

Samenvatting

Chemische analyses zijn een belangrijke techniek voor het toezicht houden op de kwaliteit van levensmiddelen. Eén van de snelste en makkelijkste chemische analyses die met dit doel wordt toegepast is gebaseerd op headspace analyse van vluchtige componenten. Het is aangetoond dat het analyseren van vluchtige componenten bruikbaar is voor de kwaliteitsborging van een groot scala aan levensmiddelen. Headspace analyse van melk en melkproducten ten behoeve van kwaliteitsborging is eerder uitgevoerd met verschillende technieken, zoals toegelicht in hoofdstuk 2. Alhoewel deze eerdere studies hebben gefocust op (verhitte) melkproducten, zou ook verandering van de kwaliteit van rauwe melk mogelijk op basis van vluchtige componenten bepaald kunnen worden. Naast veranderingen in rauwe melk kwaliteit, zouden dierziekten mogelijk ook gedetecteerd kunnen worden in melk. De meest voor de hand liggende dierziekte om te bestuderen is mastitis, omdat hierbij pathogenen betrokken zijn die mogelijk op basis van hun vluchtige componenten geïdentificeerd kunnen worden. In dit proefschrift worden zowel kwaliteitsborging van rauwe melk als identificatie van mastitis pathogenen beschreven.

Hoofdstuk 3 beschrijft de geschiktheid van de headspace analyse voor toezicht op de kwaliteit van rauwe koemelk. Het herkennen van verschillende kwaliteitsgebreken veroorzaakt door diervoeding, microbiologische en chemische contaminatie, en enzymatische afbraak zijn bestudeerd. Verse rauwe melk zonder kwaliteitsgebreken bleek altijd dezelfde 7 vluchtige componenten te bevatten. Ook werd aangetoond dat behandelingen zoals verhitten en homogeniseren van rauwe melk dit patroon sterk veranderden, resulterend in een tot 10 maal groter aantal vluchtige componenten. De groei van *Pseudomonas* kon niet in een vroeg stadium worden gedetecteerd met de headspace analyse. Diervoeding had een invloed op de vluchtige componenten indien specifieke plantaardige producten werden gevoerd. Chloroform contaminatie kan worden gekwantificeerd, net als de mate van lipolyse door bepaling van het gehalte vrije vetzuren. Voor het kwantificeren van zowel chloroform als lipolyse was de gevoeligheid en reproduceerbaarheid van de methode voldoende voor kwaliteitsborging. De methode was dus in staat verschillende kwaliteitsgebreken in één analyse te bepalen en is daardoor een nuttige aanvullende methode voor kwaliteitsborging van rauwe melk. De mogelijkheid om mastitis pathogenen te identificeren op basis van hun vluchtige metabolieten is beschreven in hoofdstuk 4. Melkmonsters van koeien met mastitis veroorzaakt door *Staphylococcus aureus*, coagulase-negatieve staphylococci (CNS), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* en *Escherichia coli* werden verzameld. Ook monsters van koeien zonder klinische mastitis en met een laag celgetal werden ter vergelijking verzameld. Alle mastitis melkmonsters werden onderzocht met klassiek bacteriologisch onderzoek gevolgd door headspace analyse. Melk van bacteriologisch-negatieve monsters bevatte veel minder vluchtige componenten in vergelijking met melk van kwartieren met mastitis. Als gevolg van variatie binnen groepen was vergelijking tussen groepen onvoldoende voor classificatie op basis van univariate statistiek. Daarom werd een neurale netwerk getraind voor het identificeren van de pathogenen in melkmonsters op basis van hun vluchtige metabolieten. Een probabilistisch neurale netwerk (PNN) was het type neurale netwerk dat is toegepast voor dit onderzoek. Het getrainde PNN kon foutloos het onderscheid maken tussen ongeïnficeerde en geïnficeerde kwartieren. Bij het vergelijken van pathogenen bleek *Staph. aureus* een sterk afwijkend patroon van vluchtige metabolieten te vormen ten opzichte van de andere monsters. Monsters met CNS en *E. coli* verschilden voldoende van de andere monsters om ze te identificeren. De 2 soorten Streptokokken verschilden niet significant van elkaar maar konden als groep wel onderscheiden worden van de andere pathogenen. Vijf groepen kunnen dus onderscheiden worden op basis van vluchtige metabolieten: *Staph. aureus*, CNS, Streptokokken (*Strep. uberis* en *Strep. dysgalactiae* als groep), *E. coli* en ongeïnficeerde kwartieren. Omdat de oorsprong van de vluchtige metabolieten beschreven in hoofdstuk 4 onbekend is werd de vorming van vluchtige componenten door mastitis pathogenen in geïnoculeerde melk van gezonde koeien onderzocht, zoals beschreven in hoofdstuk 5. De vluchtige componenten in geïnoculeerde monsters werden vergeleken met die in mastitis monsters waaruit het pathogeen geïsoleerd was dat gebruikt was voor inoculatie. De meeste metabolieten die gevonden werden in geïnoculeerde monsters waren dezelfde als in mastitis monsters, zowel in aanwezigheid als in hoeveelheid. Voorspelling door het PNN toonde aan dat de overeenkomst tussen geïnoculeerde monsters en mastitis monsters groot genoeg was voor de correcte voorspelling van het mastitis veroorzakende pathogeen in geïnoculeerde monsters. Het belangrijkste verschil tussen de geïnoculeerde monsters en mastitis monsters was de afwezigheid van ethylesters van vrije vetzuren in de geïnoculeerde monsters. Een mogelijke verklaring hiervoor ligt in de verstoring van de melk-bloed barrière bij koeien met mastitis, waardoor esterase van het koeienbloed naar de melk kan komen.

