grafene bekreftet hvordan varme reduserte enzymaktiviteten, da proteinmønsteret endret seg enda saktere med tiden etter at varmebehandling hadde funnet sted. Blant annet viste lavpasteurisert melk tilsatt 1 % proteinaseløsning en mønsterutvikling mer lik UP 0,01 % enn UP 1 %. Lavpasteurisert melk med den minste podemengden (LP 0,01 %) viste at proteinaseaktiviteten på melkeprotein hadde vært svært lav, selv etter 168 timer. Dette kan ses i sammenheng med tidligere studier som har vist at proteinase fra *P. fluorescens* er mindre stabil ved lavpasteurisering ved 55-60 °C, enn ved høyere temperaturer (Sørhaug & Stepaniak 1997).

HP 1 % og 0,01 % inneholdt mange forstyrrelser, men det kan også her se ut til at svært lite proteolyse hadde foregått. Dersom tiden hadde tillatt det burde nok analysene ha blitt utført flere ganger for å om mulig oppnå bedre grafer. Dette ble imidlertid også gjort for de to sistnevnte prøvene (HP), noe som likevel ikke resulterte i mindre forstyrrelser.

Generelt bekreftet disse funnene resultater fra tidligere studier som beskrevet, som viser at varme i ulik grad vil kunne redusere proteinaseaktivitet. Likevel viste de også at ikke alle proteinasene vil settes ut av spill av varmebehandling, men at en viss proteolyse vil kunne fortsette å skje under lagring etter varmebehandling.

Under inkubasjon av melkeprøvene ble teoriene om geldannelse i UHT-melk grunnet enzymatisk proteolyse dessuten et faktum. Som beskrevet i resultatdelen kunne det observeres et koagel eller en gel i flere av melkeprøvene, blant annet tydelig i UP 1 % og 0,01 % etter 96 timer, men også til en viss grad i LP og HP 1 %. Sørhaug og Stepaniak (1991) forteller om studier hvor tilsvarende observasjoner har blitt gjort etter at det har blitt tilsatt proteinase til UHT-melk, blant annet proteinase fra *P. fluorescens* NCDO 2085. De nevner også hvordan det i tillegg ved hjelp av elektronmikroskopering har blitt vist at slike geler består av kaseinmiceller som har klumpet seg til et nettverk på samme måte som i melk koagulert med chymosin (løpe) (Sørhaug & Stepaniak 1991).

4.9 Oppsummering og avslutning

Fordi *P. fluorescens* har denne evnen til å vokse i melk ved lave temperaturer som illustrert i dette studiet, vil det være spesielt viktig å redusere graden av kontaminering i utgangspunktet mest mulig. Samtidig blir det klart hvor viktig det faktisk er å raskt kjøle ned fersk melk, for deretter å bevare en ubrutt kjølekjede helt fra gårdstank via tankbil til meieri og videre til forbruker. Fluktuering i temperatur bør unngås, også etter varmebehandling. Selv om lav temperatur ikke stopper veksten av psykrotrofe bakterier, vil det likevel bidra til betydelig redusert vekst, som beskrevet av De Jonghe et al. (2011). Også andre metoder som tillegg til lav temperatur kan benyttes for å redusere vekst og påfølgende enzymproduksjon, slik som flushing med karbondioksid- eller nitrogengass og termisering. I Norge og en rekke andre industrialiserte land er pasteurisering et påbudt prosessstrinn før salg av melk og meieriprodukter, mens for eksempel syrning av enkelte meieriprodukter med melkesyrebakterier også vil kunne bidra til å inhibere vekst av eventuelle uønskede psykrotrofe og/eller patogene bakterier (Walstra et al. 2014).

Som både denne og andre studier har vist, vil akkurat hvilke følger man får av psykrotrof bakterievekst i melk kunne avhenge av både bakterieart og –stamme. Fordi ulike stammer for eksempel vil kunne produsere ulike typer enzymer i forskjellige mengder og med ulik aktivitet og stabilitet, vil dermed heller ikke alle stammer utgjøre en like stor trussel. Uansett har det vist seg at enkelte stammer kan ha svært negativ effekt, som illustrert med stamme B i denne studien. Forhåndsregelen bør derfor være at kontaminering med psykrotrofe bakterier i melk bør forhindres så langt det lar seg gjøre.

