



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2024 45 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Effekt av mikrobiell proteolyse i fløte, homogeniseringsmetode og lagringstid på rømmekvalitet

Effect of microbial proteolysis in cream,
homogenization method and storage time on sour
cream quality

Hilde Hamremoen Tørud

Matvitenskap- Produksjon og utvikling av næringsmidler

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet i forbindelse med en masterutdannelse i Matvitenskap, retning Produksjon og utvikling av næringsmidler, ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitetet (NMBU). Oppgaven ble gjennomført i perioden august 2023 – mai 2024 ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) og er skrevet i samarbeid med TINE SA.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Davide Porcellato, for hans engasjement, og tilgjengelighet, i forbindelse med både forsøksoppsett, praktisk utførelse og gjennomlesing av oppgaven. Videre vil jeg takke Marius Normann og Ola Tjøland for assistanse i forbindelse med rømmeproduksjon ved fakultetets pilotanlegg. Jeg vil også takke Kari Olsen, May Helene Aalberg, Ahmed Abdelghani og annet laboratoriepersonell for hjelp og råd angående analysene utført ved universitetet, og for deres smittende og gode humør. I tillegg vil jeg takke Veronica Moscone for utførelse av de mikrobiologiske analysene i forbindelse med denne oppgaven. Jeg ønsker også å takke medstudent Marie Skurdal Tofte, for god dialog og støtte i forbindelse med samkjøring av både rømmeproduksjon og analyseutføring, da vi begge har vært en del av det samme forskningsprosjektet. Takk til TINE SA for økonomisk støtte. Et samarbeid med industrien har vært både lærerikt og interessant. En spesiell takk til min tidligere biveileder Camilla Elise Jørgensen for god oppfølging og stort engasjement. Tusen takk til Kim Marius Moe som kunne ta over rollen som biveileder på kort varsel, og for gjennomlesning av oppgaven. Jeg vil også benytte anledningen til å takke Åse Riseng Grendstad, Dorota Dynda, Cecilie Rask og Arne Eide for hjelp og oppfølging i forbindelse med analysene som ble utført ved innovasjonsbygget til TINA SA. En stor takk til det sensoriske panelet som stilte opp i tilknytning til de sensoriske testene. Jeg ønsker også å takke Anne-Grethe Johansen for bistand til frakt av prøver mellom universitetet og TINE SA. Til slutt vil jeg også takke samboer, familie, venner og medstudenter, for både støtte og motivasjon, i løpet av studieperioden.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2024

Hilde Hamremoen Tørud

Sammendrag

Flere kvalitetsparametere i rømme, slik som for eksempel konsistens, smak, lukt og utseende, kan påvirkes av en rekke faktorer. Både råmateriale, produksjonsprosess og videre distribuering er alle viktige elementer, som kan ha en innvirkning på produktets endelige kvalitet. Denne masteroppgaven fokuserer på betydningen av proteolytisk aktivitet i fløte, homogeniseringsparametere og lagringstid. Varmestabile proteaser i råmelk kan føre til blant annet bismak og teksturale defekter, både i råmateriale og endeprodukt, og det er derfor ønskelig å minimere denne enzymaktiviteten. Ved å homogenisere fløten i kun ett trinn vil resultatet bli større fettkuler sammenliknet med å benytte to trinns homogenisering. Dette igjen påvirker blant annet tekstur og viskositet i rømme. Økt lagringstid av rømmen påvirker også flere kvalitetsparametere. Hvor raskt, og hvor store endringer som skjer over en periode på 5 uker, var ønskelig å teste ut.

Fløte (35 % fett) ble inokulert med *Pseudomonas* i henholdsvis 0 og 6 døgn. Dette for å fremprovosere proteolytisk aktivitet i fløten som ble inokulert lengst. Deretter ble det produsert rømme, hvor både ett-trinns og to-trinns homogenisering ble benyttet. Dette forsøksdesignet resulterte i fire ulike typer rømme. Til slutt ble alle rømmeprøvene lagret i henholdsvis 0, 3 og 5 uker ved 4 °C. Det ble totalt utført tre produksjonsgjentak, og en rekke analyser ble utført for å undersøke både fløte- og rømmekvalitet. Flere mikrobiologiske, kjemiske, reologiske og sensoriske analyser ble gjennomført i forbindelse med denne oppgaven. I tillegg ble det benyttet en linjalmetode og mørkefeltmikroskopi for videre analysering.

Det var tydelig at både fløte og homogeniseringsmetode påvirket syrekulturens metabolisme, da det tok lenger tid å fermentere fløten som ble inokulert lengst med *Pseudomonas*, samt at innholdet av flere metabolitter ble påvirket av én eller flere forsøksfaktorer. Det ble hovedsakelig detektert mest proteolyse i prøver som hadde blitt inokulert lengst med *Pseudomonas*, men syrekulturens egne proteaser hadde også en effekt på den totale aktiviteten. Det var tydelig at rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, og som var homogenisert i ett trinn hadde flest fnokker, og det var også denne rømmen som generelt scoret dårligst under de sensoriske analysene. Samlet sett påvirket alle de tre forsøksfaktorene; mikrobiell proteolyse i fløte, homogeniseringsmetode og lagringstid, rømmekvaliteten i varierende grad.

Abstract

Several quality parameters in sour cream, such as consistency, taste, smell, and appearance, can be influenced by a variety of factors. Both raw materials, production processes, and further distribution are all important elements that can impact the final quality of the product. This master's thesis focuses on the effects of proteolytic activity in cream, homogenization parameters, and storage time. Heat-stable proteases in raw milk can for example lead to off-flavours and textural defects, both in the raw material and in the final product, and it is therefore desirable to minimize this enzyme activity. By homogenizing the cream in just one step, the result will be larger fat globules compared to using two-step homogenization. This can, among other things, affect the texture and viscosity of the sour cream. Increased storage time of the sour cream also affects several quality parameters. It was desirable to test out how quickly and to what extent changes could occur over a period of 5 weeks.

Cream (35 % fat) was inoculated with *Pseudomonas* for 0 and 6 days. This was done to provoke proteolytic activity in the cream that was inoculated the longest. Sour cream was produced, where both one-step and two-step homogenization was applied. This experimental design resulted in four different types of sour cream. Finally, all the sour cream samples were stored for 0, 3, and 5 weeks at 4 °C. Three repeats of the production were performed, and a variety of analyses were conducted to examine both the cream and sour cream quality. Several microbiological, chemical, rheological, and sensory analyses were conducted. In addition, a ruler method and dark-field microscopy were used for further analysis.

Both cream quality and homogenization method affected the metabolism of the starter culture, as it took longer to ferment the cream inoculated the longest with *Pseudomonas*. In addition, the content of several metabolites was affected by one or more experimental factors. Proteolysis was mainly detected in samples that had been inoculated the longest with *Pseudomonas*, but the starter culture's own proteases also influenced the total activity. It was evident that sour cream produced from cream inoculated with *Pseudomonas* for 6 days, and which was homogenized in one step, had the most curds, and this sour cream generally scored worse in the sensory analyses as well. Overall, all three experimental factors; microbial proteolysis in cream, homogenization method and storage time, influenced the sour cream quality to varying degrees.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
1.0 Formål og hypoteser	1
2.0 Teori	2
2.1 Sammensetning i melk	2
2.2 Melkesyrebakterier og metabolismer	5
2.2.1 Syrekultur	7
2.3 Rømmeproduksjon	8
2.3.1 Homogenisering	10
2.3.2 Pasteurisering	11
2.3.3 Inokulering og inkubering	11
2.3.4 Geldannelse	12
2.3.5 Lagringsbetingelser	13
2.4 Kvalitetsproblemer i rømme.....	14
2.4.1 Fnokker.....	14
2.5 Melke- og fløtekvalitet	15
2.5.1 Psykotrofe bakterier.....	16
2.5.1.1 Pseudomonas spp.....	16
2.5.2 Proteolytisk aktivitet.....	16
3.0 Materialer og metode	18
3.1 Forsøksdesign.....	18
3.2 Utprøving og optimalisering av metoder.....	20
3.2.1 Vekst av <i>Pseudomonas trivialis</i> i fløte etter 6 døgn ved 6 °C.	20
3.2.2 Fermenteringstid.....	21
3.2.3 Metodeutvikling	21
3.3 Fremstilling av rømme	21
3.3.1 Melkebehandling (separering, standardisering, termisering)	22
3.3.2 Inokulasjon med <i>Pseudomonas</i>	23
3.3.2.1 Preparering av kultur	23
3.3.3 Homogenisering	23
3.3.4 Varmebehandling.....	23
3.3.5 Fermentering	24
3.3.6 Røre og bryte koagel	25

3.3.7 Pakking og kjølelagring.....	25
3.4 Analyser.....	25
3.4.1 Mikrobiologiske analyser (Bakterievekst på PCA, LBS og M17 agar)	25
3.4.2 Kjemiske analyser	26
3.4.2.1 Milkoscan	26
3.4.2.2. pH.....	26
3.4.2.3 HSGC-FID- Flyktige komponenter	26
3.4.2.4 HPLC- Organiske syrer og karbohydrater	27
3.4.2.5 HPLC- Frie aminosyrer	28
3.4.2.6 Kapillærelektroforese	29
3.4.2.7 Azocasein.....	30
3.4.3 Reologiske analyser.....	31
3.4.3.1 Teksturanalyse	31
3.4.3.2 Viskositetsanalyse.....	32
3.4.4 Linjalmetode og fotografering.....	33
3.4.5 Mørkefeltmikroskopi.....	33
3.4.6 Sensoriske analyser	34
3.4.6.1 Sensorisk kvalitetsbedømmelse.....	34
3.4.6.2 Sensorisk profilering	35
3.5 Statistisk bearbeiding	36
4.0 Resultater	37
4.1 Utpøving og optimalisering av metode	37
4.2 Mikrobiologiske analyser	37
4.2.1 Bakterievekst.....	37
4.2.2 Vekst av <i>Lactococcus</i> og <i>Leuconostoc</i>	39
4.3 Kjemiske analyser	40
4.3.1 Kjemisk sammensetning i fløte	40
4.3.2 Fermenteringstid og pH under lagring.....	40
4.3.3 Organiske syrer, karbohydrater og flyktige komponenter i rømme.....	42
4.3.4 Frie aminosyrer i fløte og rømme.....	44
4.3.5 Proteinnedbryting (Kapillærelektroforese).....	46
4.3.6 Proteolytisk aktivitet (Azocasein-analyse).....	50
4.4 Reologiske analyser.....	51
4.4.1 Fasthet i rømme (Teksturanalyse).....	51
4.4.2 Viskositet i rømme (Viskositetsanalyse).....	52
4.5 Fnokker i rømme (Linjalmetode og foto).....	53

4.6 Mikrostruktur i rømme (Mørkefeltmikroskopi)	55
4.7 Sensoriske analyser	57
4.7.1 Sensorisk kvalitetsbedømmelse av rømme.....	57
4.7.2 Sensorisk profilering av rømme	57
5.0 Diskusjon	59
5.1 Fløte kvalitet.....	59
5.2 Homogeniseringsmetode	64
5.3 Lagringstid.....	67
5.4 Konklusjon og videre arbeid	68
6.0 Referanser	71
7.0 Vedlegg	77
Vedlegg 1: Gjennomsnitt og standardavvik.....	77
Vedlegg 2: Oversikt over forsøksfaktorenes signifikansnivå	78
Vedlegg 3: Utvikling av pH under fermentering	80
Vedlegg 4: Standardkurve proteolytisk aktivitet	83
Vedlegg 5: Anmerkninger og avvik ved sensorisk kvalitetsbedømmelse.....	84
Vedlegg 6: Sensorisk profilering	86

1.0 Formål og hypoteser

Rømme er et tradisjonelt meieriprodukt og benyttes blant annet i gryteretter, i sauser, som garnityr eller i bakevarer (Narvhus et al., 2019). Produktet produseres ved å fermentere fløte ved hjelp av en kultur bestående av melkesyrebakterier. Generelt skal rømmeprodukter være jevne, fyldige og viskøse med en mild diacetyl-aroma og en lett syrlig smak (Lyck et al., 2006; Meunier-Goddik, 2012). Det finnes imidlertid flere produktvarianter, hvorav spesifikke kvalitetsparametere avhenger av blant annet fettinnhold og bruksområde. Rømme skal hovedsakelig inneholde 18 % fett eller mer (International Dairy Foods Associations, n.d; U.S. Food and Drug Administration, 2023). Det finnes magrere alternativer på markedet, men om disse kan kalles rømme er omdiskutert (Narvhus et al., 2019).

Rømmeproduksjon er en relativ enkel prosess, men det er ikke alltid det går slik det skal, noe som i verste fall kan resultere i vraking av produkt. Svinn er svært uønsket, og kan resultere i store økonomiske tap. Det er heller ikke gunstig med tanke på det bærekraftige perspektivet. Industrien følger strenge krav og rutiner for å unngå svinn, men det er ikke alltid at årsaken til et avvik er kjent. Forekomsten av små klumper, eller såkalte fnokker som det kalles på fagspråket, er et vanlig problem i industriell produsert rømme og andre meieriprodukter. Det finnes lite vitenskapelig litteratur om fnokker og hvordan de oppstår. Det er flere teorier på hva som kan være årsaken til slike kvalitetsfeil, og sannsynligvis er det flere faktorer som spiller inn. Noen årsaker kan eksempelvis være proteolytisk aktivitet i melken eller fløten, homogeniseringsbetingelse, proteinaggregering, punktsyrning fra kultur, utilstrekkelig opprøring av rømmekoagel etter fermentering eller lagringsbetingelser.

Denne masteroppgaven setter søkelys på betydningen av proteolytisk aktivitet i fløte, homogeniseringsbetingelse og lagringstid. En hypotese går ut på at proteolytisk aktivitet forårsaket av enzymer som spalter proteiner, kan føre til redusert kaseinmicellestabilitet og/eller fettkulestabilitet. Dette kan resultere i flokkulering eller aggregering av protein og fett, og kan bli visuelt i form av fnokker. At trykket under trinn to ved fløtehomogeniseringen kan bidra til å redusere agglomerater av fett som dannes under første trinn ved homogenisering, var enda en hypotese som var ønskelig å teste ut. Det var i tillegg essensielt å undersøke ytterligere påvirkning av kvalitet ved økt lagringstid. På bakgrunn av dette ble det utformet en problemstilling hvor hensikten var å dokumentere effekten av mikrobiell proteolyse i fløte, samt effekten av ett og to-trinns homogenisering, i tillegg til lagringstid, på rømmekvalitet.

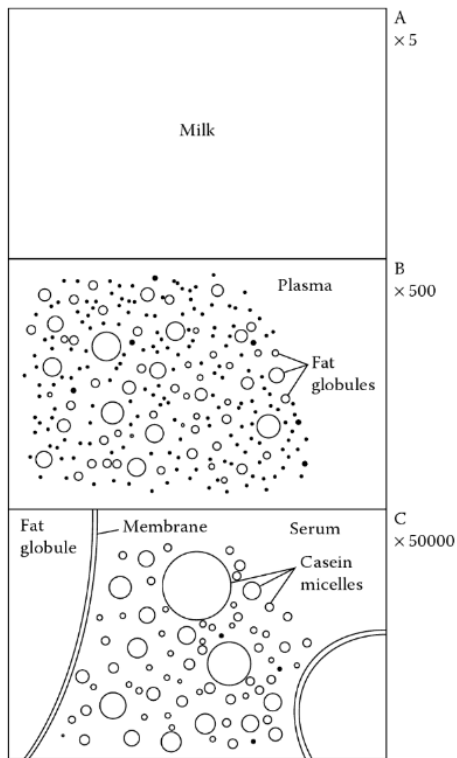
2.0 Teori

2.1 Sammensetning i melk

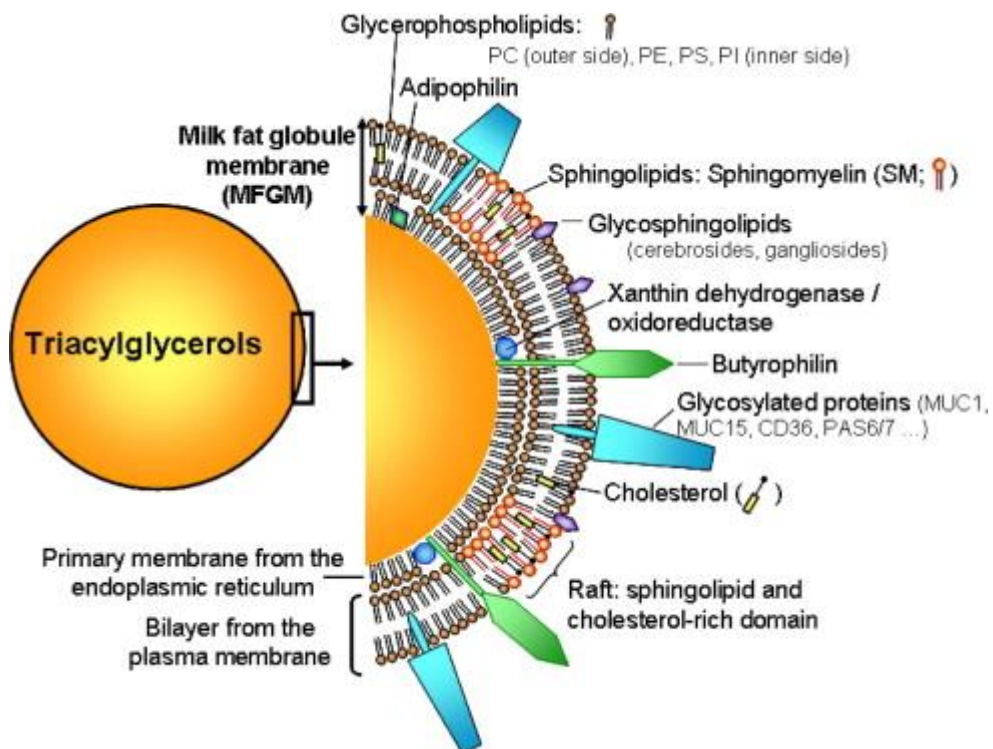
Melk har en lang tradisjon i Norge, og kan brukes til mye. Det er kumelk som blir hyppigst benyttet, og ved videre omtalelse av melk i denne oppgaven er det kumelk det refereres til. I tillegg til rømme, produseres blant annet både yoghurt, ost og smør fra denne råvaren. Melk er et svært næringsrikt produkt som består av laktose, fett, og proteiner, i tillegg til viktige mineraler og salter. Som Walstra et al. (2006, s. 4) presiserer, består melk av omtrentlig 4,6 % laktose, 4 % fett og 3,3 % protein (w/w). Den største komponenten i melk er imidlertid vann, hvorav hele 87,1 % er vann.

Etter vann, inneholder melk hovedsakelig laktose. Laktose er et karbohydrat, eller nærmere bestemt et disakkarid, bestående av D-glukose og D-galaktose, og bidrar blant annet til den søtlige smaken i melk (Walstra et al., 2006, s. 17-19). Ved fermentering av melk og fløte omdannes også laktose til melkesyre ved at laktosen fungerer som et substrat for melkesyrebakteriene. Laktose er derfor en svært viktig komponent i melk, som er helt essensiell for å kunne produsere fermenterte melkeprodukter. Det finnes naturligvis andre karbohydrater også, men disse er til stede i mye mindre mengder (Walstra et al., 2006, s. 17).

Mesteparten av fettene i melken er triglyserider (98 %), men det finnes også mono- og diglyserider, frie fettsyrer, fosfolipider og kolesterol, (Walstra et al., 2006, s. 42-47). I melken foreligger det meste av fettene i såkalte fettkuler på ca. 0,1-15 μm . Disse fettkulene er dispergert i serumfasen sammen med kaseinmicellene (figur 1). Fettkulene er omgitt av en nokså kompleks fettkulemembran (MFGM), som blant annet beskytter dem fra koalesens og enzymatisk degradering. Membranen består for det meste av ulike proteiner samt fosfo- og sphingolipider. Fettkulenes kjerne består imidlertid hovedsakelig av triglyserider (Dewettinck et al., 2008). Fettkulenes oppbygning, samt komponentene i MFGM er fremstilt i figur 2.

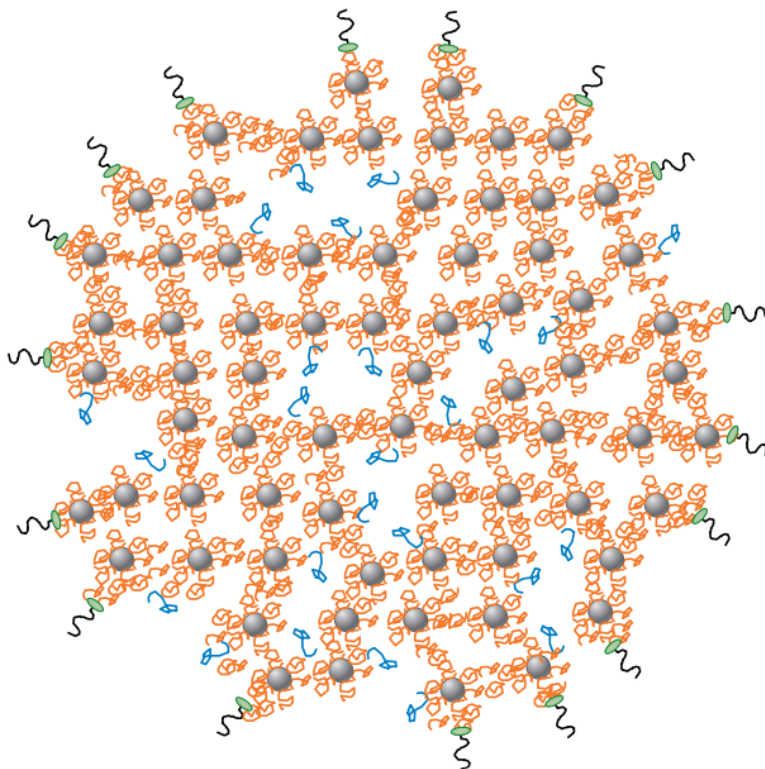


Figur 1. Melkeillustrasjon, med relative størrelser på elementene i melken i forhold til hverandre (Walstra et al., 2006, s. 5)



Figur 2. Illustrasjon av en melkefettkules oppbygning (Lopez et al., 2010)

Melkeprotein regnes som et høykvalitetsprotein da det blant annet inneholder alle de 9 essensielle aminosyrene vi mennesker trenger (Davoodi et al., 2016; Zhang et al., 2021). Blant proteinene i melk utgjør omtrent 80 % kasein og 20 % myseprotein. Det skilles mellom fire ulike typer kasein, nemlig β -kasein, α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein og κ -kasein. I melken foreligger kasein i form av miceller. Størrelsen på kaseinmicellene varierer, men gjennomsnittlig størrelse er 150-200 nm (Dalglish & Corredig, 2012). Strukturen holdes blant annet sammen av kolloidalt kalsiumfosfat (Holt & Kruif, 2003). Det er uenigheter i fagmiljøer når det gjelder kaseinmicellens struktur, men én forenklet og akseptert struktur, er fremstilt i figur 3.



Figur 3. Illustrasjon av kaseinmicellen. α_s - og β -kasein (i oransje) er festet til kalsiumfosfat (i grått) som holder micellen sammen. β -kasein (i blått) er hydrofobisk bundet til andre kaseiner. Para- κ -kasein (i grønt) og kaseinmakropeptider (i sort) befinner seg på overflaten (Dalglish & Corredig, 2012)

β -kasein befinner seg hovedsakelig i den indre kjernen mens κ -kasein er lokalisert på overflaten. Mer jevnt fordelt er α_{s1} - og α_{s2} -kaseinene, som befinner seg både i kjernen og det ytre laget. Da κ -kasein har en negativ ladet ende som er orientert utover, vil micellens overflate være negativ ladet, noe som medfører at kaseinmicellene frastøter hverandre og forblir i løsning (Dalglish & Corredig, 2012; Walstra et al., 2006, s.141-142). Under syrning vil imidlertid kaseinmicellen oppnå sitt isoelektriske punkt rundt pH 4,6 og dermed felle ut (Chandan, 2006; Lucey & Sing, 1997). Når pH synker vil også kolloidalt kalsiumfosfat oppløses, som følge av at forbindelser

som fosfater, serin og rester av fosfoserin i kasein blir protonert (Jørgensen, 2017). At kolloidalt kalsiumfosfat oppløses resulterer i svakere bindinger innad i micellen, og dermed en oppløsning av kaseinmicellen (Walstra et al., 2006, s. 149).

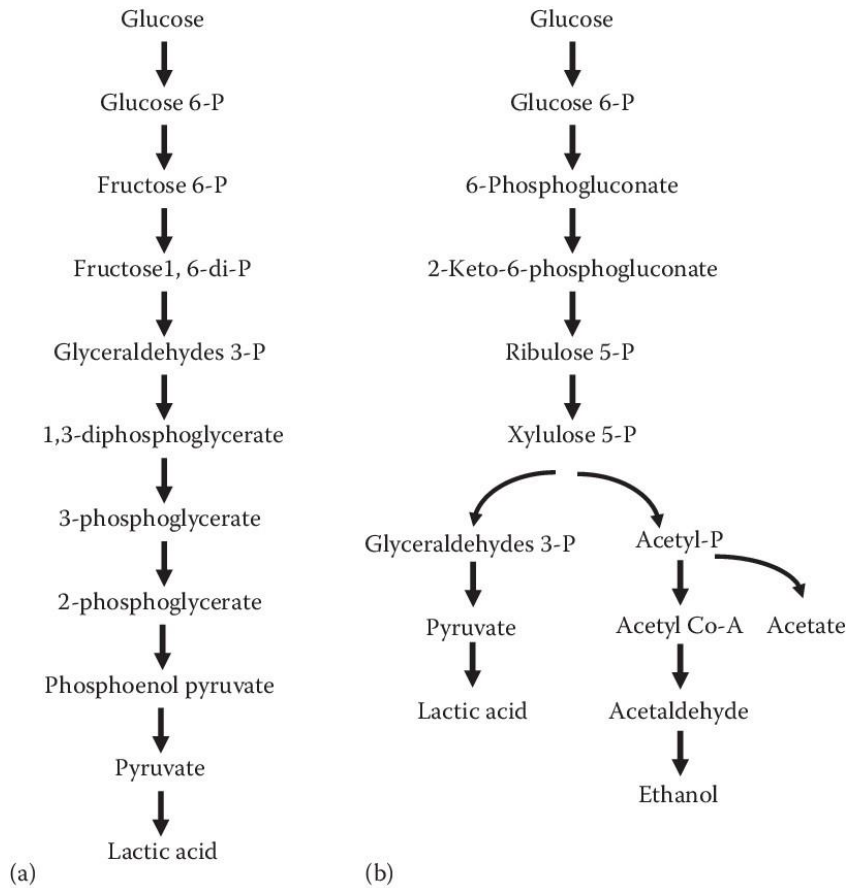
Blant myseproteinene skilles det mellom β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serumalbumin, og immunoglobuliner (Waalstra et al., 2006, s 76-77). Myseprotein, også kalt serumprotein, har for det meste en globulær struktur, med både sekundære, tertiære og kvartære strukturer. Strukturen holdes sammen av blant annet hydrofobe interaksjoner, hvorav intermolekylære disulfidbindinger er essensielle (Walstra et al., 2006, s. 68). Myseproteiner er sensitive for varme, og denaturering vil begynne allerede ved 65 °C, mens den vil være omtrent total ved 90 °C i 5 min (Bylund, 1995).

2.2 Melkesyrebakterier og metabolismer

Melk er et ferskvareprodukt, som ved lagring i moderate temperaturer kan bli surt grunnet mikrobiell aktivitet. Det er hovedsakelig melkesyrebakteriene som er årsaken til dette. De fleste fermenterte melkeprodukter i dag blir tilsatt melkesyrebakterier for å fremprovosere og styre fermenteringen. Det finnes en rekke ulike melkesyrebakterier, men felles for dem alle er at de er gram positive, ikke-bevegelige, ikke sporedannende og aerotolerante. I meierifermenteringsindustrien blir hovedsakelig disse fem slektene benyttet; *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* og *Lactobacillus*. (Walstra et al., 2006, s. 357-358).

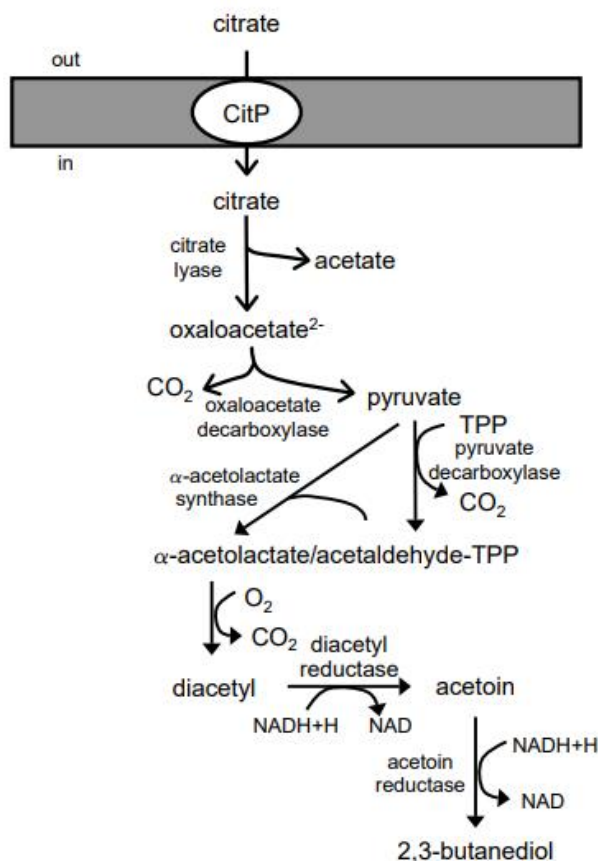
Melkesyrebakteriene omdanner hovedsakelig laktose til melkesyre, og dette kan skje gjennom både homofermentering og heterofermentering (figur 4). Homofermentative melkesyrebakterier vil omdanne laktose til melkesyre, i tillegg til at mer energi i form av ATP også produseres. Noen eksempler på homofermentative melkesyrebakterier er *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* og *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Walstra et al., 2006, s. 358). Heterofermentative melkesyrebakterier, slik som *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, vil kunne danne både melkesyre, etanol, karbondioksid og eddiksyre, men mye mindre ATP. Endeproduktene er også avhengig av tilgangen på oksygen. Ved liten tilgang på oksygen dannes melkesyre, etanol og karbondioksid, mens det ved mer aerobe forhold produseres melkesyre, karbondioksid og eddiksyre, i tillegg til noe mer ATP (Gänzle & Gobetti, 2013). Ved enkelte betingelser kan den homofermentative metabolismen endres og en alternativ pyruvatmetabolisme vil kunne oppstå. Dette kan for eksempelvis skje ved lave konsentrasjoner av karbohydrater og/eller ved aerobe forhold, og

mulige endeprodukter ved metabolismen kan være format, eddiksyre, acetaldehyd, etanol, karbondioksid, acetoin, diacetyl og 2,3 butandiol (Walstra et al., 2006, s. 365-266).