Tijdens de proef beschreven in hoofdstuk 4 waren de monsters overnacht geïncubeerd. Om de totale analysetijd te minimaliseren zou geen incubatie, of een korte incubatie, de voorkeur verdienen. Daarom werd het effect van de incubatietijd op de vorming van vluchtige metabolieten in mastitis monsters bestudeerd, zoals

beschreven in hoofdstuk 6. Een selectie van de 6 vluchtige metabolieten met de hoogste impact op het PNN voor mastitis pathogeen identificatie zijn vergeleken bij 6 incubatietijden tussen 0 en 24 uur. Zonder incubatie kon geen verschil worden aangetoond tussen de pathogenen, waaruit geconcludeerd werd dat incubatie noodzakelijk is voor pathogeen identificatie. De minimale incubatietijd voordat de meeste van de 6 vluchtige metabolieten gedetecteerd kon worden was 4 tot 8 uur. Een langere incubatietijd had als voordeel dat de verschillen tussen de pathogenen toenamen. Het minimaliseren van de incubatietijd is echter belangrijk voor praktische toepassing van de methode. Omdat na 8 uur alle metabolieten konden worden gedetecteerd werd 8 uur gekozen als optimale incubatietijd. Deze optimale incubatie tijd werd geëvalueerd met een set van 25 mastitis monsters, waarvan 88% goed werd geclassificeerd na 8 uur incubatie.

De belangrijkste conclusies van het onderzoek beschreven in dit proefschrift zijn:

- Verse rauwe melk zonder kwaliteitsgebreken bevat altijd dezelfde 7 vluchtige componenten. Headspace analyse kan gebruikt worden voor het detecteren van het voeren van specifieke plantaardige bijproducten en daarnaast voor de kwantificering van de mate van lipolyse en de hoeveelheid chloroform. Headspace analyse is dus in staat verschillende kwaliteitsgebreken te detecteren met een enkele analyse en is daarom een nuttige aanvullende methode voor kwaliteitsborging van rauwe melk.
- Vluchtige metabolieten in de melk van kwartieren die besmet zijn met mastitis pathogenen verschillen significant van de metabolieten gevonden in melk van ongeïnfecteerde kwartieren.
- Verschillende pathogenen vormen verschillende patronen van vluchtige metabolieten. Met een probabilistisch neurale netwerk kunnen mastitis veroorzakende pathogenen worden geïdentificeerd op basis van dit patroon van vluchtige metabolieten.
- Met uitzonder van ethyl esters word het patroon van vluchtige metabolieten gevormd in mastitis monsters ook gevormd in met mastitis pathogenen geïnoculeerde melkmonsters. Het probabilistisch neurale netwerk identificeerde het geïnoculeerde pathogeen correct. Dit laat zien dat geïnoculeerde monsters als model kunnen dienen voor mastitis monsters in headspace analyse.
- Incubatie is een noodzakelijke stap voorafgaande aan de analyse vluchtige componenten ten behoeve van de mastitis pathogeen identificatie. Omdat na 8 uur incubatie alle metabolieten gedetecteerd konden worden werd 8 uur geselecteerd als optimale incubatietijd.