Å unngå psykrotrofe bakterier helt vil i prinsipp være vanskelig, men å redusere graden av kontaminering mest mulig vil være et svært viktig tiltak for å redusere forringelse av melkens kvalitet. God hygieneparaksis på gården har avgjørende betydning, og områder som det særlig bør fokuseres på er tilstrekkelig vask og desinfeksjon av melkeutstyr og redskap i forbindelse med melking. Andre kilder til kontaminering kan være skitne jur og spener. Å ha hygiene i fokus må være en selvfølge i forbindelse med all håndtering av melk, det vil si også under transport, bearbeiding og lagring.

Mange tiltak kan benyttes, og Sørhaug og Stepaniak (1997) har for eksempel foreslått hvordan økt bruk av maskiner designet for aseptisk tapping i større grad kan tas i bruk på meieriene for å redusere graden av rekontaminering etter pasteurisering av melk og bearbeiding av meieriprodukter. I tillegg kan det være svært nyttig med metoder for å raskt og

enkelt kunne kontrollere den melken meieriet mottar, for å vurdere hva melken vil være mest egnet til. Ved høye psykrotoftall og/eller enzymmengder bør for eksempel kanskje ikke melken benyttes til langtidsholdbar UHT-melk, da denne ofte lagres både lenge og ved romtemperatur (Birkeland 1987).

Det kan antas at trenden i dagens meieriindustri ikke vil gå tilbake til verken mindre gårdsbruk, hyppigere henting eller flere meierier, men sannsynligvis heller ha fokus på ytterligere økende effektivisering. For å imøtekomme dette må allerede etablert kontroll og gode rutiner bevares og om mulig også bedres. Det bør jobbes mot å stadig oppnå ny, forbedret kunnskap, men samtidig er det også viktig å bruke den kunnskapen vi allerede har fullt ut. Kanskje vil det i fremtiden utvikles nye, mer effektive metoder for å få bukt med mange av de utfordringene vi i dag står ovenfor i meieriindustrien.

5. Videre arbeid

I denne oppgaven ble vekst og metabolisme undersøkt hos to stammer av *Pseudomonas fluorescens* under lagring i melk ved ulike temperaturer. Ved forsøket start var det usikkerhet knyttet til hvilke forventninger man egentlig hadde til disse bakteriene og hva følgende resultater dermed ville vise. Kanskje burde flere grundige for-tester derfor vært gjort på bakteriestammene benyttet. Dessuten kunne muligens andre, mer passende og relevante stammer ha vært valgt dersom disse hadde vært tilgjengelige.

Forsøket skulle utføres i triplikat, og for å begrense omfanget ble det bestemt å undersøke to ulike stammer og tre ulike temperaturer over totalt fem døgn. I tillegg til selve vekstforsøket, ble det utført en rekke ulike analyser. Hver og en av disse kunne det med fordel blitt arbeidet mer omfattende med, dersom tidsaspektet ikke hadde vært en begrensning. For eksempel kunne det vært en fordel for min egen del å på forhånd opparbeide større innsikt og forståelse for metoder som TDGCMS og CE. Det var også noe begrenset hvor dypt det var mulig å sette seg inn i absolutt alle resultater. For eksempel måtte det i forbindelse med den omfattende analysen TDGCMS gjøres begrensninger på antall prøver som ble analysert og undersøkt.

For sikrere resultater og bedre presisjon burde flere gjentak for mange av analysene vært utført. Å utføre statistiske analyser på enkelte av resultatene kunne vært en fordel. Det kan også tenkes at ikke alle analysene var like egnet eller godt tilpasset denne typen forsøk, og derfor burde tilpasses bedre.