Figur 4. Heterofermentativ (a) og homofermentativ (b) metabolisme hos melkesyre bakterier (Kumar et al., 2015).

Enkelte melkesyrebakterier, slik som *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, har i tillegg en sitrat metabolisme, hvor sitrat blant annet omdannes til eddiksyre, karbondioksid, diacetyl, acetoin og 2,3- butandiol (Hutkins, 2007; Østlie et al., 2003). Diacetyl er blant annet en velkjent aromakomponent i rømme og er svært ønskelig (Meunier-Goddik, 2012).



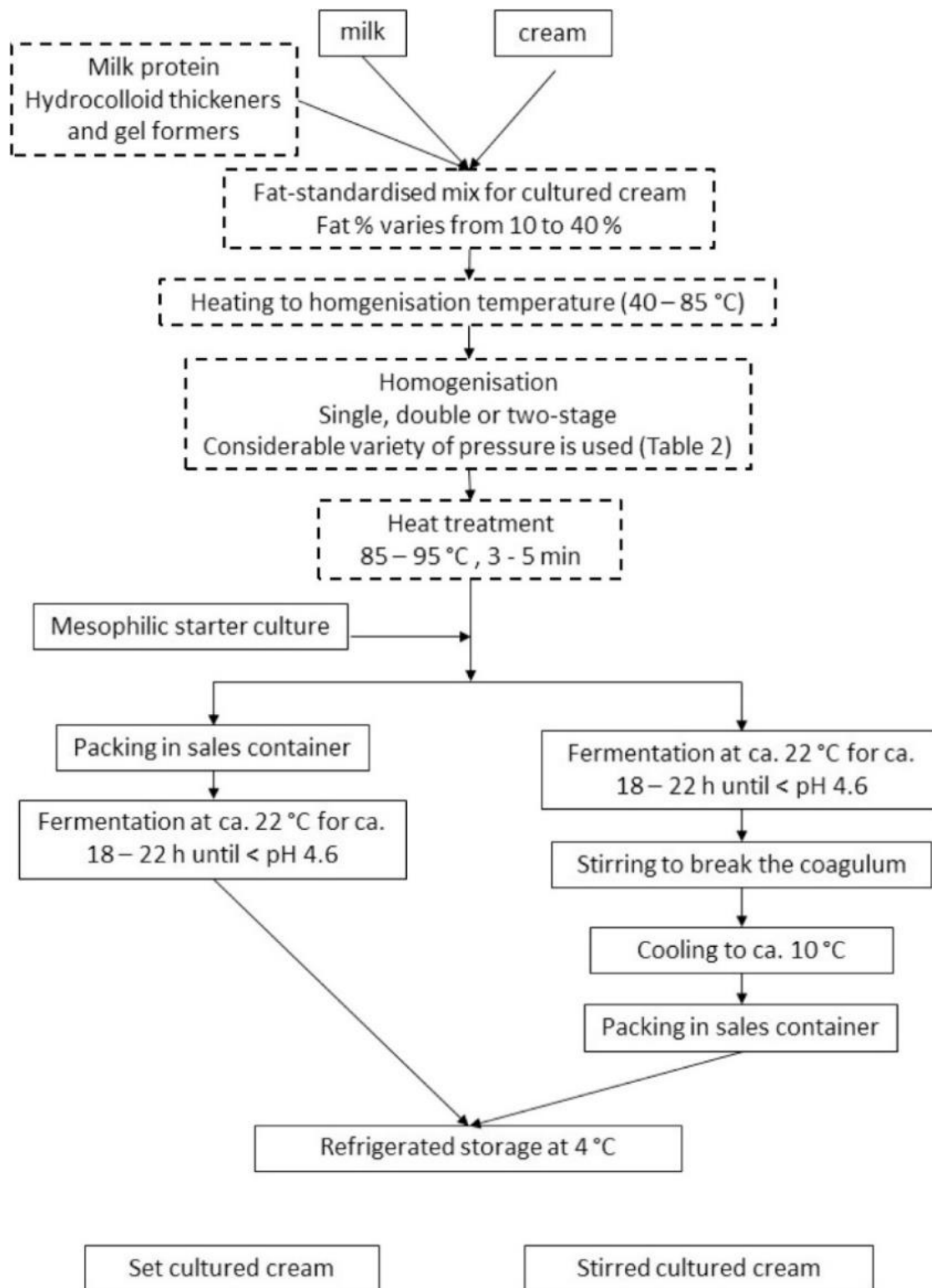
Figur 5. Sitratmetabolisme hos melkesyrebakterier (Hutkins, 2007)

2.2.1 Syrekultur

For å utnytte bakteriernes positive egenskaper kan det settes sammen en syrekultur bestående av flere typer melkesyrebakterier. Syrekulturer blir benyttet i fermenterte melkeprodukter for å styre produktets endelige karakteristikk, hvorav tekstur, syrlighet og aroma i stor grad blir påvirket. Det skilles hovedsakelig mellom mesofile og termofile kulturer, hvorav mesofile kulturer har sitt optimum temperaturområde ved 30 °C og termofile kulturer ved 42 °C (Fox et al., 2017). Hvilken type syrekultur som benyttes avhenger av type produkt, og i rømme benyttes en mesofil syrekultur. De mesofile syrekulturene kan igjen kategoriseres i DL, D, L og O kulturer ettersom hvilke melkesyrebakterier de består av. I rømme benyttes som oftest en DL syrekultur, og en slik syrekultur består av melkesyrebakteriene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. (Walstra et al., 2006, s. 386-387).

2.3 Rømmeproduksjon

Rømme er et meieriprodukt som produseres ved å fermentere fløte med bruk av melkesyrebakterier. Produktet skal ha en fyldig og kremet konsistent med en mild og lett syrlig smak, men det finnes naturligvis noen variasjoner mellom ulike produsenter og land. Hvilken type syrekultur som benyttes har en stor innvirkning på rømmens endelige karakteristikk, men produktvariasjoner kan også styres gjennom ulike produksjonstrinn. Før fløten syres med melkesyrebakterier blir den standardisert til ønsket fettprosent, homogenisert og pasteurisert. Deretter tilsettes syrekultur før fermenteringen avsluttes når pH er kommet under 4,6 (Narvhus et al., 2019). Rømmen kan fermenteres direkte i emballasjen (set/fast rømme) eller på tank (rørt rømme), og videre produksjonsprosess avhenger av dette. Om rømmen er blitt fermentert på tank må gelen brytes og røres opp, før den kan overføres til respektiv emballasje. I rørt rømme vil gelen derfor være noe løsere sammenliknet med fast (set) rømme som har et ubrutt koagulum (Lyck et al., 2006). Figur 6 presenterer hvordan produksjonen av rømme kan se ut.



Figur 6. Flytskjema over rømmeproduksjon (Narvhus et al., 2019)

2.3.1 Homogenisering

Hovedhensikten med homogenisering er å redusere oppfløtningshastigheten av fett. Gjennom denne prosessen vil fettkulene forstyrres og bli mindre, noe som vil gi en jevnere fettfordeling i fløten. Homogenisering blir blant annet benyttet for å forhindre kremdannelse, forbedre stabiliteten og øke viskositeten i et produkt, i tillegg til at det kan gi et hvitere og mer appetittlig utseende (Bylund, 1995). Ettersom fettkulene blir flere og mindre øker fettkuleoverflaten, gjerne 5-10 ganger (Narvhus et al., 2019; Walstra et al., 2006, s. 279). Når fettkuleoverflaten øker vil det ikke være nok membranmateriale (MFGM) til å dekke de nye fettkulene, og det dannes en ny pseudomembran bestående av hovedsakelig kaseinprotein i tillegg til gammelt membranmateriale.

Homogenisatoren består av en pumpe som under trykk vil presse fløten igjennom en ventil. Det skilles mellom ett- og to-trinns homogenisering. Ved ett-trinns homogenisering blir fløten ført igjennom én ventil, mens det ved to-trinns homogenisering blir benyttet to ventiler. Fløten kan også homogeniseres i to omganger, igjennom samme ventil, og kalles da for dobbel homogenisering (Narvhus et al., 2019). Ved å benytte ett-trinns homogenisering vil resultatet bli fløte med større fettkuler sammenliknet med å benytte to-trinns homogenisering. Ved to-trinns homogenisering benyttes først et høyere trykk, etterfulgt av et lavere. På denne måten forhindres agglomerering av fettkulene ved at de blir spredt på nytt ved det lave trykket i steg to. Det er ikke godt dokumentert hva som skiller effektene av dobbel og to-trinns homogenisering, men mye tyder på at størrelsen på fettkulene reduseres ytterligere i runde to ved dobbel homogenisering, mens de ved to trinns homogenisering hovedsakelig holdes ytterligere adskilt, slik at det ikke dannes klynger (Mulder & Walstra, 1974; Narvhus et al., 2019). Dette fører til lavere viskositet i produktet. Som Lucey (2004) konstaterer, så fører imidlertid dobbel homogenisering til økt viskositet og jevnhet på rømme. Generelt er ett trinns homogenisering anbefalt om det er ønskelig med en fastere konsistens på rømmen. Viskositeten kan imidlertid bli for høy med ett trinns homogenisering, og Østby (2017) skriver i sin masteroppgave at leverandør av syrekulturer, Chr. Hansen, anbefaler to-trinns homogenisering til fløte som benyttes til rømmeproduksjon. Bylund (1995) anbefaler også to-trinns homogenisering til produkter med et høyt fettinnhold.

Hvilken metode som benyttes, hvilke(t) trykk og ved hvilken temperatur fløten homogeniseres varierer. Vanligvis er homogeniseringstemperaturen mellom 40-75 °C. Det er generelt viktig at temperaturen ikke er for lav slik at fett krystalliseres (Walstra et al., 2006, s. 286-287). Hvilket trykk som er optimalt, avhenger i stor grad av fettprosenten. Noen retningslinjer på hva som er

vanlig å benytte er 30-50 bar for 38 % fett, 120-170 bar for 18 % fett og 150-200 for 10 % fett (Lyck et al., 2006). Fløte med høy fettprosent homogeniseres gjerne ved lavere trykk fordi det er ønskelig med større fettkuler. Dette for å kompensere for manglende proteiner, slik at overdreven aggregering unngås og at det isteden dannes en stabil emulsjon (Narvhus et al., 2019). For at homogeniseringen skal ha stor nok effekt kreves nemlig 0,2 g kasein per gram fett (Mulder & Walstra, 1974). Ved mangel på tilstrekkelig protein vil ikke de nye fettkulene bli omsluttet av en membran, og dette fører til koalens og aggregering mellom fettkulene. Det vil heller ikke være nok fritt protein i serumfasen. I følge Walstra et al. (2006, s. 291-292) vil fettkulene alltid, i fløte som inneholder mer enn 18 % fett, klynge seg sammen i såkalte fettkuleklynger etter homogenisering. Disse fettkuleklyngene deler membranmateriale ved å dele på kasein miceller ved grensesnittet (Mulder & Walstra, 1974). Fettkuleklynger kan imidlertid være ønsket i visse produkter. I eksempelvis rømme vil det bidra til en høyere viskositet (Lucey, 2004).

2.3.2 Pasteurisering

Etter homogenisering blir fløten varmebehandlet ved 90-95 °C i 5 minutter (Lyck et al., 2006). Varmebehandlingen er nødvendig for å inaktivere patogene mikroorganismer, men i produkter som rømme er det også et essensielt produksjonstrinn for å denaturere myseproteiner. Myseproteinene denaturerer ved ulike temperaturer (Zhang et al., 2021) og en studie viser at nesten alt myseprotein i rå melk denatureres ved 95 °C i 10 minutter (Qian et al., 2017). Den typiske pasteuriseringstemperaturen på 72 °C i 15 sek vil med andre ord ikke være tilstrekkelig for et syrnet melkeprodukt. Denatureringen av myseprotein gir en økning i mengde gel dannende protein, hvor en for svak varmebehandling kan føre til en svak og skjør gel (Lucey, 2004). Det er hovedsakelig denaturering av β -laktoglobulin som har blitt studert i detalj og ved tilstrekkelig denaturering vil myseproteinene binde seg via svovelbindinger til både κ -kasein og andre proteiner i fettkulemembranen (Walstra et al., 2006, s. 231). Som Tamime (2003) konstaterer kan komplekset med κ -kasein og denaturert β -laktoglobulin bidra til minimal synerese og gi en økt fasthet på gelen.

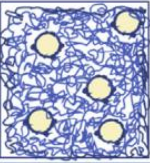

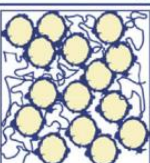
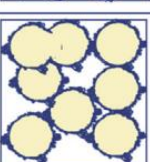
2.3.3 Inokulering og inkubering

Før inokulering med DL- syrekultur kjøles fløten ned til syringstemperatur. Det er viktig at temperaturen verken er høyere eller lavere enn det syrekulturen trives med, da dette vil inhibere

melkesyreproduksjonen. Syrningstemperaturen ligger som regel mellom 20-25 °C (Meunier-Goddik, 2012), og har mye å si da den påvirker utviklingen og forholdet mellom de ulike bakteriene i kulturen. Desto høyere temperatur, desto raskere går syrningen, men en for rask syrning kan resultere i svakere aroma, da de fleste aromastoffene dannes mot slutten av syrningen (Born, 2006). Melkesyreproduksjon er essensielt for at pH skal synke til under det isoelektriske punktet til kasein, slik at det dannes ett gel nettverk. I følge Lyck et al., 2006 tar det omtrent 18-20 timer å nå korrekt pH, men dette avhenger naturligvis av syrekultur og temperatur.

2.3.4 Geldannelse

En gel er et solid liknende materiale, som består av et tredimensjonalt nettverk av polymerer dispergert i en vandig fase (Rogovina et al., 2008). Rømmens gel-nettverk er bygget opp av både fettkuler, kaseinmiceller og denaturerte myseproteiner. Etersom melkesyre produseres og pH synker, produseres det hydrogen ioner som nøytraliserer kaseinmicellens ladning. Kaseinmicellene, som ikke lenger frastøter hverandre vil aggregere via både hydrofobe og elektrostatiske interaksjoner (Lucey, 2004). Under syrningen vil også kolloidalt kalsiumfosfat frigjøres og migrere fra micellen til serumfasen. Kaseinmicellene vil da holdes sammen av saltbroer og hydrofobe interaksjoner (Walstra et al., 2006, s 155). Gel-nettverkets oppbygning vil imidlertid variere avhengig av fettinnhold. Som Narvhus et al. (2019) presiseres er det uklart hvordan en gel dannes når tilstedeværelsen av fett er høyere enn protein, og mer forskning er nødvendig for å kunne forklare mekanismene bak dannelsen av syrefelt gel, med et fettinnhold over 18 %. Ved homogenisering øker riktignok fettkuleoverflaten, og protein inkorporeres i den nye pseudomembranen. Fløte med mye fett vil dermed ha behov for mer protein i fettkulemembranen sammenliknet med fløte med lav fettprosent. Narvhus et al., 2019 har foreslått hvordan gel strukturen påvirkes av fettinnholdet (figur 7). En gel med 35 % fett vil i stor grad bestå av fettkuler med protein inkorporert i membranen, der nærmest ikke noe protein vil være til stede i serumfasen. Det oppstår en markant koalesens og aggregering av fettkulene.

Fat content		
4 %		The acid gel consists predominantly of a network of casein and whey proteins. Fat globules are covered with protein (pseudoprotein) and are incorporated in the protein network.
10 %		The acid gel is still predominantly a protein network, but this is less dense since more protein has covered the fat globules which occupy a greater volume.
20 %		At 20 % fat, the fat globules are slightly larger than those in 4% fat and therefore adsorb proportionally less protein. Despite this, most of the protein is incorporated in the fat globule membrane and little is left to participate in the gel. The gel is therefore mostly a network of pseudoprotein (fat globules covered with protein). Some fat globules share protein and some clustering is observed.
35 %		In cream with 35% fat, fat globules have about twice the diameter of those in milk with 4 % fat. Virtually no protein can be found in the serum phase and there is marked coalescence and aggregation of fat globules.

Figur 7. Illustrasjon av gel strukturene i fermentert produkt fra homogenisert melk og fløte med ulike fettinnhold. (Narvhus et al., 2019)

Andre faktorer som også kan ha en innvirkning på gel-nettverkets oppbygning er homogeniseringsbetingelser, varmebehandling og fermenteringstemperatur. Effektene av disse faktorene er henholdsvis forklart i delkapitlene over (2.3.1, 2.3.2 og 2.3.3).

2.3.5 Lagringsbetingelser

Når fermenteringen er avsluttet, og etter eventuell opprøring av gelen (avhengig av om det produseres rørt eller fast type), blir rømmen oppbevart ved 4 °C frem til videre distribusjon (Narvhus et al., 2019). I følge Meunier-Goddik (2012) har rømme vanligvis en holdbarhet på rundt 25-45 dager, men det er varierende anbefalinger. En viktig faktor, som har stor betydning for videre holdbarhet, er fløte kvalitet. Det vil raskt utvikles bismak i rømmen hvis ikke fløten er av utmerket kvalitet. Forutsatt at det benyttes fløte av god kvalitet så begrenses hovedsakelig holdbarhetstiden av smaksfeil eller overflatevekst av gjær og muggsopp (Meunier-Goddik, 2012). Til tross for strenge hygienekrav under produksjonen kan allikevel gjær og mugg vokse på overflaten av produktet hvis ikke pakken er lufttett (Lyck et al, 2006). En studie viser at attributter som stikkende munnfølelse, diacetyl-aroma, acetaldehyd-aroma, sur lukt, harsk aroma, ostaroma og bitter smak er korrelert med økt lagringstid over en periode på 28 dager

(Folkenberg & Skriver, 2001). Lyck et al. (2006) presiserer at bitterhet i rømmen kan forårsakes av at melkesyrebakterienes enzymer hydrolyserer β -laktoglobulin ved forlenget lagring. Den samme kilden foreslår også at et endret smaksbilde kan komme av diffusjon av aromatiske stoffer gjennom emballasjematerialet.

2.4 Kvalitetsproblemer i rømme

Rømme skal være et jevnt og viskøst produkt, med en mild diacetyl-aroma og en lett syrlig smak (Lyck et al., 2006; Meunier-Goddik, 2012). Egenskapene blant ulike rømmevarianter varierer riktignok, spesielt de fysikalske egenskapene. I noen tilfeller er det ønskelig med et mer viskøst produkt, mens andre ganger vil man at konsistensen skal være såpass fast at det må benyttes skje for å få overført produktet. Hva som er optimal konsistens, avhenger i stor grad av fettinnholdet (Narvhus et al., 2019).

Det finnes flere kvalitetsutfordringer med rømme, både når det gjelder smak, utseende og konsistens. På grunn av det høye fettinnholdet kan produktet få en harsk og oksidert smak hvis det ikke blir behandlet og oppbevart på korrekt måte. En for svak diacetyl-aroma, et for surt produkt og/eller en bitter smak er andre smaksdefekter. Når det gjelder teksturen kan utfordringer være at produktet blir for tynt eller for tykt, at det blir kornete og/eller klumpete eller at det får en geleliknende konsistens. Et uhomogent produkt med myse-seperasjon er enda en defekt (Born, 2006; Meunier-Goddik, 2012). Som Narvhus et al. (2019) presiserer, er det flere grunner til at kvalitetsproblemer oppstår. Forholdet mellom protein- og fettinnhold, homogenisering og varmebehandling av fløten, type starterkultur, fermenteringsbetingelser, nedkjølingsprosess og lagring samt distribusjon, er alle viktige faktorer som kan spille inn.

2.4.1 Fnokker

Et vanlig kvalitetsproblem i rømme, som det finnes svært lite litteratur på, er fnokker. I internasjonal litteratur benyttes ord som «granular», «nodules» og «curds», samt «grainy» og/eller «lumpy» tekstur for disse små klumpene. Slike teksturale defekter er kritikkverdige ettersom det avviker fra kvalitetsstandarden (Lucey & Singh, 1997). Ettersom det ikke er et uniformt ord for fnokker på engelsk, kan det være utfordrende å vite hva litteraturen sikter til. Fnokker og klumper skiller seg hovedsakelig fra hverandre på størrelsen, hvor klumper under

2 mm kan defineres som fnokker. På bildet under (figur 8) er fnokker i rømme avbildet på linjalen til høyre.



Figur 8. Fnokker i rømme (linjalen til høyre) Foto: Hilde Hamremoen Tørud

Årsakene til fnokkedannelse er relativt ukjente, og det er behov for mer forskning på dette området. En mulig hypotese er at proteolytisk aktivitet i fløten kan fremprovosere denne dannelsen. En bakteriell protease; aprX, produseres av *Pseudomonas fluorescens* og har vist seg å bryte ned κ -kasein, noe som kan resultere i en flokkulering av kaseinmiceller og fettkuler (Zhang et al., 2020). Kapittel 2.5.2 går nærmere inn på mekanismene bak dette.

2.5 Melke- og fløte kvalitet

Kvaliteten på råstoffet er av stor betydning for kvaliteten på endelig produkt. Blant annet påvirkes rømmens lagringstid, sensorisk kvalitet, og utbytte i stor grad av den mikrobielle tilstanden i råstoffet (Samarzija et al., 2012). Ettersom råmelk både blir oppbevart lengre og kaldere sammenliknet med tidligere, favoriseres veksten av psykotrofe bakterier. Disse bakteriene er blant annet i stand til å produsere termotabile ekstra- og intracellulære enzymer som kan forårsake ødeleggelse av melk og meieriprodukter (Samarzija et al., 2012). Videre følger litt teori om psykotrofe bakterier og proteolytiske systemer, og hvilke innvirkninger dette kan ha på kvaliteten.

2.5.1 Psykotrofe bakterier

Psykotrofe bakterier består av en rekke ulike slekter og har sitt optimale vekstområde mellom 20-30 °C. De kan allikevel vokse ved 7 °C eller lavere temperaturer, og er naturlig tilstedeværende i både vann, jord og luft (Samarzija et al., 2012; Waalstra et al., 2006, s. 195). Psykotrofe bakterier utgjør vanligvis mer enn 90 % av den totale mikrobielle populasjonen i råmelk og har blitt et stort problem i meieriindustrien da det er hovedårsaken til ødeleggelse og økonomiske tap (Samarzija et al., 2012). Kontaminering skjer som oftest på grunn av utilstrekkelig vask og desinfisering av utstyr. Forurensing skjer gjerne i lagrings- og transportutstyr før varmebehandling, men kan også oppstå etter pasteurisering, eksempelvis ved pakking (Munsch-Alatossava & Alatossava, 2006). De fleste psykotrofe bakterier har også evnen til å feste seg til overflater og danne biofilm, noe som gjør dem ekstremt vanskelig å bli kvitt (Sillankorva et al., 2008). I tillegg til dette kan de produsere termotabile enzymer, som reduserer både sensorisk kvalitet og holdbarhet i bearbejdede flytende melkeprodukter (Simões et al., 2010).

2.5.1.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. er den mest dominerende melkeassosierte psykotrofe bakterien, hvor *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi* og *P. lundensis* er de mest detekterte i melk og melkeprodukter (Meng et al., 2017). *Pseudomonas* spp. er en bredspektret slekt og er kjennetegnet ved å være gram negativ, aerob, ikke-fermentativ, katalase- og oksidase positiv, mesofil- og psykotolerant, i tillegg til ikke-sporedannende (Caldera et al., 2016). Bakterien har en kort generasjonstid, der kun en liten kontaminasjon kan få store konsekvenser. Det er også hydrolytiske termotabile enzymer, i form av proteaser, lipaser og fosfolipaser produsert av *Pseudomonas* spp. (og *Bacillus* spp.) som har de største påvirkningene i meieriindustrien (Samarzija et al., 2012).

2.5.2 Proteolytisk aktivitet

De hydrolytiske enzymene bryter ned ulike bestanddeler i melk. Proteasene hydrolyserer kasein, lipasene hydrolyserer fett og fosfolipasene forstyrrer fettkulemembranen slik at fettene blir tilgjengelig for lipasene. Noen stammer av *Pseudomonas* spp. produserer både proteaser, lipaser og fosfolipaser, mens andre produserer kun proteaser eller lipaser (Samarzija et al., 2012). Fokuset i denne oppgaven vil være på proteolytisk aktivitet fra proteaser.

Det store problemet med proteasene er at de er varmestabile, og dermed kan beholde sin aktivitet selv etter pasteurisering eller ultra høy varmebehandling (UHT) (Meng et al., 2017). Proteinase kan blant annet medføre bismak og lukt i melk (Bendicho et al., 2002), i tillegg til koagulering og degradering over tid (Meng et al., 2017).

Det finnes imidlertid ulike typer proteaser, og effektene kan være noe forskjellige. I flere *Pseudomonas* spp. stammer har den viktigste proteinasen, aprX, blitt karakterisert (Meng et al., 2017). AprX er en kaseinolytisk ekstracellulær alkalisk metalloprotease som hovedsakelig hydrolyserer κ -kasein, etterfulgt av β - og α_{s1} -kasein (Zhang et al., 2020). Ifølge samme kilde viser det seg å være en forskjell på effekt av bakteriell protease (aprX) og native protease (plasmin) når det gjelder fettdestabilisering i UHT melk. Dette kommer av at nedbrytingen av kasein skjer på forskjellige måter. AprX hydrolyserer κ -kasein, noe som medfører en flokkulering av kaseinmicellene og fettkulene, og en sedimentering. Plasmin derimot hydrolyserer hovedsakelig α - og β -kasein noe som resulterer i at fettkulene smelter sammen og stiger opp til overflaten i UHT melken (Zhang et al., 2020).

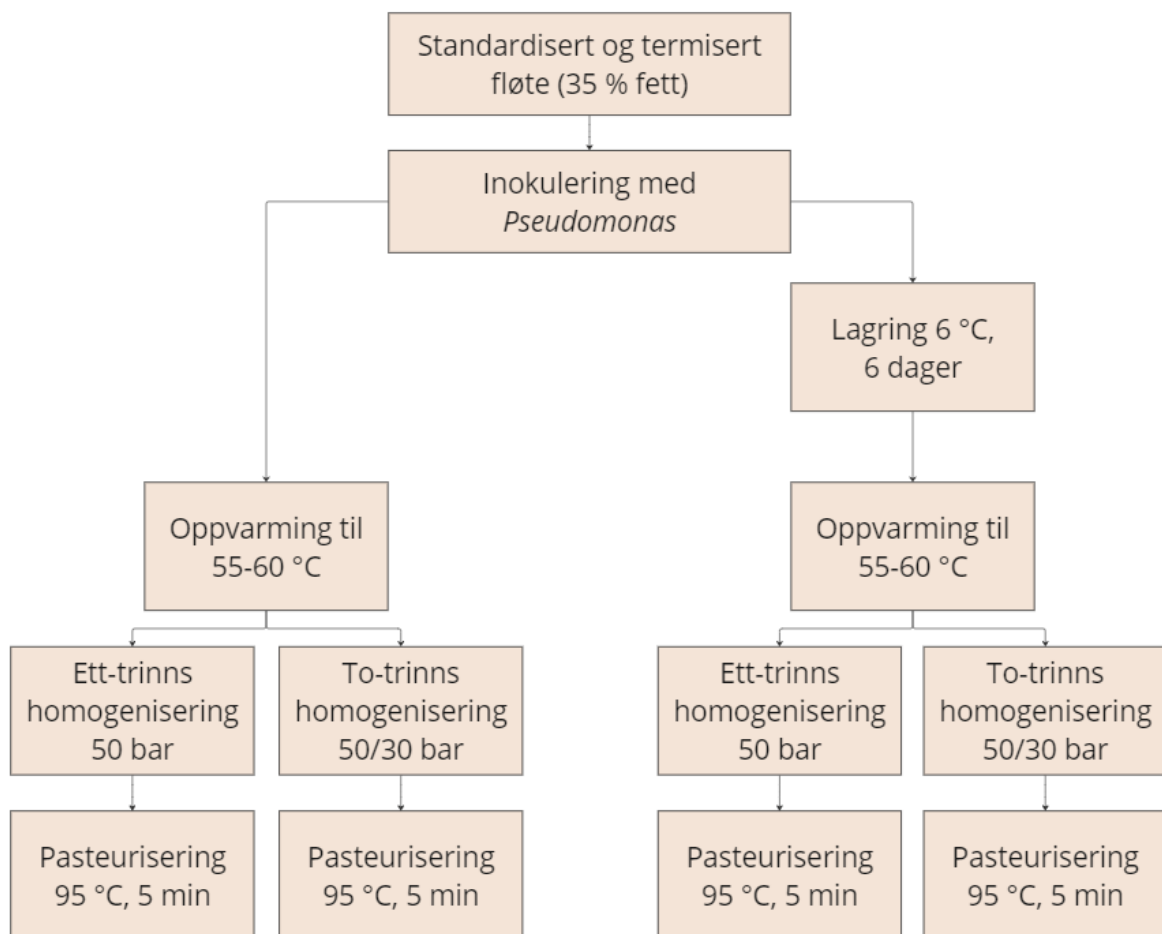
I rømme vil proteolyse gi en tydelig bitter, aldrende og bedervet smak (Born, 2006), men de fleste egenskapene er ukjente da det er blitt lite studert. En studie av Gassem & Frank (1991) har analysert de fysiske egenskaper til yoghurt produsert av melk behandlet med bakterielle proteaser fra *Pseudomonas* og plasmin. Yoghurt produsert fra melk behandlet med bakterielle proteaser ble fastere, oppnådde en høyere viskositet og en høyere synerese, mens motsatt effekt ble observert i yoghurt produsert fra melk behandlet med plasmin (Gassem & Frank, 1991). Den samme studien viste en økt proteolytisk aktivitet ved lagring, og Meng et al. (2017) påpeker også at både temperatur og lagring har en effekt på den proteolytiske aktiviteten. En lav lagringstemperatur i tillegg til kort oppbevaring, helst under 48 timer før prosessering, anbefales for å minimere proteolysen (Meng et al., 2017).

Det finnes flere metoder for å undersøke proteolytisk aktivitet. Noen metoder undersøker degraderingen ved å analysere innholdet av frie aminosyrer og peptider. Andre metoder går ut på å måle hydrolysegrad, slik som for eksempel o-phthaldialdehyde (OPA) metoden (Rutherford, 2010). Det finnes også metoder hvor en spesifikt og dirkete kan måle grad av enzymaktivitet ved tilførsel av et substrat, slik som for eksempel ved azocasein-analyse (Bendicho et al., 2002).

3.0 Materialer og metode

3.1 Forsøksdesign

Det overordnede målet med studien var å dokumentere effekten av mikrobiell proteolyse i fløte samt effekten av ett- og to-trinns homogenisering, i tillegg til lagringstid, på rømmekvalitet. I forbindelse med dette ble det produsert totalt fire typer rørt seterrømme, alle med 35 % fett. For å undersøke effekten av fløte med ulik grad av proteolyse, ble fløte inokulert med *Pseudomonas* før rømme ble produsert etter henholdsvis 0 og 6 dager. *Pseudomonas trivialis* 9 ble benyttet for å fremprovosere proteolyse da denne stammen har høy proteolytisk aktivitet (Narvhus et al., 2021). Rømme laget av inokulert fløte dag 0 ble pasteurisert kort tid etter inokulasjon for å ha intakte proteiner. Effekten av ett-trinns homogenisering og to-trinns homogenisering ble undersøkt ved å homogenisere fløten ved henholdsvis 50 bar (ett-trinns) og 50 + 30 bar (to-trinns). Basert på tilgjengelig utstyr, ble det teoretisk sett benyttet dobbel homogenisering fremfor to-trinns homogenisering. Forsøksdesignet er fremstilt i figur 9.



Figur 9. Benyttet forsøksdesign, hvor totalt fire rømmetyper (35 % fett) ble produsert avhengig av om fløten ble inokulert i 0 eller 6 dager med *Pseudomonas trivialis* 9, og om det ble benyttet ett- eller to-trinns homogenisering.

De ferdige rømmeprøvene ble analysert ved 0, 3 og 5 ukers lagring for å undersøke effekten av lagringstid. Analysene ved 0 uker ble utført 1-2 dager etter fermenteringsstopp. I tillegg til å analysere ferdig rømme ble det tatt flere prøveuttak underveis i produksjonen som også ble analysert. En oversikt over alle prøveuttak og hvilke analyser som ble utført, er vist i tabell 1. Alle uttak som ble tatt etter inokulering med *Pseudomonas*, ble naturligvis tatt for hver forsøksfaktor.

Tabell 1. En oversikt over alle prøveuttak og hvilke analyser som ble utført på dem.

Prøveuttak	Milko-scan	PCA	M17/LBS	Proteolytisk aktivitet (Azocasein, Kapillærelektroforese, Frie aminosyrer)	pH, HSGC, HPLC, Teksturanalyse, Viskositetsanalyse, Linjalmetode og foto, Mørkefeltmikroskopi	Sensorisk kvalitetsbedømmelse & profilering
Standardisert fløte	x	x				
Termisert fløte		x				
Fløte etter inokulering med <i>Pseu.</i>		x		x		
Fløte etter homogenisering og pasteurisering		x				
Fløte etter inokulering med syrekultur			x			
Rømme 0 uker lagring			x	x	x	
Rømme 3 uker lagring			x	x	x	x
Rømme 5 uker lagring			x	x	x	

Totalt ble det gjennomført 3 produksjonsgjentak, ett i oktober 2023, og to i januar 2024. I tillegg ble det gjennomført et forforsøk i september 2023. Ved forforsøket ble ikke fløten inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9, da produksjonen kun var ment for å teste ut utstyr og prosess.

Til rømmefremstillingen ble det benyttet en kommersiell frossen DL kultur, med lav EPS produksjon. Denne kulturen bestod av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. En fast fermenteringstemperatur (23 °C) ble benyttet ved hvert forsøk.

Rømmeproduksjonen ble utført i pilotanlegget ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU). Analyser ble utført ved laboratoriet til KBM samt ved Innovasjonsbygget til TINE Kalbakken.

3.2 Utprøving og optimalisering av metoder

I forkant av rømmeproduksjonen ble det gjennomført flere tester i småskala. Dette ble gjort for å få en indikasjon på hvor godt *Pseudomonas trivialis* 9 vokser i fløte ved den bestemte lagringsbetingelsen og for å få en prognose på forventet fermenteringstid. I tillegg ble enkelte av analysemetodene testet ut og optimalisert ved behov.

3.2.1 Vekst av *Pseudomonas trivialis* i fløte etter 6 døgn ved 6 °C.

Da halvparten av den inokulerte fløten skulle oppbevares ved 6 °C i 6 døgn for å fremprovosere fløte med mye proteolyse, var det essensielt å finne ut av om stammen ville vokse godt ved disse betingelsene. En overnattkultur av *Pseudomonas trivialis* 9 ble preparert ved å tilsette 100µL kultur, hentet opp fra frys (-80 °C) til 5 mL Lysogenbuljong (ThermoFisher, USA). Blandingen ble inkubert over natt ved 22 °C, før kulturen ble rensert og inokulert i fløte. Ved utførelse ble 1 mL overnattkultur sentrifugert (10 000 g, 10 min) i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland), før pellet ble resuspendert i 500 µL Ringers løsning. 100µL rensert kultur ble sterilt overført til 10 mL kommersiell kremfløte (37% fett) som ble inkubert ved 6 °C i 6 døgn. Deretter ble fløten fortynnet (1:10) ned til 10⁻⁸, og platet ut på skåler med platetallsagar tilsatt skummet melk (Merck, Darmstadt, Tyskland) før skålene ble inkubert ved 22 °C i 3-4 døgn og antall kolonier ble talt. For å kunne vite om *Pseudomonas trivialis* 9 hadde vekst, ble resultatet sammenliknet med en nullprøve. Nullprøve ble preparert ved at 100 µL kultur ble fortynnet (1:10) ned til 10⁻⁸, platet ut på skåler med Plate Count Agar (PCA) (ThermoFisher, USA), og inkubert ved de samme betingelsene.

3.2.2 Fermenteringstid

For å få en indikasjon på fermenteringstid ved 23 °C ble kommersiell kremfløte (37 % fett) inokulert (0,04 %) med DL-kulturen som skulle benyttes ved rømmeproduksjonene. Den inokulerte fløten ble plassert i et vannbad og inkubert ved 23 °C i 16-17 timer før pH ble lest av på pH- meteret; PHM 92 (Nerliens kjemiske tekniske AS, København, Danmark).

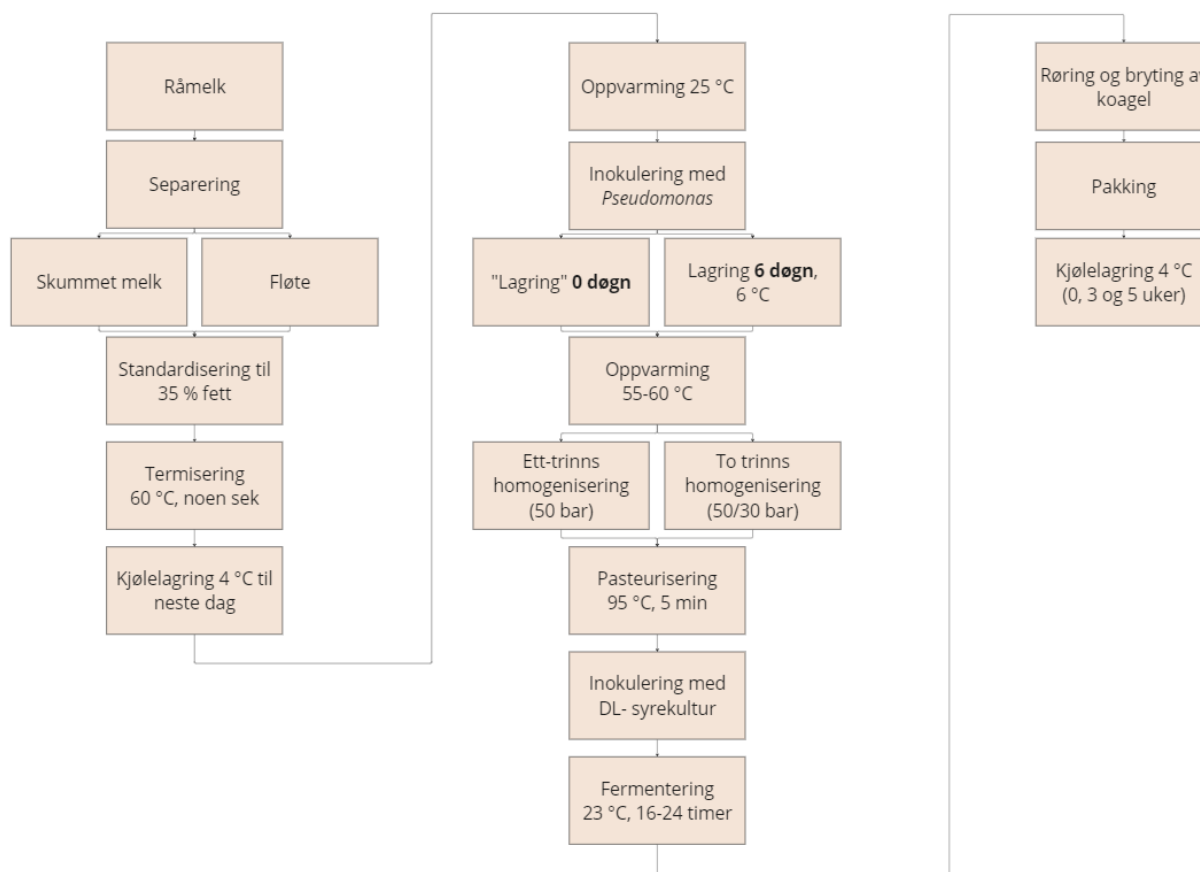
3.2.3 Metodeutvikling

I forbindelse med denne masteroppgaven var det ønskelig å benytte flere metoder for å analysere proteolytisk aktivitet og kvantifisere nedbryting av proteiner. Basert på tilgjengelig utstyr ble det besluttet å prøve ut følgende metoder til dette; O-Ftaldialdehyd spektrofotometrisk analyse (OPA), høyttelse væskekromatografi (HPLC), kapillærelektroforese og azocasein-analyse. Metodene ble testet på kommersiell seterrømme (35 % fett). OPA metoden ble utført i henhold til metode beskrevet av Church et al. (1983) og Goodno et al. (1981), men på grunn av lite kunnskap om metoden i forbindelse med rømmeprodukter, samt mangel på tid ble det besluttet å ikke benytte metoden videre. Utføring av HPLC for detektering av frie aminosyrer, kapillærelektroforese og azocasein-analyse, er henholdsvis beskrevet i delkapittel 3.4.2.5, 3.4.2.6 og 3.4.2.7.

Resterende analyser, hvor det var usikkerhet knyttet til metoden når det gjaldt rømmeprodukter, ble også testet ut. Dette for å se om det var nødvendig å tilpasse noen av metodene ytterligere i henhold til produkt. Alle benyttede metodeutføring er beskrevet i kapittel 3.4.

3.3 Fremstilling av rømme

Rørt seterrømme med 35 % fett ble produsert ved pilotanlegget til KBM, og produksjonsprosessen er fremstilt under i figur 10.



Figur10. Produksjonsprosess rørt romme ved pilotanlegget til KBM, NMBU.

3.3.1 Melkebehandling (separering, standardisering, termisering)

Råmelk fra Ås gård (NMBU) ble levert til pilotanlegget og deretter separert på melkebehandlingslinjen hvor Westfalia separator AG (GEA, Oelde, Tyskland) ble benyttet. Fløten ble varmebehandlet ved 55 °C mens skummetmelk ble pasteurisert på linjen ved 75 °C i 15 sekunder ved hjelp av platevarmeveksler fra Alfa Laval (Lund, Sverige). Fettinnholdet i fløte og skummetmelk ble analysert ved bruk av Milkoscan™ FT1 (Foss Analytical AS, Hillerød, Danmark). Det ble tatt sterile prøveuttak med bulkotester (Norsk Formblåsing AS, Notodden, Norge), og blandingsforholdet for å oppnå fløte med 35 % fett ble regnet ut. Etter at fløten var standardisert til riktig fettprosent ble den termisert i vannbad ved 60 °C i noen sekunder for å sikre kvaliteten frem til neste dag. Dette ble gjort da det ikke var tid til videre produksjon samme dag pga. sen levering av melk. Fløten ble oppbevart ved 4 °C til neste dag.

Ved produksjonsgjentak 2 var det problemer med melkebehandlingslinjen, og råmelken ble derfor først termisert ved 65 °C i noen sekunder, før den ble separert med Milky FJ 125 EAR3 separator (Janschitz GmbH, Althofen, Østerrike). Fløten ble standardisert til korrekt fettprosent (35 %) og lagret kjølig ved 4 °C til neste dag.

3.3.2 Inokulasjon med *Pseudomonas*

Påfølgende dag ble fløten varmet opp til 25 °C på vannbad og inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 (log 5, CFU/mL). Av den ene fløtehalvparten ble det produsert rømme samme dag. Den andre fløtehalvparten ble overført til et kjølerom (6 °C) hvor temperaturmålinger ble tatt jevnlig over 6 døgn, før det ble produsert rømme av denne batchen også.

3.3.2.1 Preparering av kultur

Før fløten kunne inokuleres med *Pseudomonas trivialis* 9, måtte kulturen bli dyrket opp og rensset. Bakteriekulturen ble hentet opp fra fryser (-80 °C), strøket ut på PCA (ThermoFisher, USA), og inkubert ved 22 °C i 1 døgn. Videre ble koloniene podet i Lysogenbuljong (LB-broth, ThermoFisher, USA), og inkuberte ved 22 °C i 1 døgn. Log vekst av bakterien ble lest av ved bruk av Burker tellekammer (Marienfeldt, Tyskland). For å rense kulturen fra mediet ble løsningen sentrifugert ved 8 000 g i 10 min (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) og resuspendert i Ringers løsning (1:1, for å opprettholde log 5 CFU/mL).

3.3.3 Homogenisering

Fløten ble varmet opp til 55-60 °C i vannbad under omrøring før den ble homogenisert ved 50 bar på APV Rannie (Rannie Machine Works Ltd., Albertslund, Danmark) Halvparten av fløten ble homogenisert en gang til ved 30 bar. Ett-trinns og to-trinns fløten ble holdt adskilt videre i produksjonen.

3.3.4 Varmebehandling

Fløten ble pasteurisert ved bruk av to hjemmelagde «bordmikserer» på piloten (figur 11). Hver bordmikser bestod av en 5 L beholder i rustfritt stål, med tilkoblet tappekran og røreverk. En drill ble benyttet for å styre røreverket mens tilkoblet damp og kaldt vann ble brukt for å justere temperaturen. Fløten ble varmet opp til 95 °C, og holdt i 5 minutter, før den ble kjølt ned til

rundt 30 °C og tappet over i viskubator spann. Ett- og to-trinns fløten ble overført til hvert sitt viskubator spann (ca. 7 L). Spannene ble deretter satt i viskubatoren (FH Scandinox, Mandal, Norge) og kjølt videre ned til ca. 10 °C. Temperaturen ble justert opp igjen til 23 °C (ca. 2 timer) før inokulering med syrekultur. Avhengig av produksjonsdag og klokkeslett for inokulasjon, stod fløten i viskubatoren i alt fra 2-5 timer før inokulering.



Figur 11. Hjemmelagd bordmikser/pasteur med tilkoblet tappekran, røreverk og temperaturregulering benyttet på pilotanlegget (KBM, NMBU). Foto: Hilde Hamremoens Tørud

3.3.5 Fermentering

Frossen DL kultur (kommersiell produsent av kulturer) ble hentet opp i forkant av inokulasjon og satt kjølig. Smeltet syrekultur ble inokulert i fløten (0,04 %) ved hjelp av steril automatpipette og pipettespiss. Fløten ble inkubert ved 23 °C frem til pH 4,6 ble nådd, eller til pH hadde stabilisert seg. For å unngå kontaminasjon fra pH-meteret ble det tatt så sterile prøveuttak som mulig av rømmen ved hver pH-avlesning. Uttak ble tatt med teskjeer dyppet i klorvann.

3.3.6 Røre og bryte koagel

Etter fermenteringen ble rømmen rørt kraftig opp 60 ganger. Til dette ble det benyttet en rørepinne med hull og med en diameter på 7,5 cm (figur 12).



Figur 12. Rørepinne (diameter=7,5 cm) benyttet til å røre opp rømmekoagel etter fermentering. Foto: Hilde Hamremoen Tørud

3.3.7 Pakking og kjølelagring

Rørt rømme ble overført til vakuumposer (50x30 cm, Maske Gruppen AS, Trondheim, Norge) som ble avklippt i tuppen og brukt som sprøytepose for overføring av rømme til rømmebegre. Rømmebegrene ble fylt opp med rømme ca. 1-2 cm fra kanten før oblat ble strøket på ved bruk av et strykejern. Lokk ble lagt på, og rømmen ble deretter lagret kjølig ved 4 °C i 1-2 dager (0 uker), 3 uker og 5 uker.

3.4 Analyser

3.4.1 Mikrobiologiske analyser (Bakterievekst på PCA, LBS og M17 agar)

For å sjekke både totalantall og vekst av spesifikke bakterier ble det ved KBM utført platetelling på PCA (ThermoFisher, USA), Lactobacillus selektiv agar (Becton Dickinson, GmbH, Tyskland) og M17-agar (Merck, Tyskland). Det ble preparert fortynningsrekker av 0,1 g prøve i Ringers løsning. Hvilke fortyninger som ble strøket ut på agar var avhengig av inkubasjonsdag og type agar. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 2 døgn, med unntak av skåler med platetallsagar. Disse ble inkubert ved 22 °C i 2-3 døgn.

3.4.2 Kjemiske analyser

3.4.2.1 Milkoscan

Innholdet av fett, protein og tørrstoff i standardisert fløte ble analysert ved bruk av Milkoscan™ FT1 (Foss Analytical AS, Hillerød, Danmark). Maskinen ble også benyttet til å analysere fettinnholdet i separert fløte og skummet melk før standardisering. Det ble tatt sterile prøveuttak med bulkotester (Norsk Formblåsing AS, Notodden, Norge).

3.4.2.2. pH

16 timer etter inokulering med syrekultur ble pH målt kontinuerlig med Orion Star™ A211 pH-meter (Thermo Scientific, Massachusetts, US) frem til pH nådde 4,6 eller hadde stabilisert seg. I forkant av målingene ble pH-meteret vasket og kalibrert med standard bufferløsninger med pH 4,0 og 7,0 som var temperert til romtemperatur.

For å undersøke pH utvikling under lagring ble pH målt i de ferdige rømmeprovne ved 0, 3 og 5 ukers lagring. pH-meteret PHM 92 (Nerliens kjemiske tekniske AS, København, Danmark) ble benyttet, hvor det i forkant ble kalibrert med standard bufferløsninger (pH 4,0 og 7,0) temperert til 4 °C.

3.4.2.3 HSGC-FID- Flyktige komponenter

Innhold av flyktige forbindelser i prøvene ble analysert ved bruk av headspace gas chromatography (HSGC). Metoden ble modifisert etter en metode tidligere beskrevet av Grønnevik et al. (2011). Prøvene ble godt blandet før 10,00 g ble veid ut i headspace-flasker (Machery Nagel, Dueren, Tyskland). Flaskene ble forseglet med teflonbelagt septa med aluminium ring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Prøvene ble plassert i en Agilent Technologies 7679A automatisk headspace sampler med et 6890 GC system (Agilent Technologies) og en flamme ioniseringsdetektor. Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies).

Som bæregass ble det benyttet helium (Aga, Norge) med en total flow på 11,1 mL/min. Vilråene for headspace flaskene var 50 °C med en forvarmingstid på 45 minutter, med miksing satt til 70 shakes/min. Headspace flaskene var trykksatt til 10 PSIG i 1.50 minutter før injeksjon og injeksjonstiden var på 0.5 minutt.

En CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland) ble benyttet for separering av komponentene. Kolonnen hadde en lengde på 25 meter, med indre diameter på 0,53 mm og

filmtykkelse på 5,0 μm . Det ble benyttet følgende temperaturprogram under analysen; 53 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; økning med 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 70 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; økning med 22 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 130 $^{\circ}\text{C}$, 3 min.

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-metyl-butanal, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanal, 3-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol (Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, 1-butanol, 2-butanol og 2.3-pentadion (Merck, Tyskland).

3.4.2.4 HPLC- Organiske syrer og karbohydrater

Innhold av organiske syrer og karbohydrater ble analysert ved bruk av HPLC etter en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011) med noen modifikasjoner.

Prøvene ble godt blandet før 1,00 g ble veid inn i et 10 mL rør. Prøvene ble tilsatt 2,5 mL ionebyttet vann, 200 μl 0,5 M H_2SO_4 (Merck, Tyskland) og 8 mL acetonitril (Merck). Etter tilsetning av acetonitril ble prøvene ristet for hånd før de ble satt i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min ved 40 rpm. Prøvene ble sentrifugert i romtemperatur, 15 minutter ved 1470 x g (3400 rpm) i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Supernatanten ble deretter filtrert med 0,2 μm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør. Analysen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), bestående av pumpe (Agilent Technologies), autosampler (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV detektor (Agilent Technologies), og RI-detektor (Agilent Technologies). Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies). 25 μl av prøven ble injisert og separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For beskyttelse av kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories). Kolonnetemperatur var satt til 32 $^{\circ}\text{C}$. Den mobile fasen som ble benyttet var 5 mM H_2SO_4 (Merck), med en hastighet på 0.4 mL/min.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var maltose,

fruktose, laktose, glukose og galaktose (Merck) og av organiske syrer ble sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyroglutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsninger. Karbohydratene og eddiksyre ble detektert ved hjelp av en RI-detektor, mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en DAD-UV detektor.

3.4.2.5 HPLC- Frie aminosyrer

Identifisering og kvantifisering av frie aminosyrer ble gjennomført ved bruk av HPLC, etter metode beskrevet av Bütikofer og Ardö (1999) og Moe et al. (2012) med noen modifikasjoner.

Ved opparbeidelse av prøvene ble 5,00 g veid inn i et 50 mL sterilt Nunc-rør og tilsatt 5,00 mL indre standardløsning (0,4 $\mu\text{mol/mL}$ L-norvalin (Sigma-Aldrich, Kina) i 0,1 M HCl (Merck, Tyskland)). Prøvene ble mikset i 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 plassert i et ultralydvannbad (Branson 2510, Soest, Nederland) i 30 minutter før de ble sentrifugert (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) i 40 minutter ved 2500 g (3400 rpm) og en temperatur på 4 °C. Det ble tilsatt 700 μL 4 % trikloreddiksyre (Merck) til 700 μL av supernatanten i et 2 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. Prøvene ble overført til en 10 mL steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) og deretter filtrert med 0,2 μm cellulose acetat-filer (VWR, USA) over i et HPLC-rør. 50 μL av dette ble overført til et analyserør og lagt på fryser for analysering (-20 °C). Resten av prøven 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), reaksjonstiden var 0,15 min 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 mol/L natrium-acetat-trihydrat (Merck) og 0,53 mol/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 min, 20,7-30 % B i 12 min og 30-100 % B i 4 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. 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).

3.4.2.6 Kapillærelektroforese

For å undersøke proteinnedbrytning ble det utført kapillærelektroforese etter en metode beskrevet av Jørgensen et al. (2016) med noen modifikasjoner. 600 mg prøve ble veid ut direkte i 1,5 mL eppendorfrør og fryst ned frem til analysering.

I forkant av analysen ble det preparert og fryst ned prøvebuffer og kjørebuffer i henhold til Jørgensen et al. (2016). Ved analysering av prøvene ble en løsning bestående av prøvebuffer og 1,4-Dithiothretiol (DTT, Sigma-Aldrich, Burlington, USA) preparert (39,3 mg DTT per 5 mL prøvebuffer). Tinte fløte- og rømmepøver (600 mg) ble tilsatt 900 µL bufferløsning hver, før prøvene ble godt blandet og satt på røring i en time (580 rpm, 35 °C) på en PCMT Termo-Shaker (Grant-Bio, Cambridgeshire, England). Prøvene ble deretter sentrifugert ved 5000 g i 10 minutter i en Micro Star 17 fra VWR (Tyskland). Supernatant ble filtrert over i nye eppendorfrør med en 2 mL steril sprøyte og enengangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) samt et 13 mm filter (0,22 µm, VWR). 50 µl filtrert supernatant ble deretter overført til CE-prøverør (250 µl PP snap, Agilent Technologies, USA).

Tint kjørebuffer ble filtrert med en 10 mL steril sprøyte (Henke-Ject, Tuttlingen, Tyskland) og et sterilt Filtropur S, 0,2 µm filter (Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Tyskland). 750 µl filtrert kjørebuffer ble deretter overført til respektive CE prøverør (1,5 mL Crimo Neck Vial, VWR, Tyskland).

CE prøverørene ble plassert i kapillæren (HPCE standard cap 50 µm id 56 cm lgth, Agilent Technologies, Tyskland), før analysen ble kjørt med Agilent ChemStation programvaren og på Agilent kapillærelektroforese-system (Agilent G7100A, Agilent Technologies, Waldbronn Tyskland). Elektroferogrammene ble deretter integrert i henhold til Jørgensen et al. (2016).

3.4.2.7 Azocasein

For å undersøke proteolytisk aktivitet ble en azocasein-analyse utført etter en metode tidligere beskrevet av Andreani et al. (2016) med noen modifikasjoner. Det ble benyttet en 3 % (w/v) løsning med Azocasein bestående av Azocasein (Sigma-Aldrich, St-louis, USA) og Tris buffer. Tris buffer bestod av 100 mM Tris (hydroxymetyl)aminomethane (TRIS, VWR, Belgia) og 5mM Kalsiumklorid dihydrat (Merck, USA). Bufferens pH ble justert til 8,5 ved hjelp av 1M HCl løsning. Ved preparering av 3 % (w/v) azocasein løsning ble løsningen varmet opp til 50 °C og satt på røring til pulveret var helt oppløst.

Prøvene ble tint og sentrifugert ved 15 000 g i 3 min (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland). 400 µL supernatant ble overført til tre 2 mL lavproteinbindende eppendorfrør (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland), hvorav ett rør ble tilsatt 100 µL Azocasein 3 % (w/v) løsning og ett rør ble tilsatt 100 µL Tris buffer. Disse to rørene ble inkubert ved 37 °C i 2 timer, mens det siste røret, som skulle tilsvare en blank-prøve, ble satt direkte på kjølerom ved 4 °C. Etter inkubering ble prøvene tilsatt 500 µL TCA (20 % w/v), med unntak av blank-prøvene som ble tilsatt 100 µL Azocasein 3 % (w/v) løsning og deretter 500 µL TCA (20 % w/v). Prøvene ble sentrifugert ved 12 000 g i 10 min på Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). 1 mL Supernatant ble overført til 1,5 mL kyvetter (Brand GmbH, Wertheim, Tyskland) og absorbansen ble målt ved 440 nm i ett spektrofotometer (Genesys 50, ThermoFisher, Maddison, USA).

For å få en indikasjon på proteolytisk aktivitet ut ifra absorbansen ble det også preparert en standardkurve med proteinase K (Recombinant PCR grade >600 U/mL, Thermo Scientific, Vilnius, Litauen). UHT melk ble sentrifugert ved 15 000 g i 3 min (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) før det ble preparert fire fortynningsrekker med proteinase K (1:10, frem til 10⁻⁶) i supernatant fra UHT melk. Fra fortynningsrekke 10⁻²-10⁻⁶ ble 400 µL av hver fortykning overført til 2 mL lavproteinbindende eppendorfrør (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland). Det ble også preparert prøver uten proteinase K, som kun bestod av supernatant fra UHT melk. 400 µL supernatant ble da overført til fire 2 mL lavproteinbindende eppendorfrør

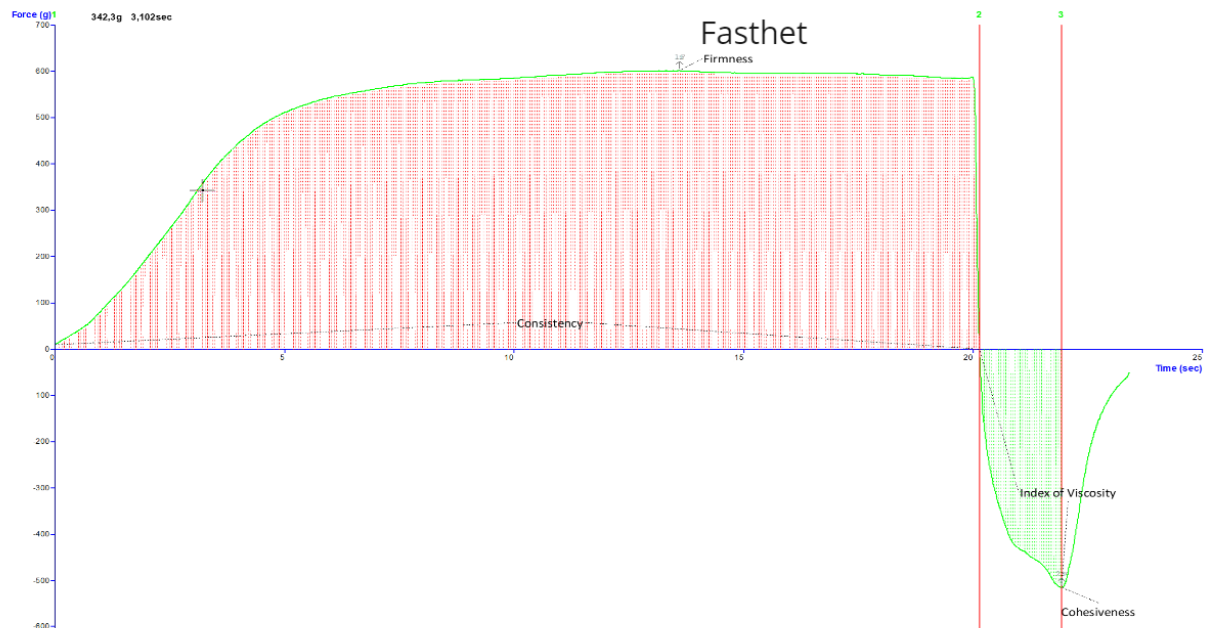
(Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland), hvorav ett rør ble satt direkte på kjøøl (4 °C). De tre andre rørene med UHT supernatant ble sammen med tre av fortynningsrekkene med proteinase K tilsatt 100 µL Azocasein 3 % (w/v) løsning før de ble inkubert ved 37 °C i 2 timer. Den fjerde fortynningsrekken ble satt på 4 °C og skulle tilsvare blank prøvene. Etter 2 timer ble prøvene (inkubert ved 37 °C) tilsatt 500 µL TCA (20 %, w/v) for å stanse reaksjonen, mens blank prøver ble tilsatt 100 µL Azocasein 3 % (w/v) løsning og deretter 500 µL TCA (20 %, w/v). Deretter ble alle prøvene sentrifugert ved 12 000 g i 10 minutter på Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) 1 mL supernatant ble deretter overført til 1,5 mL kyvetter (Brand GmbH, Wertheim, Tyskland) og absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 440 nm (Genesys 50, ThermoFisher, Maddison, USA). Mellom hver fortynning ble det blanket ut med en blank-prøve for hver enkelt fortynning. Til slutt ble det fremstilt en standardkurve med en eksponentiell likning ut ifra tallene (Vedlegg 4).