Videre kunne det vært interessant å undersøke flere bakteriestammer som hadde proteolytisk aktivitet, for å kunne se likheter og forskjeller i denne aktiviteten. En idé kunne vært å benytte stammer isolert fra fersk melk og/eller som man vet sikkert at nylig har blitt forbundet med forringelse av melk eller andre meieriprodukter. Det kunne også vært mulig å utvide forsøket på andre måter, for eksempel i forbindelse med temperatur. Temperaturområdet ved 10-12 °C kunne blant annet vært av interesse, da 22 °C er ganske usannsynlig i praksis, mens 4 og 7 °C viste seg å være noe lavt med tanke på faktiske observerte forandringer i melken tilknyttet metabolsk aktivitet. Svært interessant kunne det også ha vært å arbeide tettere med meieriindustrien for å høre mer om reelle utfordringer og problemer, og å undersøke muligheter rundt hvordan slike utfordringer kan løses. Som nevnt ble heller ikke lipolytiske egenskaper undersøkt i det hele tatt, noe som også ville vært relevant å undersøke i forbindelse med kvalitetsforringelse av melk.

6. Referanser

- Adams, D., Barach, J. & Speck, M. (1976). Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *Journal of dairy science*, 59 (5): 823-827.
- Adams, D. M., Barach, J. T. & Speck, M. L. (1975). Heat Resistant Proteases Produced in Milk by Psychrotrophic Bacteria of Dairy Origin. *Journal of Dairy Science*, 58 (6): 828-834.
- Alichanidis, E. & Andrews, A. T. (1977). Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain AR-11. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 485 (2): 424-433.
- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22 (1): 79-89.
- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I. & Bello, J. (2001). Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *Food Research International*, 34 (1): 67-75.
- Barbano, D., Ma, Y. & Santos, M. (2006). Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life 1, 2. *Journal of dairy science*, 89: E15-E19.
- Birkeland, S.-E. (1987). *Hurtigmetoder for påvisning av psykotrofe bakterier i melk*. Dr. scient. . Ås: Norges Landbrukshøgskole, Institutt for meieri- og næringsmiddelfag, 290 s.
- Bylund, G. (2003). *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems.
- Bütikofer, U. & Ardö, Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *Bulletin-FIL-IDF (Belgium)*.
- Bütikofer, U., Meyer, J. & Rehberger, B. (2006). Determination of the percentage of α -lactalbumin and β -lactoglobulin of total milk protein in raw and heat treated skim milk. *Milchwissenschaft*, 61 (3): 263-266.
- Cempírková, R. & Mikulová, M. (2009). Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech J Anim Sci*, 54 (2): 65-73.
- Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D., Mafu, A. A., Griffiths, M. W. & White, C. (1994). Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34 (1): 1-30.
- Chen, L., Daniel, R. M. & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International dairy journal*, 13 (4): 255-275.
- Christen, G. (1987). A rapid method for measuring protease activity in milk using radiolabeled casein. *Journal of dairy science*, 70 (9): 1807-1814.
- Christen, G. L. & Marshall, R. T. (1984). Selected Properties of Lipase and Protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 Produced in Four Media. *Journal of Dairy Science*, 67 (8): 1680-1687.
- Clarke, P. H. & Richmond, M. (1974). *Genetics and biochemistry of Pseudomonas*: John Wiley & Sons.
- Craven, H. & Macauley, B. (1992). Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage. 1. Identification of types. *Australian journal of dairy technology*.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P. & Heyndrickx, M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and environmental microbiology*, 77 (2): 460-470.
- Eie, T. (1994). Technological utilization of carbonated milk. *Agricultural University of Norway. Doctor Scientiarum Theses (Norway)*.
- Fairbairn, D. J. & Law, B. A. (1986). Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *Journal of Dairy Research*, 53 (01): 139-177.
- Fajardo-Lira, C., Oria, M., Hayes, K. & Nielsen, S. (2000). Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. *Journal of dairy science*, 83 (10): 2190-2199.
- Francoeur, S. N., Wetzal, R. G. & Neely, R. K. (2001). New spatially explicit method for detecting extracellular protease activity in biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 67 (9): 4329-4334.