Etter fremstillingen av standardkurven, og måling av absorbans i alle fløte- og rømmeprøver, ble den eksponentielle likningen anvendt for å gi en indikasjon på proteolytisk aktivitet i hver prøve. Beregninger ble gjort ved å ta absorbansen til prøvene med Azocasein og trekke fra absorbansen til prøvene med Tris-buffer. Deretter ble log tallet til denne differansen satt inn i standardkurvens genererte likning.

3.4.3 Reologiske analyser

3.4.3.1 Teksturanalyse

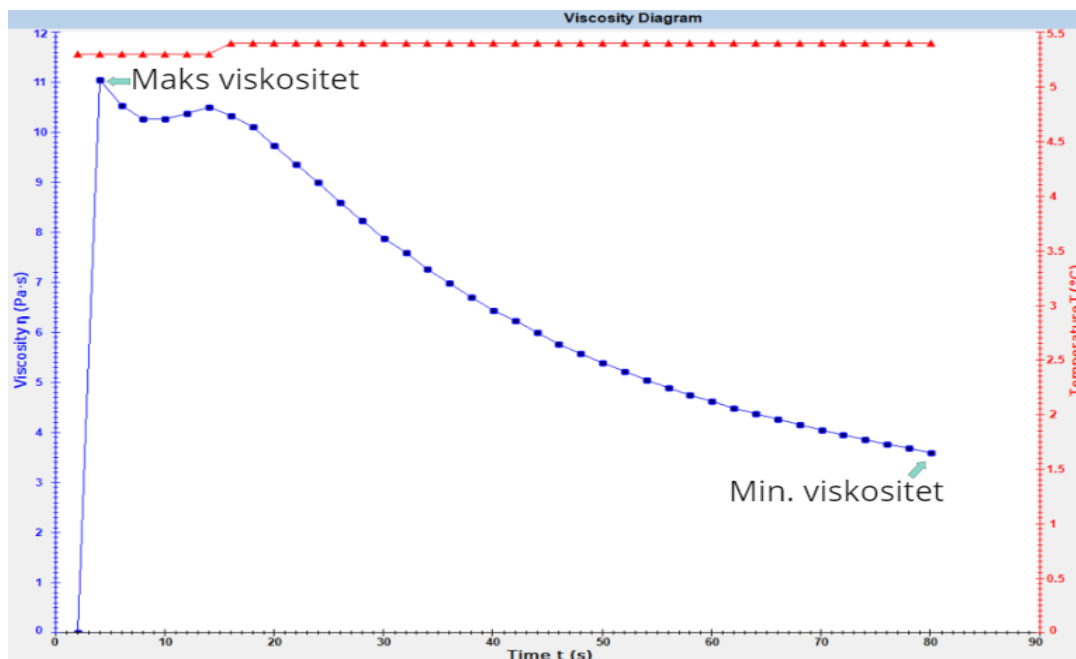
Rømmeprøvenes fasthet ble målt ved 0, 3 og 5 ukers lagring ved bruk av teksturanalyseinstrumentet TA.XT Plus (Nerliens Meszansky AS, Harlow Essex, England). En veiecelle på 5 kg og et kalibreringslodd på 2 kg ble benyttet ved kalibrering av instrumentet. Rømmebegrene ble hentet fra kjøøl (4 °C) og plassert under en 3,5 cm probe. Utløserkraften var satt til 10 g. Med en hastighet på 1 mm/s ble proben ført 20 mm ned i prøven før den ble ført opp igjen med en hastighet på 10 mm/s. Det ble tatt tre replikaer per prøve, hvor et rømmebeger (ca. 3 dl rømme) ble benyttet per replika. Proben ble tørket med papir mellom hver måling. For å analysere resultatene ble programvaren Exponent software (Stable Micro Systems Ltd) benyttet, hvor en analytisk makro beregnet resultatene. Et eksempel på hvordan en teksturprofil kan se ut er vist i figur 13.



Figur 13. Eksempel på en teksturprofil fremstilt med teksturanalyseinstrumentet TA.XT Plus (Nerliens Meszansky AS, Harlow Essex, England), tilkoblet programvare- Exponent Software (Stable Micro Systems Ltd).

3.4.3.2 Viskositetsanalyse

For å måle viskositet i rømme ved 0, 3 og 5 ukers lagring ble Brookfield RS Plus Rheometer (Nerliens Meszansky AS, Harlow Essex, England) benyttet. I forkant av analyse ble tilkoblet vannbad Julabo F12 (Seelbach, Tyskland) stilt inn på 4 °C. Når korrekt temperatur var nådd ble rømmep prøven hentet fra kjøll (4 °C) og rørt ca. 30 ganger med skje. Beholderen ble fylt med ca. 100 g prøvemateriale. Antall målepunkter ble satt til 40 og proben velges til measuring System: CCT- 25. Det ble gjennomført to-tre replikaer for hver prøve og beholder og probe ble vasket og tørket mellom hver måling. Målingene ble gjennomført ved en lineær økende skjærs hastighet på 0-40 1/s i løpet av 80 sekunder. Resultatene ble hentet ved bruk av tilkoblet dataprogram RHEO3000_v2.0 For hvert målepunkt ble tid (sek), skjærs spenning (Pa), skjærs hastighet (1/s), viskositet (Pa·s) og temperatur (°C.) angitt. Figur 14 fremstiller en viskositetsprofil, med min. og maks viskositet.



Figur 14. Eksempel på en viskositetsprofil fremstilt med viskositetsanalyseinstrumentet Brookfield RS Plus Rheometer (Nerliens Meszansky AS, Harlow Essex, England), tilkoblet programvare RHEO3000_v2.0.

3.4.4 Linjalmetode og fotografering

For å få en indikasjon på innholdet av fnokker i rømmeprovne ble antall fnokker som befant seg i et område over 2 cm på en sort linjal fra Möbius + Ruppert (Barby, Tyskland) talt opp. For å sikre en homogen blanding ble rømmen rørt 30 ganger med en skje, etterfulgt av 5 røring med linjal. Overflødig rømme ble kasket av linjalen og antall fnokker som befant seg i det gitte området på linjalen ble talt.

Bilder ble tatt med en Samsung Galaxy S22 Ultra. Linjalen ble plassert i et foto-telt med LED lys (GODOX LST60, Cewe, Japan Photo, Norge) ved fotografering.

3.4.5 Mørkefeltmikroskopi

For å studere og sammenlikne strukturer i prøvene ble det utført mørkefeltmikroskopi ved bruk av Leica DM 5000B (Wetzlar, Tyskland) og programvare LAS V4.7 (Leica Software, Wetzlar, Tyskland). Ved hjelp av en podenål ble en liten mengde prøve tatt ut og rørt ut i en dråpe med sterilt destillert vann. En dråpe ble deretter overført til et objektglass, før prøven ble mikroskopert med mørkefelt (DF) og et 10x objektiv. To representative bilder ble tatt av hver prøve.

3.4.6 Sensoriske analyser

3.4.6.1 Sensorisk kvalitetsbedømmelse

For å bedømme kvalitet ble det utført en sensorisk kvalitetsbedømmelse på rømmeprovne ved 3 ukers lagring ved TINE SA Kalbakken. Intern metode hos TINE SA ble benyttet og var basert på ISO22935-3|IDF99-3 (ISO/IDF, 2023). Panelet bestod av seks trente dommere (kvinner og menn, 30-64 år) ved FoU avdelingen ved TINE SA Kalbakken. Kvalitetsbedømmelsen ble gjennomført i et sensorikkrom utformet etter generell veiledning for utforming av testrom (ISO, 2007), og ved bruk av EyeQuestion Software (V5.7.2)

I forkant av evalueringen ble panelet koordinert i en omgang for å bli enige om bruk av bedømmelsesskala 1-5 (tabell 2). Prøvene som ble benyttet til koordinering dekket den sensoriske variasjonen som senere skulle evalueres. Panelet bedømte prøvene etter en spesifikk sensorisk spesifikasjon utviklet for studien hvor utseende, konsistens lukt og smak ble vurdert (tabell 3). Omtrent en time i forkant av bedømmelse ble prøvene flyttet fra kjølerom (4 °C) til et annet (11 °C). Prøvene ble rørt opp 15 ganger med skje før cirka 20 g ble overført til hvite serveringsbeholdere (50 mL) med tresifrede koder. Panelet ble kalibrert med de to prøvene som var antatt å ha den største sensoriske forskjellen i forkant av selve evalueringen. Prøvene ble servert i randomisert rekkefølge og vurdert ved bruk av samme bedømmelsesskala fra 1-5 og gjennom anmerkninger av avvik.

Tabell 2. Poengskala benyttet for sensorisk kvalitetsbedømmelse. Rømmeprovne ble gitt poeng fra 1 til 5.

Poengsum	Beskrivelse av poengsum
1	Meget betydelig avvik fra sensorisk spesifikasjon
2	Betydelig avvik fra sensorisk spesifikasjon
3	Merkbart avvik fra sensorisk spesifikasjon
4	Minimalt avvik fra sensorisk spesifikasjon
5	Ingen avvik fra sensorisk spesifikasjon

Tabell 3. Sensorisk spesifikasjon utviklet for studien, hvor utseende, konsistens, lukt og smak ble evaluert.

Attributt	Beskrivelse av attributt	Evalueringsprosedyre
Utseende	Gul-hvit farge med en glatt overflate. Ingen myse separasjon. Ingen tegn til mugg, gjær eller fremmedpartikler.	Evalueringsprosedyre Evaluering av synlige karakteristikk etter røring med plastikk skje.
Konsistens	Homogen og glatt, ingen klumper eller fnokker. Produktet burde danne en haug når det blir overført til bolle med en skje.	Evaluering av produktets fasthet, flyteegenskaper, struktur, og munnfølelse ved røring og smaking
Lukt/smak	Mild, syrlig og aromatisk smak	Evaluering av produktets lukt/smak, ved å lukte og smake på produktet

3.4.6.2 Sensorisk profilering

Det ble utført en sensorisk profilering i form av en kvantitativ deskriptiv analyse (QDA) av rømmeprovne ved 3 ukers lagring. Profileringen ble utført av et trent panel bestående av 6 personer (kvinner og menn, 30-64 år) ved FoU avdelingen ved TINE SA Kalbakken. Profileringen ble gjennomført i et sensorikkrom utformet etter generell veiledning for utforming av testrom (ISO, 2007), og ved bruk av EyeQuestion Software (V5.7.2). De 16 attributtene som ble evaluert er vist i tabell 4.

I forkant av evalueringen ble panelet koordinert i en omgang for å bli enige om bruk av bedømmelsesskala fra 1-9. Prøvene som ble benyttet til koordinering dekket den sensoriske variasjonen som senere skulle evalueres. Panelet ble også kalibrert rett før bedømmelsen med de to prøvene som var antatt å ha den største sensoriske forskjellen i forkant av selve evalueringen. Prøvene ble flyttet fra kjølerom (4 °C) til et annet (11 °C) omtrent en time før kalibrering og profilering. Prøvene ble rørt 15 ganger og overført til serveringsbeholdere (50 mL) merket med tresifrede koder før de ble servert i tilfeldig rekkefølge til hver dommer. Vann ble benyttet til å rense pallettet mellom hver prøve, og det ble også tatt pauser underveis for å unngå smakstretthet.

Tabell 4. Attributter og poengskala benyttet ved kvantitativ deskriptiv analyse (QDA) av rømmeprovne..

Attributt	Beskrivelse av skala (1-9)
Farge	1= hvit, 9= gylden
Fnokker/klumper	1=ingen synlige, 9= svært mange
Blankhet	1=svært matt, 9=svært blank
Glatthet	1=svært grov, 9=svært glatt
Seighet	1= ikke seig, 9=svært seig
Konsistens	1= svært tynn, 9= svært tykk
Fyldighet/ munnfølelse	1= svært lite kremet, 9= svært kremet
Melen	1= ikke melen/sandet, 9= svært melen/sandet
Sandet	1= ikke melen/sandet, 9= svært melen/sandet
Rømmesmak/aromatisk	1= ingen, 9= intens
Syrlighet	1= ingen, 9= intens
Søthet	1= ingen, 9= intens
Friskhet	1= svært tam, 9= svært frisk
Besk/bitter smak	1= ingen, 9= intens
Oksidert smak	1= ingen, 9= intens
Bismak	1= ingen, 9= intens

3.5 Statistisk bearbeiding

Data ble bearbeidet i Microsoft Excel, og klargjort for statistiske programmer. Microsoft Excel ble også benyttet for utregninger av gjennomsnitt og standardavvik mellom de tre produksjonene, samt for å fremstille enkelte tabeller og figurer. Box plots ble fremstilt ved bruk av R-statistikk (R Core Team, 2017).

Signifikansnivå ble undersøkt ved bruk av variansanalyse (ANOVA) mellom de tre forsøksfaktorene; produksjonsdag (fløtekvalitet), homogeniseringsbetingelse og lagring. Det ble benyttet både enveis, toveis og treveis ANOVA avhengig av hvilke prøver som ble undersøkt. Analysene ble utført ved bruk av R-statistikk (R Core Team, 2017). Det ble utviklet en nullhypotese (H0) og en alternativ hypotese (H1). H0 sier at forsøksfaktorene ikke hadde noen effekt på prøvene, mens H1 sier at forsøksfaktorene hadde en effekt på prøvene. Signifikansnivå ble satt til 5 %.

4.0 Resultater

En oversikt over relevante gjennomsnitt og standardavvik, som ikke er inkludert i resultatdel, finnes i vedlegg 1. Vedlegg 2 oppsummerer signifikansnivåene for hver forsøksfaktor, ved hver analyse.

4.1 Utprøving og optimalisering av metode

Kommersiell kremfløte (37 % fett) ble inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 under forforsøket. Det ble inokulert log 5 CFU/mL, og bakterien vokste med 3 log tall etter å ha blitt oppbevart ved 6 °C i 6 døgn. Dette indikerte at lagringsbetingelsene ville gi vekst ved hovedforsøket.

For å få en indikasjon på forventet fermenteringstid ble kommersiell kremfløte (37 % fett) inokulert med DL-kulturen som senere skulle benyttes ved rømmeproduksjonene (0,04 %), og inkubert ved 23 °C. Etter 16 timer var pH på 4,70 og etter 17 timer på 4,53. Basert på dette ble fermenteringstiden under rømmeproduksjonene satt til 16 timer før pH skulle måles for første gang.

4.2 Mikrobiologiske analyser

4.2.1 Bakterievekst

Standardisert og termisert fløte (35 % fett) ble inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9, hvor bakterietallet gjennomsnittlig steg med log 2 (CFU/mL) i fløten, ettersom den ble lagret i 6 døgn ved 6 °C (tabell 5).

Tabell 5. Gjennomsnittlig bakterievekst (log CFU/mL) i fløte etter inokulasjon med Pseudomonas trivialis 9. D0= Fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 0 døgn. D6= Fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 6 døgn ved 6 °C

Fløte (35 % fett)	Log (CFU/mL)	STD. Avvik
D0	5,96	0,37
D6	7,85	0,02

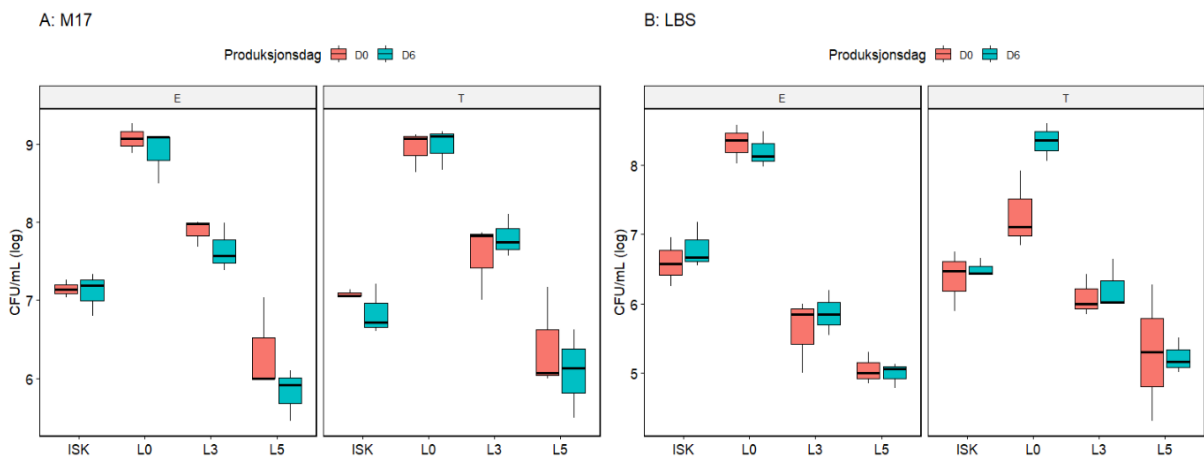
For å få en indikasjon på fløte kvaliteten og eventuell kontaminasjon **før** inokulering med *Pseudomonas*, ble bakterieinnholdet i standardisert og termisert fløte undersøkt ved hjelp av platetelling på PCA. I produksjonsgjentak 2, hvor det var problemer med separatoren, ble bakterieinnholdet målt i råmelk fremfor standardisert fløte. Bakterievekst i prøvene var noe varierende mellom de ulike produksjonene, men til tross for påvisning av bakterier indikerte alle resultatene lav bakterievekst. **Etter** at fløten var inokulert med *Pseudomonas* og pasteurisert, ble det igjen utført platetelling for å sjekke om bakteriene var drept og/eller om det hadde skjedd en kontaminasjon i fløten. Det ble observert noe vekst i enkelte prøver fra de to første produksjonene, men ikke i produksjonsgjentak 3 (tabell 6).

Tabell 6. Bakterievekst (log CFU/mL) i råmelk, standardisert- og termisert fløte samt i pasteuriserte fløteprøver. D0= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

Produksjon	Prøve	Fløte	Homogeniseringsbetingelse	CFU/mL (log)
1	Standardisert fløte	-	-	0,0
	Termisert fløte	-	-	0,0
	Pasteurisert fløte	D0	E	0,0
			T	3,6
		D6	E	0,0
			T	0,0
2	Råmelk	-	-	4,4
	Termisert fløte	-	-	2,9
	Pasteurisert fløte	D0	E	0,0
			T	2,3
		D6	E	4,2
			T	0,0
3	Standardisert fløte	-	-	2,5
	Termisert fløte	-	-	2,5
	Pasteurisert fløte	D0	E	0,0
			T	0,0
		D6	E	0,0
			T	0,0

4.2.2 Vekst av *Lactococcus* og *Leuconostoc*

Vekst av *Lactococcus* og *Leuconostoc* i fløten rett etter inokulasjon med syrekultur (DL), samt i rømme ved 0, 3 og 5 ukers lagring, ble henholdsvis detektert ved hjelp av platetelling på M17- og LBS agar. Det ble observert en stigende bakterievekst ettersom fløten ble fermentert til rømme, men ved ytterligere lagring av rømmen i 3 og 5 uker, sank innholdet av bakterieslektene igjen. Lagring hadde en signifikant påvirkning på veksten av både *Lactococcus* og *Leuconostoc*, i tillegg til at det var en signifikant interaksjonseffekt mellom homogeniseringsbetingelse og lagring på veksten av *Leuconostoc* (p -verdi < 0.05). Vekst av de to bakterieslektene ble ikke tydelig påvirket av fløteekvalitet (produksjonsdag), men, i rømme behandlet med to-trinns homogenisering, hvor fløten var inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, ble det observert et redusert nivå av *Leuconostoc* etter 0 ukers lagring (figur 15).



Figur 15. Vekst av *Lactococcus* og *Leuconostoc* (log CFU/mL), i fløte inokulert med syrekultur og i rømme under 0,3 og 5 ukers lagring, på henholdsvis M17 agar (A) og LBS agar (B). ISK= Fløte inokulert med syrekultur. L0=Rømme lagret 0 uker, L3= Rømme lagret 3 uker, L5= Rømme lagret 5 uker. D0= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

4.3 Kjemiske analyser

4.3.1 Kjemisk sammensetning i fløte

Innholdet av fett, protein og tørrstoff i standardisert fløte (35 % fett) benyttet ved hver rømmeproduksjon, er fremstilt i tabell 7. Det var ingen signifikante forskjeller mellom produksjonene (p-verdi > 0.05).

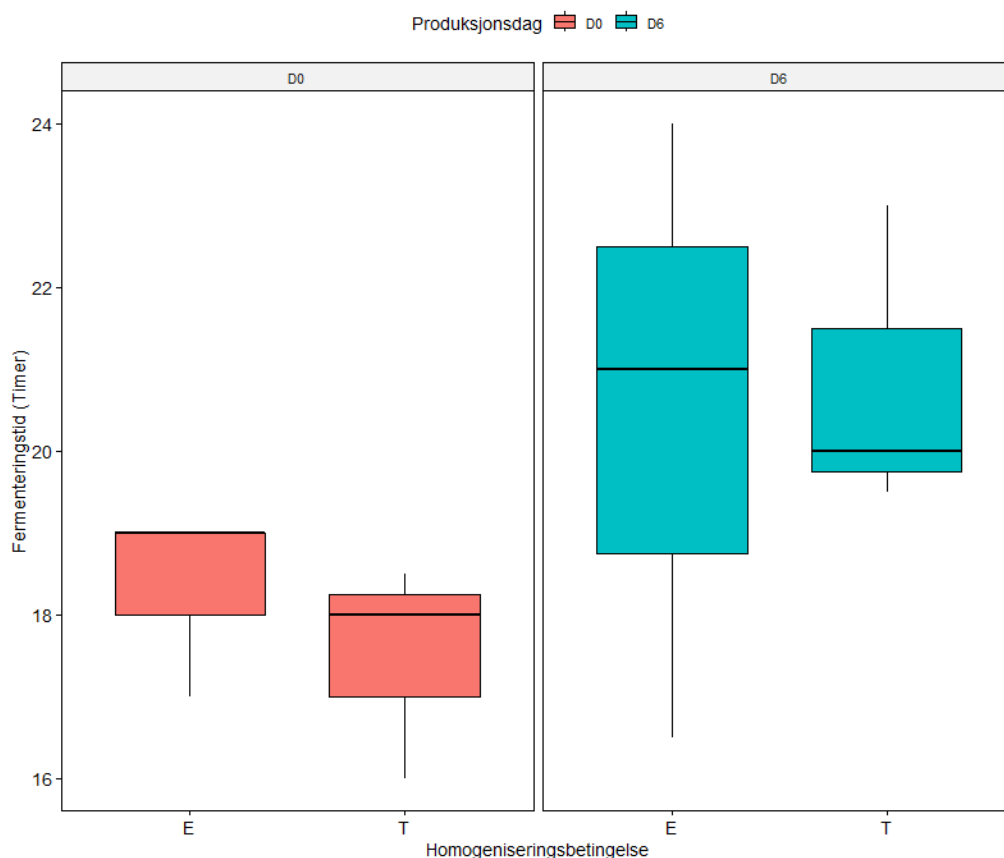
*Tabell 7. Kjemisk sammensetning i standardisert fløte (35 %) benyttet ved rømmeproduksjon. Dag 0= Fløten som skulle inokuleres med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. Dag 6= Fløten som skulle inokuleres med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C.*

Produksjon	Fløte	Liter	Fett %	Fett SD	Protein %	TS %
1	Dag 0	35,00	34,95	0,00	2,39	41,16
	Dag 6	35,10	35,00	0,02	2,39	41,23
2	Dag 0	35,50	34,84	0,01	2,40	41,14
	Dag 6	35,90	34,87	0,04	2,39	41,19
3	Dag 0	35,00	35,12	0,03	2,30	41,58
	Dag 6	37,00	34,86	0,01	2,32	41,33

4.3.2 Fermenteringstid og pH under lagring

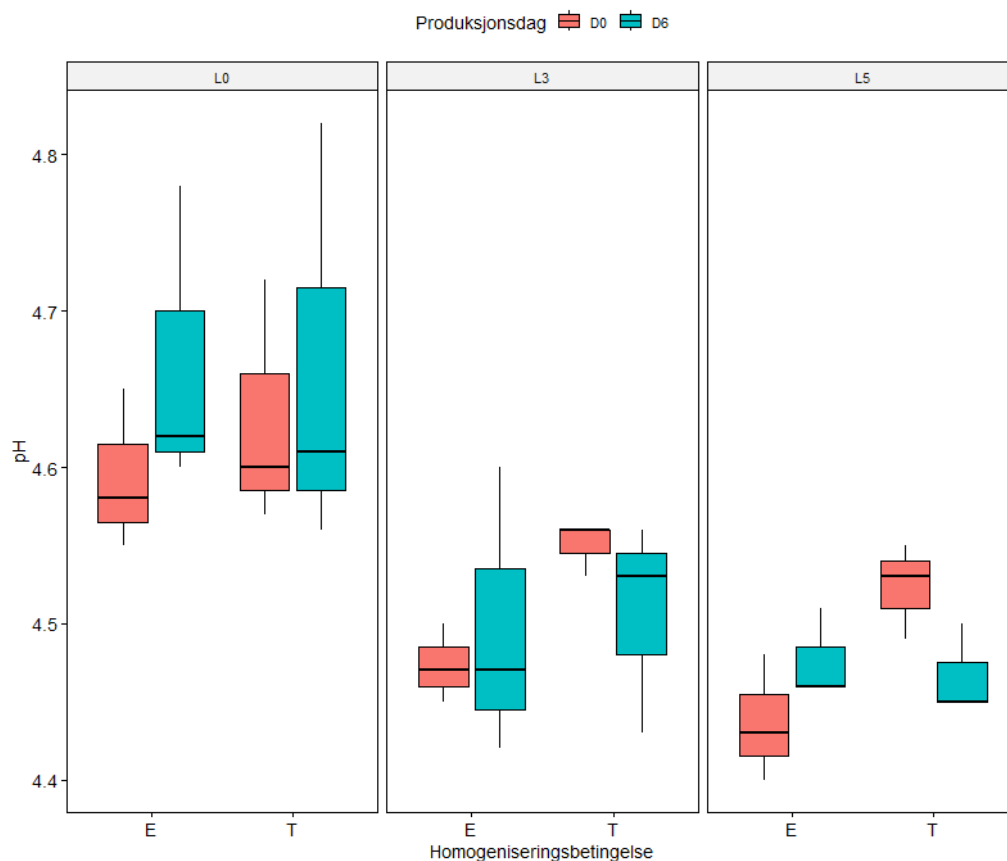
Fermenteringstiden varierte fra 16 til 24 timer avhengig av forsøksdesign og produksjonsgjentak (figur 16). Det tok generelt lenger tid å fermentere fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, da det tok $20,67 \pm 2,68$ timer å fermentere denne fløten. Til sammenlikning tok det $17,92 \pm 1,20$ timer å fermentere fløten inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn. Hverken produksjonsdag eller homogeniseringsbetingelse hadde noen signifikant påvirkning på fermenteringstiden (p-verdi > 0.05), men produksjonsdag hadde allikevel en tydelig effekt da p-verdi var 0.0708.

Ved noen av produksjonene stabiliserte pH seg før ønsket pH på 4,6 var nådd og fermenteringen ble dermed avsluttet. Nøyaktige pH avlesninger ved hver enkelt produksjon er vist i vedlegg 3.



Figur 16. Fermenteringstid (timer) ved rømmeproduksjonene. D0= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

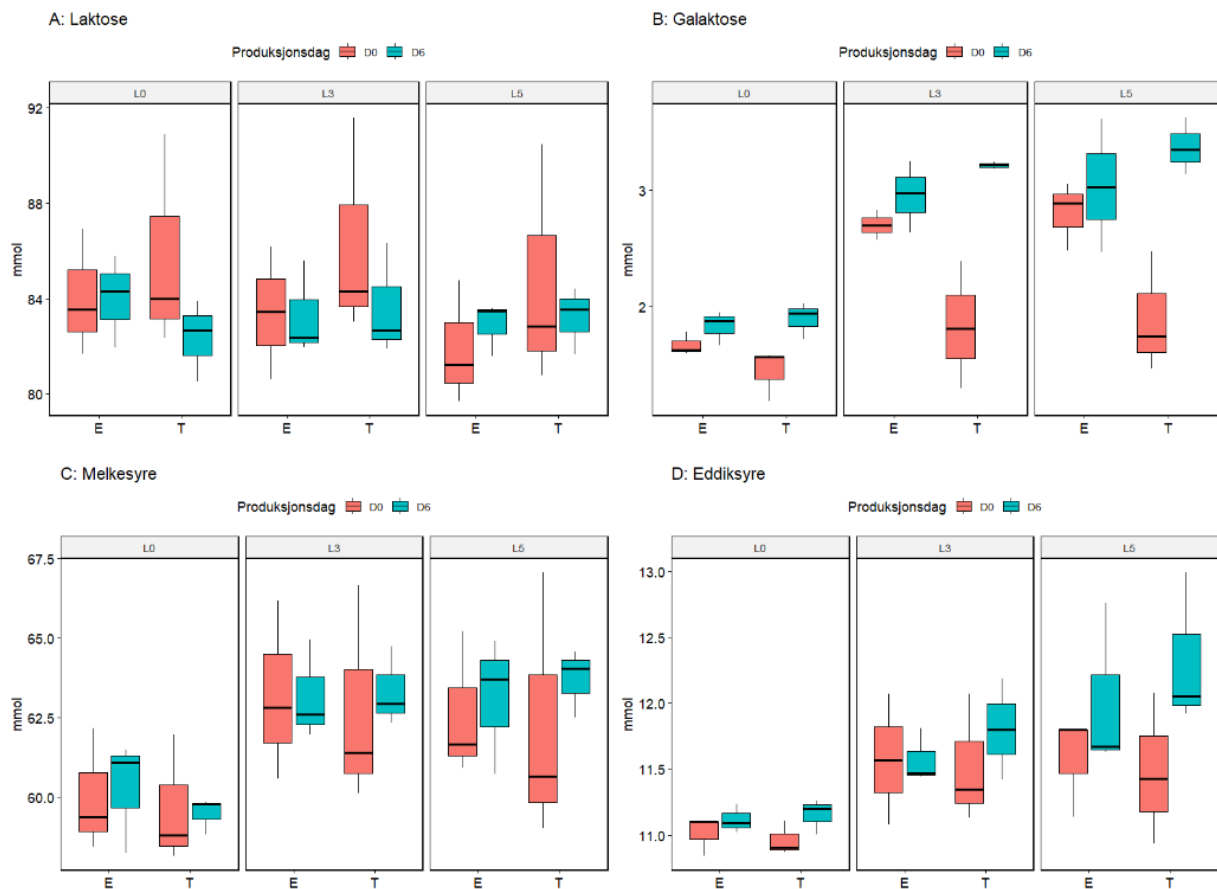
For å undersøke pH utviklingen i rømme under lagring ved 4 °C, ble pH målt etter henholdsvis 0, 3 og 5 uker. Lagringstiden påvirket pH signifikant (p -verdi < 0.05), hvor pH sank ytterligere under lagring (figur 17). Det var imidlertid ingen store forskjeller mellom 3 og 5 ukers lagring, og hverken produksjonsdag eller homogeniseringsbetingelse hadde noen signifikant effekt på pH (p -verdi > 0.05).