- Glatz, Z. (2006). Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 841 (1): 23-37.
- Gügi, B., Orange, N., HELLIO, F., Burini, J., Guillou, C., Leriche, F. & Guespin-Michel, J. (1991). Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology*, 173 (12): 3814-3820.
- Hantsis-Zacharov, E. & Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and environmental microbiology*, 73 (22): 7162-7168.
- Haug, I. (2014). *Bactocount tall* (e-post til Ingrid Haug, fasjef for melkekvalitet ved TINE Rådgiving og Medlem 06.08.2014).
- Haug, I. & Hettasch, T. (2014). *Produksjonshygiene – sentralt for robotbruk*. Oslo: TINE SA. Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/cms/fagprat/mj%C3%B8lkekvalitet/produksjonshygiene-sentralt-for-robotbruk> (lest 13.04.2015).
- Heck, J., Olieman, C., Schennink, A., Van Valenberg, H., Visser, M., Meuldijk, R. & Van Hooijdonk, A. (2008). Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 18 (5): 548-555.
- Hull, M. E. (1947). Studies on Milk Proteins. II. Colorimetric Determination of the Partial Hydrolysis of the Proteins in Milk. *Journal of Dairy Science*, 30 (11): 881-884.
- Humbert, E., Campbell, J., Blankenagel, G. & Gebre-Egziabher, A. (1985). Extended storage of raw milk. II. The role of thermization. *Canadian Institute of Food Science and Technology journal*, 18 (4): 302-305.
- IDF. (2001). Milk - Determination of nitrogen content. *IDF 20*. Ottawa. 18 s.
- Juffs, H., Hayward, A. & Doelle, H. (1968). Growth and proteinase production in *Pseudomonas* spp. cultivated under various conditions of temperature and nutrition. *Journal of Dairy Research*, 35 (03): 385-393.
- Labows, J. N., McGinley, K. J., Webster, G. & Leyden, J. (1980). Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 12 (4): 521-526.
- Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A. & Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology*, 70 (9): 5644-5650.
- Law, B. A. (1979). Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research*, 46 (03): 573-588.
- Lebert, I., Begot, C. & Lebert, A. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25 C). *International journal of food microbiology*, 39 (1): 53-60.
- Low, Y. H., Agboola, S., Zhao, J. & Lim, M. Y. (2006). Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International dairy journal*, 16 (4): 335-343.
- Magan, N., Pavlou, A. & Chrysanthakis, I. (2001). Milk-sense: a volatile sensing system recognises spoilage bacteria and yeasts in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 72 (1): 28-34.
- Maier, I., Okun, V. M., Pittner, F. & Lindner, W. (2006). Changes in peptic digestibility of bovine β -lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. *Journal of Chromatography B*, 841 (1): 160-167.
- Mailloux, R. J., Bériault, R., Lemire, J., Singh, R., Chénier, D. R., Hamel, R. D. & Appanna, V. D. (2007). The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS One*, 2 (8): e690.
- Marsili, R., Ostapenko, H., Simmons, R. & Green, D. (1981). High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *Journal of Food Science*, 46 (1): 52-57.
- Martins, M. L., de Araújo, E. F., Mantovani, H. C., Moraes, C. A. & Vanetti, M. C. D. (2005). Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 102 (2): 203-211.