Figur 17. pH i rømmeprovne under lagring i 0, 3 og 5 uker. L0= Lagring 0 uker. L3= Lagring 3 uker. L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

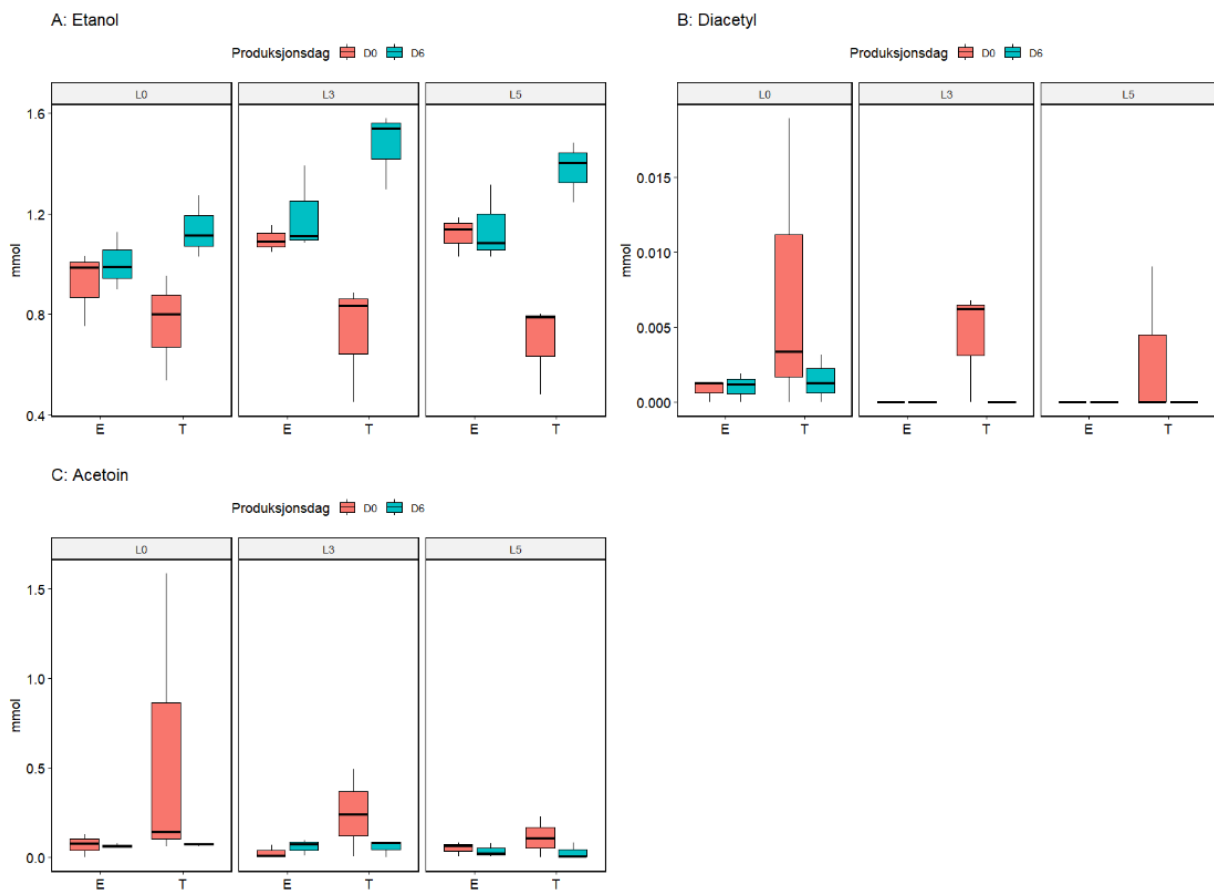
4.3.3 Organiske syrer, karbohydrater og flyktige komponenter i rømme.

For å studere syrekultur metabolisme ble HPLC og HSGC benyttet for å detektere innholdet av organiske syrer, karbohydrater og flyktige komponenter i rømmeprovne. Innholdet av laktose varierte mellom 80-92 mmol, der ingen av forsøksfaktorene hadde noen signifikant påvirkning på dette (p-verdi > 0.05). Galaktoseinnholdet ble derimot signifikant påvirket av alle forsøksfaktorene, hvor også produksjonsdag og homogeniseringsbetingelse hadde en signifikant interaksjonseffekt (p-verdi < 0.05). Innholdet av galaktose var lavest i rømmeprovne produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, som var homogenisert i to trinn. Produksjonen av både melkesyre og eddiksyre steg signifikant under lagring av rømmen (p-verdi < 0.05). Eddiksyre ble i tillegg signifikant påvirket av produksjonsdag (p-verdi < 0.05), hvor det ble detektert mer eddiksyre i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn (figur 18).



Figur 18. Laktose (A), Galaktose (B), Melkesyre (C) og Eddiksyre (D) (mmol) detektert i rømmeprovne. L0= Lagring 0 uker. L3= Lagring 3 uker. L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

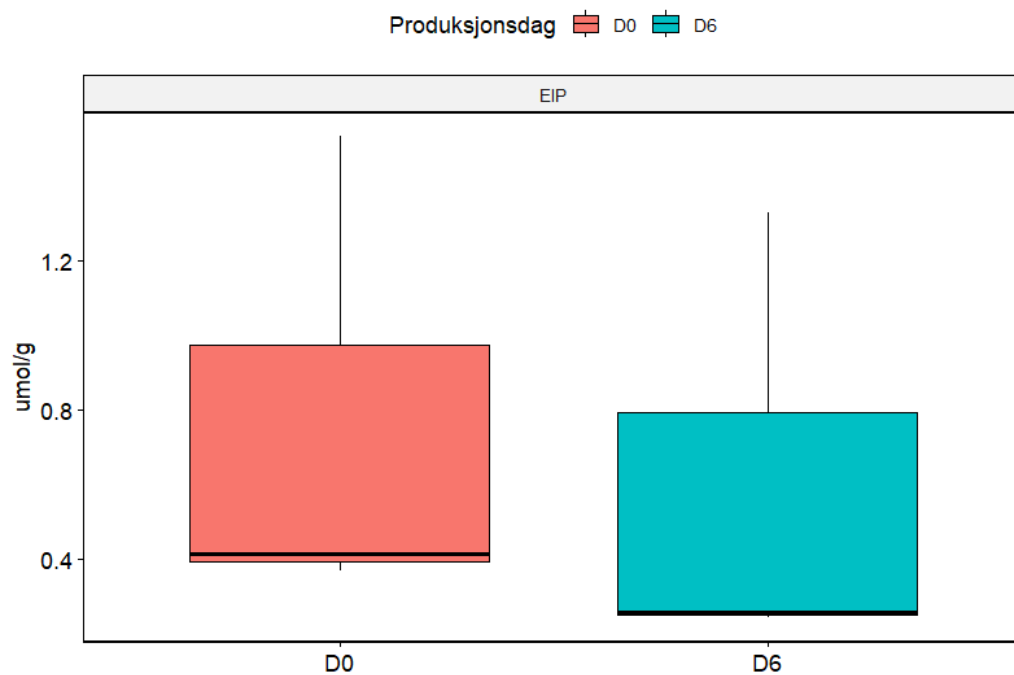
Det detekterte innholdet av de flyktige komponentene etanol, diacetyl og acetoin skilte seg spesielt ut i rømmeprovne produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, som var homogenisert i to trinn (figur 19). Innholdet av diacetyl og acetoin var høyere i disse prøvene, mens etanolinnholdet var lavere, sammenliknet med de andre rømmeprovne. Innholdet av hverken diacetyl eller acetoin ble signifikant påvirket av forsøksfaktorene (p -verdi > 0.05), men både homogeniseringsbetingelse og produksjonsdag var på grensen til å påvirke diacetylinnholdet signifikant (p -verdi= 0.0512 og 0.0728). Interaksjonseffekten mellom disse to faktorene hadde i tillegg en p -verdi på 0.0670, så det var tydelig at disse forsøksfaktorene hadde en effekt hva gjaldt innholdet av diacetyl. Etanolinnholdet ble signifikant påvirket av både produksjonsdag og lagring, i tillegg til at homogeniseringsbetingelse og produksjonsdag hadde en signifikant interaksjonseffekt (p -verdi < 0.05).



Figur 19. Etanol (A), Diacetyl (B) og Acetoin (C) (mmol) detektert i rømmeprovne. L0= Lagring 0 uker. L3= Lagring 3 uker. L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

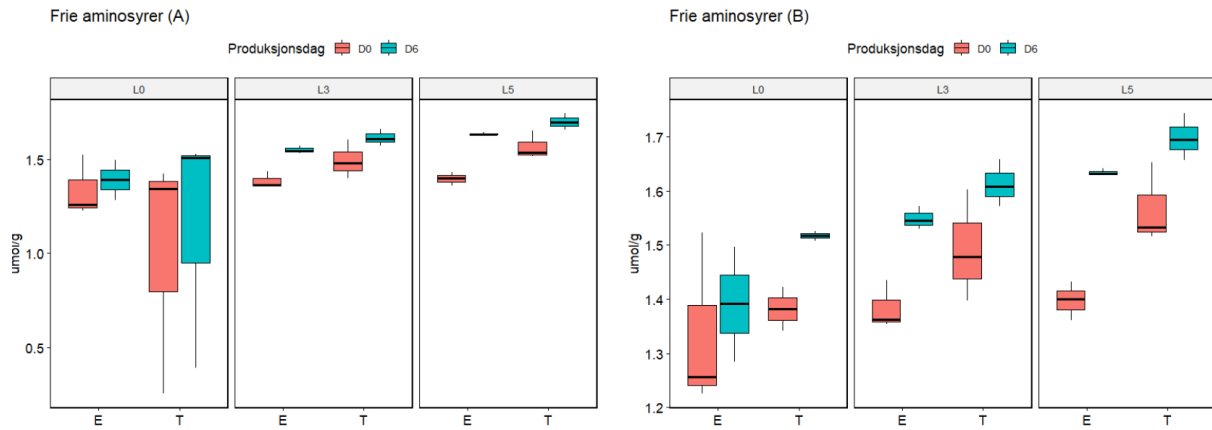
4.3.4 Frie aminosyrer i fløte og rømme

Det ble benyttet HPLC for å detektere innholdet av frie aminosyrer i både fløte- og rømmeprovner. Totalt ble det detektert et høyere innhold av frie aminosyrer i fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn sammenliknet med fløten som ble inokulert i 6 døgn ved 6 °C (figur 20). Det var imidlertid ingen store forskjeller, og produksjonsdag hadde ingen signifikant påvirkning på det totale antallet frie aminosyrer i fløten (p-verdi > 0.05).



Figur 20. Totalt antall frie aminosyrer ($\mu\text{mol/g}$) i fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn (D0) og i fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C (D6). EIP= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9.

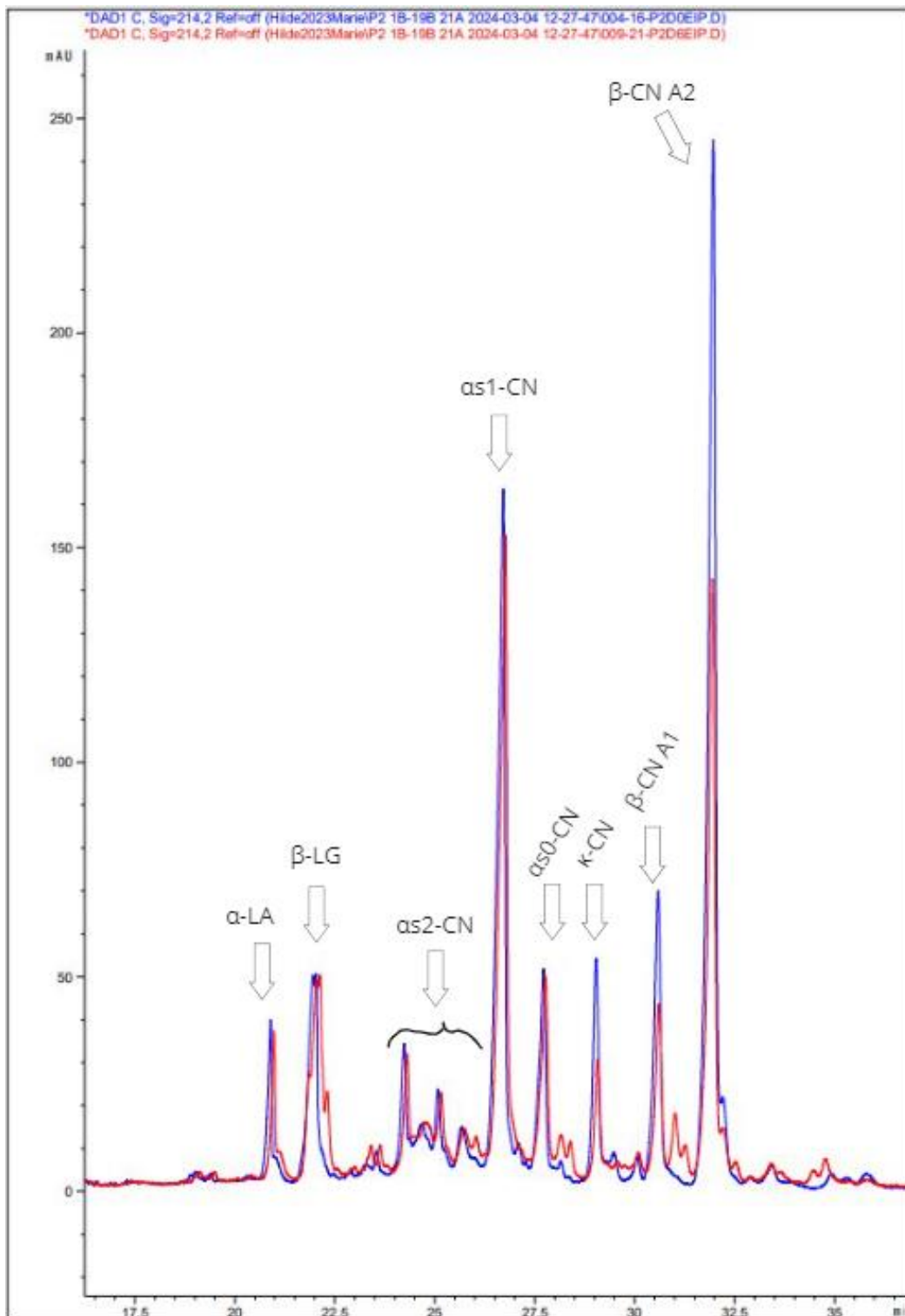
Innholdet av frie aminosyrer så ut til å være høyere i rømmeprovne produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, samt i rømmeprovne homogenisert i to trinn. Det totale innholdet av frie aminosyrer så også ut til å stige ved lagring (figur 21). To prøver fra det siste produksjonsgjentaket (Prøve ID; P3D0L0T & P3D6L0T) hadde et betraktelig lavere innhold av frie aminosyrer, og er derfor utelatt i det ene plottet, da det mest sannsynlig har skjedd en feil under analyseringen. Utelates disse prøvene hadde alle faktorene en signifikant påvirkning på det totale antallet frie aminosyrer (p -verdi < 0.05). Hvis de to prøvene inkluderes er det kun lagring som viste seg å ha en signifikant påvirkning på innholdet av frie aminosyrer i rømmeprovne (p -verdi < 0.05), der innholdet steg med økt lagringstid.



Figur 21. Frie aminosyrer (umol/g) detektert i rømmeprovne (A), og frie aminosyrer (umol/g) detektert i rømmeprovne når to prøver (P3D0L0T & P3D6L0T) er utelatt (B). L0= Lagring 0 uker. L3= Lagring 3 uker. L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

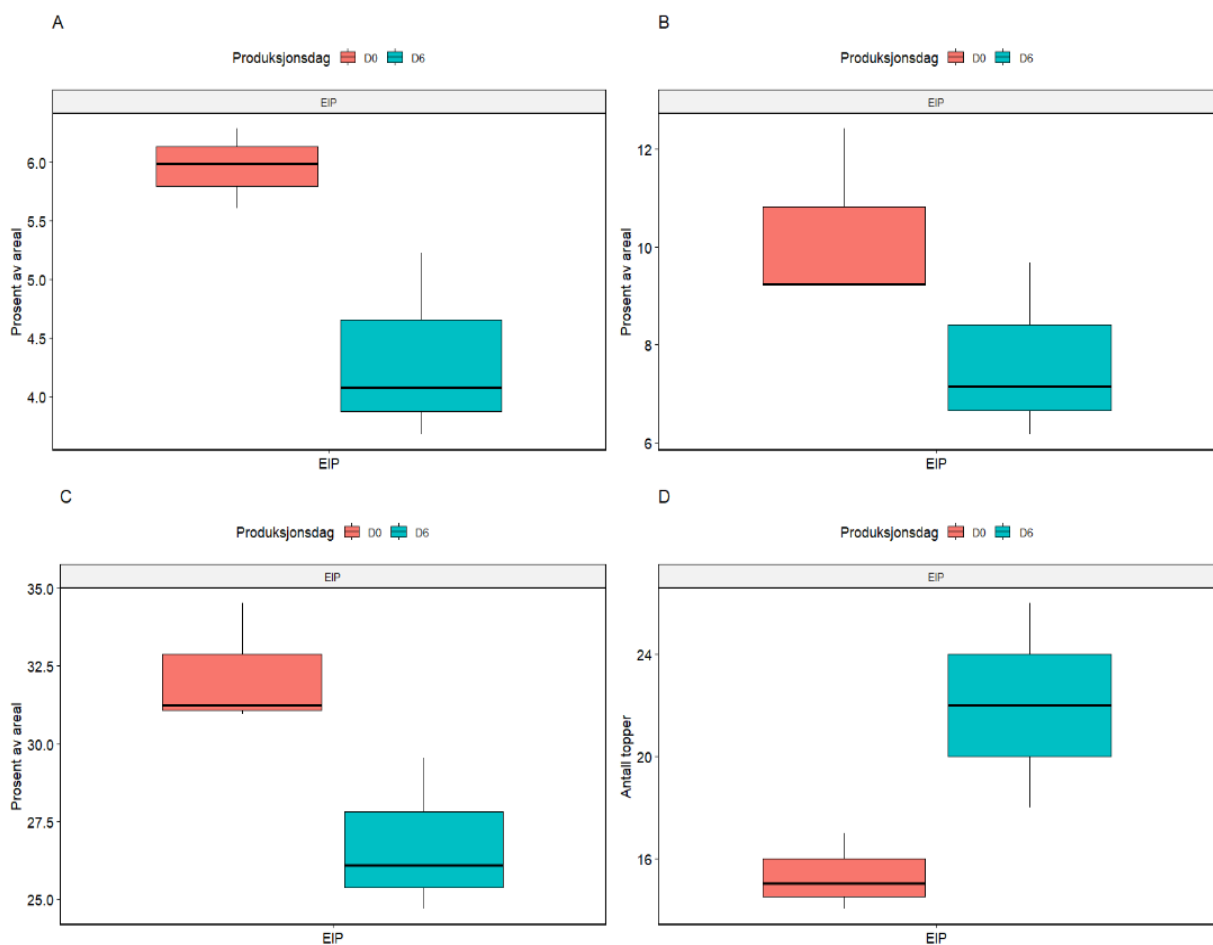
4.3.5 Protein nedbryting (Kapillærelektroforese)

Nedbryting av proteiner til peptider ble undersøkt ved bruk av kapillærelektroforese, hvor proteinprofilene som detekteres i prøvene illustreres i elektroferogram. Figur 22 fremstiller proteinprofilene til to av fløteprøvene fra produksjonsgjentak nummer 2, der det var tydelig at enkelte proteiner hadde blitt brutt ned i fløten inokulert i 6 døgn med *Pseudomonas* (rød profil). Spesielt var innholdet av κ -kasein, β A1-kasein og β A2-kasein lavere i denne fløten. I tillegg hadde flere topper kommet frem i fløten inokulert lengst med *Pseudomonas*, noe som indikerte at proteinene var brutt ned til nye peptider, som ble detektert.



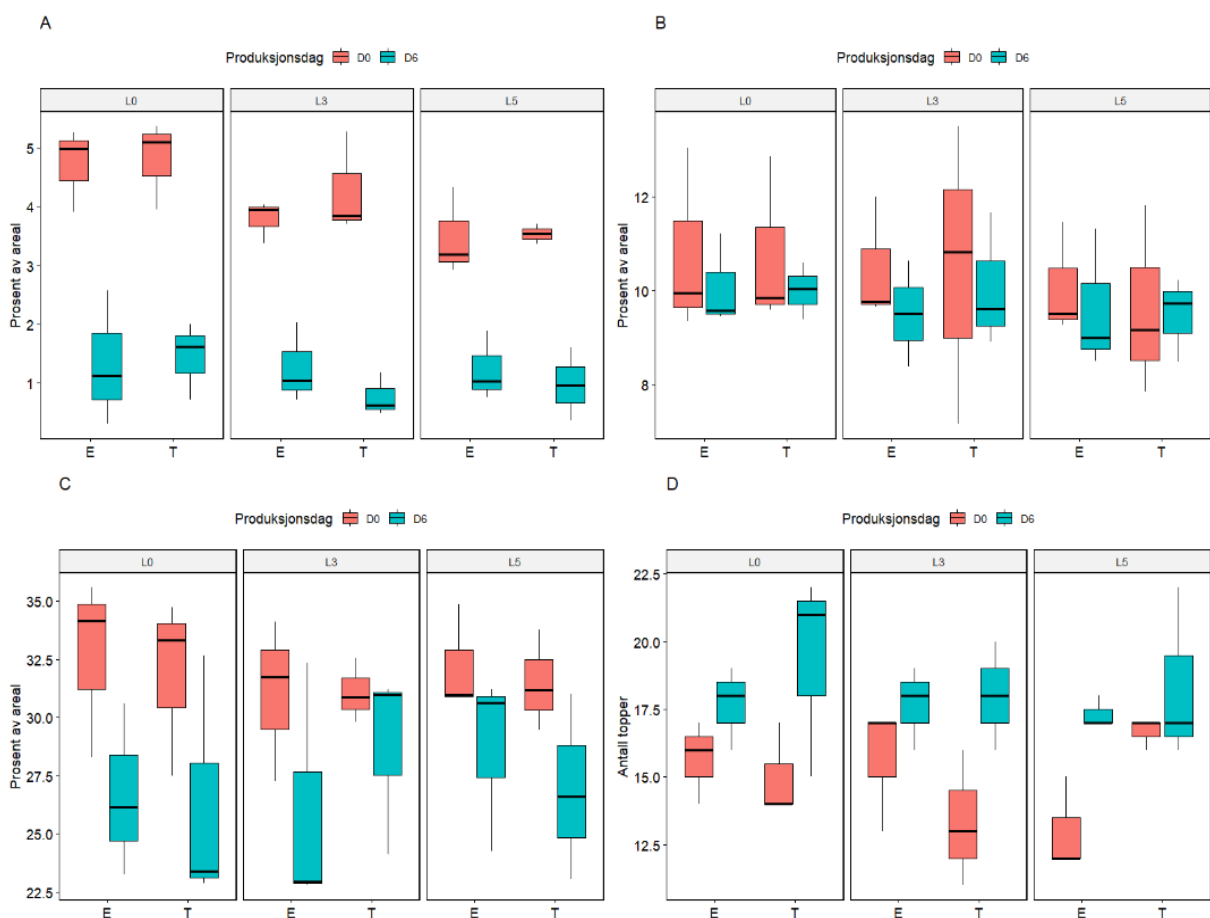
Figur 22. Proteinprofilene til to fløteprøver fra produksjonsgjentak nummer 2 fremstilt i et elektroferogram. Fløte inokulert i 0 døgn med *Pseudomonas trivialis* 9 (blå) og fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C (rød). Retensjonstid (min) er plottet mot Absorbans (mAU). α -LA= Alfa laktalbumin, β -LG= beta laktoglobulin, α_2 -CN= alfa s2 kasein, α_1 -CN= alfa s1 kasein, α_0 -CN= alfa s0 kasein, κ -CN= kappa kasein, β -CN A1= beta kasein A1, β -CN A2= beta kasein A2.

De gjennomsnittlige prosentandelene til arealene under toppene til κ -kasein, β A1-kasein og β A2-kasein, samt antall topper som ble detektert i alle fløteprøvene ved utførelse av kapillærelektroforese, er fremstilt i figur 23. Prosentandelene av arealene til de tre kasein toppene var mindre i fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, sammenliknet med fløte inokulert i 0 døgn. Produksjonsdag hadde en signifikant påvirkning på arealet under toppene til både κ - og β A2-kasein (p-verdi < 0.05), men ikke til β A1-kasein (p-verdi > 0.05). Antallet topper detektert i analysen var høyere i fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, og produksjonsdag var på grensen til å påvirke antallet topper signifikant (p- verdi = 0.0543).



Figur 23. Prosentandel av arealet under toppene til κ -kasein (A), β A1-kasein (B) og β A2-kasein (C), samt antall proteintopper (D), detektert i fløteprøvene ved utførelse av kapillærelektroforese. EIP= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9. D0= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C.

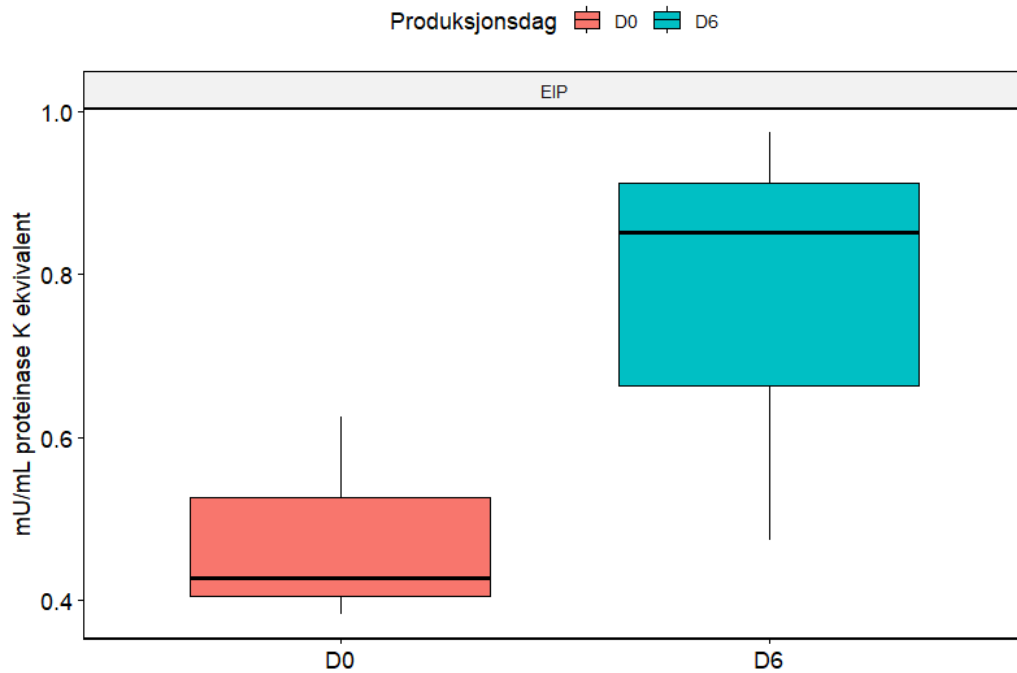
I rømmeprovne er det prosentvise arealet under proteintoppene κ -kasein, β A1-kasein og β A2-kasein, samt antall topper som ble detektert ved utførelse av kapillærelektroforese, fremstilt i figur 24. Mengde κ -kasein og β A2-kasein var lavere i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn sammenliknet med fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn. Produksjonsdag hadde en signifikant påvirkning på arealet under toppene til både κ - og β A2-kasein (p-verdi < 0.05), men ikke til β A1-kasein (p-verdi > 0.05). Mengde κ -kasein ble i tillegg signifikant påvirket av lagring (p-verdi < 0.05), hvor mengden sank med økt lagringstid. Produksjonsdag påvirket antall topper detektert i analysen signifikant (p-verdi < 0.05), der antallet var høyere i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn.



Figur 24. Prosentandel av arealet under toppene til κ -kasein (A), β A1-kasein (B) og β A2-kasein (C), samt antall proteintopper (D), detektert i rømmeprovne ved utførelse av kapillærelektroforese. L0= Lagring 0 uker; L3= Lagring 3 uker; L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

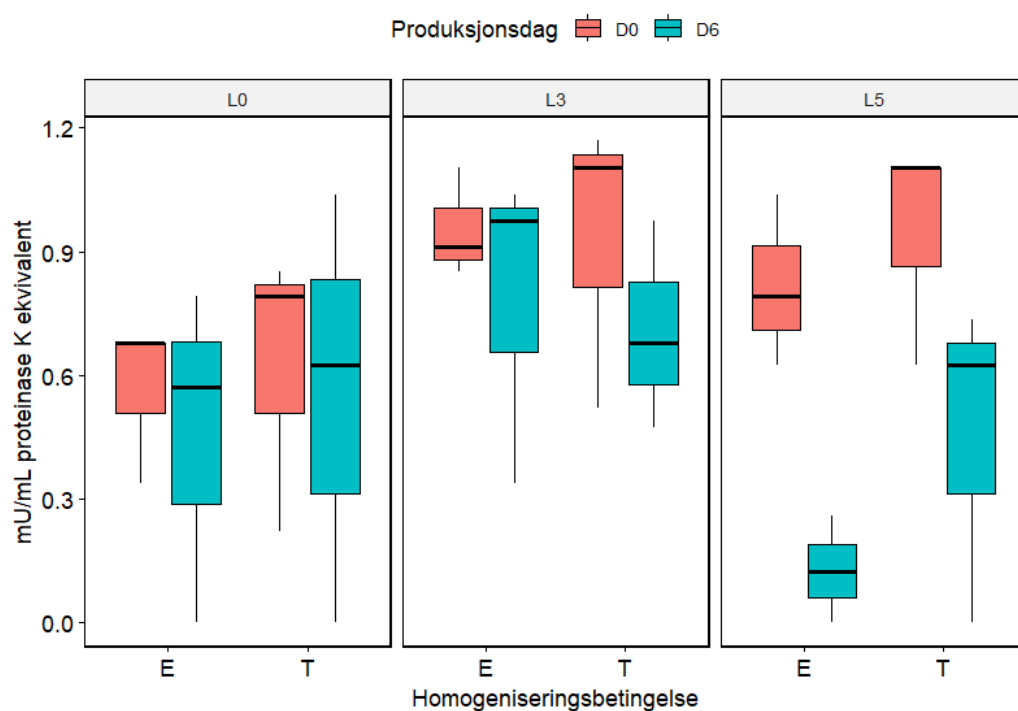
4.3.6 Proteolytisk aktivitet (Azocasein-analyse)

Proteolytisk aktivitet ble målt i både fløte og rømmeprøver. I fløten var det tydelig at aktiviteten var høyere i fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn sammenliknet med fløten som kun ble inokulert i 0 døgn (figur 25). Produksjonsdag hadde imidlertid ingen signifikant påvirkning på den proteolytiske aktiviteten (p-verdi > 0.05).



Figur 25. Proteolytisk aktivitet målt i Proteinase K ekvivalent (mU/mL) i fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn (D0) og i fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C (D6). EIP= Fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9.

I rømmeprøvene var den proteolytiske aktiviteten generelt noe høyere i rømme produsert fra fløte inokulert i 0 døgn med *Pseudomonas* (figur 26), og dette kom spesielt tydelig frem i rømme som var lagret i 5 uker. Produksjonsdag var den eneste faktoren som påvirket den proteolytiske aktiviteten signifikant (p-verdi < 0.05), men lagring hadde også en tydelig effekt da p-verdi var 0.0691.

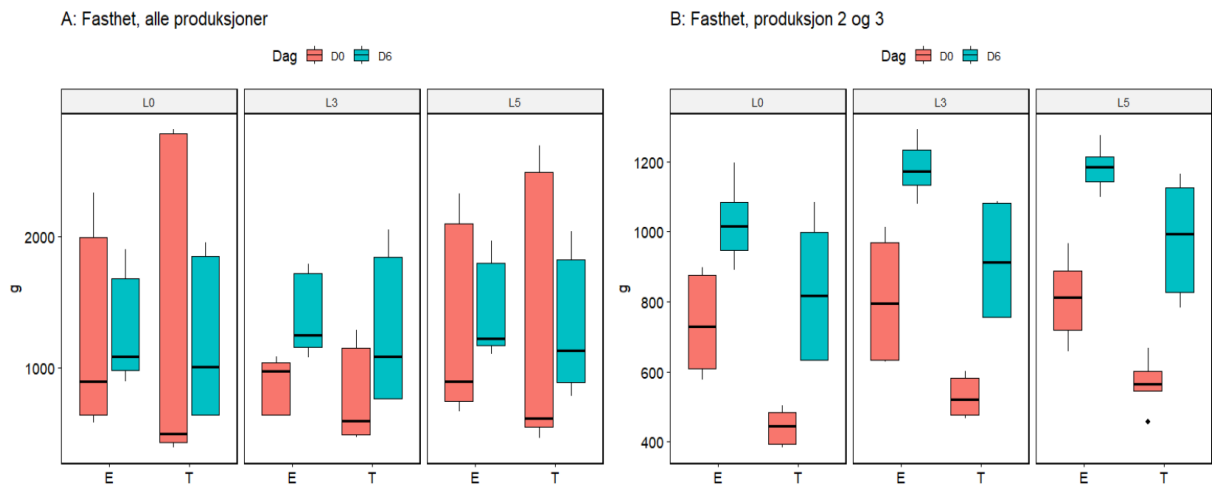


Figur 26. Proteolytisk aktivitet målt i Proteinase K ekvivalent (mU/mL) i rømmepøver ved 0, 3 og 5 ukers lagring. L0= Lagring 0 uker, L3= Lagring 3 uker, L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

4.4 Reologiske analyser

4.4.1 Fasthet i rømme (Teksturanalyse)

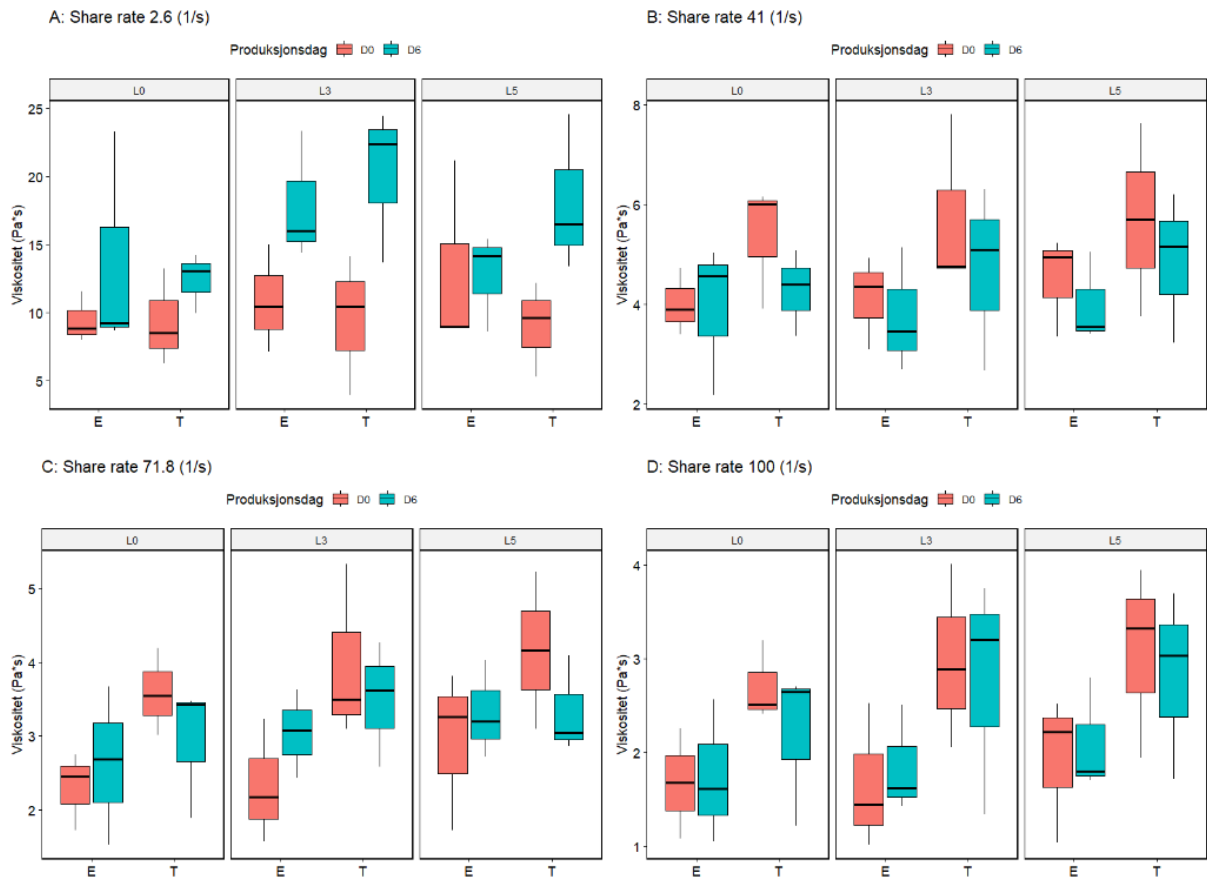
Det ble utført en kompresjonstest på alle rømmepøvene. Rømmepøvene fra produksjon 1 var mye fastere sammenliknet med rømmepøvene fra de to andre produksjonsgjentakene, og det var ingen forsøksfaktorer som påvirket fastheten signifikant ($p\text{-verdi} > 0.05$). Hvis data fra produksjonsforsøk 1 utelates, vil variasjonene i rømmepøvene fra de andre produksjonene bli tydeligere (figur 27). I rømmepøver fra produksjon 2 og 3 hadde både produksjonsdag, homogeniseringsbetingelse og lagring en signifikant påvirkning på fasthet ($p\text{-verdi} < 0.05$). Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn hadde en høyere fasthet enn rømmepøver produsert av fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn. Ett-trinns homogenisering så også ut til å ha bidratt til en fastere tekstur sammenliknet med to-trinns homogenisering. I tillegg ble tekturen fastere under lagring.



Figur 27. Fasthet (g) i rømmepøver fra alle produksjoner (A) og fasthet (g) i rømmepøver fra produksjon 2 og 3 (B). L0= Lagring 0 uker, L3= Lagring 3 uker, L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns

4.4.2 Viskositet i rømme (Viskositetsanalyse)

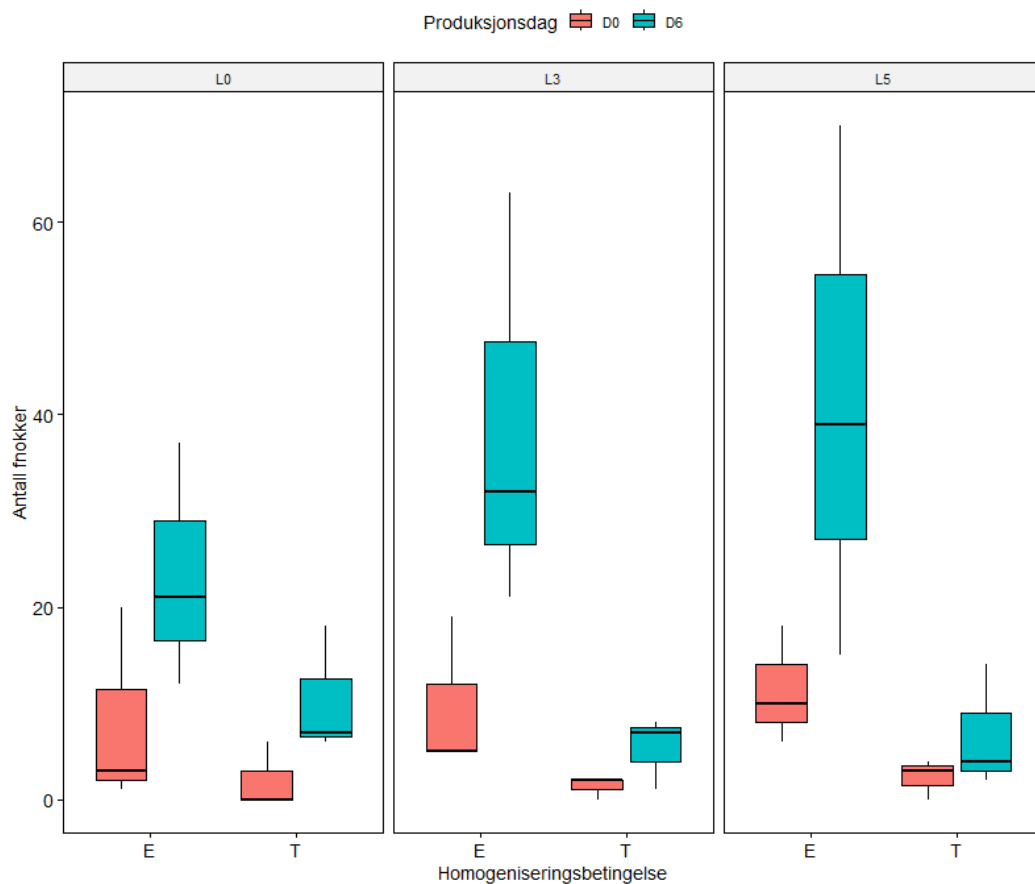
Rømmepøvenes viskositet er fremstilt ved utvalgte skjærhastigheter (shear rates) i figur 28. Ved økende skjærhastighet sank viskositeten, og det var tydelig at prøvene hadde størst variasjon i viskositet ved 2.6 (1/s). Ved denne skjærhastigheten hadde produksjonsdag en signifikant påvirkning på viskositeten (p-verdi < 0.05), mens ved skjærhastighet 41, 71.8 og 100 (1/s) ble viskositeten signifikant påvirket av homogeniseringsbetingelse (p-verdi < 0.05). Ved disse skjærhastighetene var viskositeten høyere i prøver som hadde blitt homogenisert i to trinn.



Figur 28. Viskositet (Pa*s) i rømmepøver ved skjærspenning 2.6, 41, 71.8 og 100 (1/s). L0= Lagring 0 uker, L3= Lagring 3 uker, L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

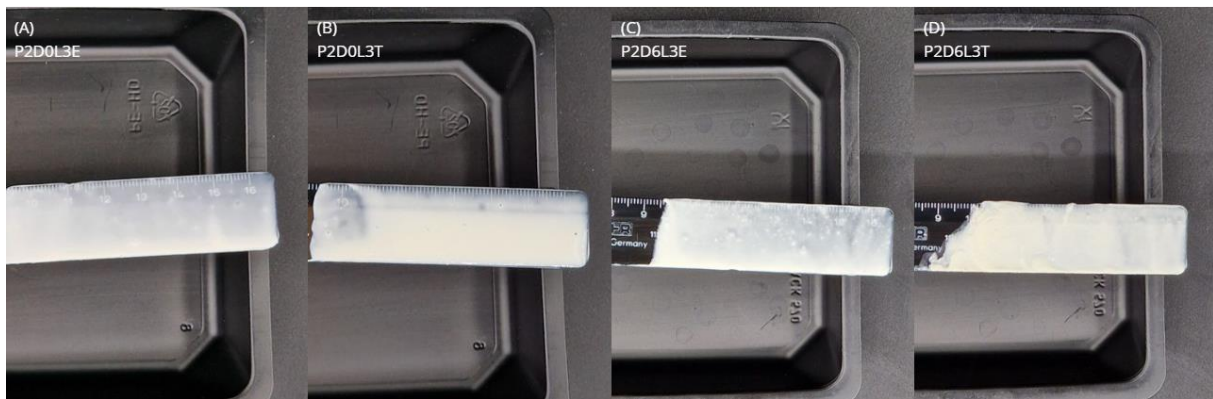
4.5 Fnokker i rømme (Linjalmetode og foto)

Både produksjonsdag og homogeniseringsbetingelse påvirket antall fnokker avlest på linjalen signifikant (p-verdi < 0.05). Det var også en interaksjonseffekt mellom disse to faktorene, der rømmepøver produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, homogenisert i ett trinn, hadde flest fnokker (figur 29).



Figur 29. Antall fnokker avlest på en sort linjal (over et område på 2 cm) som er blitt rørt ned i rømmeprovne, før overflødig rømme er blitt kakket av. L0= Lagring 0 uker, L3= Lagring 3 uker, L5= Lagring 5 uker. D0= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

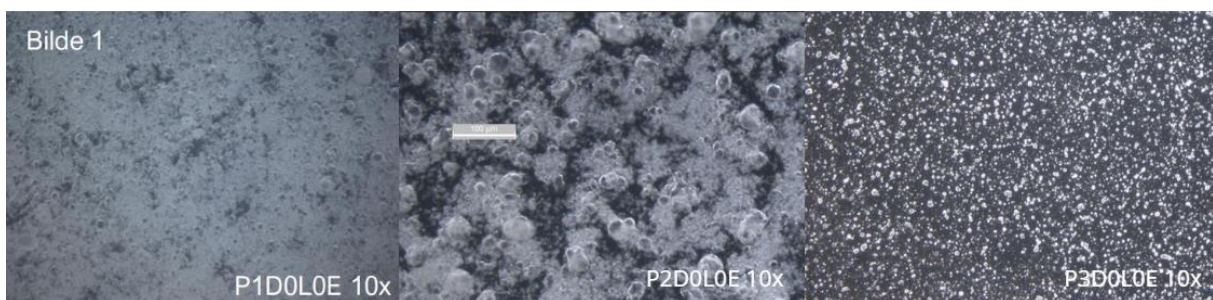
Det ble også tatt bilder av rømmeprovne. Resultatene fra linjalmetoden kan gjenspeiles i bildene, da det kom tydelig frem at rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, der det ble benyttet ett-trinns homogenisering under produksjonen, så ut til å ha flest fnokker (figur 30).



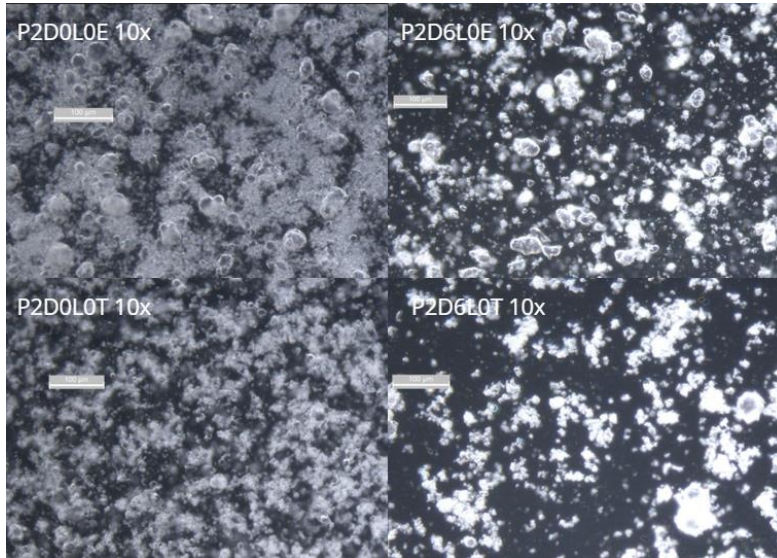
Figur 30. Linjaler med rømmepøver etter 3 ukers lagring fra produksjonsgjentak 2. P2= Produksjon 2, D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. L3= 3 ukers lagring. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

4.6 Mikrostruktur i rømme (Mørkefeltmikroskopi)

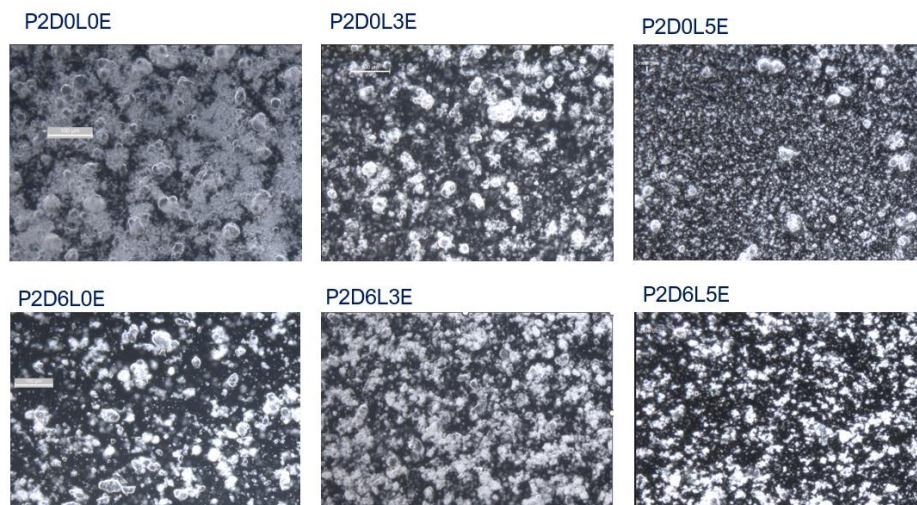
Rømmepøvene ble mikroskopert med mørkefelt (DF) og et 10x objektiv, og noen av bildene som ble tatt er fremstilt under. Det var store variasjoner mellom produksjonsgjentakene, hvor det ved den første produksjonen ble observert en veldig tett struktur, mens det ved den siste produksjonen ble observert mindre og mer finfordelte aggregater (figur 31). Generelt ble det observert en mer sammenhengende struktur i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn. Det klare hvite på bildene; trolig fett, kom tydeligere frem i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn (figur 32). Ved to-trinns homogeniseringen så det ut til at fettaggregatene ble noe mindre sammenliknet med ett-trinns homogeniseringen, uavhengig av fløte kvaliteten (figur 32), og under lagring så det ut til at fettene kom tydeligere frem (figur 33).



Figur 31. Bilder av prøve P1D0L0E (t.v.), P2D0L0E og P3D0L0E (t.h.) tatt ved mørkefeltmikroskopi. P1= Produksjon 1. P2= Produksjon 2. P3= Produksjon 3. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. L0= Lagring 0 uker. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar).



Figur 32. Bilder av prøve P2D0L0E, P2D6L0E, P2D0L0T og P2D6L0T tatt ved mørkefeltmikroskopi. P2= Produksjon 2. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. L0= Lagring 0 uker. E= Ett- trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

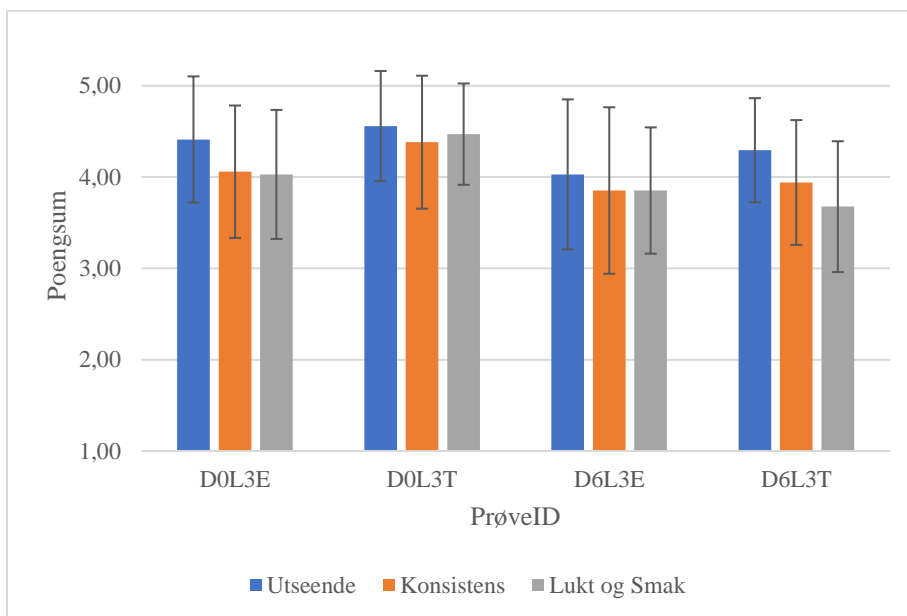


Figur 33. Bilder av prøve P2D0L0E, P2D0L3E, P2D0L5E, P2D6L0E, P2D6L3E, P2D6L5E tatt ved mørkefeltmikroskopi. P2= Produksjon 2. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. L0= Lagring 0 uker. L3= Lagring 3 uker. L5= Lagring 5 uker. E= Ett- trinns homogenisering (50 bar).

4.7 Sensoriske analyser

4.7.1 Sensorisk kvalitetsbedømmelse av rømme

Det ble utført en sensorisk kvalitetsbedømmelse på rømmeprøvene ved 3 ukers lagring, der rømme produsert fra fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn scoret lavere på både utseende, konsistens, lukt og smak sammenliknet med rømmeprøvene produsert fra fløten inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn (figur 34). Produksjonsdag/fløte kvalitet påvirket også samtlige attributter signifikant (p -verdi < 0.05). Homogeniseringsbetingelse og produksjonsdag hadde i tillegg en signifikant interaksjonseffekt hva gjaldt lukt og smak (p -verdi < 0.05). Anmerkninger og avvik varierte mellom produksjonene og er presentert i vedlegg 5.

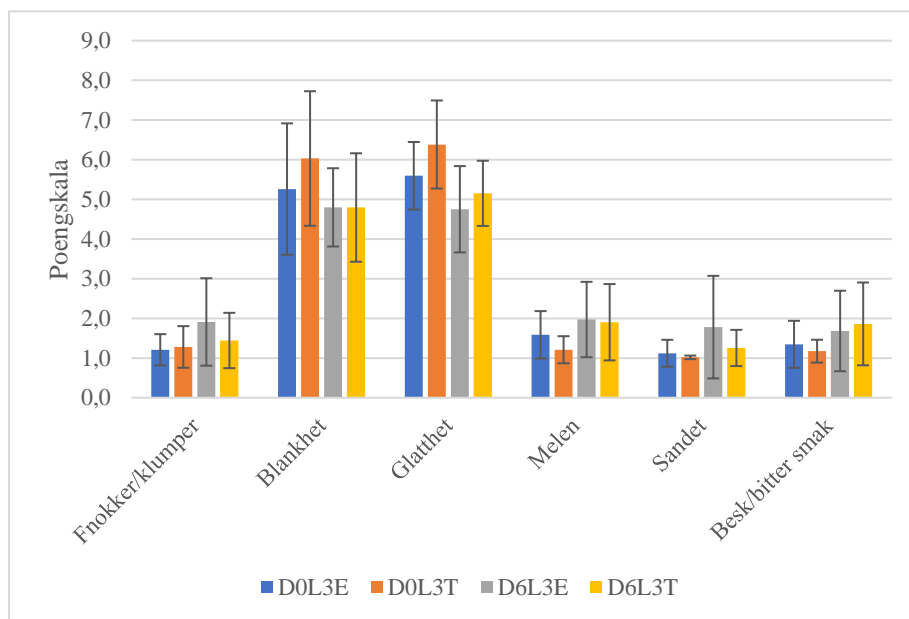


Figur 34. Sensorisk kvalitetsbedømmelse av rømmeprøvene ved 3 ukers lagring. Prøvene er vurdert på en skala fra 1-5. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. L3= 3 ukers lagring. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

4.7.2 Sensorisk profilering av rømme

I tillegg til kvalitetsbedømmelsen, ble det ved 3 ukers lagring gjennomført en sensorisk profilering av rømmeprøvene. Prøvene ble vurdert nokså likt for flere av egenskapene, og det er kun de attributtene som ble påvirket signifikant (p -verdi < 0.05) av forsøksfaktorene som er fremstilt i figur 35. Produksjonsdag/fløte kvaliteten påvirket attributtene; fnokker/ klumper, blankhet, glatthet, melen, sandet og besk/ bitter, mens homogeniseringsbetingelsene påvirket

attributtene; glatthet og sandet. Til tross for at ikke fnokker/ klumper ble signifikant påvirket av homogeniseringsbetingelsene (p-verdi > 0.05), var det en signifikant interaksjonseffekt mellom produksjonsdag og homogeniseringsbetingelse når det gjaldt denne egenskapen (p-verdi < 0.05). Det samme gjaldt for attributtene fyldighet/ munnfølelse og oksidert smak, men disse to attributtene ble imidlertid ikke påvirket signifikant av den enkelte forsøksfaktor (p-verdi > 0.05). Gjennomsnittlig score og standardavvik for alle de 16 attributtene vurdert under profileringen er fremstilt i vedlegg 6.



Figur 35. *Attributter der det var signifikant forskjeller mellom rømmeprovne under sensorisk profilering ved 3 ukers lagring av rømmeprovne. Provene er vurdert på en skala fra 1-9. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 6 døgn ved 6 °C. L3= 3 ukers lagring. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).*

5.0 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å dokumentere effekten av mikrobiell proteolyse i fløte samt effekten av ett- og to-trinns homogenisering, i tillegg til lagringstid, på rømmekvalitet.

For å undersøke dette ble fløte (35 % fett) inokulert med *Pseudomonas*, før det ble produsert rømme etter henholdsvis 0 og 6 dager. Teorien tilsier at fløte inokulert i 0 døgn skulle være av god kvalitet, mens fløten inokulert i 6 døgn skulle være av dårligere kvalitet, da proteasene har fått mer tid til å virke. Fløte ble homogenisert ved ett-trinns (50 bar) og to-trinns homogenisering (50/30 bar) og de ferdige rømmeprøvene ble analysert ved både 0, 3 og 5 ukers lagring for å undersøke effekten av lagringstid.

En rekke analyser ble benyttet for å undersøke ulike kvalitetsparametere i både fløte og rømme. Det ble utført mikrobiologiske analyser underveis i produksjonen, samt av rømmen, for å sjekke evt. vekst og undersøke metabolismen. Kjemiske analyser som pH-måling, HSGC og HPLC ble også benyttet for en ytterligere undersøkelse av syrekulturens metabolisme i rømmen. Proteolytisk aktivitet i fløte og rømmeprøver ble hovedsakelig undersøkt gjennom azocasein-analyse, kapillærelektroforese og frie aminosyrer (HPLC). Reologiske analyser ble utført for å analysere rømmens tekstur og viskositet, og i tillegg ble det utført en linjalmetode, mørkefeltmikroskopering og sensoriske analyser for å få en ytterligere innsikt i rømmekvaliteten.

5.1 Fløtekvalitet

Det var ingen signifikante forskjeller i protein-, fett- eller tørrstoffinnhold i standardisert fløte benyttet ved hver rømmeproduksjon. Dette var som forventet og fløten hadde på dette tidspunktet ikke blitt utsatt for noen av forsøksfaktorene ennå.

I forkant av inokulasjon med *Pseudomonas* ble det detektert noe bakterievekst i råmelk/standardisert fløte, samt i termisert fløte. Dette kan blant annet skyldes en ytre kontaminasjon. Eksempelvis ble melkelinjen på piloten byttet ut av mekanikere/teknikere samtidig som rømmeproduksjonen pågikk, noe som økte sjansene for kontaminasjon. Det ble også observert noe vekst i pasteuriserte fløteprøver, og dette kan tyde på en kontaminasjon etter varmebehandling, eller at sporer har overlevd pasteuriseringen. En varmebehandling på >95 °C i 4-15 minutter skal i prinsippet drepe ikke-sporedannende bakterier, og noen psykotrofe og mesofile sporer (Dash et al., 2022). Da produksjonen fant sted ved fakultetets pilotanlegg kan

kontamineringen eksempelvis ha kommet av utilstrekkelig vask av bordmikserne, eller fra menneskelig kontakt. Det var imidlertid en lav vekst som ble detektert, og mest sannsynlig vil ikke disse kontaminasjonene ha hatt betydning for de videre resultatene i oppgaven.

Vekst av *Pseudomonas* påvirket fløte kvaliteten, som igjen kan ha en stor innvirkning på rømmens endelige karakteristikk. I råmelk hentet fra bulk tanker på gårder i Norge er det hovedsakelig *Pseudomonas* spp. som er blitt funnet, og i noen tilfeller vokser bakterietallet til omtrent log 5 før melken transporteres til meieriene (Skeie et al., 2019). Fløten i denne master oppgaven ble derfor inokulert med *Pseudomonas* (log 5 CFU/mL) etter termisering. Etter ytterligere lagring i 6 døgn ved 6 °C økte bakterietallet som forventet da psykotrofe bakterier vokser ved lave temperaturer. Bakterien vil også produsere termostabile proteaser som kan overleve pasteurisering og redusere kvaliteten ytterligere (Samarzija et al., 2012).

Det tok lenger tid å fermentere fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, noe som indikerer at bakterien og/eller dens enzymatiske aktivitet påvirket syrekulturens metabolisme. Dette kan muligens skyldes at innholdet av både frie fettsyrer, peptider og tilgjengelige frie aminosyrer i fløten inokulert lengst med *Pseudomonas*, var annerledes fra fløten som ble pasteurisert rett etter inokulasjon. Mest sannsynlig var det en høyere andel frie fettsyrer i fløten inokulert lengst med *Pseudomonas*, da økt lagringstid medfører en økning i lipolytisk aktivitet og dermed en høyere indeks av frie fettsyrer (Pereira et al., 2019). At økt lipolytisk aktivitet fører til en akkumulering av frie fettsyrer er også poengtert av Chen et al. (2017). Frie fettsyrer kan potensielt hemme eller drepe veksten av bakterier (Desbois & Smith, 2010), og det kan derfor tenkes at melkesyrebakterienes metabolisme er blitt påvirket av mengden frie fettsyrer i fløten. Dette kan være en grunn til at fermenteringstiden er noe lenger i fløte inokulert lengst med *Pseudomonas*. Tilgjengeligheten på andre næringsstoffer- eksempelvis peptider og aminosyrer- påvirker også fermenteringsprosessen, i tillegg til at temperatur har en betydelig påvirkning på fermenteringstid (Born, 2006; Meunier- Goddik, 2012). De forskjellige fermenteringstidene observert i forsøket kan derfor også skyldes en mulig temperaturforskjell mellom batchene under syrningen. Fløten ble fermentert i viskubator-spenn, hvor viskubatoren ble stilt inn på 23 °C. Temperaturen var dog kun mulig å måle kontinuerlig i ett spenn under fermenteringen, så en liten temperaturforskjell mellom batchene kan derfor ikke utelukkes helt. Til tross for en tydelig påvirkning av fløte kvalitet på fermenteringstid, er det imidlertid viktig å understreke at den ikke var signifikant, og mer forskning er nødvendig.