- Matta, H. & Punj, V. (2000). An immunoassay for detection of heat-stable proteases from thermophilic psychrotrophic *Bacillus* spp. of dairy origin. *Microbiological Research*, 155 (3): 197-203.
- Mayerhofer, H., Marshall, R., White, C. & Lu, M. (1973). Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. *Applied microbiology*, 25 (1): 44-48.
- McKellar, R. (1981). Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 64 (11): 2138-2145.
- McKellar, R. (1982). Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens**. *Journal of Applied Bacteriology*, 53 (3): 305-316.
- McKellar, R. & Cholette, H. (1984). Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen, and phosphate. *Applied and environmental microbiology*, 47 (6): 1224-1227.
- McKellar, R. C. (1989). *Enzymes of psychrotrophs in raw food*: CRC Press.
- McPhee, J. & Griffiths, M. (2002). Psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas* spp. *Encyclopedia of dairy sciences*, 4: 2340-2351.
- Mestawet, T., Girma, A., Ådnøy, T., Devold, T., Narvhus, J. & Vegarud, G. (2014). New insights in goat breeds of Ethiopia: High content of α s1-CN and its association with coagulation properties, whey syneresis and micelle size. *Small Ruminant Research*, 119 (1): 146-155.
- Miralles, B., Ramos, M. & Amigo, L. (2003). Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis. *Journal of dairy science*, 86 (9): 2813-2817.
- Mitchell, S. L. & Marshall, R. T. (1989). Properties of Heat-Stable Proteases of *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and Hydrolysis of Milk Proteins1. *Journal of Dairy Science*, 72 (4): 864-874.
- Moe, K., Porcellato, D. & Skeie, S. (2013). Metabolism of milk fat globule membrane components by nonstarter lactic acid bacteria isolated from cheese. *Journal of dairy science*, 96 (2): 727-739.
- Moio, L., Langlois, D., Etievant, P. & Addeo, F. (1993). Powerful odorants in bovine, ovine, caprine and water buffalo milk determined by means of gas chromatography–olfactometry. *Journal of dairy research*, 60 (02): 215-222.
- Muir, D. D. & Banks, J. M. (2003). Factors affecting the shelf-life of milk and milk products. I: *Dairy Processing: Improving Quality*, s. 185-207. England: Woodhead Publishing Limited.
- Narvhus, J., Østeraas, K., Mutukumira, T. & Abrahamsen, R. (1998). Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 41 (1): 73-80.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev*, 37 (5): 664-98.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D. & Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food microbiology*, 28 (3): 465-471.
- Recio, I., de Frutos, M., Olano, A. & Ramos, M. (1996). Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (12): 3955-3959.
- Renner, E. (1988). Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high temperature products at high ambient temperatures. *Journal of Dairy Research*, 55 (01): 125-142.
- Reynolds, E. S., Lieberman, I. & Kornberg, A. (1955). The metabolism of orotic acid in aerobic bacteria. *Journal of bacteriology*, 69 (3): 250.
- Ribeiro, A., Lui, J., Queiroz, S., Ribeiro, S. & Resende, K. (2000). *Milk yield, genetic trends and genetic and phenotypic parameters estimates for milk yield and lactation length of Saanen goats in Brazil*. Proceedings of the Seventh International Conference on Goats. 15-18 s.
- Samaržija, D., Zamberlin, Š. & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, Vol.62 (No.2): Pages 77 - 95
- Saran, S., Isar, J. & Saxena, R. K. (2007). A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (4): 697-699.

- Scatamburlo, T. M., Yamazi, A. K., Cavicchioli, V. Q., Pieri, F. A. & Nero, L. A. (2015). Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *Journal of Dairy Science*, 98 (2): 759-764.
- Simões, M., Simões, L. C. & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (4): 573-583.
- Sørhaug, T. & Stepaniak, L. (1991). Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. *Food enzymology*, 1: 169-218.
- Sørhaug, T. & Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8 (2): 35-41.
- TINE SA. (2005). TINE Årsrapport 2005. *Årsmelding for TINE Grupper 2005*. Oslo. 68 s.
- TINE SA. (2012). TINE Årsrapport 2012. *Melk & myter*. Oslo. 89 s.
- TINE SA. (2014). TINE Årsrapport 2014. *TINE Årsrapport 2014*. Oslo. 72 s.
- TINEs regelverk om bedømmelse og betaling av melk etter kvalitet ved levering til TINE Råvare*. (2015). 22.12.2014 utg. Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/cms/praktisk-informasjon/tines-regelverk/attachment/346898?ts=14a7119b071> (lest 1.4.15).
- Toso, B., Procida, G. & Stefanon, B. (2002). Determination of volatile compounds in cows' milk using headspace GC-MS. *Journal of Dairy Research*, 69 (04): 569-577.
- Urbach, G. (1990). *Headspace volatiles from cold-stored raw milk*. Brief Communications of the XXIII International Dairy Congress, Montreal, October 8-12, 1990, Vol. I.: International Dairy Federation.
- Veledo, M. T., de Frutos, M. & Diez-Masa, J. C. (2005). Development of a method for quantitative analysis of the major whey proteins by capillary electrophoresis with on-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Journal of separation science*, 28 (9-10): 935-940.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. & Geurts, T. J. (2014). *Dairy science and technology*: CRC press.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no