Fløte kvaliteten påvirket innholdet av både galaktose, eddiksyre og etanol i rømmen signifikant. Dette tyder på at syrekulturens sammensetning mest sannsynlig har blitt påvirket av veksten av

Pseudomonas i fløten før rømmeproduksjonen. Da innholdet av eddiksyre var høyere i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, kan det tyde på at vekst av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* er blitt favorisert da disse melkesyrebakteriene metaboliserer sitrat til blant annet eddiksyre (Bintsis, 2018; Hutkins, 2007). Etanol, som produseres gjennom heterofermentativ metabolisme var også høyere i fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn. Dette kan bety at *Leuconostoc* har vokst bedre i denne fløten, ettersom bakterien er heterofermentativ (Pedersen et al., 2016). Fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn hadde også et signifikant høyere galaktoseinnhold enn fløten inokulert i 0 døgn. Galaktosemetabolisme er blitt godt dokumentert hos melkesyrebakterier som *Streptococcus thermophilus* og *Lactococcus lactis* på grunn av problemer assosiert med galaktoseakkumulering i fermenterte melkeprodukter (Wu et al., 2015). På bakgrunn av dette kan det bety at *Lactococcus lactis* artene i syrekulturen benyttet under rømmeproduksjonen, har produsert mer galaktose i fløten inokulert lengst med *Pseudomonas*.

Det ble detektert et høyere totalt innhold av frie aminosyrer i fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn sammenliknet med fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn. Dette kan skyldes at bakterien har brukt mer av de tilgjengelige frie aminosyrene, for å kunne vokse i fløten i løpet av de 6 døgnene. Som vist i studien til Niven et al. (1998), brukte en bakterie bestemte frie aminosyrer under vekstfasen for å vokse. Mot slutten av denne fasen, ble flere aminosyrer tilgjengelig i melken, sannsynligvis på grunn av at bakteriens proteaser bryter ned proteiner og peptider i melken for å skaffe seg mer næring. Det var riktignok store variasjoner mellom produksjonsgjentakene, og ingen signifikante forskjeller mellom fløteprøvene. I rømmeprøvene var det derimot et høyere innhold av frie aminosyrer i rømme produsert fra fløte inokulert lengst med *Pseudomonas* (6 døgn). Dette kan skyldes proteolytisk aktivitet fra både *Pseudomonas* og syrekulturen. Melkesyrebakteriene i syrekulturen har nemlig egne proteaser som kan påvirke proteinnedbrytningen (Savijoki et al., 2006). De forskjellige melkesyrebakteriene har ulike proteolytiske systemer (Liu et al., 2010), hvor syrekultrens sammensetning vil reflekteres i aminosyresammensetningen. Det kan hende at de mest proteolytiske bakteriene i syrekulturen er blitt stimulert i høyere grad, i fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, ettersom rømmen produsert fra denne fløten hadde et høyere antall frie aminosyrer.

Resultatene fra kapillærelektroforesen kan gi ytterligere informasjon om den proteolytiske aktiviteten i fløte- og rømmeprøvene. Det ble detektert et lavere innhold av profilene til både κ -, β A1- og β A2-kasein i fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 dager, samt i rømme produsert

fra denne fløten, noe som kan tyde på at det har skjedd en nedbrytning av disse proteinene. Den viktigste proteasen karakterisert i flere *Pseudomonas* spp. stammer er aprX (Meng et al., 2017). AprX har sannsynligvis brutt ned både κ -, β A1- og β A2-kasein i løpet av de 6 døgnene som fløten har vært lagret før rømmeproduksjon. I tillegg ble det ved utførelsen av kapillærelektroforese detektert totalt flere toppler i fløten inokulert lengst med *Pseudomonas*, samt i rømmeprovne produsert fra denne fløten. Dette kan forklares ved at proteinene brytes ned til mindre proteiner og peptider, og at det er disse som detekteres under analyseringen. For å detektere proteiner/peptider er man imidlertid avhengig av at det er nok av dem, og at de beveger seg i et tempo hvor de kommer frem i det tidsvinduet som er satt til detektering. Det kan også ligge flere toppler av proteiner/peptider bak andre toppler, noe som fører til at de ikke detekteres. Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor ikke enda flere toppler kommer frem i prøvene hvor det trolig har skjedd en nedbrytning av protein.

I tillegg til å undersøke antall frie aminosyrer og proteinnedbrytning ved kapillærelektroforese, kan potensielt azocasein-analysen gi supplerende innsikt hva gjelder den proteolytiske aktiviteten. Ved denne analysen ble det detektert noe mer proteolytisk aktivitet i fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, sammenliknet med fløten inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn. Disse funnene støtter oppunder resultatene fra kapillærelektroforesen, og proteasene har mest sannsynlig brutt ned proteinene. I rømmeprovne ble imidlertid motsatt mønster detektert ved asocaseinanalysen, der rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, så ut til å ha noe høyere proteolytisk aktivitet. Syrekulturens egne proteaser har påvirket den totale proteolytiske aktiviteten, og analysemetoden burde generelt ha blitt mer tilpasset rømmeprovner hvis det hadde vært mer tid og kompetanse tilknyttet metoden. Det er også essensielt å påpeke at det ikke ble benyttet aprX ved preparering av standardkurven brukt under analysen. I stedet ble Proteinase K, en annen uspesifikk proteinase benyttet (Saenger, 2013).

Basert på de tre analysene benyttet for å detektere proteinnedbrytning er det mye som tyder på at *Pseudomonas* spp. har fremprovosert proteolytisk aktivitet og proteinnedbrytning i fløten. For å undersøke hypotesen om at den proteolytiske aktiviteten kan bli visuell i form av fnokker ble det også utført en linjalmetode. Ved denne analysen kom det tydelig frem at fløte kvaliteten påvirket antall fnokker i rømmen, noe som støtter hypotesen om at proteolytisk aktivitet kan føre til redusert kaseinmicellestabilitet og/eller fettkulestabilitet, som igjen kan resultere i flokkulering eller aggregering av protein og fett (Zhang et al., 2020). Det kan hende at disse flokkuleringene eller aggregatene blir visuelle i form av fnokker, men nøyaktig hva en fnokk består av, og hvordan den er bygd opp, er ennå ukjent.

Det er også andre kvalitetsaspekter utover fnokker i rømme, slik som eksempelvis fasthet og viskositet, som kan påvirkes av fløte­kvalitet. Ekskluderes det første produksjonsgjentaket er det tydelig at produksjonsdag/fløte­kvalitet påvirket fastheten. Som studien til Gassem og Frank (1991) viste, ble yoghurt produsert fra melk behandlet med bakterielle proteaser fra *Pseudomonas* både fastere og mer viskøs sammenliknet med yoghurt produsert fra ubehandlet melk. Studien presiserer at det er hydrolysen av κ -kasein som kan forklare dette, og det kan derfor antas at dette også kan være en årsak til den økte fastheten og viskositeten (ved shear rate 2.6 (1/s)) i rømmeprøvene inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn. Inkluderes det første rømme­produksjonsgjentaket, påvirkes imidlertid ikke fasthet noe særlig av fløte­kvalitet. Ved produksjonsgjentak 1 ble rømmeprøvene nemlig svært faste, noe som resulterte i store variasjoner mellom de tre rømme­produksjonene. Det er vanskelig å vite årsaken til hvorfor rømmen fra den første produksjonen ble så mye fastere sammenliknet med de andre, men det er mulig at ikke rømmekoagelet ble rørt like godt opp etter fermenteringen ved den første produksjonen. Rørte produkter vil ha en løsere konsistens sammenliknet med urørte produkter, og overdreven skjæring kan resultere i tap av struktur (Lucey, 2004). Det motsatte kan observeres ved en for mild røring. Det ble tilstrebet å sikre en så lik røring som mulig ved hvert produksjonsgjentak, men da dette ble gjort manuelt kan det ha vært noen ulikheter mellom hver produksjon. Til tross for at antall opprøringer var lik mellom produksjonene, kan det ha vært forskjeller i hvor fort og kraftig gelen ble rørt opp. Produksjonsgjentak 2 og 3 fant sted nærmere hverandre i tid, noe som kan bidratt til å sikre en mer ensartet røring mellom disse to produksjonene. En annen mulig forklaring kan være at fløtens fettsammensetning har vært ulik mellom produksjonen. For eksempel kan det ha vært mer mettet fett i fløten som ble benyttet ved den første produksjonen, ettersom melkeprodukter med mer umettet fett vil oppnå en mykere struktur sammenliknet med produkter med mye mettet fett (Chen et al., 2004).

For å studere rømmens mikrostruktur, ble det utført mørkefeltmikroskopering. Det er viktig å poengtere at vurderingen av mørkefelt bildene baserer seg på en subjektiv vurdering, og siden bildene er i sort-hvitt er det vanskelig å gi en konkret forklaring til hvilke komponenter som faktisk tydes. Det ser allikevel ut til at det kan ha skjedd en utkrystallisering av fett i prøvene produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, da det klare hvite på bildene av disse prøvene trolig er fett. Dette kan skyldes at mer protein er blitt brutt ned i disse rømmeprøvene, noe som kan resultere i at fett kommer tydeligere frem, i form av fettkrystaller. Dette er imidlertid uvisst, da det ikke er mulig å skille de ulike komponentene fra hverandre ved mørkefeltmikroskopering. Det er også en rekke andre feilkilder som kan spille inn på

resultatene. Det kan være små forskjeller i prøveopparbeidelsen; for eksempel kan det være variasjoner mellom mengde vann og mengde rømme som ble rørt sammen, hvor mye prøvene ble rørt, samt tykkelsen på preparatet på objektglass. Hvor på prøven bildet er tatt kan også ha en innvirkning. Det hadde vært interessant å benytte fluorosens for å skille mellom protein og fett, men det var det dessverre verken ressurser eller tid til. Sammen med de andre analysene viser resultatene fra mørkefeltmikroskoperingen allikevel flere kvalitetsforskjeller.

Kvalitetsforskjeller gjenspeiles også gjennom de sensoriske analysene utført i forbindelse med denne oppgaven. Fløte kvaliteten påvirket både utseende, konsistens, lukt og smak under kvalitetsbedømmelsen, og under den sensoriske profileringen ble attributtene; fnokker/klumper, blankhet, glatthet, melen, sandet og besk/bitter også signifikant påvirket av fløte kvaliteten. Dette var forventet ettersom proteolytisk aktivitet kan medføre både bismak og lukt i melk (Bendicho et al., 2002; Born 2006) i tillegg til fysiske egenskaper som fasthet, viskositet og synerese (Gassem & Frank, 1991).

5.2 Homogeniseringsmetode

Innholdet av både galaktose og etanol var signifikant lavere i rømmeprøvene produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, som var homogenisert i to trinn. Innholdet av diacetyl og acetoin var derimot høyere i disse rømmeprøvene. Det er noe overaskende at homogeniseringsmetoden viste seg å ha betydning på metabolismen i rømmen, men som både Massoud et al., (2015), Muramalla & Aryana (2011) og Serra et al., (2009) beviser, så kan homogenisering påvirke bakterieinnhold og metabolisme i yoghurt. Disse kildene diskuterer imidlertid ikke noe om hvordan dette kan skje, og det er behov for mer forskning på dette området.

Det er rømme produsert fra fløten inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, og som er homogenisert i to trinn, som skiller seg mest ut med tanke på det lavere galaktose og etanolinnholdet, og det høyere diacetyl og acetoin innholdet. Spesielt ved 0 ukers lagring var også veksten av *Leuconostoc* i denne rømmen lavere. Da *Leuconostoc* er heterofermentativ (Pedersen et al., 2016), kan dette være en forklaring på hvorfor det blant annet ble produsert mindre etanol i rømme produsert fra fløten inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, som var homogenisert i to trinn. At innholdet av diacetyl og acetoin er høyere når veksten av *Leuconostoc* er lavere, er ikke helt som forventet, i og med at denne bakterien har sitratmetabolisme (Bintsis, 2018). *Lactococcus lactis diacetylactis* har imidlertid også denne

metabolismen, så det kan virke som at forholdene derfor tilrettelegger mer vekst av denne bakterien. Innholdet av diacetyl og acetoin er riktignok ikke detekterbar i flere av de andre rømmeprøvene, og det kan hende at forskjellene dermed virker større enn de egentlig er. At metabolismen er annerledes i rømme produsert fra fløten inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn og som er homogenisert i to trinn er uansett tydelig. Det er mulig at ved en finere fettfordeling, blir proteinene mindre tilgjengelige for bakteriene, da mer protein blir en del av den nye pseudomembranen. Underskudd, eller mangel på protein, til å dekke de små nye fettkulene etter homogeniseringen, kan resultere i fravær av fritt protein i serumfasen (Narvhus et al., 2019). Hvis proteinene blir mindre tilgjengelige kan dette resultere i at *Leuconostoc* vokser saktere, da bakterier er avhengig av blant annet proteiner for å kunne vokse godt (Liu et al., 2010). Med en fettprosent på 35 % er det allikevel høyst sannsynlig at det uansett ikke vil befinne seg fritt protein i serumfasen, da alt proteinet vil befinne seg i fettkulemembranen (Narvhus et al., 2019). I fløten inokulert kortest med *Pseudomonas* blir også færre peptider tilgjengelig, i og med at det er mindre proteolytisk aktivitet i denne fløten. Hvordan både fløte kvalitet og homogeniseringsmetode påvirker metabolitter som galaktose, etanol, diacetyl og acetoin, er imidlertid ikke godt nok dokumentert i litteraturen, og mer forskning er nødvendig.

Homogeniseringsmetode påvirket også innholdet av frie aminosyrer i rømmen, der innholdet var høyere i rømmeprøver hvor fløten var blitt homogenisert i to trinn fremfor ett trinn. Det kan hende at aktiviteten til proteinasene (fra både *Pseudomonas* og syrekultur) forhøyes når fettkulene er mer finfordelte. Som nevnt tidligere kan det hende at det mer finfordelte fett etter to trinns homogeniseringen, vil påvirke syrekulturens metabolisme og komposisjon. En mulighet er at mikrober som er mer effektive i å bryte ned proteiner og peptider blir favorisert ved to-trinns homogenisering. I og med at fettkuleoverflaten øker når fettkulestørrelsen reduseres (Huppertz et al., 2020) kan det hende at fettkuleoverflaten blir mer tilgjengelig for enzymatisk aktivitet. Dette finnes det dessverre lite dokumentasjon på.

Ved bruk av linjalmetoden kom det tydelig frem at både fløte kvalitet og homogeniseringsbetingelse påvirket antallet fnokker i rømmen. Det var også en signifikant interaksjonseffekt mellom disse to faktorene, der rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, som var homogenisert i ett trinn, hadde høyest antall fnokker. Dette kan være en kombinasjon av at den proteolytiske aktiviteten blir visuell i form av protein- og fettaggregering grunnet redusert kaseinmicelle og/eller fettkulestabilitet (Zhang et al., 2020), samt at fettagglomerater gjerne blir mer synlige ved ett-trinns homogeniseringen. Agglomeratene er nemlig ikke blitt ytterligere adskilt, slik de mest sannsynlig har blitt under

to-trinns homogeniseringen (Narvhus et al., 2019). Det kan imidlertid være vanskelig å forstå hvordan fnokker oppstår når man ikke vet nøyaktig hva de består av, og mer forskning er nødvendig.

Ekskluderes den første produksjonen, hvor alle rømmeprøvene ble ekstremt faste, er det tydelig at homogeniseringsmetode også påvirker fastheten på rømmen signifikant. I rømme hvor fløte er blitt homogenisert i ett trinn, er teksturen fastere sammenliknet med rømme der fløte er blitt homogenisert i to trinn. Når fettkulene blir ytterligere adskilt under to-trinns homogenisering, minimeres fettkuleagglomeratene. Ved rømmeproduksjon kan imidlertid disse agglomeratene være ønskelige da de gir mer fylde til produktet, og flere kilder anbefaler ett-trinns homogenisering for produksjon av rømme der høy viskositet og fast konsistens er ønskelig (Bylund, 1995; Narvhus et al., 2019).

Homogeniseringsmetoden påvirket også rømmens viskositet. Ved en skjærhastighet på både 41, 71.8 og 100 (1/s) var viskositeten signifikant høyere i prøver som hadde gjennomgått to-trinns homogenisering. Det er viktig å poengtere at det i denne oppgaven egentlig ble benyttet dobbel homogenisering fremfor to-trinns homogenisering, da homogenisatoren som ble benyttet kun var utstyrt med én ventil. Fløten ble derfor kjørt igjennom samme ventil to ganger, noe som i prinsippet blir dobbel homogenisering. I følge Lucey (2004) medfører dette en økt viskositet og jevnhet på rømmen, noe som kan forklare hvorfor viskositeten var høyere i prøvene homogenisert under «to-trinns» homogenisering.

Ved mørkefeltmikroskoperingen så det ut til at to-trinns homogeniseringen førte til at fettaggregatene ble noe mindre sammenliknet med ett-trinns homogeniseringen. Dette stemmer godt overens med teorien, da fettkulene blir ytterligere adskilt og mer finfordelte ved to-trinns homogenisering (Narvhus et al., 2019). Mørkefeltmikroskoperingen viste også noen forskjeller mellom produksjonene. Homogeniseringstrykket måtte konstant justeres manuelt under produksjonene, noe som kan ha påvirket mikrostrukturen mellom produksjonene. Eksempelvis ved produksjonsgjentak 3 hvor fett så ut til å være mer finfordelt, kan trykket muligens ha vært noe høyere enn ønsket.

Homogeniseringsmetode påvirket ikke den sensoriske kvalitetsbedømmelsen signifikant, men det var en signifikant interaksjonseffekt mellom fløte kvalitet og homogenisering på lukt & smak. Dette kan eksempelvis skyldes at proteolytiske aktivitet gir bitter lukt og smak (Bendicho et al., 2002; Born 2006), mens ett-trinns homogenisering kan gi en tydeligere oppfatning av fett i og med at fettagglomeratene er større. Til sammen kan dette føre til en mer merkbar

forskjell under vurderingen. Ved den sensoriske profileringen ble attributtene glatthet og sandet påvirket av homogeniseringsbetingelse. De større fettagglomeratene i disse rømmeprovne oppfattes muligens som sandete, og gjør at rømmen dermed også virker mindre glatt. Det var i tillegg en interaksjonseffekt mellom produksjonsdag og homogenisering på de tre egenskapene; fnokker/klumper, fyldighet/munnfølelse og oksidert smak, noe som kan skyldes at forskjellene i disse attributtene blir mer synlige når rømmeprovne både er påvirket av proteolytisk aktivitet og homogeniseringsmetode.

5.3 Lagringstid

pH i rømmeprovne synker under lagring, og dette kan skyldes at syrekulturen fortsetter å produsere melkesyre så lenge det er laktose tilgjengelig (Bintsis, 2018). En svakhet under forsøket var at det ble benyttet et annet pH meter under lagringen enn det som ble benyttet ved fermenteringen. Det kan forklare hvorfor det ble detektert noe høyere verdier under lagring av enkelte rømmeprovner sammenliknet med den pH-verdien fermenteringen ble avsluttet ved.

Ettersom fløten ble fermentert til rømme, steg også veksten av *Lactococcus* og *Leuconostoc*, noe som skyldes tilsetningen av syrekulturen. Ved ytterligere lagring av rømmen i 3 og 5 uker sank derimot innholdet av bakterieslektene. Som studien til Jakubowska & Karamucki (2020) viser, reduseres veksten av mikroorganismen i yoghurt ettersom lagringstiden øker, så det var forventet at dette skulle skje i rømme også. Den raske vekstreduksjonen var allikevel noe uventet da det blant annet forventes at syrekultur benyttet i yoghurt skal være stabil og overleve kjøletemperatur under en lagringstid på rundt 21-28 dager (Popović et al., 2020). Det kan imidlertid hende at bakteriene var levedyktige, uten å være kultiverbare, som en følge av stress eller lite tilgang på næring (Pazos-Rojas et al., 2024).

Lagringstiden påvirket også innholdet av både galaktose, melkesyre, eddiksyre og etanol, hvor innholdet av alle komponentene steg under lagring. Syrekulturens metabolisme vil være aktiv så lenge det er laktose igjen i produktet (Bintsis, 2018), og da det var mer laktose igjen i rømmeprovne vil innholdet av både galaktose, melkesyre, eddiksyre og etanol stige under lagring.

Under lagring av rømmeprovne økte også innholdet av frie aminosyrer. Dette kan skyldes at protasene, både fra *Pseudomonas* og syrekulturen, er aktive og at proteinene dermed blir mer og mer nedbrutt (Samarzija et al., 2012). Dette gjenspeiles også i nedbrytningen av κ -kasein, der innholdet av proteinprofilen synker under lagringstiden. Lyck et al. (2006) kommenterer at

bitterhet i rømme kan komme av at melkesyrebakterienes enzymer hydrolyserer β -laktoglobulin ved forlenget lagring, så at de fortsetter å hydrolysere κ -kasein er også høyst sannsynlig. I en tidligere studie av yoghurt ble det presisert at hydrolyse av κ -kasein kunne være en årsak til økt fasthet og viskositet i yoghurt behandlet med bakterielle proteaser fra *Pseudomonas* (Gassem & Frank, 1991). Dette kan derfor være en mulig forklaring til hvorfor rømmeprovne i denne oppgaven fikk en fastere tekstur under lagring.

Ved 5 ukers lagring var det også en tydelig forskjell i proteolytisk aktivitet (detektert gjennom azocasein-analyse) mellom rømmeprovne, hvor aktiviteten sank i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn. Som studien til Amani et al. (2017) viser, så fortsetter proteolysen i yoghurt i løpet av en lagringstid på 28 dager. De andre analysene for detektering av proteolytisk aktivitet i forbindelse med denne masteroppgaven viste også en økt proteolyse under lagring. Da det imidlertid kun var en nedgang i proteolytisk aktivitet i rømme produsert fra fløten inokulert lengst med *Pseudomonas* (6 døgn), kan det hende at proteinene i denne rømmen er blitt helt nedbrutt etter 5 ukers lagring, og at den proteolytiske aktiviteten dermed avtok. Det kan også skyldes at mikroorganismene ikke lenger har et behov for å bryte ned proteiner, og at de dermed nedregulerte enzymaktiviteten. Melkesyrebakteriene kan nemlig regulere sine proteolytiske systemer for å sikre en korrekt nitrogenbalanse i cellene sine (Savijoki et al., 2006).

I tillegg til at både mikroorganismer og proteaser fortsetter å påvirke metabolismen under lagring av rømmen, viser bildene ved mørkefeltmikroskoperingen at det skjer en endring av mikrostrukturen under lagring. Proteasene bryter sannsynligvis proteinene mer og mer ned, noe som kan endre strukturen. Resultatene fra mikroskoperingen er riktignok basert på subjektive observasjoner og det finnes, som diskutert i kapittel 5.1, en rekke feilkilder i forbindelse med analysen som kan være av betydning.

5.4 Konklusjon og videre arbeid

De tre forsøksfaktorene; mikrobiell proteolyse i fløte, homogeniseringsmetode og lagringstid påvirket alle rømmekvaliteten i varierende grad.

Pseudomonas vokste godt i fløten ved 6 °C lagring, hvor veksten økte med 2 log CFU/mL i løpet av 6 døgn. Det var tydelig at både fløte kvaliteten og homogeniseringsmetode påvirket syrekulturens metabolisme, da det tok lenger tid å fermentere fløten inokulert lengst med *Pseudomonas*, samt at innholdet av både galaktose, eddiksyre, etanol, diacetyl og acetoin ble

påvirket av én eller flere forsøksfaktorer. Flere av metabolittene som ble detektert økte også under lagring. Som forventet ble det generelt registrert mer proteolytisk aktivitet i både fløte og rømme som var inokulert lengst med *Pseudomonas*. Det var imidlertid ikke alle analysene som viste dette, noe som indikerte at proteasene fra syrekulturen også hadde en effekt. Det var tydelig at rømmeprøvene produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn, og som var homogenisert i ett trinn hadde flest fnokker. Disse rømmeprøvene var også mye fastere. Viskositeten var imidlertid generelt høyere i rømme hvor to-trinns homogenisering var benyttet. Rømmeprøvenes mikrostruktur virket mer sammenhengende i rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas* i 0 døgn, og disse rømmeprøvene ble også vurdert bedre ved de sensoriske analysene.

Det var riktignok noe variasjoner mellom de ulike produksjonsgjentakene, og mer forskning er nødvendig. Det er flere aspekter som kan være interessante å utforske ved videre arbeid. For eksempel kan det være interessant å sjekke effektene av en lavere inokulasjon med *Pseudomonas*. Fløten inokulert med *Pseudomonas* i 6 døgn var av svært dårlig kvalitet, og mest sannsynlig ville ikke denne fløten ha blitt benyttet videre i meieriindustrien. Det kan også være relevant å undersøke effekten av å benytte en lavere lagringstemperatur for oppbevaring av fløten før rømmeproduksjon. Eksempelvis hadde en kjøletemperatur på 2 °C og/eller 4 °C fremfor 6 °C vært relevant med tanke på at både eldre og nyere studier har vist mindre effekt av mikrobiell aktivitet ved disse temperaturene (Griffiths et al., 1987; O'Connell et al., 2016).

Effektene av en tidlig varmebehandling av melken (eks ved 65 °C i 30 min) før videre oppbevaring, kunne potensielt ha påvirket den proteolytiske aktiviteten i råmateriale, da en slik varmebehandling har vist seg å redusere protease-aktivitet (Alves et al., 2016). Virkningene av dette kan dermed være relevante å undersøke ytterligere. Resultatene i denne oppgaven viser også en tydelig påvirkning av syrekultursammensetningen, og det hadde derfor vært interessant å studere denne sammensetningen ved bruk av sekvensering. Sekvenseringen ville ha gitt en dypere innsikt i syrekulturens komposisjon, og dermed en bredere forståelse av resultatene. Da innholdet av frie fettsyrer kan påvirke veksten av bakterier burde dette også måles ved videre arbeid. Basert på alle resultatene i denne oppgaven er det flere signifikante forskjeller mellom de forskjellige rømmeprøvene. Ved videre forskning vil det derfor også være interessant å kjøre forbrukertester, for å sjekke om forbrukere faktisk oppdager disse forskjellene.

Produksjon og analysemetoder kan også optimaliseres videre. Blant annet burde metodene som måler proteolytisk aktivitet optimaliseres i forhold til rømmeprøvene, da det er vanskelig å vite

hva som skyldes proteolytisk aktivitet fra *Pseudomonas* og hva som skyldes syrekulturens egne proteaser.

Industrien bør tilstrebe å forhindre proteolytisk aktivitet i den grad det er mulig i et tids- og kostnadsperspektiv, hvor en kort oppbevaringstid av råmelk og/eller fløte kan minimere produksjonen av de varmebestandige proteasene. I tillegg bør den homogeniseringsmetoden som passer best opp mot produktets endelige ønskede karakteristikk benyttes. Ved å optimalisere råstoff og prosess, vil både produktkvalitet og lagringstid påvirkes i positiv retning.

6.0 Referanser

- Alves, M. P., Salgado, R. L., Eller, M. R., Vidigal, P. M. P., & Fernandes de Carvalho, A. (2016). Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7842-7851. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2016-11236>
- Amani, E., Eskandari, M. H., & Shekarforoush, S. (2017). The effect of proteolytic activity of starter cultures on technologically important properties of yogurt. *Food Science & Nutrition*, 5(3), 525-537. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.427>
- Andreani, N. A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Lucchini, R., Novelli, E. & Cardazzo, B. (2016). Characterisation of the Thermostable Protease AprX in Strains of *Pseudomonas Fluorescens* and Impact on the Shelf-life of Dairy Products: Preliminary Results. *Italian Journal of Food Safety*, 5(4), 6175. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.6175>
- Bendicho, S., Martí, G., Hernández, T., & Martín, O. (2002). Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chemistry*, 79(2), 245-249. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00126-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00126-7)
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol*, 4(4), 665-684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Born, B. (2006). Cultured/Sour Cream. In R. C. Chandan, C. H. White, A. Kilara, & Y. H. Hui (Eds.), *Manufacturing yoghurt and fermented milks* (pp. 285-293). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Bylund., G. (1995). *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB.
- Bütikofer, U. A., Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 337, 24-32.
- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54, 142-153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>
- Chandan, R. C. (2006). Milk Composition, Physical and Processing Characteristics. In R. C. Chandan, C. H. White, A. Kilara, & Y. H. Hui (Eds.), *Manufacturing yoghurt and fermented milks* (pp. 17-39). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., & Zhao, G. (2017). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S316-S330. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295988>
- Chen, S., Bobe, G., Zimmerman, S., Hammond, E. G., Luhman, C. M., Boylston, T. D., Freeman, A. E., & Beitz, D. C. (2004). Physical and Sensory Properties of Dairy Products from Cows with Various Milk Fatty Acid Compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3422-3428. <https://doi.org/10.1021/jf035193z>

- Church, F. C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H & Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66 (6): 1219-1227. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu Rev Food Sci Technol*, 3, 449-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- Dash, K. K., Fayaz, U., Dar, A. H., Shams, R., Manzoor, S., Sundarsingh, A., Deka, P., & Khan, S. A. (2022). A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. *Food Chemistry Advances*, 1, 100041. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100041>
- Davoodi, S. H., Shahbazi, R., Esmaili, S., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A., Jazayeri, S., & Taslimi, A. (2016). Health-Related Aspects of Milk Proteins. *Iran J Pharm Res*, 15(3), 573-591.
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629-1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., & Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18(5), 436-457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014>
- Folkenberg, D. M., & Skriver, A. (2001). Sensory properties of sour cream as affected by fermentation culture and storage time. *Milchwissenschaft*, 56, 261-264.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Starter Cultures. In P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 121-183). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_6
- Gassem, M. A., & Frank, J. F. (1991). Physical Properties of Yogurt Made from Milk Treated with Proteolytic Enzymes. *Journal of Dairy Science*, 74(5), 1503-1511. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78310-0](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78310-0)
- Goodno, C. C., Swaisgood, H.E & Catignani, G.L. (1981). A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Analytical Biochemistry*, 115(1): 203-211. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90547-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90547-9)
- Griffiths, M. W., Phillips, J. D., & Muir, D. D. (1987). Effect of low-temperature storage on the bacteriological quality of raw milk. *Food Microbiology*, 4(4), 285-291. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(87\)80002-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0740-0020(87)80002-3)
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J.A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21(9): 601-606. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.001>
- Gänzle, M., & Gobbetti, M. (2013). Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria. *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 183-216). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_7

- Holt, C., & De Kruif, C. G. (2003). Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins. In (pp. 233-276). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_5
- Huppertz, T., Uniacke-Lowe, T., & Kelly, A. L. (2020). Physical Chemistry of Milk Fat Globules. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, & J. A. O'Mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids* (pp. 133-167). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48686-0_5
- Hutkins, R. W. (2007). Microbiology and Technology of Fermented Foods. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, 1-473. <https://doi.org/10.1002/9780470277515>
- International Dairy Food Association. (n.d.). *Definitions*. <https://www.idfa.org/definition>
- ISO. (2007). ISO 8589:2007. In *Sensory analysis — General guidance for the design of test rooms*. International Organization for Standardization.
- ISO/IDF. (2023). ISO 22935-3 | IDF 99-3. In *Milk and milk products — Sensory analysis — Part 3: Method for evaluation of compliance with product specifications for sensory properties by scoring*. International Organization for Standardization.
- Jakubowska, M., & Karamucki, T. (2020). The effect of storage time and temperature on the quality of natural yoghurt. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*, 18(4), 29-38.
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E. O., Johansen, A.G., Schüller, R. B & Skeie, S. B. S. (2016). Optimization of protein fractionation by skim milk microfiltration: Choice of ceramic membrane pore size and filtration temperature. *Journal of Dairy Science*, 99(8): 6164-6179. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11090>
- Jørgensen, C. E. (2017). *Protein fractionation by microfiltration in high-protein yogurt processing*. [PhD, Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet]. Ås. <http://hdl.handle.net/11250/2616492>
- Kumar, R., M, K., Garsa, A., Shrivastava, B., Pv, R., & Tyagi, A. (2015). Natural and Cultured Buttermilk. In (pp. 203-225).
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-36>
- Lopez, C., Madec, M.-N., & Jimenez-Flores, R. (2010). Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry*, 120(1), 22-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.065>
- Lucey, J. (2004). Cultured dairy products: An overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 77-84. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00142.x>
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30(7), 529-542. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5)
- Lyck, S., Nilsson, L. E., & Tamime, A. Y. (2006). Miscellaneous Fermented Milk Products. In (pp. 217-236). <https://doi.org/10.1002/9780470995501.ch9>

- Massoud, R., Fadaei, V., Khosravi-Darani, K., & Nikbakht, H. R. (2015). Improving the Viability of Probiotic Bacteria in Yoghurt by Homogenization. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2984-2990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.12551>
- Meng, L., Zhang, Y., Wang, J., & Zheng, N. (2017). Characterization of Pseudomonas spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02158>
- Meunier-Goddik, L. (2012). Sour Cream and Crème Fraîche. In (pp. 235-246). <https://doi.org/10.1201/b12084-16>
- Moe, K. M., Porcellato, D. & Skeie, S. (2012). Metabolism of milk fat globule membrane components by nonstarter lactic acid bacteria isolated from cheese. *Journal of Dairy Science*, 96(2): 727-739. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5497>
- Mulder, H., Walstra, P. (1974). *The milk fat globule. Emulsion science as applied to milk products and comparable foods*. Wageningen, the Netherlands: Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- Munsch-Alatossava, P., & Alatossava, T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*, 161(4), 334-346. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.12.004>
- Muramalla, T., & Aryana, K. J. (2011). Some low homogenization pressures improve certain probiotic characteristics of yogurt culture bacteria and Lactobacillus acidophilus LA-K1. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3725-3738. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2010-3737>
- Narvhus, J. A., Nilsen Bækkelund, O., Tidemann, E. M., Østlie, H. M., & Abrahamsen, R. K. (2021). Isolates of Pseudomonas spp. from cold-stored raw milk show variation in proteolytic and lipolytic properties. *International Dairy Journal*, 123, 105049. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105049>
- Narvhus, J. A., Osteraas, K., Mutukumira, T. & Abrahamsen, R.K. (1998). Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 41(1), 73-80. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00036-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00036-1)
- Narvhus, J. A., Østby, N., & Abrahamsen, R. K. (2019). Science and technology of cultured cream products: A review. *International Dairy Journal*, 93, 57-71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.01.011>
- Niven, G. W., Knight, D. J., & Mulholland, F. (1998). Changes in the concentrations of free amino acids in milk during growth of Lactococcus lactis indicate biphasic nitrogen metabolism. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 101-107. <https://doi.org/10.1017/S002202999700263X>
- O'Connell, A., Ruegg, P. L., Jordan, K., O'Brien, B., & Gleeson, D. (2016). The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3367-3374. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2015-10495>

- Pazos-Rojas, L. A., Cuellar-Sánchez, A., Romero-Cerón, A. L., Rivera-Urbalejo, A., Van Dillewijn, P., Luna-Vital, D. A., Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., & Bustillos-Cristales, M. D. (2024). The Viable but Non-Culturable (VBNC) State, a Poorly Explored Aspect of Beneficial Bacteria. *Microorganisms*, 12(1).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12010039>
- Pedersen, T. B., Vogensen, F. K., & Ardö, Y. (2016). Effect of heterofermentative lactic acid bacteria of DL-starters in initial ripening of semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 57, 72-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.041>
- Pereira, F., Luiz, L., Bruzaroski, S. R., Poli-Frederico, R., Fagnani, R., & Santana, E. (2019). The effect of cold storage, time and the population of Pseudomonas species on milk lipolysis. *Grasas y Aceites*, 70(2).
- Popović, N., Brdarić, E., Đokić, J., Dinić, M., Veljović, K., Golić, N., & Terzić-Vidojević, A. (2020). Yogurt Produced by Novel Natural Starter Cultures Improves Gut Epithelial Barrier In Vitro. *Microorganisms*, 8(10).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8101586>
- Qian, F., Sun, J., Cao, D., Tuo, Y., Jiang, S., & Mu, G. (2017). Experimental and Modelling Study of the Denaturation of Milk Protein by Heat Treatment. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 37(1), 44-51. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.44>
- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Rogovina, L. Z., Vasil'ev, V. G., & Braudo, E. E. (2008). Definition of the concept of polymer gel. *Polymer Science Series C*, 50(1), 85-92.
<https://doi.org/10.1134/S1811238208010050>
- Rutherford, S. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC International*, 93, 1515-1522.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
- Saenger, W. (2013). Proteinase K. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3, 3240-3242.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00714-6>
- Samarzija, D., Zamberlin, Š., & Pogacic, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo / Dairy*, 62, 77-95.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Serra, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2009). Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, 19(2), 100-106.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.08.002>
- Sillankorva, S., Neubauer, P., & Azeredo, J. (2008). Pseudomonas fluorescens biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol*, 8, 79.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-79>
- 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.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>

- Skeie, S. B., Håland, M., Thorsen, I. M., Narvhus, J., & Porcellato, D. (2019). Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *Journal of Dairy Science*, *102*(3), 1959-1971.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-14083>
- Tamime, A. Y. (2003). Fermented milks: A historical food with modern applications - A review. *European journal of clinical nutrition*, *56 Suppl 4*, S2-S15.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601657>
- U.S. Food and Drug Administration. (2023). *Sec. 131.160 Sour cream. I Title 21- Food and drugs, Part 131- Milk and cream*
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=131.160>
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology* (Second ed.). CRC Press.
- Wu, Q., Cheung, C. K. W., & Shah, N. P. (2015). Towards galactose accumulation in dairy foods fermented by conventional starter cultures: Challenges and strategies. *Trends in Food Science & Technology*, *41*(1), 24-36.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.010>
- Zhang, C., Bijl, E., Muis, K. E., & Hettinga, K. (2020). Stability of fat globules in UHT milk during proteolysis by the AprX protease from *Pseudomonas fluorescens* and by plasmin. *Journal of Dairy Science*, *103*(1), 179-190.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2019-17150>
- Zhang, L., Zhou, R., Zhang, J., & Zhou, P. (2021). Heat-induced denaturation and bioactivity changes of whey proteins. *International Dairy Journal*, *123*, 105175.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105175>
- Østby, N. (2017). *Effekt av ulike teknologiske produksjonsparametere på lettrømmekvalitet* [Master, Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet]. Ås.
<http://hdl.handle.net/11250/2445343>
- Østlie, H., Helland, M., & Narvhus, J. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, *87*, 17-27.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00044-8)

7.0 Vedlegg

Vedlegg 1: Gjennomsnitt og standardavvik

Tabell 8. Gjennomsnitt og standardavvik mellom rømmeproduksjonsgjentak, ved analyser i forbindelse med forsøket.

Analyse	G.j.snitt (STD.avvik)															Benevnig
	D0L0E	D0L0T	D0L3E	D0L3T	D0L5E	D0L5T	D6L0E	D6L0T	D6L3E	D6L3T	D6L5E	D6L5T				
pH	4.59(0.05)	4.63(0.08)	4.47(0.03)	4.55(0.02)	4.44(0.04)	4.52(0.03)	4.67(0.1)	4.66(0.14)	4.5(0.09)	4.51(0.07)	4.48(0.03)	4.47(0.03)	pH			
HPLC	84.04(2.64)	85.74(4.54)	83.42(2.78)	86.31(4.62)	81.89(2.6)	84.7(5.11)	84(1.94)	82.37(1.72)	83.3(1.98)	83.64(2.37)	82.88(1.14)	83.21(1.42)	mmol			
	1.66(0.1)	1.44(0.23)	2.7(0.13)	1.83(0.55)	2.81(0.29)	1.89(0.52)	1.83(0.15)	1.89(0.16)	2.95(0.31)	3.21(0.03)	3.04(0.57)	3.37(0.24)	mmol			
	60(1.93)	59.63(2.05)	63.18(2.81)	62.72(3.47)	62.6(2.3)	62.24(4.25)	60.27(1.77)	59.48(0.58)	63.16(1.57)	63.34(1.25)	63.11(2.15)	63.7(1.07)	mmol			
	11.02(0.15)	10.96(0.13)	11.57(0.5)	11.52(0.49)	11.58(0.38)	11.48(0.58)	11.12(0.11)	11.15(0.14)	11.57(0.2)	11.8(0.38)	12.02(0.64)	12.32(0.58)	mmol			
	0.92(0.15)	0.76(0.21)	1.1(0.05)	0.72(0.24)	1.12(0.08)	0.69(0.18)	1(0.11)	1.14(0.12)	1.19(0.17)	1.47(0.15)	1.14(0.15)	1.38(0.12)	mmol			
HSGC	0(0)	0.01(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	mmol			
	0.07(0.06)	0.6(0.86)	0.03(0.04)	0.25(0.24)	0.05(0.04)	0.11(0.11)	0.07(0.01)	0.07(0.01)	0.06(0.05)	0.06(0.05)	0.04(0.04)	0.03(0.04)	mmol			
Frie aa i fløte	0.77(0.66)												µmol/g			
Frie aa i rømme	1.33(0.16)	1.01(0.65)	1.38(0.04)	1.49(0.1)	1.4(0.04)	1.57(0.07)	1.39(0.11)	1.14(0.65)	1.55(0.02)	1.61(0.04)	1.63(0.01)	1.7(0.04)	µmol/g			
Frie aminosyrer (uten P3D0L0T & P3D6L0T)	1.33(0.16)	1.38(0.06)	1.38(0.04)	1.49(0.1)	1.4(0.04)	1.57(0.07)	1.39(0.11)	1.52(0.01)	1.55(0.02)	1.61(0.04)	1.63(0.01)	1.7(0.04)	µmol/g			
Azocasein	0.57(0.2)	0.62(0.35)	0.96(0.13)	0.93(0.36)	0.82(0.21)	0.94(0.28)	0.45(0.41)	0.55(0.52)	0.78(0.39)	0.71(0.25)	0.13(0.13)	0.45(0.4)	mU/mL			
Kappa (fløte)	5.96(0.34)												% av areal			
Beta A1 (fløte)	10.28(1.85)												% av areal			
Beta A2 (fløte)	32.23(1.99)												% av areal			
Antall.topper (fløte)	15.33(1.53)												stk			
Kappa (rømme)	4.72(0.71)	4.81(0.75)	3.79(0.35)	4.28(0.87)	3.48(0.75)	3.53(0.17)	1.32(1.15)	1.44(0.66)	1.26(0.69)	0.76(0.37)	1.22(0.6)	0.96(0.62)	% av areal			
Beta A1 (rømme)	10.77(1.98)	10.76(1.81)	10.47(1.32)	10.49(3.18)	10.07(1.2)	9.61(2.02)	10.08(0.98)	10(0.6)	9.51(1.13)	10.05(1.43)	9.6(1.5)	9.48(0.9)	% av areal			
Beta A2 (rømme)	32.67(3.87)	31.84(3.84)	31.02(3.49)	31.07(1.38)	32.23(2.28)	31.47(2.17)	26.67(3.7)	26.3(5.52)	26.02(5.49)	28.75(4.04)	28.69(3.86)	26.87(3.98)	% av areal			
Antall.topper (rømme)	15.67(1.53)	15(1.73)	15.67(2.31)	13.33(2.52)	13(1.73)	16.67(0.58)	17.67(1.53)	19.33(3.79)	17.67(1.53)	18(2)	17.33(0.58)	18.33(3.21)	stk			
Produksjon 1, 2 & 3	1224.51(744)	1231.64(118889.52)	1196.765.57(359)	1288.61(729)	1237.48(106)	1280.8423.1181	465551376.37	2991252.51	5241409.06	3451308.74	516g					
Produksjon 2 & 3	738.08(149)	441.82(52.1)	806.19(191)	529.55(61.2)	808.6(121.3)	568.24(70.6)	1023.88(106830.07)	217.4	1181.35	781917.8	1177.3	1183(62.5)	979.27(173.4)	g		
Linjalmetode	8(10.44)	2(3.46)	9.67(8.08)	1.33(1.15)	11.33(6.11)	2.33(2.08)	23.33(12.66)	10.33(6.66)	38.67(21.78)	5.33(3.79)	41.33(27.57)	6.67(6.43)	stk			

Vedlegg 2: Oversikt over forsøksfaktorenes signifikansnivå

Tabell 9. Oversikt over forsøksfaktorene (Fløte kvalitet/produksjonsdag, Homogeniseringsmetode og Lagringstid) sitt signifikansnivå.

Analyse	Kommentar	Forsøksfaktor		
		Fløte kvalitet/ Produksjonsdag	Homogeniseringsmetode	Lagringstid
Vekst på M17 og LBS	M17			A
	LBS		*	A*
Fermenteringstid og pH	Fermenteringstid	B		n.d
	pH under lagring			A
HPLC	Laktose			
	Galaktose	A*	A*	A
	Melkesyre			A
	Eddiksyre	A		A
HSGC	Etanol	A*	*	A
	Diacetyl	B	B	
	Acetoin			
Frie aminosyrer	Frie aa i fløte		n.d	n.d
	Frie aa i rømme			A
	Frie aa i rømme (uten P3D0L0T & P3D6L0T)	A	A	A
Azocasein	Azo i fløte		n.d	n.d
	Azo i rømme	A		B
Kapillær	κ-kasein (fløte)	A	n.d	n.d
	βA1-kasein (fløte)		n.d	n.d
	βA2-kasein (fløte)	A	n.d	n.d
	Antall.topper (fløte)	B	n.d	n.d
	κ-kasein (rømme)	A		A
	βA1-kasein (rømme)			
	βA2-kasein (rømme)	A		
	Antall.topper (rømme)	A		
Fasthet	Produksjon 1, 2 & 3			
	Produksjon 2 & 3	A	A	A

Analyse	Kommentar	Forsøksfaktor		
		Fløte kvalitet/ Produksjonsdag	Homogeniseringsmetode	Lagringstid
Viskositet	Shear rate 2.6 (1/s)	A		
	Shear rate 41 (1/s)		A	
	Shear rate 71.8 (1/s)		A	
	Shear rate 100 (1/s)		A	
Linjalmetode	Antall fnokker	A*	A*	
Sensorisk kvalitetsbedømmelse	Utseende	A	B	n.d
	Konsistens	A		n.d
	Lukt og smak	A*	*	n.d
Sensorisk profilering	Farge			n.d
	Fnokker/ klumper	A*	*	n.d
	Blankhet	A		n.d
	Glatthet	A	A	n.d
	Seighet			n.d
	Konsistens			n.d
	Fyldighet/ munnfølelse	*	*	n.d
	Melen	A	B	n.d
	Sandet	A	A	n.d
	Rømmesmak/ aromatisk		B	n.d
	Syrlighet			n.d
	Søthet			n.d
	Friskhet			n.d
	Besk/ bitter smak	A		n.d
	Oksidert smak	*	*	n.d
	Bismak			n.d

* *A* = p -verdi < 0.05, *B* = $0.05 < p$ -verdi < 0.1, Blankt felt = p -verdi > 0.1, * = interaksjonseffekt mellom faktorer, n.d = forsøksfaktor ikke gjeldene for prøve

Vedlegg 3: Utvikling av pH under fermentering

Tabell 10. pH utvikling under fermentering av fløten ved produksjonsgjentak 1. P1= Produksjonsgjentak 1. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

ProveID	Tid	pH	Kommentar
P1D0E	08:20	4,79	Inokulert med syrekultur kl. 16:40 dagen før
	08:45	4,64	
	09:35	4,59	
P1D0T	08:20	4,73	Inokulert med syrekultur kl. 16:40 dagen før
	08:45	4,58	
P1D6E	08:35	4,80	Inokulert med syrekultur kl. 17:30 dagen før
	09:00	4,78	
	09:25	4,69	
	09:50	4,77	
	10:10	4,60	
P1D6T	08:35	4,96	Inokulert med syrekultur kl. 17:30 dagen før
	09:00	4,77	
	09:25	4,69	
	09:50	4,82	
	10:10	4,67	
	11:10	4,69	
	11:20	4,76	
	11:35	4,71	
	12:00	4,69	
	12:30	4,68	
	13:15	4,63	
	13:45	4,68	
	13:45	4,58	

*Tabell 11. pH utvikling under fermentering av fløten ved produksjonsgjentak 2. P2= Produksjonsgjentak 2. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).*

ProveID	Tid	pH	Kommentar
P2D0E	08:20	4,9	Inokulert med syrekultur kl. 16:30 dagen før
	09:00	4,83	
	09:30	4,72	
	10:15	4,71	
	11:00	4,68	
	11:45	4,68	
	11:45	4,55	
P2D0T	08:20	4,94	Inokulert med syrekultur kl. 17:30 dagen før
	09:00	4,8	
	09:30	4,74	
	10:15	4,70	
	11:00	4,71	
	11:45	4,69	
	11:45	4,52	
P2D6E	08:00	4,94	Inokulert med syrekultur kl. 15:00 dagen før
	09:50	4,81	
	11:40	4,59	
P2D6T	08:00	4,70	Inokulert med syrekultur kl. 15:00 dagen før
	09:00	4,63	
	09:20	4,67	
	09:50	4,64	
	10:30	4,60	

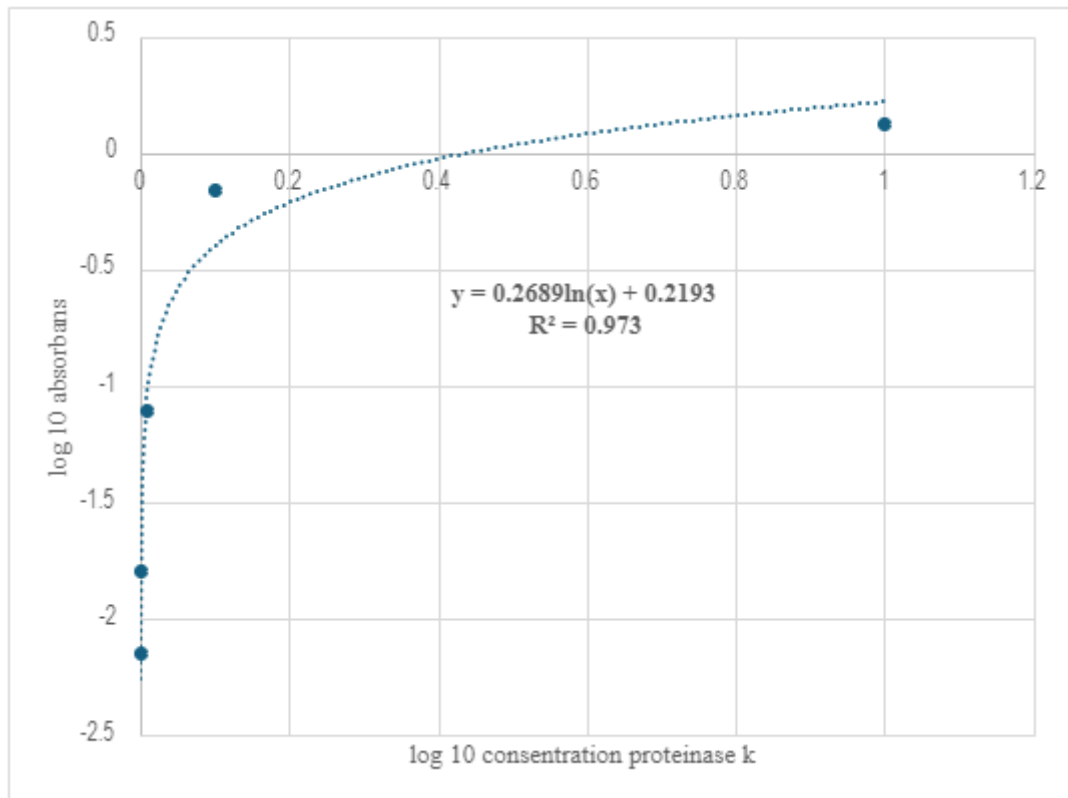
*Tabell 12. pH utvikling under fermentering av fløten ved produksjonsgjentak 3. P3= Produksjonsgjentak 3. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).*

ProveID	Tid	pH	Kommentar
P3D0E	09:50	4,76	Inokulert med syrekultur kl. 18:00 dagen før
	11:40	4,68	
	13:00	4,45	
P3D0T	09:50	4,74	Inokulert med syrekultur kl. 18:00 dagen før
	11:40	4,64	
	12:30	4,51	
P3D6E	08:10	4,79	Inokulert med syrekultur kl. 15:00 dagen før
	09:30	4,80	
	10:30	4,76	
	11:30	4,72	
	12:30	4,65	
	12:45	4,65	
	13:30	4,77	
	14:00	4,69	
P3D6T	08:10	4,80	Inokulert med syrekultur kl. 15:00 dagen før
	09:30	4,77	
	10:30	4,70	
	11:30	4,64	
	12:30	4,7	
	12:45	4,63	
	13:30	4,77	
	14:00	4,69	

Vedlegg 4: Standardkurve proteolytisk aktivitet

Tabell 13. Absorbans ved 440 nm (A440) av fortynningsrekke med proteinase K i UHT melk

Log proteinase K konsentrasjon	Fortynning		A440				Log OD
			1	2	3	OD GJ. Snitt	
10	UHT Melk		0,763	0,403	-0,578	0,196	
1	0	-2	1,265	1,338	1,336	1,337	0,126131407
0,1	-1	-3	0,152	0,748	0,617	0,6825	-0,165897344
0,01	-2	-4	0,006	0,084	0,073	0,0785	-1,105130343
0,001	-3	-5	0,004	0,022	0,01	0,016	-1,795880017
0,0001	-4	-6	0,009	0,054	0,005	0,007	-2,15490196



Figur 36. Standardkurve proteinase K, hvor proteinase K konsentrasjon er plottet mot absorbans.

Vedlegg 5: Anmerkninger og avvik ved sensorisk kvalitetsbedømmelse

Tabell 14. Registrerte anmerkninger og avvik under sensorisk kvalitetsbedømmelse av rømmeprøvene ved 3 ukers lagring. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med *Pseudomonas trivialis* 9 i 6 døgn ved 6 °C. L3= 3 ukers lagring. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

Prøve ID	Dommer	Replikat	Anm. utseende*	Avvik utseende	Anm. konsistens*	Avvik konsistens	Anm. lukt & smak*	Avvik lukt og smak
P1D0L3E	U41452	1	165,00					
P1D0L3E	U41496	1					302	
P1D0L3E	U41944	1	114,00		204;222			
P1D0L3E	U41945	1			201			
P1D0L3E	U42673	1			210		303;329	
P1D0L3E	U42687	1		Litt grov		Litt melen	303	
P1D0L3E	U41944	2			204;222			
P1D0L3E	U41945	2			201;222		329	
P1D0L3E	U42673	2	165,00	Grov	200;201;210		303;329	
P1D0L3E	U42687	2	165,00	Grov		Litt melen		Litt besk
P2D0L3E	U41452	1			202			
P2D0L3E	U41496	1					331	
P2D0L3E	U41945	1			202		331	
P2D0L3E	U42687	1				Litt tynn, løs	310	
P2D0L3E	U41452	2			202;208		331	
P2D0L3E	U41945	2					329	
P2D0L3E	U42687	2				Litt løst kosgel		Ant. bismak
P1D0L3T	U41496	1		Lit grov				
P1D0L3T	U41945	1			201		329	
P1D0L3T	U42673	1	165,00	Grov	200;210			
P1D0L3T	U42687	1		Litt grov		Litt melen		Litt besk
P1D0L3T	U41452	2			202			
P1D0L3T	U41496	2		Grov	222			
P1D0L3T	U41944	2	114,00		210		302	
P1D0L3T	U41945	2			201;222			
P1D0L3T	U42673	2	165,00		210;222			
P1D0L3T	U42687	2		Litt grov		Litt melen		Litt besk
P1D6L3E	U41452	1	165,00		208			
P1D6L3E	U41496	1		Grov		Tykk		
P1D6L3E	U41944	1		Grov	204;210		304	
P1D6L3E	U41945	1	165,00		201;222			
P1D6L3E	U42673	1	165,00	Grov	200;210		303	
P1D6L3E	U42687	1	165,00	Grov	200;210		303	
P1D6L3E	U41452	2	165,00		201;208			
P1D6L3E	U41496	2		Litt grov	200		302	
P1D6L3E	U41944	2	114,00	Grov	200;204;208;222		302;304	

Prøve ID	Dommer	Replikat	Anm. utseende*	Avvik utseende	Anm. konsistens*	Avvik konsistens	Anm. lukt & smak*	Avvik lukt og smak
P1D6L3E	U41945	2	165,00		200;201;222		329	
P1D6L3E	U42673	2	165,00		210;222		303	
P1D6L3E	U42687	2	165,00	Grov	210		303;307	
P2D6L3E	U41946	1		Grov	200;208;222		329	
P2D6L3E	U42687	1		Litt grovt uts.		Litt melen og litt løst koagel	310	
P2D6L3E	U41452	2			208			
P2D6L3E	U41946	2		Grov	200;208;222		329	
P2D6L3E	U42687	2		Litt grovt uts.		Litt melen		Ant. bismak
P3D6L3E	U42673	2					303	
P1D6L3T	U41452	1		Matt, ikke glatt				
P1D6L3T	U41944	1					304	
P1D6L3T	U41945	1			201			
P1D6L3T	U42673	1					303	
P1D6L3T	U42687	1		Litt grov		Litt melen	303	
P1D6L3T	U41452	2			201;210		303	
P1D6L3T	U41944	2	114,00		217		302;304	
P1D6L3T	U41945	2			201;222		329	
P1D6L3T	U42673	2			210		303;329	
P1D6L3T	U42687	2		Litt grov		Litt melen	303	
P2D6L3T	U41452	1					303	
P2D6L3T	U41945	1					329	
P2D6L3T	U41946	1		Grov	210;222		304	
P2D6L3T	U42687	1		Litt grovt utseende	210;222	Tykk		Ant. bismak
P2D6L3T	U41452	2			210			
P2D6L3T	U41946	2		Grov	210;222		329	
P2D6L3T	U42687	2		Litt grovt utseende	222	Tykk, ant. melen		Litt lite frisk
P3D6L3T	U41946	1					306	
P3D6L3T	U41452	1					303	
P3D6L3T	U42673	1					303;310	
P3D6L3T	U41946	2					310	

*114=Utypisk farge, 165=Uhomogen, 200=Klumper, fnokker, 201=Viskøs, 202=Tynn, 204=Fast koagel, 208=Grynet, 210=Melen, 217=Seig, 222=Fast, 302=Skarp sur, 303=Besk, 304=Bitter, 306=Kvalm, 307=Kokt, 310=Bismak, 329= Utypisk, 331=Lite smak

Vedlegg 6: Sensorisk profilering

Tabell 15. Gjennomsnittlig vurdering av rømmeprovener på en skala fra 1-9, samt standardavvik. D0=Rømme produsert fra fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 0 døgn. D6= Rømme produsert fra fløte inokulert med Pseudomonas trivialis 9 i 6 døgn ved 6 °C. L3= 3 ukers lagring. E= Ett-trinns homogenisering (50 bar). T= To-trinns homogenisering (50/30 bar).

Attributt	Prøve ID							
	D0L3E		D0L3T		D6L3E		D6L3T	
	Gj. snitt	Std. avvik	Gj. snitt	Std. avvik	Gj. snitt	Std. avvik	Gj. snitt	Std. avvik
Farge	2,8	0,6	2,6	0,5	2,8	0,6	2,7	0,6
Fnokker/ klumper	1,2	0,4	1,3	0,5	1,9	1,1	1,4	0,7
Blankhet	5,3	1,7	6,0	1,7	4,8	1,0	4,8	1,4
Glatthet	5,6	0,9	6,4	1,1	4,8	1,1	5,2	0,8
Seighet	1,6	0,6	1,9	0,6	1,6	0,7	1,6	0,6
Konsistens	6,3	1,2	6,6	1,1	6,5	0,9	6,5	0,9
Fyldighet/ munnfølelse	5,7	0,7	6,2	0,6	5,8	0,7	5,7	1,1
Melen	1,6	0,6	1,2	0,3	2,0	1,0	1,9	1,0
Sandet	1,1	0,3	1,0	0,0	1,8	1,3	1,3	0,5
Rømmesmak/ aromatisk	5,1	0,7	5,5	0,7	5,1	0,7	5,1	0,7
Syrlighet	5,1	0,7	5,2	0,6	5,2	0,9	5,3	0,6
Søthet	1,8	0,4	1,8	0,4	1,8	0,4	1,8	0,4
Friskhet	5,0	0,7	5,2	0,8	5,0	0,9	5,1	0,7
Besk/ bitter smak	1,3	0,6	1,2	0,3	1,7	1,0	1,9	1,0
Oksidert smak	1,1	0,1	1,1	0,2	1,1	0,1	1,0	0,1
Bismak	1,1	0,2	1,1	0,3	1,3	0,5	1,1	0,2



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway