

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## Forord

Denne oppgaven er skrevet i samarbeid med Stabburet og ble gjennomført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap ved Universitet for Miljø- og Biovitenskap. Råvarer og økonomisk støtte er gitt av Stabburet AS.

I løpet av prosessen med denne oppgaven har jeg hatt to veiledere, en intern og en ekstern. Intern veileder har vært Hilde Marit Østlie (UMB) og ekstern veileder har vært Ida Henriksen (Stabburet). Jeg vil rette en stor takk til begge to; Hilde for uvurderlige råd, konstruktive tilbakemeldinger samt stor tålmodighet og Ida for å bistå med alt jeg måtte trenge av informasjon vedrørende produkt og produksjon. Oppgaven hadde ikke vært mulig å gjennomføre uten at begge hadde avsatt tid og resurser til dette.

Det er selvsagt flere personer som har bidratt til at jeg med denne oppgaven kan avslutte 5 innholdsrike og uforglemmelige år ved UMB. Disse er Therese Faye for hjelp ved planlegging av forsøk samt korrektur på resultatpresentasjon, og Zhian Salehian meget god hjelp på laboratoriet. Ved å sørge for at utstyr og kjemikalier har blitt skaffet til veie, i tillegg til praktiske råd og godt humør, har damene på laboratoriet vært til stor hjelp. Blant disse, en særlig takk til May Aalborg!

Avslutningsvis vil jeg takke Hankattforeningen st. 1902 v/Administrerende Direktør for Kulturelle avbrekk i en hektisk hverdag samt venner, familie og kjæreste for oppmuntring og motivasjon.

Tusen takk til dere alle sammen!!!

Ås 10. mai 2013

Bjørn Ingvaldsen

## Sammendrag

Det er flere indre faktorer i maten som kan påvirke vekst av mikroorganismer. Slike faktorer kan være pH, vannaktivitet, tilsetningsstoffer, reduksjons-oksidasjonspotensiale og naturlige komponenter i maten som enten hemmer eller fremmer vekst. I tillegg til indre faktorer, finnes det ytre faktorer som påvirker mikrobiell vekst. Blant disse inngår relativ fuktighet, atmosfære og temperatur.

Intensjonen med denne oppgaven var å kartlegge og beskrive bakteriologiske endringer som skjer under lagring av fersk pizza i modifisert atmosfære (i dette tilfelle Dagens Pizza m/kjøttdeig, bacon og løk). Pizzaen var pakket i modifisert atmosfære (40 % CO<sub>2</sub>, 60 % N<sub>2</sub>) og hadde oppgitt holdbarhet på 21 dager. Analyser ble utført på pizza fra 3 separate produksjonsdager. Pizzaene ble lagret ved 4 °C, 1,5 t 20 °C/4 °C, 6 °C og 8 °C. Pizza fra siste produksjonsdag ble i tillegg til nevnte lagringstemperaturer lagret ved 2 °C. Første uttak til mikrobiologiske analyser ble utført 1 dag etter produksjon. Deretter ble det gjort uttak etter 10, 15, 18, 21 og 25 dagers lagring av pizza fra alle produksjonsdager.

Følgende mikrobiologiske analyser ble utført: Aerobt mesofilt celletall, psykrotroft celletall, melkesyrebakterier, mugg/gjær, koliforme bakterier, *Bacillus cereus* og *Listeria monocytogenes*. I tillegg til mikrobiologiske analyser ble det registrert pH i samtlige pizzaer og det ble utført en analyse av modifisert atmosfære for pizza lagret ved 6 °C. Avslutningsvis ble det gjort et forsøk på å identifisere mikrobiell flora ved å identifisere et utvalg kolonier ved hjelp av både klassiske og molekylære metoder.

Etter 21 dagers lagring var aerobt mesofilt celletall for høyt med hensyn på akseptabel kvalitet i alle pizzaene og det ble observert store variasjoner mellom de forskjellige produksjonsdagene både med hensyn på kintall og mugg/gjær. Aerobt mesofilt celletall viste akseptabelt nivå etter 15 dagers lagring ved 4 °C for produksjonsdato 15.10.12 og 22.10.12, mens pizza med produksjonsdato 05.11.12 viste ikke tilfredsstillende kvalitet allerede ved første uttak ( $7,15 \cdot 10^5$  CFU/g). Aerobt mesofilt celletall og antall melkesyrebakterier var relativt likt for alle pizzaer ved alle uttak og lagringsbetingelser.

Koliforme bakterier ble registrert i pizza med produksjonsdato 05.11.12 etter lagring i 21 og 25 dager ved 4 °C. I pizza lagret ved 4 °C med produksjonsdato 15.10.12 og 22.10.12 ble det ikke registrert koliforme bakterier. Totalt ble det registrert koliforme bakterier i 8 pizzaer. Det ble videre identifisert *Bacillus cereus* i en pizza og *Listeria monocytogenes* i 5 pizzaer, hvor to av disse var pizzaer lagret ved 4 °C (produksjonsdato 15.10.12 og 05.11.12 lagret i henholdsvis 16 og 23 dager).

Med hensyn på modifisert atmosfære ble det registrert en økning i andel CO<sub>2</sub> gjennom lagringstiden. I løpet av lagringstiden ble det observert en reduksjon i pH, hvor reduksjonen var størst i pizza lagret ved 8 °C.

Ved identifisering av mikrobiell flora var samtlige utvalgte isolat (med unntak av 1 isolat) katalase negative og Gram- positive. 16S/18S rDNA sekvensering identifiserte alle bakterier som melkesyrebakterier, mens alle eukaryote ble identifisert som gjær.

## Abstract

There are several intrinsic factors in the food that may affect the growth of microorganisms. Such factors include pH, water activity, food additives, reduction-oxidation potential and natural components in food that either inhibit or promote growth. In addition to intrinsic factors, there are extrinsic factors that also affect microbial growth. They include relative humidity, atmosphere and temperature.

The intention of this study was to identify and describe the bacteriological changes occurring during storage of fresh pizza in modified atmosphere (in this case Dagens Pizza with ground beef, bacon and onions). The pizza was packed in modified atmosphere (40% CO<sub>2</sub>, 60% N<sub>2</sub>) and with shelf life of 21 days. Analyses were performed on pizza from three separate production days. The pizzas were stored at 4 °C, 1,5 h 20 °C /4 °C, 6 °C and 8 °C. Pizza from the last production day was in addition to the aforementioned storage temperatures stored at 2 °C. The first microbiological sampling was performed 1 day after production, with further sampling after 10, 15, 18, 21 and 25 days.

The following microbiological analyzes were performed: Aerobic mesophilic cell count, psychrotrophic cell count, lactic acid bacteria, moulds/yeasts, coliform bacteria, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. In addition to the microbiological analyzes, pH was recorded in all pizzas and changes in the modified atmosphere for pizzas stored at 6 °C were also recorded. Finally, both classical and molecular techniques were used on a selection of isolates to identify the microbial flora in the pizza.

Aerobic mesophilic cell count was too high (with respect to acceptable quality) in all the pizzas after 21 days of storage, and it was observed wide variations between the different production days regarding plate counts and moulds/yeasts numbers. Aerobic mesophilic cell count showed acceptable levels after 15 days of storage at 4 °C for pizzas with production date 15.10.12 and 22.10.12, while pizza produced 05.11.12 showed unsatisfactory quality at first sampling ( $7,15 \cdot 10^5$  CFU/g). Aerobic mesophilic cell count and the number of lactic acid bacteria were relatively similar for all pizzas at all samplings and storage conditions.

Coliform bacteria were detected in two pizzas with production date 05.11.12 (storage for 21 and 25 days at 4 °C). Pizza stored at 4 °C with production date 15.10.12 and 22.10.12 was free from coliform bacteria. Totally it was registered coliform bacteria in 8 pizzas. It was further identified *Bacillus cereus* in one pizza and *Listeria monocytogenes* in 5 pizzas, where two of these were pizzas stored at 4 °C (production date 15.10.12 and 05.11.12 stored for 16 and 23 days, respectively).

With respect to modified atmosphere it was registered an increase in the proportion of CO<sub>2</sub> during the storage period. During the storage period a decrease in pH was observed, with greatest reduction in pizza stored at 8 °C.

When identifying the microbial flora, all of the selected isolates (with the exception of one isolate) were catalase negative and Gram positive. 16S/18S rDNA sequencing identified all bacteria as lactic acid bacteria, while all eukaryotes were identified as yeasts.

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Innledning .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Teori.....</b>	<b>3</b>
2.1 Mat som vekstmedium.....	3
2.2 Indre faktorer som påvirker vekst.....	3
2.2.1 pH.....	3
2.2.2 Vannaktivitet.....	4
2.2.3 Redokspotensiale, $E_h$ .....	6
2.2.4 Tilsetningsstoffer .....	8
2.2.5 Naturlige barrierer i mat.....	9
2.3 Ytre faktorer som påvirker vekst .....	11
2.3.1 Temperatur .....	11
2.3.2 Atmosfære.....	13
2.3.3 Relativ fuktighet.....	15
2.4 Konkurransen.....	16
2.5 Vekstkurver .....	16
2.6 Klassisk mikrobiologi og begrensninger .....	17
2.7 Indikatororganismer.....	19
2.8 Identifisering av mikrobiell flora (tradisjonelle metoder) .....	21
2.8.1 Katalasetest .....	21
2.8.2 Gramfarging .....	21
2.9 Identifisering av mikrobiell flora (molekylære metoder).....	21
2.9.1 16s ribosomal RNA, 16s rRNA .....	21
2.9.2 Polymerase Chain Reaction, PCR.....	22
2.9.3 Gel elektroforese .....	23
2.10 Hygieniske krav og retningslinjer.....	23
<b>3. Materialer og metoder .....</b>	<b>24</b>
3.1 Bedriftsbesøk .....	24
3.2 Pizza.....	24
3.2.1 Sammensetning og spesifisering .....	24
3.2.2 Holdbarhet.....	25
3.3 Analyseplan .....	25

3.3.1 Lagringsbetingelser .....	25
3.3.2 Ulike produksjoner.....	26
3.3.3 Uttaksplan .....	26
3.4 Analyser av pizza.....	26
3.4.1 Prøveuttak .....	26
3.4.2 Mikrobiologiske analyser.....	26
3.4.3 Gassmålinger.....	28
3.4.4 pH.....	29
3.5 Identifisering av mikrobiell flora.....	29
3.5.1 Isolering av mikroorganismer .....	29
3.5.2 Tradisjonelle metoder .....	31
3.5.3 Molekylær identifisering.....	31
<b>4. Resultater .....</b>	<b>36</b>
4.1 Bedriftsbesøk Stranda.....	36
4.2 Mikrobiologiske analyser .....	37
4.2.1 Pizza produsert 15.10.12.....	37
4.2.2 Pizza produsert 22.10.12.....	41
4.3.3 Pizza produsert 05.11.12.....	46
4.3.4 Sammenligning alle produksjonsdager .....	50
4.3 MAP måling .....	53
4.4 pH .....	54
4.5 Identifisering av mikrobiologisk flora (klassiske metoder).....	55
4.5.1 Katalasetest og Gramfarging.....	55
4.6 Identifisering av mikrobiologisk flora (16S/18S rDNA sekvensering).....	56
4.6.1 PCR.....	56
4.6.2 16S/18S rDNA sekvensering .....	58
<b>5. Diskusjon.....</b>	<b>59</b>
5.1 Bedriftsbesøk på stranda.....	59
5.2 Analyseplan og lagringsbetingelser.....	60
5.3 Mikrobiologiske analyser .....	61
5.3.1 Kimtall (mesofile og psykrotrofe bakterier) .....	61
5.3.2 Melkesyrebakterier.....	63
5.3.4 Mugg og gjær.....	65



5.3.5 Koliforme bakterier.....	66
5.3.6 <i>Bacillus cereus</i> og <i>Listeria monocytogenes</i> .....	66
5.3.7 Variasjon mellom produksjonsdager .....	67
5.4 Endring – MAP.....	67
5.5 Endring – pH .....	69
5.6 Identifisering av mikrobiell flora.....	70
5.6.1 Utvelgning av kolonier og isolering av mikroorganismer .....	70
5.6.2 Katalasetest og Gramfarging.....	70
5.6.4 Sekvensering .....	71
<b>6. Videre arbeid .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Referanser .....</b>	<b>75</b>
<b>8. Vedlegg .....</b>	<b>77</b>
8.1 Elektroniske vedlegg .....	77

# 1. Innledning

Maten vi spiser er sjelden steril; den inneholder enten mikroorganismer som finnes naturlig på råvarene eller mikroorganismer som har blitt tilført i løpet av bearbeiding og produksjon. I de fleste tilfeller kan maten konsumeres trygt og uten tanke på mikrobiologisk aktivitet, mens i andre tilfeller kan maten påvirkes betraktelig. Mikroorganismer i mat kan forårsake forråtnelse, de kan forårsake matbåren sykdom og deres egenskaper kan benyttes til å gi produktet en særegen smak som ved fermentering av melk (Adams & Moss 2008).

Bakgrunn for denne oppgaven er Stabburets satsing på kjølt pizza. Dette startet med oppkjøp av Dagens i 2011; en liten fabrikk på Nærbø hvor en vesentlig del av produksjonen var kjølt pizza. Produksjon på Nærbø ble avsluttet april 2012 og flyttet til Stranda med oppstart av ordinærproduksjon juni 2012. Dette bidraget vil forhåpentligvis være viktig for Stabburets videre arbeid med å få en bedre forståelse for området kjølt pizza. Pizza, som det ble utført forsøk på i denne oppgaven, var Dagens Pizza med kjøttdeig, bacon og løk med oppgitt holdbarhet på 21 dager.

Hensikten med denne oppgaven er å kartlegge og beskrive de bakteriologiske endringer som skjer under lagring av fersk pizza i modifisert atmosfære og hvilken effekt ulike lagringstemperaturer har på den mikrobiologiske veksten. For å undersøke om emballasjen som benyttes er tett og om gass-sammensetning endres i løpet av lagringstiden, vil det i tillegg bli utført en analyse av den modifiserte atmosfæren. Avslutningsvis ble det gjort et forsøk på å identifisere mikrobiell flora ved å identifisere et utvalg kolonier ved hjelp av både klassiske og molekylære metoder.

Denne oppgaven ble valgt først og fremst fordi den ble funnet meget relevant i forhold til det jeg kan tenke meg å jobbe med i fremtiden. Jeg så muligheten til å jobbe selvstendig med noe som virkelig interesserer meg, og samtidig oppsummere 5 års studier ved UMB i en veldig konkret oppgave. Stabburet er en sentral aktør i norsk næringsmiddelindustri som i likhet med alle andre er avhengig av høy kvalitet på deres produkter. At denne oppgaven kan bidra til en bedre forståelse for området kjølt pizza, er en ekstra motivasjon for gjennomføring av oppgaven.

Det antas at pizzaene er produsert forskriftsmessig, og at eventuell vekst av mikroorganismer skyldes forhold utenom selve produksjonen. Ved diskusjon av resultater tas det kun hensyn til de observasjoner som ble gjort i løpet av dette studiet.

## 2. Teori

### 2.1 Mat som vekstmedium

Mat er godt egnet som vekstmedium for mikroorganismer. I likhet med andre levende organismer er de avhengig av at deres miljø kan imøtekomme spesifikke behov og tilveiebringe essensielle næringsstoffer for vekst. Næringsstoffer som karbohydrater, lipider, proteiner, vitaminer og mineraler er like viktige for mikroorganismer som de er for oss. Blant mikroorganismer finnes det variasjon i evnen til å nytte seg av disse næringsstoffene. Varierende evne til å utnytte ulike nitrogenkilder til syntese av proteiner gjør at enkelte mikroorganismer må ha spesielle aminosyrer tilstede i substratet for å kunne vokse, hvilket også gjelder for vitaminer (Rushing et al. 2013). På samme måte som maten skal dekke våre elementære behov for næringsstoffer, kan den gjøre det for mikroorganismer. Mange typer mat er derfor meget gode vekstmedium for mikroorganismer (Adams & Moss 2008).

### 2.2 Indre faktorer som påvirker vekst

Det er flere indre faktorer i maten som kan påvirke vekst av mikroorganismer. Slike faktorer kan være pH, vannaktivitet, tilsetningsstoffer, reduksjons-oksidasjonspotensiale og naturlige komponenter i maten som enten hemmer eller fremmer vekst. Hver av de nevnte faktorene vil belyses ytterligere i påfølgende avsnitt.

#### 2.2.1 pH

Av indre faktorer som påvirker vekst av mikroorganismer, er pH den viktigste. For å hindre irreversibel denaturering av proteiner, er det viktig at mikroorganismenes intracellulære pH ( $pH_i$ ) holdes stabil over en kritisk grense. Cellen benytter flere mekanismer for å beskytte seg mot endringer i pH, og mekanismene kan variere mellom ulike organismer. I hovedsak går responsen ut på å hindre protoner i å komme inn i cellen, pumpe protoner ut fra cellen, reparere eventuelle skader forårsaket av lav pH eller syntetisere proteiner som tåler lav pH uten å denaturere (Foster 2001). Type respons vil variere med grad av surhet; «homeostatisk respons» hjelper cellen til å opprettholde  $pH_i$  ved svakt sure omgivelser ( $pH >6$ ), «syretoleranserespons» vil aktiveres ved medium sure omgivelser ( $pH 5,5-6$ ), mens syntese av «syresjokkproteiner» vil aktiveres ved sure omgivelser ( $pH 3-5$ ) (Montville & Matthews 2007).

«Homeostatisk respons» er den mildeste av de nevnte tre responser, og trigges dersom omgivelser rundt cellen blir svakt sure ( $\text{pH} > 6$ ). Respons baserer seg på en allosterisk modulering av cellens protonpumper, antiportere og symportere slik at aktiviteten økes og protoner pumpes ut av cellen i en større grad en tidligere. Homeostatisk responsmekanisme er konstitutiv og fungerer i nærvær av proteinsynteseinhibitorer. «Syretoleranserespons» aktiveres ved  $\text{pH} 5,5-6$  og kan opprettholde  $\text{pH}_i > 5$  ved  $\text{pH}$  i omgivelser helt ned mot 4. Mekanismer og  $\text{pH}$  som trigger respons varierer mellom ulike organismer (Montville & Matthews 2007). Studier har vist at dersom celler i logfase eksponeres for middels sure omgivelser ( $\text{pH} 5-6$ ) i 30-60 minutter, vil disse danne toleranse for lav  $\text{pH}$  (helt ned mot  $\text{pH} 3$ ). Beskyttelse mot lav  $\text{pH}$  varte i minst to timer og krevde syntese av nye proteiner i adapteringsfasen. Studier har videre vist at celler i stasjonær fase er mer syretolerante enn celler i log fase, selv uten adaptering til omgivelser med lav  $\text{pH}$ . Celler i stasjonær fase kan også adapteres til miljøer med lav  $\text{pH}$ , da ved syntese av nye proteiner. Dette gir fire nivåer syretoleranse (presentert etter økende syretoleranseevne): celler i log fase, syreadapterte celler i log fase, celler i stasjonær fase og syreadapterte celler i stasjonær fase (Foster 2001).

Syreadapteringsresponsen kan gi organismen beskyttelse mot andre stressfaktorer. For eksempel er syreadaptert *E. coli* O157:H7 mer motstandsdyktig mot varme og kulde, mens syreadapterte *L. monocytogenes* viser økt motstandsdyktighet mot varmesjokk, osmotisk stress, alkohol og nisin (Montville & Matthews 2007).

### **2.2.2 Vannaktivitet**

Nærmest alle prosesser som finner sted i biologiske systemer er avhengig av vann. Vann løser opp og hydratiserer kjemiske forbindelser slik at disse gjøres tilgjengelig for biologiske systemer (Schiraldi et al. 2012). Kjemiske og biologiske reaksjoner i cellen finner sted i et vandig miljø inne i cytoplasma som er omgitt av en semipermeabel cellemembran. Cellemembranen er en effektiv barriere mot flere forbindelser, med unntak av blant annet vann som fritt kan vandre over membranen. Den dynamiske flyten av vann inn og ut av cellen er vanligvis i likevekt, og systemet blir kun stresset dersom det skjer en netto transport av vann inn eller ut av cellen (Adams & Moss 2008).

Vannets frysepunkt og kokepunkt representerer henholdsvis minimumstemperatur og maksimumstemperatur for hvor det er mulig for biologisk liv å vokse. Ved temperaturer utover dette intervallet, har ikke vannet lenger de egenskapene som gjør vann til en essensiell

faktor for biologisk vekst. Frysepunkt og kokepunkt kan manipuleres ved å løse et stoff i vannet, eller øke det hydrostatiske trykket. Dersom frysepunktet senkes, senkes også minimumstemperatur for biologisk vekst. Høyt antall flerumettede fettsyrer i cellemembranen, og tilstedeværelse av blant annet flerverdige alkoholer i cytoplasma, gjør det mulig for enkelte organismer å vokse ved temperaturer under 0 °C. Tilsvarende har man i undersjøiske vulkaner, hvor trykket er høyt, funnet mikroorganismer som kan vokse ved temperaturer over 100 °C (Adams & Moss 2008).

Selv om cytoplasma må være flytende for at cellen skal kunne vokse, kan vann i omgivelser rundt cellen foreligge i ulike faser. En nyttig parameter, som hjelper oss å forstå bevegelse av vann mellom omgivelser rundt cellen og cytoplasma er vannaktivitet,  $a_w$ . Med vannaktivitet menes tilgjengelig vann. Vannaktiviteten til et substrat er definert som vandamptrykket i atmosfæren over et substrat (P) dividert på damptrykket av rent vann ( $P_0$ ) ved en gitt temperatur. Vannaktivitet kan derfor bestemmes ved å måle relativ fuktighet over substratet dersom dette befinner seg i et lukket kammer og er i likevekt med omgivelsene. Dersom relativ fuktighet måles til 0,9 vil vannaktiviteten tilsvarende være 0,9 (Adams & Moss 2008).

Vannaktivitet er en egenskap som påvirkes av antall løste molekyler i løsningen, og ikke størrelsen på disse. Derfor vil en forbindelse som natriumklorid redusere vannaktiviteten mer enn sukrose dersom disse tilsettes løsningen i samme mengde. Dette fordi en natriumkloridløsning vil foreligge som  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  dersom løsningen ikke er mettet. En parameter relatert til vannaktivitet er osmotisk trykk. Osmose er en prosess som fører til at forskjell i konsentrasjon mellom to løsninger utjevnes ved at forbindelser i løsningen vandrer mot lavere konsentrasjon. Trykket som kreves for å stoppe denne diffusjonen er tilsvarende det osmotiske trykket; molekyler i en løsning øver altså et osmotisk trykk (Adams & Moss 2008).

Fordi cytoplasma er en vandig løsning med lavere vannaktivitet enn rent vann, vil bakterier i rent vann oppleve at vann strømmer gjennom membranen og inn i cellen. Dersom cellen ikke er i stand til å takle dette, vil cellen svulle og i verste fall sprekke (lysere). Ulike mikroorganismer takler dette forskjellig, og det er en sterk cellevegg som gjør at Gram positive bakterier takler dette bedre enn Gram negative bakterier. Tilsvarende vil bakterier oppleve en netto transport av vann ut av cellen dersom konsentrasjon av løste stoffer i løsning rundt cellen er høyere enn inne i cytoplasma. For å motvirke dette må cellen sørge for at det

osmotiske trykket inne i cytoplasma er høyere enn i omgivelsene rundt cellen, noe den gjør ved å starte produksjon av løselige forbindelser som vil redusere vannaktiviteten. Det er viktig at disse forbindelsene ikke påvirker andre funksjoner i cellen (Adams & Moss 2008).

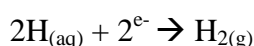
Vannaktivitet er en effektiv barriere som bestemmer hvilke mikroorganismer som kan vokse i et næringsmiddel. Mest sensitive for lav vannaktivitet er de fleste Gram-negative bakterier som krever minimum vannaktivitet på 0,9 for å kunne vokse. På andre enden av skalaen finnes enkelte xerofile sopper som kan vokse ved vannaktivitet helt ned mot 0,6. Tabell 1 viser en oversikt over minimum vannaktivitet påkrevd for ulike grupper mikroorganismer.

Tabell 1. Oversikt over gruppe mikroorganismer og minimum vannaktivitet påkrevd av disse for vekst (Adams & Moss 2008; Barbosa-Canovas et al. 2007).

Gruppe mikroorganisme	Minimum $a_w$
De fleste Gram-negative bakterier	0,97
De fleste Gram-positive bakterier	0,90
De fleste gjærarter	0,88
De fleste sopparter	0,80
Halofile bakterier	0,75
Xerofile sopp, osmofile gjær	0,60
Ingen vekst	< 0,60

### 2.2.3 Redokspotensiale, $E_h$

En redoksreaksjon er en kjemisk reaksjon hvor en forbindelse blir oksidert samtidig som en annen blir redusert. En forbindelse blir oksidert dersom den gir fra seg elektroner til en annen forbindelse, eller ved reaksjon med oksygen (Jay, J. M. 2000). Standard reduksjonspotensial er et kvantitativt mål for en forbindelses evne til å bli redusert, hvor halvreaksjonen



brukes som referanse med standard reduksjonspotensial  $E_h = 0$ . Redokspotensiale til et næringsmiddel er positivt dersom flertallet av forbindelser i substratet foreligger i oksidert form, og negativt dersom flertallet av forbindelser foreligger i redusert form (Adams & Moss 2008).

I et næringsmiddel er det flere faktorer som påvirker  $E_h$ . De viktigste er redokspar til stede, forholdet mellom oksidant og reduktant, pH, tilgjengelig oksygen og mikrobiologisk aktivitet (Adams & Moss 2008). Blant forbindelser som bidrar til et reduserende miljø i næringsmidler er SH-grupper i kjøtt, askorbinsyre og reduserende sukker i frukt og grønnsaker. Faktorer som bidrar til et oksiderende miljø er blant annet tilgang på oksygen i atmosfæren eller i næringsmiddelet (Jay, J. M. 2000). Ved å hakke, male eller kutte en råvare vil tilgang på oksygen i produktet økes og med det produktets  $E_h$  (Adams & Moss 2008).

Det elektroniske potensialet mellom to forbindelser måles i millivolt (mV), hvor en høy positiv verdi indikerer at den oksiderte forbindelsen er en sterk oksiderende forbindelse, og tilsvarende at en høy negativ verdi indikerer en sterk reduserende forbindelse. Dersom konsentrasjonen av oksiderende forbindelser er lik konsentrasjonen av reduserende forbindelser, er næringsmiddelets redokspotensiale lik null (Jay, J. M. 2000).

Redokspotensialet i et næringsmiddel er en effektiv barriere som virker bestemmende for hvilke mikroorganismer som kan vokse der. Obligat aerobe mikroorganismer benytter oksidativ fosforylering til å generere energi, hvor oksygen er siste forbindelse som mottar elektroner i elektrontransportkjeden, og krever derfor et oksygenrikt miljø med positivt redokspotensiale (Adams & Moss 2008). Obligat anaerobe mikroorganismer vokser kun ved lavt eller negativt redokspotensiale da disse benytter fermentering for å generere energi. Ofte er pyruvat siste elektronmottaker som reduseres til melkesyre når den mottar elektron fra NADH (Montville & Matthews 2007). Pyruvat har langt lavere reduksjonspotensiale enn oksygen (Adams & Moss 2008). Enkelte aerobe mikroorganismer krever et svakt reduserende miljø for å kunne vokse, og disse blir referert til som mikroaerofile. Fakultativt anaerobe mikroorganismer kan vokse uavhengig av om miljøet er oksiderende eller reduserende (Jay, J. M. 2000).

I tillegg til å påvirke redokspotensialet er oksygen giftig for flere anaerobe mikroorganismer. Fordi disse mangler enzymene katalase og superoksid dismutase er de ikke i stand til å uskadeliggjøre giftige oksygenprodukter som hydrogenperoksid og superoksidanion radikal. Superoksidanion radikal er et radikal som dannes når molekylært oksygen reduseres med et elektron. Superoksid dismutase katalyserer reaksjonen hvor superoksidanion radikal og hydrogen danner hydrogenperoksid og oksygen, mens katalase benyttes til å omdanne hydrogenperoksid til vann og oksygen (Adams & Moss 2008).



Enkelte anaerobe mikroorganismer er aerotolerante. De genererer mer energi dersom små mengder oksygen er tilgjengelig. Enkelte melkesyrebakterier faller inn under denne kategorien da disse regenererer  $\text{NAD}^+$  ved at oksygen reduseres til hydrogenperoksid. Dette sparer pyruvat som endelig elektronmottaker, og det dannes et ekstra molekyl ATP når pyruvat reduseres til melkesyre. Disse bakteriene benytter så NADH peroksidase til å uskadeliggjøre hydrogenperoksid (Montville & Matthews 2007).

Mikrobiologisk vekst i et substrat kan påvirke redokspotensialet i et næringsmiddel. Dette gjelder særlig for aerobe mikroorganismer som vil forbruke oksygen ved vekst, og med det senke  $E_h$ . Redokspotensialet til et næringsmiddel kan også reduseres ved at det dannes metabolske biprodukter som vil reagere med og forbruke oksygen.  $\text{H}_2\text{S}$  er en slik forbindelse som har kapasitet til å senke  $E_h$  til  $-300$  mV (Jay, J. M. 2000).

#### **2.2.4 Tilsetningsstoffer**

Tilsetningsstoffer er kjemiske forbindelser som tilsettes næringsmidler i den hensikt å forbedre produktet. De deles inn i grupper basert på kjemisk sammensetning og virkeområde. Tilsetningsstoffer som tilsettes maten for å redusere forringelse og øke holdbarhet er enten antioksidanter eller direkte antimikrobielle. Benyttet korrekt, vil antimikrobielle tilsetningsstoffer være et effektivt verktøy som kan gi næringsmiddelindustrien store miljøgevinster i form av økt holdbarhet på produkter, og med det mindre mat som må kastes.

Flere antimikrobielle forbindelser som benyttes som tilsetningsstoffer i maten er svake organiske syrer. I kraft av sin kjemiske struktur, har disse evne til å vandre over cellemembranen og inn i cytoplasma. Fordi cellemembranen er en effektiv barriere for ladde forbindelser, vil pH i maten ha stor påvirkning på hvor lett disse syrene vil kunne komme inn i cytoplasma; syrenes grad av protonering øker med avtagende pH, og med det evne til å vandre gjennom membranen (Davidson & Harrison 2002). I tabell 2 gjengis en oversikt over de vanligste antimikrobielle tilsetningsstoffene som benyttes, spesifisert med hensyn til biologisk aktivitet og typiske matvarer hvor de benyttes.

Tabell 2. Ulike antimikrobielle tilsetningsstoffer, biologisk aktivitet og typiske matvarer hvor det er vanlig å benytte de ulike tilsetningsstoffene (Davidson & Harrison 2002).

Gruppe tilsetningsstoff	Biologisk aktivitet	Typiske matvarer
<b>Eddiksyre/acetat</b>	Gjær, bakterier	Bakverk, meieriprodukter etc.
<b>Benzosyre/benzoat</b>	Gjær, mugg	Drikkevarer, fruktprodukter, margarin
<b>Dimetyl dikarbonat</b>	Gjær	Drikkevarer
<b>Melkesyre/laktat</b>	Bakterier	Kjøtt, fermenterte produkter
<b>Lactoferrin</b>	Bakterier	Kjøtt
<b>Lysozym</b>	Bakterier	Ost, pølser, fjærfe
<b>Natamycin</b>	Mugg	Ost
<b>Nisin</b>	Bakterier	Ost, andre produkter
<b>Nitritt</b>	<i>Clostridium botulinum</i>	Fisk, kjøtt,
<b>Parabener</b>	Gjær, mugg, G+bakterier	Drikkevarer, bakverk, sirup
<b>Propionsyre/propionat</b>	Mugg	Bakverk, meieriprodukter
<b>Sorbinsyre/sorbat</b>	Gjær, mugg, bakterier	Drikkevarer, vin, andre matvarer
<b>Sulfitt</b>	Gjær, mugg	Frukt, fruktprodukter, vin

### 2.2.5 Naturlige barrierer i mat

Ved et punkt har all mat vært en del av en levende organisme og, med det, hatt en viss beskyttelse mot mikrobielle infeksjoner. Denne beskyttelsen begrenses når organismen dør, eller dersom den naturlige beskyttelsen blir skadet. Den første beskyttelsen er som regel huden, skinnen eller skallet rundt organismen som vanligvis består av motstandsdyktige makromolekyler, og til en viss grad antimikrobielle forbindelser i form av korte fettsyrer. I tillegg er ofte vannaktivitet og tilgang på næringsstoffer i den ytre barrieren lav, slik at forhold for mikrobiell vekst er meget dårlig. Dersom intakt, er denne beskyttelsen meget effektiv, og det er svært viktig at produktet behandles korrekt dersom råvaren er produktet (frukt, grønnsaker etc.) (Adams & Moss 2008).

Neste barriere mot mikrobiell vekst er at også vevet kan inneholde antimikrobielle forbindelser; hvor konsentrasjon ofte øker som følge av fysisk skade. Type forbindelser og mekanisme for hvordan disse frigis varierer mellom ulike organismer. Hos planter kan fysisk skade føre til at enzym og substrat føres sammen slik at det dannes antimikrobielle forbindelser, eller at spesielle lagringsceller går i stykker og frigir slike forbindelser.

Fytoaleksiner er en klasse lavmolekylære forbindelser med antimikrobiell virkning som produseres som respons mot mikrobiell infeksjon av mange planter (Adams & Moss 2008). Benzosyre og sorbinsyre er svake organiske syrer som benyttes i stor grad av næringsmiddelindustrien. Begge forekommer naturlig i blant annet bær og forhindrer vekst av både bakterier og sopp. Det er også rapportert at sorbinsyre inhiberer spiring og vekst av sporer (Adams & Moss 2008; Jay, J. M. 2000).

Syrekonstanten brukes som et mål for syrens styrke. I en løsning vil alle syrer avgi protoner, men i hvilken grad dette skjer avhenger av hvor sterk syren er, eller basens evne til å motta protoner. I en løsning vil svake syrer befinne seg i en pH-avhengig likevekt mellom dissosiert og udisosiert form. Effekten av svake syrer som konserveringsmiddel vil øke dersom pH er lav fordi lav pH vil endre likevekten slik at flere syremolekyler vil foreligge i udisosiert tilstand. I udisosiert tilstand har syremolekylene ingen ladning, og de kan derfor vandre fritt over cellemembranen og inn i cytoplasma. I cytoplasma, hvor pH er høyere, vil syremolekylene dissosiere og føre til en akkumulering av anioner og protoner fanget inne i cellen. Inne i cellen kan disse føre til ødeleggelse av membranen, inhibering av essensielle metabolske reaksjoner, stresse intracellulær pH homeostase og akkumulering av giftige anioner som cellen må bruke mye energi på å håndtere (Brul & Coote 1999).

Det finnes flere naturlige antimikrobielle enzymer som benyttes mot uønsket vekst av mikroorganismer. I melk finnes blant annet enzymet lactoperoxidase som ved tilstedeværelse av hydrogenperoksid kan oksidere en rekke organiske og uorganiske substrater. Blant disse substratene finnes tiocyanat som av lactoperoxidase oksideres til hypotiocyanitt; en forbindelse som inhiberer de fleste bakterier. I melk, hvor det finnes mye lactoperoxidase, er ofte tiocyanat begrensende faktor. I land med dårlig etablerte kjølekjeder, hender det at melken tilsettes små mengder hydrogenperoksid og tiocyanat, hvilket vil forsinke forråtnelse med flere timer. I tillegg til lactoperoxidase finnes det flere enzymer i melk med antimikrobielle egenskaper (Walstra et al. 2006).

Naturlig antimikrobielle forbindelser finnes i mange råvarer, og de varierer med hensyn på funksjon og effektivitet. Ovotransferrin i egg og lactoferrin i melk er proteiner som binder til seg tilgjengelig jern. Da alle bakterier er avhengig av jern for å kunne vokse, kan tilstedeværelse av nevnte proteiner redusere vekst. Lysozym er et enzym som finnes i egg og melk, og er et enzym som katalyserer hydrolyse av glykosidbindingene i peptidoglykan.

Peptidoglukan er en polymer som er ansvarlig for styrke og stivhet i bakteriens cellevegg. Dersom denne celleveggen ødelegges kan det føre til at cellen sprekker på grunn av osmotisk trykk. Lysozym er mest effektiv mot Gram positive bakterier, hvor peptidoglykan er mer tilgjengelig, men kan også drepe Gram negative bakterier dersom yttermembranen ødelegges (Adams & Moss 2008).

### **2.3 Ytre faktorer som påvirker vekst**

På samme måte som indre faktorer påvirker mikrobiell vekst, er det også ytre faktorer som gjør dette. Av ytre faktorer som har stor innflytelse er atmosfære og temperatur de viktigste. En tredje faktor er relativ fuktighet som også er viktig. Den vil sammen med atmosfære og temperatur belyses ytterligere i avsnittene under.

#### **2.3.1 Temperatur**

Av ytre faktorer som i størst grad påvirker mikrobiell vekst, er temperatur den viktigste (Montville & Matthews 2007). Mikrobiell vekst kan forekomme ved alle temperaturer mellom  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  og over  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  så lenge vann i flytende form er tilgjengelig. Ingen mikroorganismer er i stand til å vokse over hele dette spennet; vekst begrenses til en avmålt del av skalaen. Hver mikroorganisme opererer med en minimumstemperatur, en optimumstemperatur og en maksimumstemperatur for vekst.. Basert på disse temperaturene kan mikroorganismer klassifiseres i ulike fysiologiske grupper (Adams & Moss 2008).

Psykrofile og psykrotrofe bakterier kan begge vokse ved  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  selv om vekst ved denne temperaturen er kraftig redusert. Hvor psykrofile bakterier har en optimumstemperatur ved  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  og en maksimumstemperatur på  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , har psykrotrofe bakterier en optimumstemperatur på rundt  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  og maksimumstemperatur på omtrent  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Forskjellen mellom disse to fysiologiske gruppene er altså optimumstemperatur og maksimumstemperatur for mulig vekst; begge er i stand til å vokse ved  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Montville & Matthews 2007). Mesofile bakterier stammer ofte fra dyr eller mennesker og har derfor en optimumstemperatur på  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Maksimumstemperatur for mesofile bakterier ligger på rundt  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mens minimumstemperatur går helt ned mot  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mest resistent mot varme er de termofile bakteriene som opererer med optimumstemperatur på mellom  $55$  og  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Maksimumstemperatur for disse er opp mot  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , og minimumstemperatur er rundt  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Adams & Moss 2008).

I kjemien sier en tommelfingerregel at reaksjonshastighet fordobles når temperatur øker med 10 °C, hvilket også kan sies om bakterievekst så lenge temperaturøkning foregår innenfor et gitt område (Montville & Matthews 2007). Ved sine respektive optimumstemperaturer vil de mesofile bakteriene vokse raskere enn de psykrotrofe bakteriene, blant annet fordi kjemiske og biologiske reaksjoner vil skje raskere ved høyere temperatur. Dette betyr da at mat som lagres ved høye temperaturer vil forringes raskere enn mat som lagres ved lave temperaturer. De bakterier som har størst innvirkning på forringelse av mat, er mesofile og psykrotrofe bakterier. Psykrotrofe bakterier har relativt høy optimumstemperatur, men kan likevel vokse ned mot 0 °C. For disse vil ikke kjøling være en like stor barriere for vekst som for mesofile bakterier hvor vekst ofte begrenses ved 10 °C. Termofile bakterier er ikke like viktige i næringsmiddelmikrobiologien, da vekst sjelden forekommer under 40 °C (Adams & Moss 2008).

Kurven for mikrobiell vekst er ikke symmetrisk rundt optimumstemperaturen; den avtar raskere rundt maksimumstemperaturen. For at membranens funksjon skal opprettholdes, er det viktig at denne er riktig sammensatt med hensyn på aktuell veksttemperatur. Dersom temperaturen overstiger bakteriens maksimumstemperatur, er det stor sannsynlighet for at bakterien vil dø fordi membranen går i stykker, eller at det skjer en irreversibel denaturering av proteiner i cellen. Enzymatisk aktivitet i cellen avtar med avtagende temperatur og er sammen med endringer i membranen en viktig årsak til at mikrobiell vekst stanser når temperatur blir tilstrekkelig lav; membranen stivner da og mister sin fluiditet. Økt andel umettede eller korte fettsyrer i membranen, reduserer smeltepunktet til denne slik at nødvendig fluiditet opprettholdes selv ved lave temperaturer (Adams & Moss 2008). Knekk i karbonkjede forårsaket av dobbeltbindinger i de umettede fettsyrene forhindrer tett pakking og at smeltepunktet reduseres (Montville & Matthews 2007).

I tillegg til å påvirke vekst, påvirker også temperatur hvilke gener som uttrykkes; vekst ved lave temperaturer gir mikroorganismen et annet genuttrykk enn vekst rundt optimumstemperatur. Temperatur påvirker altså andel en- og flerumettede fettsyrer i cellemembranen, og membranens fysiske tilstand påvirker videre hvilke gener som uttrykkes. Produksjon av kuldesjokkproteiner (CSP) øker organismens evne til å vokse ved lave temperaturer (Montville & Matthews 2007).

Kuldesjokkproteiner til *E. coli* er best studert, men homologer er identifisert hos flere Gram-positive og Gram-negative bakterier (Phadtare et al. 1999). Kuldesjokkproteiner hos *E. coli* kategoriseres i to grupper. Klasse 1 CSP uttrykkes i liten grad ved 37 °C, men øker kraftig i antall dersom temperatur reguleres ned. Klasse 2 CSP øker også i antall ved nedregulering av temperatur, men ikke i like stor grad som klasse 1 CSP (Montville & Matthews 2007). Ved en tydelig nedregulering av temperatur, vil mesteparten av proteinsyntese hos *E. coli* opphøre midlertidig. Dette fører til at vekst stopper opp, mens organismen akklimatiseres til vekst ved lavere temperatur ved at den igangsetter syntese av kuldesjokkproteiner. Enkelte av disse proteinene er essensielle for at cellen skal kunne gjenoppta vekst ved lav temperatur (Thieringer et al. 1998).

Respons mot temperatursjokk, kan gi kryssbeskyttelse mot andre stressfaktorer. *Bacillus subtilis* som utsettes for mildt varmestress kan overleve høye konsentrasjoner av NaCl i tillegg til temperaturer den ellers ikke ville kunnet overleve ved. *E. coli* O157:H7 som utsettes for høy varme vil oppleve økt resistens for lav pH og redusert resistens dersom den utsettes for lave temperaturer (Montville & Matthews 2007).

### **2.3.2 Atmosfære**

Modifisert atmosfærepakking (MAP) benyttes i stor grad av vestlig næringsmiddelindustri for at lett bedervelige produkter skal få økt holdbarhet (Devlighere & Debevere 2000). Oksygen utgjør 21 % av jordas atmosfære, og er under normale forhold den gassen som har størst innvirkning på mikrobiell vekst (Adams & Moss 2008). Sammenheng mellom oksygen og redokspotensiale er beskrevet i tidligere avsnitt og vil derfor ikke belyses ytterligere her.

Gassen som i størst grad benyttes for å kontrollere vekst av mikroorganismen er karbondioksid. Det er flere faktorer som påvirker hvor effektiv CO<sub>2</sub> vil være som barriere mot vekst, og blant disse er temperatur. Lav lagringstemperatur er ikke bare i seg selv et hinder for mikrobiell vekst, men øker også løselighet av CO<sub>2</sub> i vann. Ved 1 atm vil 100 ml vann absorbere 88 ml CO<sub>2</sub> ved 20 °C og 36 ml CO<sub>2</sub> ved 60 °C. En annen faktor er pH, hvor CO<sub>2</sub> som barriere er mer effektiv ved lav pH. Til tross for at høyere konsentrasjoner har blitt benyttet, synes en konsentrasjon på 20-30 % CO<sub>2</sub> å være optimal. For ferskt kjøtt er 20 % optimalt, mens en høyere konsentrasjon kan benyttes for sjømat (Jay, J.M. 2000).

CO<sub>2</sub> har ulik effekt på ulike grupper mikroorganismer. Mugg og Gram negative bakterier er mest sensitive, mens Gram positive bakterier er mer resistente (Adams & Moss 2008). Blant de mest sensitive finnes *Pseudomonas* og blant de som er mest resistente finnes melkesyrebakterier og *Clostridium*. Ved lang lagring av kjøtt, vil CO<sub>2</sub> endre mikrobiota fra Gram-negative bakterier i begynnelsen til hovedsakelig eller utelukkende bare Gram positive bakterier mot slutten av lagringstiden (Jay, J.M. 2000).

Mekanismen bak CO<sub>2</sub> hemming er en kombinasjon av flere prosesser, hvor ikke alle er like godt kjent. CO<sub>2</sub> løst i vann vil omdannes til hydrogenkarbonat og protoner, og med det redusere pH. CO<sub>2</sub> har i likhet med svake syrer, evne til å trenge gjennom cellemembranen slik at pH i cytoplasma vil bli redusert. I tillegg til å fungere som en svak syre, tror man at CO<sub>2</sub> kan endre fysikalske egenskaper til cellemembranen, inhibere viktige enzymer og reagere med aminogrupeer i proteiner slik at disse endrer egenskaper og funksjon (Adams & Moss 2008).

To former for MAP benyttes ofte; høyoksygen- og lavoksygenkonsentrasjon. I høyoksygen MAP, består atmosfæren av ca 70 % oksygen, 20-30 % CO<sub>2</sub> og 0-20 % nitrogen. Aerob vekst begrenses noe av den relativt høye CO<sub>2</sub> konsentrasjonen, men stoppes ikke helt. Det er ventet at den modifiserte atmosfæren vil endres noe ved lang lagring. Høyoksygen MAP benyttes ofte ved lagring av kjøtt, da oksygen vil bevare den røde fargen på kjøttet. I lavoksygen MAP består atmosfæren av 20-30 % CO<sub>2</sub>, 0-10 % oksygen og resten nitrogen (Jay, J.M. 2000). Inhibering av vekst er vanligvis større under aerobe forhold enn ved anaerobe forhold, og det er få mikroorganismer som drepes direkte av CO<sub>2</sub> da effekten av CO<sub>2</sub> stort sett regnes som bakteriostatisk (Adams & Moss 2008).

Hensikten med vakuumpakking er å fjerne luft mellom produktet og en emballasje som har høy gassbarriere. Kort tid etter at produktet er forseglet, vil konsentrasjon CO<sub>2</sub> øke som en konsekvens av at gjenværende oksygen forbrukes av vev. Aerobe organismer, og konsentrasjonen av CO<sub>2</sub>, kan i kjøttprodukter øke opp mot 30 % (Jay, J.M. 2000).

### 2.3.3 Relativ fuktighet

Der vannaktivitet til et substrat er definert som vanndamptrykket over et substrat dividert på vanndamptrykket over rent vann, er relativ fuktighet definert som forholdet mellom vanndampmengden i en gassfase og den maksimale mengden vanndamp gassfasen kan inneholde dersom den var mettet. I et system hvor det er blitt opprettet likevekt mellom næringsmiddel og atmosfære, vil vannaktivitet være 0,9 dersom relativ fuktighet er 90 % (Adams & Moss 2008).

Når et næringsmiddel med lav vannaktivitet oppbevares i en atmosfære med høy relativ fuktighet vil systemet gå mot likevekt ved at næringsmiddelet tar til seg fuktighet fra omgivelsene. Selv om det kan ta veldig lang tid før denne likevekten inntreffer, vil vann fra atmosfæren kondensere på overflaten og tilrettelegge forhold for lokal mikrobiell vekst. Mikrobiell vekst vil ytterligere bidra med vann i næringsmiddelet, da vann dannes ved respirasjon. Ved at vannaktiviteten øker, øker også antall mikroorganismer som kan vokse i substratet. Et bredt spekter av mikroorganismer vil føre til at næringsmiddelet forringes raskere (Adams & Moss 2008).

Næringsmidler som er utsatt for forringelse på overflaten, bør lagres under forhold med lav relativ fuktighet. Høy relativ fuktighet i kjøleskapet kan føre til at særlig kjøtt, som ikke er pakket ordentlig, kan utsettes for vekst av aerobe mikroorganismer på overflaten. Lavere relativ fuktighet kan redusere mulighet for overflatevekst, men dersom relativ fuktighet er lavere enn vannaktivitet i produktet, vil vann migrere over i atmosfære for å innstille likevekt. Dette kan føre til at produktet får en uakseptabel kvalitet (Jay, J.M. 2000).

Problemer knyttet til relativ fuktighet er også særlig fremtredende ved lagring og oppbevaring av enkelte råvarer som fersk frukt, grønnsaker og korn. Dersom den relative fuktigheten er for lav, vil vann migrere ut av frukten/grønnsakene slik at disse vil miste vann og trekke seg sammen (Adams & Moss 2008). Når en skal velge lagringsforhold med hensyn på relativ fuktighet, er det viktig at denne settes slik at produktets mikrobielle kvalitet ivaretas, samtidig som produktet skal beholde et attraktivt utseende (Jay, J.M. 2000).



## 2.4 Konkurransen

Ved siden av de indre og ytre faktorene som påvirker vekst, vil også mikroorganismenes iboende egenskaper påvirke deres vekst i ulike næringsmidler. Oppportune vekstvilkår med hensyn på miljø, er altså ikke en tilstrekkelig betingelse for vekst. En organismes spesifikke vekstrate vil si noe om dens innflytelse på mikrofloraen i et næringsmiddel. I et næringsmiddel hvor vekstforholdene er like gode for to ulike organismer, vil de med høyest veksthastighet dominere over tid. Mugg kan vokse meget godt på kjøtt, men på grunn av langsom vekst vil de ofte bli utkonkurrert av rasktvoksende bakterier. I matvarer hvor vannaktivitet og pH er redusert, vil disse forhold favorisere mugg som dermed vil utkonkurrere de fleste bakterier. To organismer kan ha lik spesifikk veksthastighet, men ulike affinitet til essensielle næringsstoffer. Dersom en slik forbindelse finnes i et begrenset antall, vil den mikroorganismen med høyest affinitet for denne forbindelsen dominere og utkonkurrere den andre (Adams & Moss 2008).

## 2.5 Vekstkurver

En bakteries livsløp kan deles inn i 4 faser; lagfasen, eksponentiell fase, stasjonær fase og dødsfase, og blir vanligvis plottet som antall celler på en logaritmisk skala mot tid. Kurven gjengir ikke tilstand for enkelte organismer, men for hele populasjonen. I løpet av eksponentiell fase øker antall organismer i populasjonen logaritmisk, og antall organismer i populasjonen avtar tilsvarende i dødsfasen. I lagfase og stasjonær fase er det ingen netto økning i antall organismer; vekstrate og dødsrate er lik (Montville & Matthews 2007). I løpet av lagfasen tilpasser bakteriecellene seg et nytt miljø og forbereder seg på celledeling. Behov og funksjon styrer syntese av enzymer/proteiner, og replikasjon av DNA initieres. Lengden på lagfasen avhenger av flere faktorer som temperatur, tilgang på næring og bakteriepopulasjonens fysiologiske tilstand. Dersom friske, vegetative celler overføres til et optimalt medium, trenger ikke cellene tilpasse seg det nye miljøet, og kan begynne å dele seg med en gang. Tilsvarende kan forhold manipuleres slik at lagfasen forlenges og mikrobiologisk vekst begrenses (Montville & Matthews 2007).

Neste fase er eksponentiell fase hvor det skjer en eksponentiell vekst av antall celler. I løpet av den eksponentielle fasen kan 1. ordens kinetikk benyttes til å beskrive endring i antall celler. Generasjonstiden kan benyttes som en konstant for å beskrive hastighet på den eksponentielle veksten. Generasjonstid er den tiden en celle bruker på å gjennomgå en livssyklus (fra en celledeling til neste celledeling). I løpet av den eksponentielle fasen vil det

altså være et proporsjonalt forhold mellom antall bakterier ved en hvilken som helst tid, og det antall bakterier som fantes til å begynne med. Dette betyr at god produksjonshygiene og andre tiltak som reduserer antall opprinnelige bakterier, vil ha stor effekt på antall bakterier tilstede i et næringsmiddel på et senere tidspunkt. Uavhengig av antall opprinnelige bakterier tilstede, vil etter hvert økt konkurranse føre til at vekst avtar og flater ut (Montville & Matthews 2007). Celler i eksponentiell fase vil dø lettere av lav pH, varme og antimikrobielle forbindelser enn celler i lagfase og stasjonær fase. Mikroorganismer med kort generasjonstid er ofte mindre motstandsdyktige mot nevnte faktorer enn organismer med lang generasjonstid. Ved høyere vekstrater, hvor celleaktivitet er høyere og mer balansert, vil en liten skade ha større påvirkning enn i systemer som går tregere eller står stille (Adams & Moss 2008).

I den stasjonære fasen er det ingen netto økning i antall organismer; vekstrate og dødsrate er lik. En kraftig økning av antall bakterier fører til knapphet på resurser og akkumulering av avfallsstoffer. Forhold for vekst er ikke lenger optimale, og vekst vil til slutt stagnere.

I likhet med eksponentiell fase, kan også dødsfasen beskrives med 1. ordens kinetikk. Dersom man vet antall opprinnelige bakterier, generasjonstiden og eksponeringstid kan en regne ut hvor mange levedyktige bakterieceller det vil være i et næringsmiddel etter en bestemt tid. En kinetisk konstant som ofte benyttes i denne sammenhengen, er desimal reduksjonstid, D-verdi. Med D-verdi menes den tiden det tar å redusere antall mikroorganismer i en populasjon med 90 % ved en konstant temperatur (Montville & Matthews 2007).

En D-verdi på 15 sekunder ved 72 °C betyr at en bakteriepopulasjon reduseres med 90 % hvert 15. sekund. Etter 1 minutt ved 72 °C vil bakteriepopulasjonen være redusert med 4 log-sykluser. Z-verdi er definert som den temperaturendringen som kreves for å endre D-verdi med en faktor på 10. En tredje parameter som ofte benyttes er F-verdi, som defineres som den tiden det trengs ved en gitt temperatur for å oppnå ønsket reduksjon i antall bakterier ved en bestemt Z-verdi (Fellows 2009).

## **2.6 Klassisk mikrobiologi og begrensninger**

Klassiske dyrkningsmetoder er basert på at en bakteriecelle danner en koloni, og at alle kolonier har opphav i en unik celle. En bakteriecelles evne til å danne en koloni avhenger av flere faktorer som cellens fysiologiske tilstand, medium, temperatur, atmosfære og antall celler som er tilstede. Celler som er skadet eller av andre grunner ikke er i stand til å vokse,

vil bli oversett da de mangler evne til å formere seg til synlige kolonier (Montville & Matthews 2007).

Stress forårsaket av for eksempel temperatur, pH og stråling kan skade mikroorganismene slik at evne til vekst begrenses. Skade på en mikroorganisme karakteriseres ved økt motstand mot selektive medier, eller økt behov næringsstoffer. Næringsmiddelets sammensetning vil ha betydning for skadens alvorlighet og etterfølgende reparasjon. Temperatur, konsentrasjon av skadelig agens/grad av stress, og hvor lengde bakteriecellene blir utsatt for stress, vil påvirke hvor mange bakterier som blir skadet (Montville & Matthews 2007).

Om en bakteriekultur er skadet eller ikke, kan undersøkes ved å plate den ut på et selektiv og et ikke-selektivt medium. Kolonier som vokser på det ikke-selektive mediet vil representere både skadede og friske celler, mens kolonier på det selektive mediet vil kun stamme fra friske celler. Eventuell differanse i vekst mellom begge medier, vil angi hvor stor del av populasjonen som er skadet (Jay, J.M. 2000).

Det er flere grunner til at kunnskap om mikrobiell skade, og hvordan en skal forholde seg til dette er viktig for næringsmiddelindustrien. Ved bestemmelse av passende varmebehandling for et produkt, kan det å ikke ta hensyn til skadede bakterier føre til en overvurdering av termisk sensitivitet slik at det settes en for lav D-verdi. I tillegg kan skadede bakterieceller som unngår deteksjon i etterkant av prosessering, repareres og formere seg før de konsumeres av forbruker. Dette kan føre til at produktet forringes, og i verste fall utgjøre en helsemessig risiko for forbruker. Det er derfor viktig at varmebehandlingen optimaliseres med hensyn til at alle uønskete bakterier drepes (Montville & Matthews 2007).

Sporer kan også skades ved blant annet høy temperatur, kjemikalier og stråling. Skader forårsaket av høy temperatur er best studert, og omfatter blant annet skader på DNA, RNA, membran og enzymer. I tilfeller hvor stråling er årsak til skade, vil en ofte finne skade på DNA. Sporer som skades som følge av stråling, viser økt sensitivitet for temperatur; en sensitivitet som kan vare i flere måneder (Montville & Matthews 2007). Dersom en skade først har oppstått, vil cellen forsøke å reparere denne. Ofte skyldes skade at membranen og ribosomer er gått i stykker, og da må disse repareres før cellen kan vokse videre (Jay, J.M. 2000). Reparasjon krever syntese av RNA og protein, og blir synlig i en utvidet lagfase. Omfang og hastighet på en reparasjon påvirkes av miljø og tilgang på riktig næring. *Listeria*

*onocytogenes* som skades ved 55 °C i 20 minutter, vil begynne reparasjon med en gang temperaturen når 37 °C, og vil bruke 9 timer på å komme seg helt etter skaden. Ved 4 °C vil reparasjon av skadet *L. monocytogenes* forsinkes med 8-10 dager. Den vil ikke være helt frisk før etter 16-19 dager (Montville & Matthews 2007).

«Levende, men ikke dyrkbare» (VNC) er en tilstand hvor levedyktige bakterieceller ikke er i stand til å formere seg til synlige kolonier. Overgang fra å være vegetativ celle til VNC, synes å være en overlevelsesstrategi for flere mikroorganismer som ikke er i stand til å danne sporer. Stavformede celler endrer form ved å trekke seg sammen. Hos *Vibrio* endres fettsyresammensetningen i cellemembranen når vegetative celler går over i VNC (Montville & Matthews 2007). VNC må ikke forveksles med skadde celler; de vil repareres og danne kolonier når de plates ut på et ikke-selektivt medium kolonier, hvilket ikke er tilfelle for VNC celler (Jay, J.M. 2000).

Redusert tilgang til næring, hypokloritt, endringer i temperatur og økt konsentrasjon av NaCl er faktorer som kan indusere omdanning fra en vegetativ tilstand til VNC. Selv om en celle er levende, men ikke dyrkbar, betyr det ikke at den kan avskrives som mulig problem; *Vibrio vulnificus* har vist seg dødelig for mus til tross for at hele populasjonen var VNC. Oppvåkning fra en VNC-tilstand vises ved økt antall vegetative celler i en kultur uten at totalt celletall øker. Av faktorer som trigger overgang til en vegetativ tilstand, nevnes temperatur, et næringsrikt medium og katalase/pyruvat som viktige (Montville & Matthews 2007).

Det er fortsatt mye som er uavklart når det gjelder VNC og mekanismer rundt dette; det trengs mer forskning på dette området før hele bildet blir oversiktlig. Dersom en skal benytte seg av klassiske dyrkningsmetoder, er det viktig å ha kjennskap til fenomenet, da slike metoder ikke vil identifisere VNC-bakterier (Montville & Matthews 2007).

## **2.7 Indikatororganismer**

Ved å bestemme tilstedeværelse av en indikatororganisme i et næringsmiddel, kan en tilegne seg enkel, pålitelig og hurtig informasjon om eventuelle produksjonsfeil, kontaminering under og etter produksjon, samt om generell hygiene knyttet til hvordan produktet er produsert og lagret. Metoder for å identifisere indikatororganismer kan ikke erstatte metoder for å identifisere spesifikke mikroorganismer eller patogener, men kan gi en pekepinn om mulig tilstedeværelse. Fordelen med å benytte indikatororganismer er at metoder for å identifisere disse krever kortere tid enn det som kreves ved isolering og identifisering av spesifikke

mikroorganismer (Pierson et al. 2007). Indikatororganismer som benyttes knyttet til spørsmål om mattrygghet skal tilfredsstillende følgende kriterier (Jay, J.M. 2000; Pierson et al. 2007):

- Indikatororganismer skal være mulig å detektere i alle produkter hvor kvalitet skal bedømmes.
- Vekst og antall skal ha en direkte sammenheng med produktets kvalitet.
- Indikatororganismer skal være enkle å detektere i løpet av kort tid, helst innen en dag.
- Indikatororganismer skal lett kunne skilles fra andre mikroorganismer.
- Indikatororganismers tilstedeværelse skal ikke påvirkes av annen flora i produktet.
- Indikatororganismer skal ha en etablert assosiasjon med spesifikk mikroorganisme det søkes etter; det vil si alltid være tilstede sammen med denne mikroorganismen, og ideelt sett i samme antall.
- Indikatororganismer skal ha samme krav til næringsstoffer og miljø som spesifikk mikroorganisme det søkes etter.
- Indikatororganismer skal ikke ha høyere dødsrate enn mikroorganisme det søkes etter.
- Indikatororganismer skal ikke kunne identifiseres i et produkt dersom spesifikk mikroorganisme det søkes etter ikke er tilstede.

Koliforme bakterier er en samlebetegnelse som beskriver en stor gruppe Gram negative, stavformede bakterier som ikke danner sporer, og som tilhører den taksonomiske familien Enterobacteriaceae. Koliforme bakterier er i dag definert som bakterier som er i stand til aerob og fakultativ anaerob vekst, og som forgjærer laktose ved 37 °C innen 48 timer. Koliforme bakterier skal ha enzymet B-galaktosidase, og de skal være oksidase-negative. *Salmonella* og *Shigella* tilhører også Enterobacteriaceae, men er ikke regnet som koliforme bakterier (Paruch & Mæhlum 2011).

Funn av fekale koliforme bakterier i mat indikerer ikke nødvendigvis fekal kontaminering. Fekale koliforme bakterier er meget sensitive for varme, og funn av slike bakterier i produkter som er tilstrekkelig varmebehandlet, kan tyde på at det har skjedd en kontaminering i etterkant av varmebehandlingen (bakterieflora kan være etablert i produksjonslokale e.l.). Det er likevel større sannsynlighet for at fekale koliforme bakterier inkluderer bakterier av fekal opprinnelse enn alminnelige koliforme bakterier som både består av fekale og ikke-fekale bakterier. I dag er *E. coli* den vanligste indikatorbakterien som benyttes ved påvisning av fekal kontaminering (Pierson et al. 2007).

## **2.8 Identifisering av mikrobiell flora (tradisjonelle metoder)**

### **2.8.1 Katalasetest**

Bakterier produserer et vidt spekter av enzymer. Noen er mer karakteristiske for enkelte mikroorganismer enn andre. Et slikt enzym er katalase som benyttes av mikroorganismer til å bryte ned den giftige forbindelsen hydrogenperoksid til oksyngengass og vann. Hydrogenperoksid dannes i cellen ved at superoksid dismutase katalyserer reaksjon mellom hydrogen og superoksidanion radikal. Superoksidanion radikal dannes når molekylært oksygen reduseres med et elektron. For mikroorganismer som mangler dette enzymet vil oksygen være giftig. Det er derfor hovedsakelig anaerobe mikroorganismer som mangler dette enzymet (Adams & Moss 2008).

### **2.8.2 Gramfarging**

Gramfarging er en metode for å skille bakterier i to hovedgrupper basert på deres oppbygging av cellevegg; Gram positive og Gram negative bakterier. Differensiering skjer ved hjelp av kjemiske og fysiske egenskaper i bakteriens cellevegg. Gram positive bakterier har et tykt lag peptidoglukan rundt cellen. Denne egenskapen utnyttes slik at blå farge holdes igjen inne i cellen dersom den er Gram positiv, mens Gram-negative avfarges. Dette gjør at Gram negative celler blir fargeløse eller røde dersom det benyttes en kontrastfarge, mens Gram positive celler får en blå farge (Walstra et al. 2006).

## **2.9 Identifisering av mikrobiell flora (molekylære metoder)**

### **2.9.1 16s ribosomal RNA, 16s rRNA**

Ribosomer er makromolekylære strukturer som "oversetter" RNA til proteiner. Ribosomer i både prokaryote og eukaryote organismer består av 2 subenheter; en liten og en stor. Størrelsen på disse enhetene beskrives med S, en enhet som forteller noe om sedimenteringshastighet for molekylet (stor verdi indikerer rask sedimentering og et større molekyl). Begge subenheter består av RNA og proteiner hvor RNA-molekylene er gitt navn som gjenspeiler størrelsen på disse. Størrelsen på RNA-molekylet i liten subenhet er ulik for prokaryote og eukaryote organismer; 16S hos prokaryote og 18S hos eukaryote organismer (Watson et al. 2008).

Det er 3 ulike ribosomale RNA molekyler med størrelse 5S, 16S og 23 S hos prokaryote og 4 ulike ribosomale RNA molekyler hos eukaryote med størrelser 5S, 5,8S, 18S og 28S.

Ved fylogenetisk analyse av en organisme er 16S rRNA-molekylet for prokaryote organismer og 18S rRNA for eukaryote blant de vanligste å benytte. Molekylene finnes i alle organismer, og er essensielle for at organismene skal kunne utføre proteinsyntese. Da det er av stor viktighet for organismen antas det at molekylet er meget stabilt, og at det har skjedd få mutasjoner i akkurat dette molekylet (Kurokawa et al. 2000). 16S rRNA molekylet hos prokaryote organismer og 18S rRNA hos eukaryote inneholder regioner med konserverte områder, men samtidig tilstrekkelig sekvensvariasjon i andre områder. Ved å sammenligne en 16S rRNA/18S rRNA sekvens med kjente sekvenser i en database kan man se om det er likheter mellom sekvensen man har funnet og allerede sekvenserte 16S rRNA/18S rRNA gener fra kjente organismer (Janda & Abbott 2007).

### **2.9.2 Polymerase Chain Reaction, PCR**

PCR er en biokjemisk metode for å amplifisere DNA, eller deler av dette, in vitro. Enzymet DNA polymerase styrer syntese av DNA ved å bruke single-stranded DNA som templat. Ved at et oligonukleotid fester seg til templat DNA kan DNA-polymerase benytte dette som primer til å forlenge 3' ende slik at det dannes double-stranded DNA ved hjelp av komplementær baseparing. PCR er en metode som utnytter dette enzymet og denne reaksjonen til å syntetisere 2 single-stranded oligonukleotider; en komplementær til 5' ende til tråd nr 1, og den andre komplementær til 5' ende på tråd nr 2 (Watson et al. 2008).

I praksis utføres dette ved at DNA varmes opp og makromolekylet denaturerer slik at det dannes single-stranded DNA av DNA som skal amplifiseres. Det er forholdet mellom antall A-T og G-C bindinger i DNA-molekylet som bestemmer hvor mye energi som må tilføres, da det til forskjell fra 3 hydrogenbindinger mellom G og C er to mellom A og T. Etter at DNA er denaturert senkes temperaturen slik at to ulike primere kan binde seg til sine komplementære baser på templat DNA, en på hver tråd. Primere angir startpunkt for syntesen, og er ofte korte kjemisk syntetiserte oligonukleotider med en lengde på omtrent 20 basepar. Etter at primere er festet til templat DNA, heves temperaturen igjen slik at DNA polymerase kan syntetisere en komplementær tråd ved å tilføre deoksynukleotidfosfat (dNTP) på 3' ende av primeren. Resultatet av denne reaksjonen er at det blir syntetisert to nye komplementære tråder. Et DNA-molekyl har blitt til to identiske. Ved å repetere denne syklusen flere ganger kan en amplifisere en forsvinnende liten mengde ønsket DNA til et stort antall, og med det muliggjøre videre analyser. Det er vanlig at denne syklusen repeteres 30 ganger (Watson et al. 2008).

### 2.9.3 Gel elektroforese

Gel elektroforese er en metode som gjør det mulig å separere lineært DNA med hensyn på størrelse. DNA er et negativ ladet molekyl som ved applisering på en gel, vil vandre mot positiv pol dersom det er satt spenning over gelen. Små molekyler vil lettere kunne vandre gjennom porer i gelen enn større molekyler, og med det vandre raskere igjennom og mot positiv ladet pol. To typer gel er vanlig å bruke; polyakrylamid- og agarosegel. Polyakrylamid gir en gel med stor nøyaktighet, og benyttes ved ønske om å separere mindre molekyler. Agarosegel er mindre nøyaktig og benyttes dersom store molekyler skal separeres. Ved å applisere en størrelsesmarkør, der størrelse på bånd er kjent, kan gel elektroforese benyttes for å finne ut om man har fått et PCR-produkt av ønsket størrelse (Watson et al. 2008).

### 2.10 Hygieniske krav og retningslinjer

Utfordring med pizza er at det er et sammensatt produkt. I følge «oversikt over mikrobiologiske krav og retningslinjer» for Stabburet skal kimtall i «produkter som skal varmebehandles før konsum» ikke overskride  $10^5$  CFU/g. Ved overskridelse av anbefalte grenseverdier skal tiltak diskuteres i hvert enkelt tilfelle (vedlegg 1).

I kommisjonsforordning (EF) nr. 2073/2005 av 15 november 2005 om mikrobiologiske kriterier for næringsmidler er følgende verdier valgt ut:

#### Aerobt celletall:

Kvernet kjøtt:  $m = 5 \cdot 10^5$  CFU/g,  $M = 5 \cdot 10^6$  CFU/g

Mekanisk utbeinet kjøtt:  $m = 5 \cdot 10^5$  CFU/g,  $M = 5 \cdot 10^6$  CFU/g

#### E. coli:

Kvernet kjøtt:  $m = 50$  CFU/g,  $M = 500$  CFU/g

Mekanisk utbeinet kjøtt:  $m = 50$  CFU/g,  $M = 500$  CFU/g

Ost framstilt av melk eller myse som er varmebehandlet:  $m = 100$  CFU/g,  $M = 1000$  CFU/g

Tilfredsstillende dersom daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi er  $< m$ , akseptabelt dersom daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi ligger mellom  $m$  og  $M$  ( $< M$  i maksimalt 2 av 5 prøver, de øvrige  $< m$ ) og utilfredsstillende dersom daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi er  $> M$ . I Kommisjonsforordningen benyttes *E. coli* fremfor fekale koliforme bakterier for å angi fekal forurensning.



Næringsmiddelforetak som framstiller spiseferdige næringsmidler som kan innebære risiko for folkehelsen gjennom *Listeria monocytogenes*, skal som et ledd i sin prøvetakingsplan, ta prøver fra foredlingsområdene og utstyret for å avdekke forekomst av *L. monocytogenes*.

For hele kommisjonsforordningen henvises det til vedlegg 2

### **3. Materialer og metoder**

Alle mikrobiologiske forsøk og registrering av pH ble utført på IKBM, Universitet for Miljø- og Biovitenskap, Ås. Gassmålinger i modifisert atmosfærepakket pizza ble utført hos Nofima Mat, Ås. Identifisering av *Listeria monocytogenes* ble utført på Råbekken, Fredrikstad av Stabburet. Uttak til mikrobiologiske analyser ble foretatt i perioden 16.10.12 til 30.11.12.

#### **3.1 Bedriftsbesøk**

I forkant av uttak ble det utført et bedriftsbesøk på Stranda hvor det ble gitt en grundig innføring i produksjonen, og mulighet til å overvære produksjon av aktuell pizza. Det ble takket ja til tilbud, og følgende ble observert/forklart:

- Produksjonsprosess
- Ingredienser benyttet
- Pakking
- Rutiner vedrørende vasking
- Mikrobiologiske grenseverdier

#### **3.2 Pizza**

Det ble gjort forsøk på Dagens Pizza med kjøttdeig, bacon og løk, 900 g. Pizzaene var av type ”fersk pizza” som var kjølelagret og pakket i modifisert atmosfære.

##### **3.2.1 Sammensetning og spesifisering**

For detaljert beskrivelse av produkt og dets sammensetning vises det til vedlegg 3.

Pizza pakkes med dyptrekkerteknologi. Underform (APET) stanses ut med varme fra slett film. Overfilm sveises på underformen (OPET) etter tilføring av modifisert atmosfære. Pizza blir så pakket i kasser som blir stablet på pall slik at pizza ligger vannrett fra fabrikk til butikk. Pizzaene var pakket i modifisert atmosfære bestående av 40 % CO<sub>2</sub> og 60 % N<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Holdbarhet

Holdbarhet på pizzaene var oppgitt til 21 dager.

### 3.3 Analyseplan

Pizza ble lagret ved ulike temperaturer, og det ble foretatt 6 prøveuttak for hver temperatur i løpet av lagringstiden. Tilstedeværelse av ulike mikroorganismer ble undersøkt ved hjelp av klassiske dyrkningsmetoder. Det ble benyttet metoder for bestemmelse av totaltall, melkesyre bakterier, mugg/gjær, koliforme bakterier og *Bacillus cereus*. pH i pizza ble registrert ved hvert uttak, og det ble foretatt analyse av MAP for pizza lagret ved 6 °C. Analyser ble utført på pizza fra 3 ulike produksjonsdager.

Identifisering av *Listeria monocytogenes* ble utført av Stabburet på deres fabrikk i Fredrikstad ved hjelp av VIDAS. Ved positivt resultat utføres det kvantitativ analyse (ISO 1640). For beskrivelse av metoder henvises det til vedlegg 8 og 9.

#### 3.3.1 Lagringsbetingelser

Grunnet lang avstand mellom produksjonssted og laboratorium, ble pizza levert påfølgende dag etter produksjon i kjølelagret bil (4 °C). Pizzaene ble lagret ved 4 °C, 1,5 t romtemperatur/4 °C (1,5 t/4 °C), 6 °C og 8 °C. Pizza produsert 5/11-12 ble i tillegg til nevnte lagringstemperaturer lagret ved 2 °C. Med 1,5 t/4 °C menes at pizzaene er oppbevart ved romtemperatur i 1,5 timer før de ble overført til lagring ved 4 °C. Tabell 3 gjengir en oversikt over aktuelle produksjonsdager og ved hvilken temperatur pizzaene er lagret.

Tabell 3. Oversikt over produksjonsdager og lagringstemperaturer.

Produksjonsdag	2 °C	4 °C	1,5t/4 °C*	6 °C	8 °C
15/10.12	-	X	X	x	x
22/10-12	-	X	X	x	x
22/10-12	x	x	X	x	x

\*1,5 t/4 °C = Oppbevaring 1,5 t ved romtemperatur før lagring 4 °C.

På grunn av kapasitetshensyn ble pizza til analyse av *Listeria monocytogenes* lagret ved 4 °C, 2t/4 °C og 8 °C.

### **3.3.2 Ulike produksjoner**

Analyser ble utført på pizza fra 3 produksjonsdager (15.10.12, 22.10.12 og 05.11.12)

### **3.3.3 Uttaksplan**

Første uttak ble utført 1 dag etter produksjon. Deretter ble det gjort uttak etter 10, 15, 18, 21 og 25 dager for pizza fra alle produksjonsdager.

Ved analyse av *Listeria monocytogenes* ble det gjort uttak etter 3, 9, 16, 21, 23 og 30 dager. Analysen tar 3 dager, og måtte tilpasses arbeidstid ved laboratorium.

## **3.4 Analyser av pizza**

### **3.4.1 Prøveuttak**

Prøver fra pizza ble stanset ut med sylinder i rustfritt stål (40 mm) og utveid til ca 11 gram (avhengig av tykkelse på pizza). Små biter kjøttdeig, bacon og ost fra pizzaen ble i tillegg tilsatt med steril pinsett inntil totalt 25 gram prøve. Prøven ble forsøkt gjort representativ for hele pizzaen. Utveid pizza og 225 ml Ringers løsning (MERCK, Darmstadt, Germany) ble homogenisert i Stomacher (Stomacher® 400 Circulator, Seward, Worthing, England) ved normal hastighet i 2 minutter. Av homogeniserte prøver ble det tilvirket standard fortynningsrekke med steril Ringers løsning (MERCK).

### **3.4.2 Mikrobiologiske analyser**

Vekstmedium benyttet til dette forsøket var:

- Plate Count Agar, PCA (MERCK)
- Lactobacillus Selektiv agar, LBS (BECTON, Dickinson and Company)
- Rose & Bengal agar (MERCK)
- Violet Red Bile Agar, VRBA (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England)
- *Bacillus cereus* Selektiv Agar (MERCK/OXOID)

*B. cereus* Selektiv Agar fra MERCK ble benyttet til de 5 første uttak for pizza produsert 15.10.12, og til de 2 første uttak for pizza produsert 22.10.12. Til resterende uttak ble *B.*

*cereus* Selektiv Agar fra OXOID LTD benyttet. Samtlige vekstmedier ble tilvirket i henhold til beskrivelse fra produsent og sterilisert i autoklav ved 121 °C i 15 minutter.

Følgende mikrobiologiske analyser ble utført:

#### Mesofilt celletall

Aerobt mesofilt celletall, eller kimtall ble bestemt ved bruk av PCA og innstøping. Henholdsvis 1 ml og 100 µl prøve ble sterilt overført til petriskål og støpt inn i agar før inkubering ved 30 °C i 3-5 døgn under aerobe forhold.

#### Psykrotroft celletall

Psykrotroft celletall ble bestemt ved bruk av PCA ved hjelp av overflatespredning. Henholdsvis 0,5 ml og 100 µl prøve ble sterilt overført til petriskål og spredd utover ferdigstøpt agarskål med en hockeykølle (bøyd glass-stav). Hockeykøllen oppbevares i etanol (70 %) og flamberes før bruk. I tilfeller hvor 0,5 ml prøve ble benyttet, ble resultatet multiplisert med 2 for korrekt CFU/g. Skålene ble inkubert ved 8 °C i 10-12 døgn under aerobe forhold før telling.

#### Melkesyrebakterier

Antall melkesyrebakterier ble bestemt ved bruk av *Lactobacillus* selektivt medium (LSB) ved hjelp av innstøping. Henholdsvis 1 ml og 100 µl prøve ble sterilt overført til petriskål og støpt inn i agar. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 3 døgn i et anaerobskap (10 % CO<sub>2</sub>).

#### Mugg og gjær

Tilstedeværende mugg og gjær ble bestemt ved bruk av Rose & Bengal Agar ved hjelp av innstøping. Henholdsvis 1 ml og 100 µl prøve ble sterilt overført til petriskål og støpt inn i agar. Skålene ble inkubert ved 22 °C i 5 døgn under aerobe forhold.

#### Koliforme bakterier

Antall koliforme bakterier ble bestemt ved bruk av VRBA ved hjelp av innstøping. Henholdsvis 1 ml og 100 µl prøve ble sterilt overført til petriskål og støpt inn i agar. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 1 døgn under aerobe forhold.

#### *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* ble identifisert ved bruk av *B. cereus* Selektiv Agar ved hjelp av overflatespredning. 0,5 ml prøve ble sterilt overført til petriskål og spredd utover ferdigstøpt agar med en hockeykølle. Resultat ble multiplisert med 2 for å få korrekt CFU/g. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 1 døgn under aerobe forhold.

I tabell 4 gjengis en oversikt over mikroorganismer, vekstmedium benyttet til identifikasjon av disse, inkubasjonstemperatur og -tid. I tilfeller hvor semianaerobe forhold (10 % CO<sub>2</sub>) under inkubasjon ble benyttet, kommer dette også fram i tabellen.

**Tabell 4. Oversikt over mikroorganismer, vekstmedium benyttet til identifikasjon av disse samt inkubasjonstemperatur og – tid. I tilfeller hvor semianaerobe forhold under inkubasjon er blitt benyttet, er dette bemerket.**

Analyse	Medium	Ink.temp.	Ink.tid
<b>Mesofiltall</b>	Plate Count Agar	30 °C	3-5 døgn
<b>Psykrotroftall</b>	Plate Count Agar	8 °C	10-12 døgn
<b>Melkesyrebakterier</b>	Lactobacillus Selektiv agar	30 °C (10 % CO <sub>2</sub> )	3 døgn
<b>Mugg og gjær</b>	Rose & Bengal agar	22 °C	5 døgn
<b>Koliforme bakterier</b>	Violet Red Bile Agar	37 °C	1 døgn
<b><i>B. cereus</i></b>	<i>B. cereus</i> selektiv agar	30 °C	1 døgn

Ved utregning ble det benyttet resultat fra skåler med 30-300 kolonier pr skål. I skåler hvor det ikke var mulig å telle alle kolonier, ble kolonier i tellbart område bestemt og multiplisert med størrelse på område før snitt for paralleller ble bestemt.

### 3.4.3 Gassmålinger

Analyse av gassatmosfære til MAP-pakket pizza ble foretatt på pizza lagret ved 6 °C. Samtlige analyser ble foretatt samtidig med uttak for mikrobiologi, og det ble benyttet 1 ny pizza for hver måling; totalt 18 målinger på 18 unike pizzaer, fra 3 produksjoner og 6 ulike prøveuttakstider. Pizzaene det ble analysert på ble ikke benyttet til videre mikrobiologisk analyse.

Analysen ble utført ved hjelp av CheckPoint (PBI Dansensor, Ringsted, Denmark). Septum ble festet til plastemballasje før nål på analyseinstrument ble ført igjennom emballasjen og inn i forpakningen. I løpet av testen ble en liten prøve fra gassen ført inn i instrumentet og analysert. Etter ca 10 sekunder forelå resultatet som % karbondioksid og oksygen tilstede i den modifiserte atmosfæren.

Gass benyttet ved emballering var BIOGON® NC 40 (AGA AS, Oslo, Norway) som bestod av 40 % CO<sub>2</sub> og 60 % N<sub>2</sub>.

### **3.4.4 pH**

Analyse ble foretatt samtidig med uttak for mikrobiologisk analyse for alle temperaturer. Prøver på 10 gram (2 prøver fra hver pizza) ble stanset ut og blandet med 8 ml sterilt vann før disse ble plassert i begerglass med bunnen opp i 30 min før pH måling ble utført. pH måling ble utført på samme pizza som ble benyttet til mikrobiologisk analyse. Fordi prøver ikke var homogene, ble det foretatt 2 pH målinger i hver prøve (totalt 4 målinger for hver pizza). Gjennomsnittet av disse ble notert.

Det ble også målt pH i løsning benyttet til mikrobiologisk analyse (225 ml Ringers løsning + 25 gram prøve).

pH elektroden ble kalibrert i forkant av analysen. pH målingene ble utført på PHM 92 pH meter (Radiometer, København, Danmark).

### **3.5 Identifisering av mikrobiell flora**

Vekstmedium benyttet ved identifisering av mikrobiell flora var (flytende og agar):

- M17 (OXOID)
- MRS (OXOID)
- Brain Heart Infusion, BHI (OXOID)
- Glukose Yeast Extract Pepton medium, GYP (OXOID)
- Yeast Extract Maltose Agar, YM (pH 4) (Tilvirkes i henhold til oppskrift på laboratoriet)

Kolonier ble plukket fra skåler med PCA (mesofile og psykrotrofe), LBS og Rose & Bengal Agar fra samtlige 3 produksjonsdager, og etter 21 og 25 dagers lagring av pizza ved alle lagringstemperaturer. Samtlige vekstmedier ble tilvirket i henhold til beskrivelse på forpakning og sterilisert i autoklav ved 121 °C i 15 minutter før de ble benyttet.

#### **3.5.1 Isolering av mikroorganismer**

Ved hjelp av en podeøse ble materiale fra utvalgte kolonier overført til rør med flytende medium. Prøver ble nummerert fra 1-30. For å sikre vekst, ble det benyttet 4 typer flytende medium: M17, MRS, BHI og GYP. 750 µl kultur fra medium, som hadde gitt best vekst, ble tilsatt 250 µl 60 % steril glyserol før oppbevaring ved -80 °C.

Tabell 5 gjengir en fullstendig oversikt over prøvenummer, produksjonsdato og fra hvilket vekstmedium koloni er plukket fra. I tillegg viser tabellen hvor lenge pizza er lagret og hvilket medium som ga best vekst.

**Tabell 5. Oversikt over produksjonsdato og hvor koloni er blitt hentet fra. Videre gjengis lagringstemperatur for pizza og hvilket medium som ga best vekst.**

Prøve	Prod.dato	Lagringstemp.	Opprinnelse koloni	Beste medium
1	22/10-12, 25 dager	1,5 t/4 °C	LBS	MRS
2	22/10-12, 25 dager	1,5 t/4 °C	LBS	MRS
3	22/10-12, 25 dager	1,5 t/4 °C	LBS	MRS
4	22/10-12, 21 dager	6 °C	PCA pt*	BHI
5	22/10-12, 21 dager	6 °C	PCA pt	MRS
6	22/10-12, 21 dager	6 °C	PCA pt	BHI
7	22/10-12, 21 dager	8 °C	PCA pt	MRS
8	22/10-12, 25 dager	1,5 t/4 °C	PCA mt**	MRS
9	22/10-12, 25 dager	1,5 t/4 °C	PCA mt	BHI
10	22/10-12, 21 dager	8 °C	PCA pt	MRS
11	22/10-12, 21 dager	8 °C	PCA pt	MRS
12	22/10-12, 25 dager	8 °C	Rose & Bengal agar	M17
16	22/10-12, 25 dager	8 °C	Rose & Bengal agar	M17
18	22/10-12, 21 dager	4 °C	Rose & Bengal agar	BHI
19	22/10-12, 21 dager	4 °C	Rose & Bengal agar	M17
20	22/10-12, 25 dager	8 °C	LBS	MRS
21	22/10-12, 25 dager	8 °C	LBS	MRS
22	05/11-12, 21 dager	8 °C	LBS	MRS
23	05/11-12, 21 dager	8 °C	LBS	MRS
26	05/11-12, 21 dager	8 °C	PCA	BHI
27	05/11-12, 21 dager	8 °C	PCA	MRS
28	05/11-12, 25 dager	8 °C	LBS	MRS
29	05/11-12, 25 dager	8 °C	LBS	MRS
30	05/11-12, 21 dager	6 °C	Rose & Bengal agar	GYP
31	05/11-12, 21 dager	6 °C	Rose & Bengal agar	GYP
32	05/11-12, 21 dager	6 °C	Rose & Bengal agar	GYP
33	05/11-12, 25 dager	2 °C	Rose & Bengal agar	GYP
34	05/11-12, 25 dager	2 °C	Rose & Bengal agar	GYP

\*PT = psykrotroftall, \*\* MT = mesofiltall

For å fremstille renkulturer av bakterier fra innledende forsøk, ble nedfrosne cellekulturer podet over i best egnet medium og satt til inkubasjon over natten. Rør med MRS og BHI ble inkubert ved 30 °C, mens rør med GYP ble inkubert ved 22 °C. Fra disse ble kultur overført til agarskåler ved hjelp av en podeøse. Skåler med MRS og BHI ble inkubert ved 30 °C i 3 døgn, mens skåler med YM-Agar ble inkubert ved 22 °C i 3-4 døgn. Etter inkubasjon ble 1 koloni fra hver skål igjen overført til flytende medium før det hele ble gjentatt inntil ensartede kolonier. Renkulturene ble nedfrosset og lagret ved -80°C i et medium med 15 % glycerol.

### **3.5.2 Tradisjonelle metoder**

Etter å ha dyrket frem renkulturer ble det utført en katalasetest for å undersøke om bakteriene var i stand til å bryte ned hydrogenperoksid med frigjøring av oksyngass. Cellekulturer ble Gramfarget og studert i mikroskop for å få et inntrykk av morfologi, og om bakterier var Gram positive/negative.

Katalasetest ble utført ved at bakteriekolonier ble overført og rørt ut i en dråpe med 3 % hydrogenperoksid som på forhånd var lagt på et objektglass. Dersom det produseres synlig oksyngass er mikroorganismen katalase positiv, mens den antas å være katalase negativ dersom det ikke dannes gass.

Celler fra bakteriekultur ble tørket og fiksert på et objektglass før objektglasset ble plassert i fargebeholder med krystallfiolett i 1 minutt. Deretter ble objektglasset plassert i en beholder med jod-kaliumløsning i 3 minutter før det ble vasket i en beholder med etanol til det ikke rant av mer farge (ca 30 sekunder). Etter etanolvasking, ble objektglasset plassert i en beholder med safranin i 1 minutt. Mellom hvert trinn ble objektglasset forsiktig skylt med vann, og vannet fikk renne av på et tørt papir. Etter etanolvasking og safraninfarging (kontrastfarge), ble det i tillegg benyttet papir til forsiktig å tørke av væske på objektglasset.

Grampreparater ble deretter undersøkt ved hjelp av lysfeltmikroskopi. I tillegg til cellenes morfologi, ble det notert hvorvidt disse var Gram positive eller Gram negative.

### **3.5.3 Molekylær identifisering**

Ut fra katalasetest og mikroskopering m/ Gramfarging ble 11 isolater valgt ut til videre 16S/18S rRNA sekvensering, se tabell 6.



Tabell 6. Oversikt over isolater til 16 S rRNA/18 S rRNA sekvensering samt hvor disse er hentet fra.

Isolat nr	Isolert fra	Kommentar
1	1,5 t/4 °C PCA	
5	6 °C PCA	
11	8 °C PCA	
12	8 °C R&B	Funnet på R&B, men vokser på MRS
18	4 °C R&B	Funnet på R&B, men vokser på BHI
19	4 °C R&B	Funnet på R&B, men vokser på MRS
20	8 °C LBS	
29	8 °C LBS	
31	6 °C R&B	
32	6 °C R&B	
34	2 °C R&B	

### 3.5.3.1 DNA isolering og amplifisering av 16S rDNA ved PCR

Celler ble dyrket over natt i MRS (isolat nr. 1, 5, 11, 12, 19, 20 og 29), BHI (isolat nr. 18) og GYP (isolat nr. 31, 32 og 34) ved henholdsvis 30 °C (MRS og BHI) og 22 °C (GYP) før sentrifugering ved 13000 rpm i 3 minutter. DNA ble isolert fra utvalgte bakterier og gjær ved bruk av et kommersielt kit (Qiagen Miniprep, Venlo, Nederland). Fremgangsmåte er gjengitt punktvis på under:

- Pellet ble løst i 400 µl P1
- Løsning ble overført til fastpreprør med 0,5g glasskuler (diameter  $<10^6$  µm) og kjørt 20 sekunder med 6,5 m/s i Fastprepmaskin (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Fastpreprør ble sentrifugert ved 13000 rpm i 2 min, og supernatant overført til nytt rør
- Det ble tilsatt 250 µl P2 til supernatanten, løsningen ble blandet ved å vende på rørene
- Løsningen ble så tilsatt 350 µl N3, løsningen ble blandet ved å vende på rørene
- Løsningen ble sentrifugert i 10 min ved 13000 rpm
- Supernatanten ble satt på Qiaprep spin kolonne (Qiagen)
- Kolonnen ble sentrifugert i 1 min, hvor oppsamlet væske ble kastet
- Kolonnen ble vasket med 500 µl PB og spunnet i 30 sekunder. Oppsamlet væske ble kastet.

- Kolonnen ble vasket med 750 µl PE og spunnet i 30 sekunder. Oppsamlet væske ble kastet og det ble sentrifugert i 30 sekunder på nytt.
- Kolonne ble overført til nytt Eppendorfrør
- Det ble eluert med 50 µl vann
- Det ble eluert på nytt med 100 µl vann

**P1:** 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, add RNase A to 100 µg/ml

**P2:** 200 mM NaOH, 1 % SDS

**N3:** 4.2 M GuHCl, 0.9 M KAc, pH 4.8

**PB:** 5.0 M GuHCl, 30 % isopropanol

**PE:** 80 % etanol

For utfyllende beskrivelse av fremgangsmåte vises det til QIAprep® Miniprep Handbook (vedleg 10).

Etter at DNA var isolert, ble amplifisering av DNA utført i en PCR-maskin (S1000 Thermal Cycler, BIO-RAD, Hercules, California, USA). Reaksjonsblanding som settes inn i PCR-maskin inneholdt da templat, to forskjellige primere, buffer og dNTP. Polymerasen som ble benyttet var varmestabil Tac-polymerase (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Det ble benyttet ulike primere for prokaryote og eukaryote isolater. Da det var usikkerhet om hvorvidt isolat nr. 32 var prokaryot eller eukaryot, ble den kjørt med primere for begge typer organismer i to separate rør. Primere benyttet i denne øvelsen er gjengitt i tabeller under.

**Tabell 7. Sekvens til prokaryote primere benyttet (16S rRNA).**

Primer	Sekvens
<b>11F</b>	5' TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3'
<b>5R</b>	5' CGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'
<b>1F</b>	5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'
<b>6R</b>	5' AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'
<b>4R</b>	5' ACG GGC GGT GTG TRC 3'

Første forsøk: 11F og 5R for PCR og sekvensering.

Andre forsøk (for sekvenser som ikke ga resultat ved første forsøk): 1F og 6R ved PCR, 11F og 4R ved sekvensering.

Tabell 8. Sekvens til eukaryote primere benyttet (18S rRNA).

Primer	Sekvens
ITS1	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'
ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

Temperaturprofil for PCR-maskin er gjengitt i tabell under. Syntesetid ble satt til 90 sekunder da hastighet til Tac-polymerase er 1000 bp pr sekund.

Tabell 9. Temperaturprofil for PCR-maskin.

Temperatur	Tid
95 °C	15 minutter
94 °C	10 sekunder
56 °C	30 sekunder
72 °C	90 sekunder
72 °C	10 minutter

Repeteres 30 ganger

### 3.5.3.2 Gelelektroforese

For å teste om vi hadde fått PCR-produkt eller ikke, ble det utført en gelelektroforese av PCR-produktet. Ladder som ble benyttet var 1kb for bakterier (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) og 100 bp for gjær (New England Biolabs). For isolat hvor det ikke ble observert tydelig PCR bånd ble det kjørt ny PCR, denne gang tilsatt 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM) for at primer skulle bli mindre spesifikk.

### 3.5.5.3 Rensing av PCR-produkt

Etter å ha fått bekreftet resultat for samtlige isolater, ble det benyttet et kommersielt kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, Düren, Tyskland) for å rense PCR-produktet for uønskede nukleotider, primere, enzymer og ulike PCR-tilsetninger. Fremgangsmåte er gjengitt punktvis under:

- Binding buffer ble tilsatt før sentrifugering i 30 sekunder (2-3 ganger mer Binding buffer enn volum på PCR-produkt).
- Deretter ble det tilsatt 700 µl vaskebuffer før sentrifugering ved 13000 rpm i 30 sekunder. Oppsamlingsrør ble tømt før det en gang til ble sentrifugert ved 13000 rpm i 30 sekunder.
- Det ble til slutt tilsatt 30 µl elueringsbuffer og eluat ble samlet opp etter sentrifugering ved 13000 rpm i 30 sekunder.

For utfyllende beskrivelse av fremgangsmåte og buffere vises det til produsentens manual, NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (vedlegg 11).

### **3.5.5.3 Automatisk sekvensering**

Etter at PCR-produkt var rensert, ble DNA-konsentrasjon bestemt ved hjelp av et spektrofotometer (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, Wilmington, USA). DNA-konsentrasjon skulle være 30-40 ng/µl. 1 µl ble pipettert ut på spektrofotometeret for analyse. DNA, 80 ng/µl fra hvert isolat, ble overført til to nye rør og tilsatt primer (2 ulike primere for hvert isolat i to separate rør). Isolater med prokaryote organismer ble tilsatt primerene 11F og 5R, mens isolater med eukaryote organismer ble tilsatt primerene ITS1 og ITS4. Primerkonsentrasjon var i dette tilfelle lavere enn ved PCR (5 pM). For isolater som ikke ga resultat ved første forsøk ble primerene 11F og 4R tilsatt. Isolater ble så sendt til GATC (Freiburg, Tyskland) for sekvensering.

### **3.5.5.4 Redigering og analyse av sekvenser**

Til å ”trimme” sekvenser, ble dataprogrammet BioEdit (Bioedit versjon 7.0.9.0) benyttet. Støy i område hvor primer fester seg og dårlige sekvenser mot slutten ble redigert bort. BioEdit er et dataprogram som kan lastes gratis ned på internett. Etter redigering av sekvenser, ble disse lagret som Fasta-filer og lastet opp i en database for sammenligning med sekvenser for kjente mikroorganismer. Databasen som ble benyttet var BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## 4. Resultater

### 4.1 Bedriftsbesøk Stranda

Relevante observasjoner gjort i forbindelse med bedriftsbesøk på Stabburets produksjonsanlegg på Stranda vil her bli presentert. Observasjoner relatert til:

#### Bunn:

Pizzabunnene blir bakt på Stranda og det benyttes vanlig bakemel til bunnen. Bunnen stekes i 8 min ved 175 °C. Etter steking kjøles bunnen ned til 4 °C i løpet av omtrent 1 time med luft i kjølerom. Av pizzaens totalvekt på 900 g veier bunnen 410 g.

#### Saus:

Pizzasausen tilvirkes på Stranda i forkant av produksjon. For å unngå at sausen skal trekke ned i pizzaen før den ankommer forbruker, inneholder sausen gelatin. Sausen holder derfor en temperatur på 40-50 °C når den påføres pizzaen, og pH i sausen er mellom 4,3 og 4,5. Det benyttes 170 g saus pr pizza.

#### Ost:

Det benyttes 190 g ost pr pizza. Osten ankommer Stranda ferdig revet og påføres pizzaene ved hjelp av en toppingmaskin.

#### Kjøtt:

Kjøttet ankommer Stranda frosset og påføres pizzaene frossent. Kjøddeig og bacon påføres pizzaene hver for seg i to separate toppingmaskiner. Det benyttes 110 g kjøtt pr. pizza.

#### Løk:

Løk ankommer Stranda i ferdig kuttet og i frossen tilstand. Påføres pizzaene ved hjelp av toppingmaskin.

Pizzabunner stanses ut maskinelt og plasseres i form manuelt. Steking, nedkjøling og plassering av pizzabunner på produksjonslinje gjøres manuelt. Det tar omtrent 1,5 min fra en pizzabunn blir plassert på produksjonsbåndet til den er ferdig pakket i HDPE-plast med gassbarriere. Ferdig emballerte pizzaer pakkes så i pappesker (6 stk. i hver eske). Linja er helt åpen, og enkelte steder går den rett under taket.

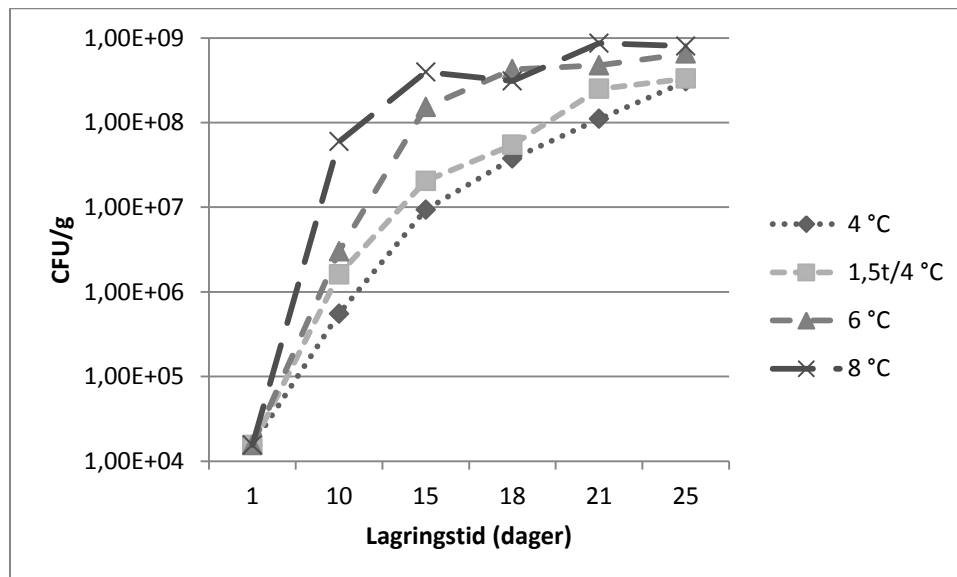
Ved emballering stanses underformen (APET) ut med varme fra en slett film, noe som bidrar til temperaturøkningen under pakking. Overfilm (OPET) sveises så fast i underfilm for forsegling av pizzaen. For å oppnå ønsket kjøletemperatur på emballasje og produkt har pizzaene karantenetid på Stranda i minimum 24 timer ved 4 °C før utekspedering. Etter at pizzaen har blitt MAP-pakket, blir andel CO<sub>2</sub> i atmosfæren målt til 35,5 %. I løpet av 1 minutt tilvirkes det ca 8 pizzaer, totalt for en hel dags produksjon ca 900 stk.

Etter daglig produksjonsslutt er det et eksternt vaskefirma som vasker ned produksjonslokalet og produksjonslinjen (grovspyling, skumming m/sterkt alkalisk skummiddel og rensyling). Det er installert tørkevifter over linjene slik at alle bånd og overflater tørker opp før oppstart neste morgen. Før produksjonsstart er det monteringsansvarlig som kontrollerer visuelt det daglige renholdet. Gjennom en produksjonsdag er det ikke praksis med vask med vann, men ved behov blir transportbåndet skrapet. Det foretas hovedrengjøring og fullstendig nedvasking av produksjonslokalet en gang i året.

## 4.2 Mikrobiologiske analyser

### 4.2.1 Pizza produsert 15.10.12

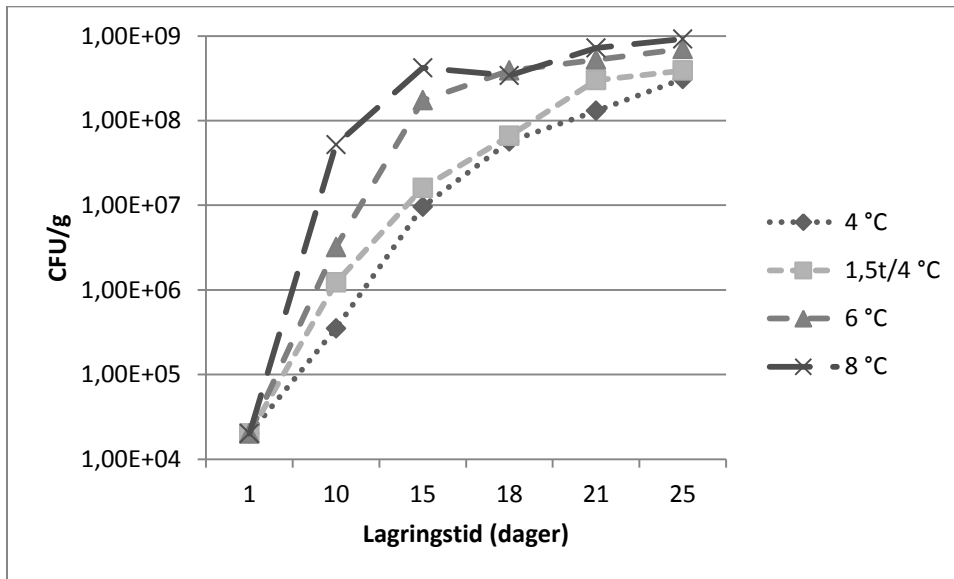
Aerobt mesofilt celletall (kimtall) ble bestemt. Resultat er vist i figur 1.



Figur 1. Aerobt mesofilt celletall (kimtall) i pizza produsert 15.10.12 gjennom lagringstiden.

Kimtall for mesofile bakterier ble 1 dag etter produksjon målt til  $1,55 \cdot 10^4$  CFU/g, og etter 21 dager lagring var antallet  $>10^8$  CFU/g for samtlige lagringstemperaturer. For pizza lagret ved 8 °C synes vekst å nå toppen etter 15 dager, kimtall stabiliserer seg mellom  $10^8$  og  $10^9$  CFU/g etter 15 dager. Lagring ved 6 °C utsetter vekststopp til 18 dager, mens lagring ved 1,5t/4 °C gir noe høyere vekst enn lagring ved 4 °C.

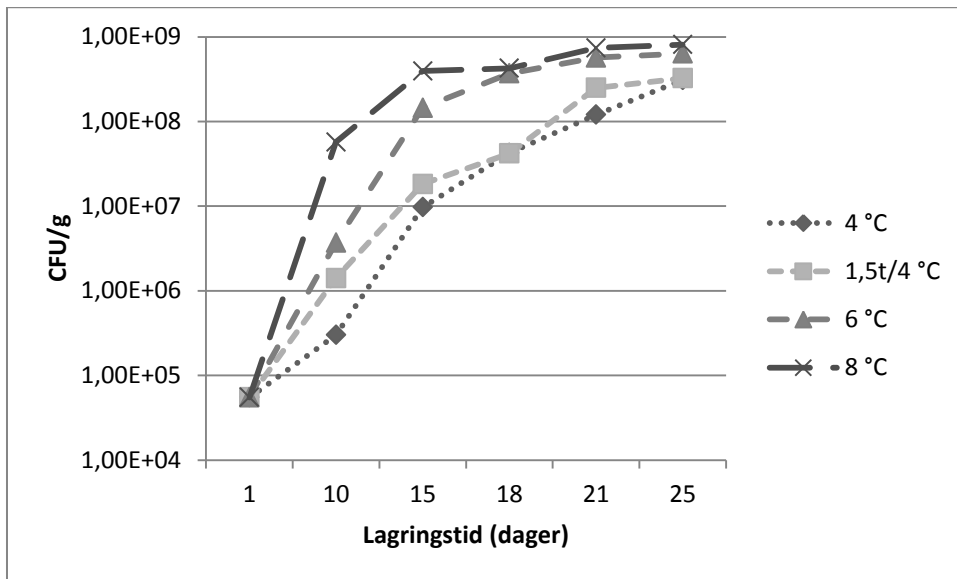
Kimtall for psykrotrofe bakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i figur 2.



Figur 2. Psykrotroft celletall i pizza produsert 15.10.12 gjennom lagringstiden.

Psykrotroft celletall ble 1 dag etter produksjon målt til  $2,00 \cdot 10^4$  CFU/g, og etter 21 dager lagring var antallet  $>10^8$  CFU/g for samtlige lagringstemperaturer. For pizza lagret ved 8 °C synes vekst å nå toppen etter 15 dager, psykrotroft celletall stabiliserer seg mellom  $10^8$  og  $10^9$  CFU/g etter 15 dager. For pizza lagret ved 6 °C flater vekst ut etter 18 dager, mens lagring ved 1,5t/4 °C gir noe høyere vekst enn lagring ved 4 °C.

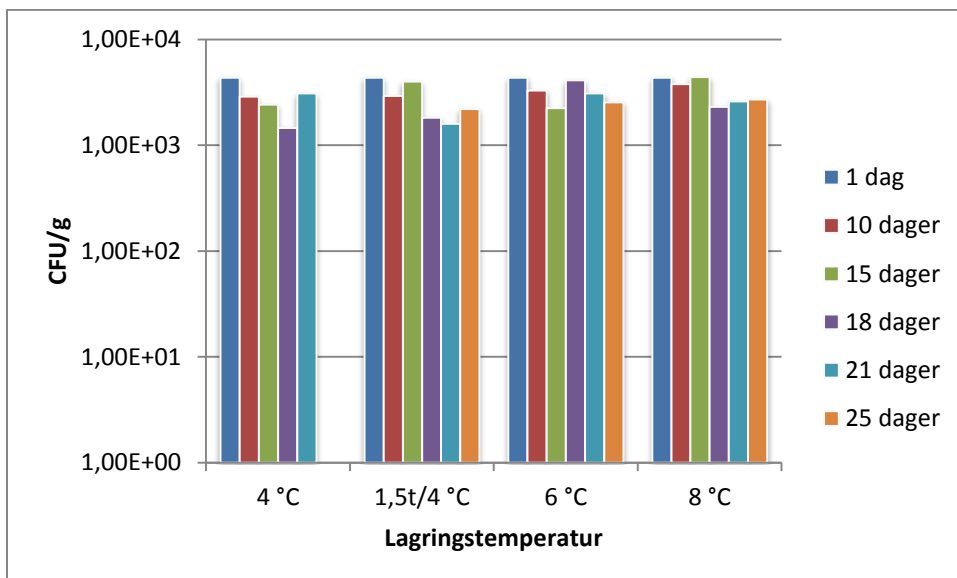
Antall melkesyrebakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i figur 3.



Figur 3. Melkesyrebakterier i pizza produsert 15.10.12 gjennom lagringstiden.

Melkesyrebakterier ble 1 dag etter produksjon målt til  $5,50 \cdot 10^4$  CFU/g, og etter 21 dager lagring var antall  $>10^8$  CFU/g for samtlige lagringstemperaturer. For pizza lagret ved 8 °C synes vekst å nå toppen etter 15 dager, antall melkesyrebakterier stabiliserer seg mellom  $10^8$  og  $10^9$  CFU/g etter 15 dager. Lagring ved 6 °C ga jevn vekst fram til 18 dager før vekst syntes å avta. Lagring ved 1,5t/4 °C gir noe høyere vekst enn lagring ved 4 °C.

Tilstedeværelse av mugg og gjær ble undersøkt. Resultatet er vist i figur 4.



Figur 4. Mugg/gjær i pizza produsert 15.10.12.



Mugg/gjær ble 1 dag etter produksjon bestemt til  $4,3 \cdot 10^3$  CFU/g. Antallet varierte mellom  $1,46 \cdot 10^3$  og  $4,4 \cdot 10^3$  CFU/g gjennom lagringstiden. På enkelte skåler ble det identifisert muggspreedere.

Antall koliforme bakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i tabell 10.

**Tabell 10. Koliforme bakterier i pizza produsert 15.10.12.**

Lagringstid (dager)	4 °C	1,5t/4 °C	6 °C	8 °C
1	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
10	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
15	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
18	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
21	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	65 CFU/g
25	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g

Av pizzaer produsert 15.10.12 ble det bare identifisert koliforme bakterier i 1 pizza etter endt lagring. Antall koliforme bakterier i pizzaen var 65 CFU/g etter lagring ved 8 °C i 21 dager.

Tilstedeværelse av *B. cereus* ble identifisert. Resultat er gjengitt i tabell 11.

**Tabell 11. *Bacillus cereus* i pizza produsert 15.10.12.**

Lagringstid (dager)	4 °C	1,5t/4 °C	6 °C	8 °C
1	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
10	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
15	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
18	<10 CFU/g	30 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
21	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
25	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g

Av pizza produsert 15.10.12 ble det identifisert *Bacillus cereus* i 1 pizza lagret ved 1,5/4 °C i 18 dager. Antallet ble bestemt til 30 CFU/g.

*Listeria monocytogenes* ble identifisert. Resultat er gjengitt i tabell 12.

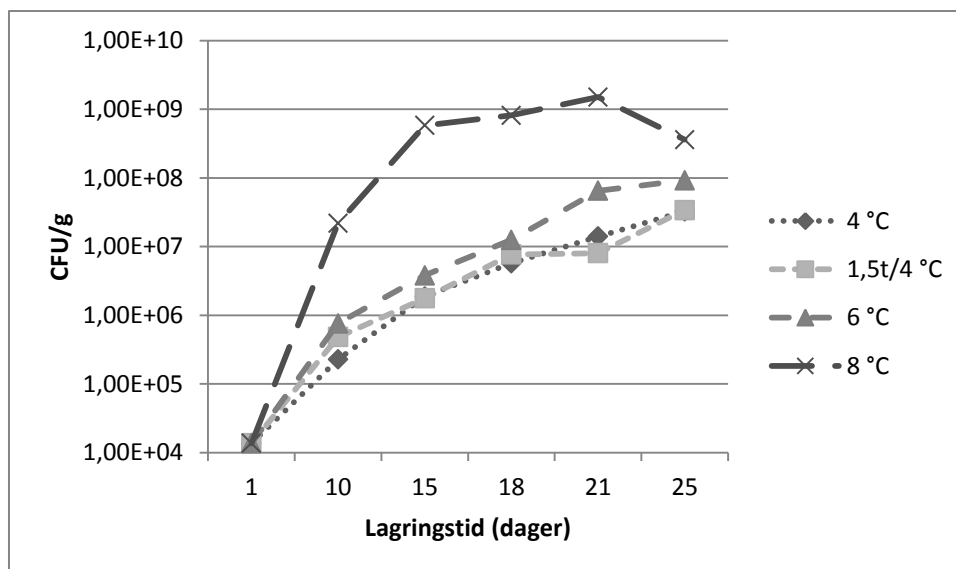
Tabell 12. *Listeria monocytogenes* i pizza produsert 15.10.12.

Lagringstid (dager)	4 °C	2t/4 °C	8 °C
3	Negativ	Negativ	Negativ
9	Negativ	Negativ	Negativ
16	Positiv, <10 CFU/g	Negativ	Positiv, <10 CFU/g
21	Negativ	Negativ	Negativ
23	Negativ	Negativ	Negativ
30	Negativ	Negativ	Negativ

Av pizzaer produsert 15.10.12 ble det identifisert *Listeria monocytogenes* i 2 pizzaer (<10 CFU/g i begge tilfeller). Begge pizzaer hadde vært lagret i 16 dager ved henholdsvis 4 °C og 8 °C.

#### 4.2.2 Pizza produsert 22.10.12

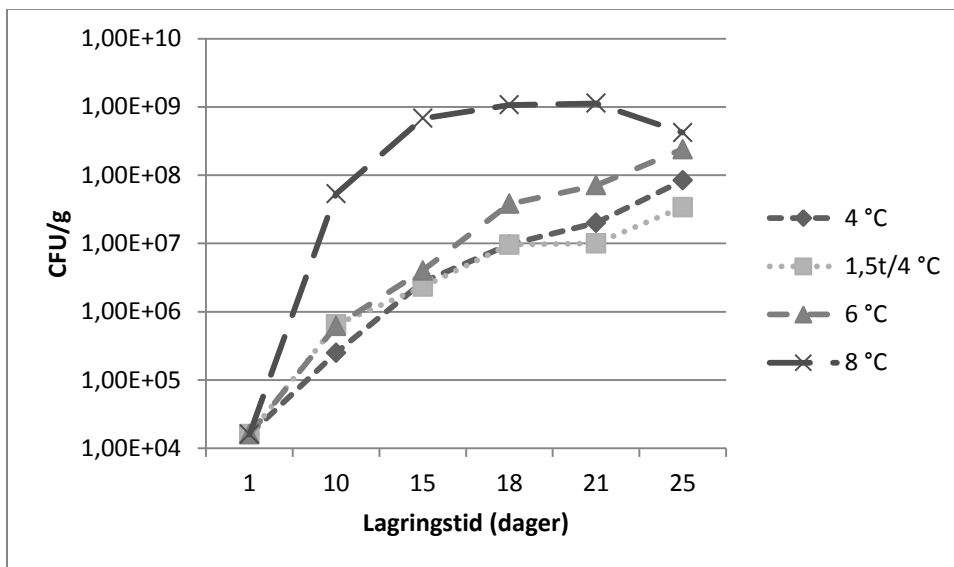
Aerobt mesofilt celletall (kimtall) ble bestemt. Resultat er vist i figur 5.



Figur 5. Aerobt mesofilt celletall (kimtall) i pizza produsert 22.10.12 gjennom lagringstiden.

Kimtall for mesofile bakterier ble 1 dag etter produksjon målt til  $1,36 \cdot 10^4$  CFU/g. Etter lagring i 21 dager ble laveste CFU/g observert i pizza lagret ved 1,5/4 °C ( $8 \cdot 10^6$  CFU/g), og høyeste CFU/g observert i pizza lagret ved 8 °C ( $1,5 \cdot 10^9$  CFU/g). For pizza lagret ved 6 °C ble det observert noe høyere vekst sammenlignet med pizza lagret ved 4 °C og 1,5/4 °C. Forskjeller med hensyn på vekst og temperatur var relativt små. I pizza lagret ved 8 °C ble det observert raskere økning i antall CFU/g enn i pizza lagret ved lavere temperaturer. Etter lagring i 21 dager ( $\text{CFU/g} > 10^9$ ) ble antall CFU/g redusert for pizza lagret ved 8 °C.

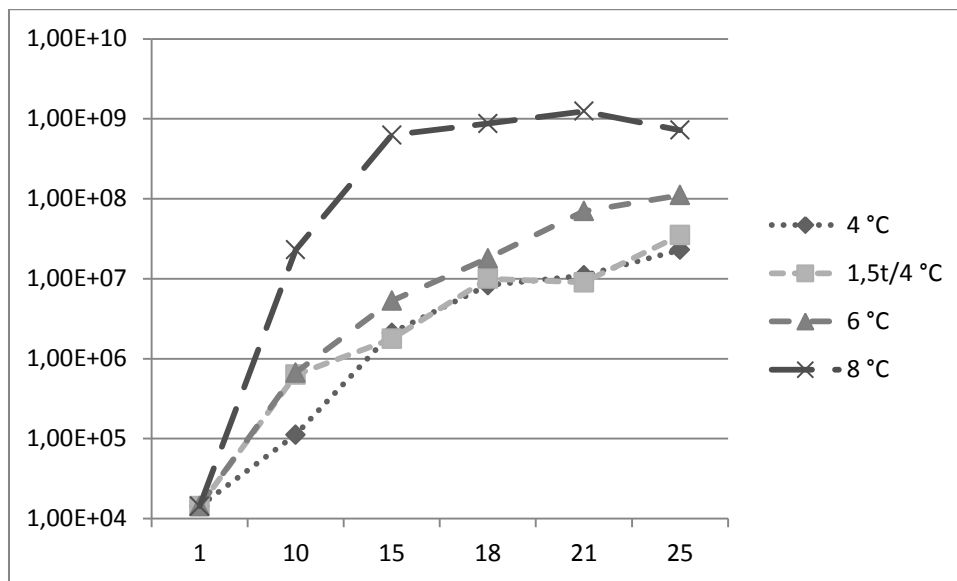
Kimtall for psykrotrofe bakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i figur 6.



Figur 6. Psykrotroft celletall i pizza produsert 22.10.12 gjennom lagringstiden.

Psykrotroft celletall ble 1 dag etter produksjon målt til  $1,6 \cdot 10^4$  CFU/g. Etter lagring i 21 dager ble laveste CFU/g observert i pizza lagret ved 1,5/4 °C ( $1,0 \cdot 10^7$  CFU/g), og høyeste CFU/g observert i pizza lagret ved 8 °C ( $1,13 \cdot 10^9$  CFU/g). Etter lagring i 15 dager ble det for pizza lagret ved 6 °C observert noe høyere vekst sammenlignet med pizza lagret ved 4 °C og 1,5/4 °C. Forskjeller med hensyn på vekst og temperatur var relativt små. I pizza lagret ved 8 °C ble det observert raskere økning i antall CFU/g enn i pizza lagret ved lavere temperaturer. Etter lagring i 21 dager ( $\text{CFU/g} > 10^9$ ) ble antall CFU/g redusert for pizza lagret ved 8 °C.

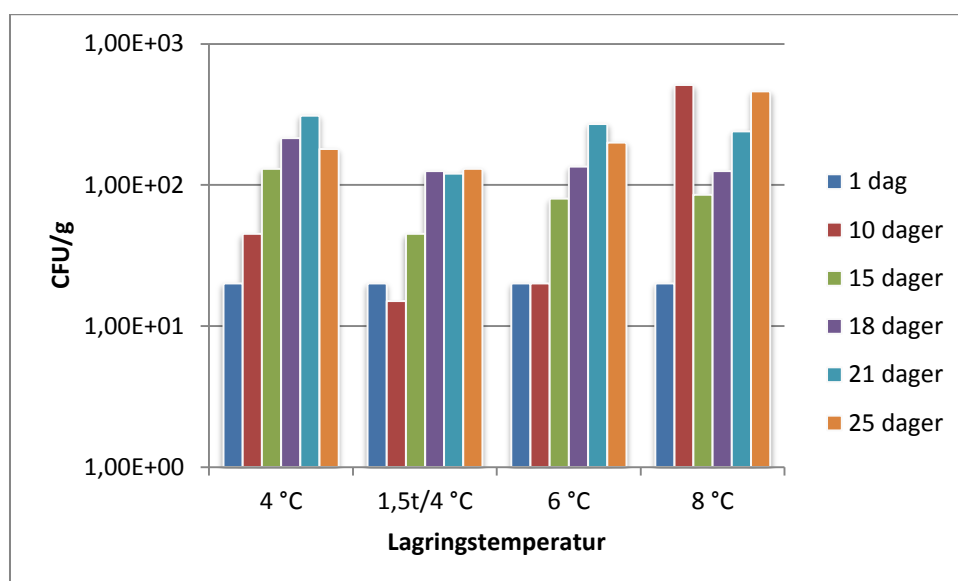
Antall melkesyrebakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i figur 7.



Figur 7. Melkesyrebakterier i pizza produsert 22.10.12 gjennom lagringstiden

Melkesyrebakterier ble 1 dag etter produksjon målt til  $1,43 \cdot 10^4$  CFU/g. Etter lagring i 21 dager ble laveste CFU/g observert i pizza lagret ved 1,5t/4 °C ( $9,0 \cdot 10^6$  CFU/g), og høyeste CFU/g observert i pizza lagret ved 8 °C ( $1,25 \cdot 10^9$  CFU/g). Etter lagring i 10 dager ble det for pizza lagret ved 6 °C observert noe høyere vekst sammenlignet med pizza lagret ved 4 °C og 1,5t/4 °C. Forskjeller med hensyn på vekst og temperatur var relativt små etter lagring i 15 dager. Fram til 15 dager ble det observert høyere CFU/g for pizza lagret ved 1,5t/4 °C enn for pizza lagret ved 4 °C. For pizza lagret ved 8 °C ble det observert raskere økning i antall CFU/g enn i pizza lagret ved lavere temperaturer. Etter lagring i 21 dager ( $\text{CFU/g} > 10^9$ ) ble antall CFU/g redusert for pizza lagret ved 8 °C.

Tilstedeværelse av mugg og gjær ble undersøkt og resultatet er vist i figur 8.



Figur 8. Mugg/gjær i pizza produsert 22.10.12

Mugg/gjær ble 1 dag etter produksjon målt til 20 CFU/g. Etter 21 dager ble høyeste antall CFU/g observert i pizza lagret ved 8 °C (510 CFU/g) og lavest i pizza lagret ved 1,5t/4 °C (120 CFU/g). For pizza lagret ved 4 °C ble det observert en jevn stigning i antall CFU/g fram til 21 dager (310 CFU/g) før antall ble redusert til 180 CFU/g etter 25 dager. For samtlige lagringstemperaturer ble det observert en økning i antall CFU/g i løpet av lagringstiden. Det ble ikke observert store forskjeller i vekst med hensyn på lagringstemperatur. På enkelte skåler ble det identifisert mugg/spredere.

Antall koliforme bakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i tabell 13.

Tabell 13. Koliforme bakterier i pizza produsert 22.10.12.

Lagringstid (dager)	4 °C	1,5t/4 °C	6 °C	8 °C
1	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
10	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
15	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
18	<10 CFU/g	<10 CFU/g	20 CFU/g	380 CFU/g
21	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
25	<10 CFU/g	10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g

Av pizza produsert 22.10.12 ble det identifisert koliforme bakterier i 3 pizzaer. Lagringstid og temperatur for disse pizzaene var 21 dager/1,5t/4 °C (10 CFU/g), 18 dager/6 °C (20 CFU/g) og 18 dager/8 °C (380 CFU/g).

Det ble ikke identifisert *Bacillus cereus* i pizza produsert 22.10.12.

*Listeria monocytogenes* ble identifisert. Resultat er gjengitt i tabell 14.

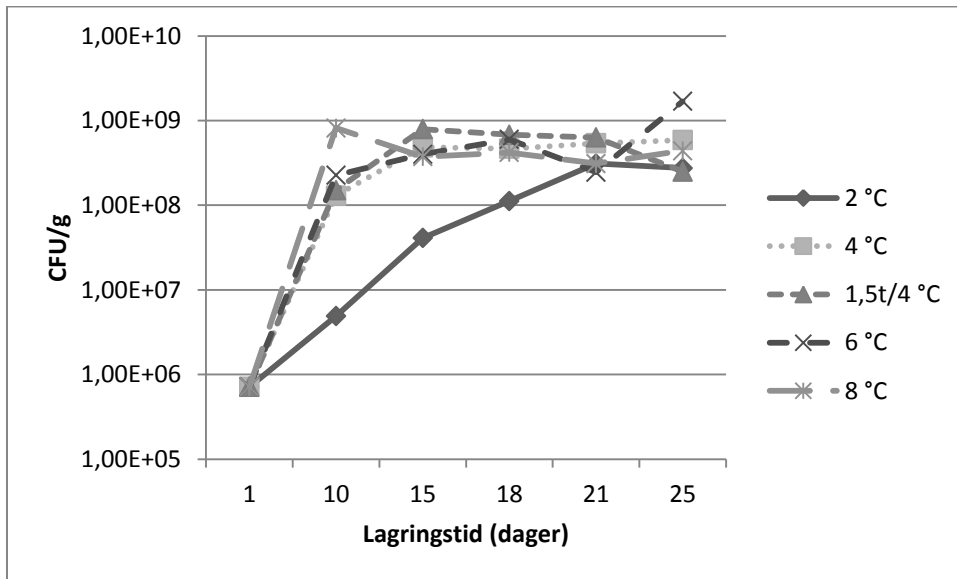
Tabell 14. *Listeria monocytogenes* i pizza produsert 22.10.12

Lagringstid (dager)	4 °C	2t/4 °C	8 °C
3	Negativ	Negativ	Negativ
9	Negativ	Negativ	Negativ
16	Negativ	Negativ	Negativ
21	Negativ	Positiv, <10 CFU/g	Negativ
23	Negativ	Positiv, <10 CFU/g	Negativ
30	Negativ	Negativ	Negativ

Av pizza produsert 22.10.12 ble det identifisert *Listeria monocytogenes* i 2 pizzaer (<10 CFU/g i begge tilfeller). Begge pizzaer hadde vært lagret ved 2t/4 °C i henholdsvis 21 og 23 dager.

### 4.3.3 Pizza produsert 05.11.12

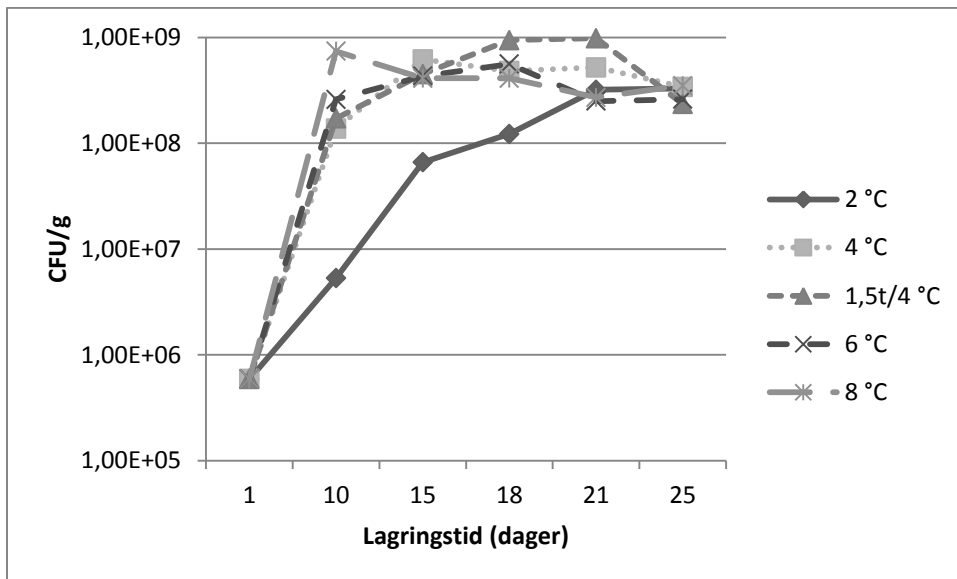
Aerobt mesofilt celletall (kimtall) ble bestemt. Resultat er vist i figur 9.



Figur 9. Aerobt mesofilt celletall (kimtall) i pizza produsert 05.11.12 gjennom lagringstiden.

Kimtall for mesofile bakterier ble 1 dag etter produksjon målt til  $7,2 \cdot 10^5$  CFU/g. For alle lagringstemperaturer, bortsett fra 2 °C, ble det observert en rask økning i antall CFU/g fram til 15 dagers lagring, hvorfra celletallet flatet ut og stabiliserte seg på rundt  $7 \cdot 10^8$  CFU/g. For pizza lagret ved 2 °C ble det en jevn stigning gjennom hele lagringstiden. Denne vekstkurven skiller seg derfor fra de andre.

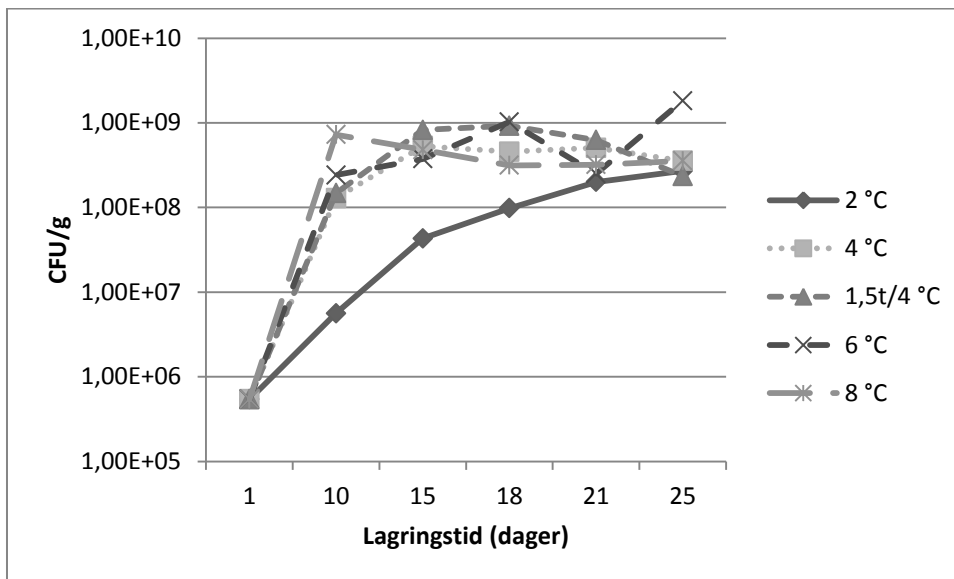
Kimtall for psykrotrofe bakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i figur 10.



Figur 10. Psykrotroft celletall i pizza produsert 05.11.12 gjennom lagringstiden.

Kimtall for psykrotrofe bakterier ble 1 dag etter produksjon målt til  $5,9 \cdot 10^5$  CFU/g. For alle lagringstemperaturer, bortsett fra 2 °C, ble det observert en rask økning i antall CFU/g fram til 10 dagers lagring, hvorfra det flatet ut og stabiliserte seg på rundt  $6 \cdot 10^8$  CFU/g. For pizza lagret ved 2 °C var det en jevn stigning gjennom hele lagringstiden. Denne vekstkurven skiller seg derfor fra de andre.

Antall melkesyrebakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i figur 11.

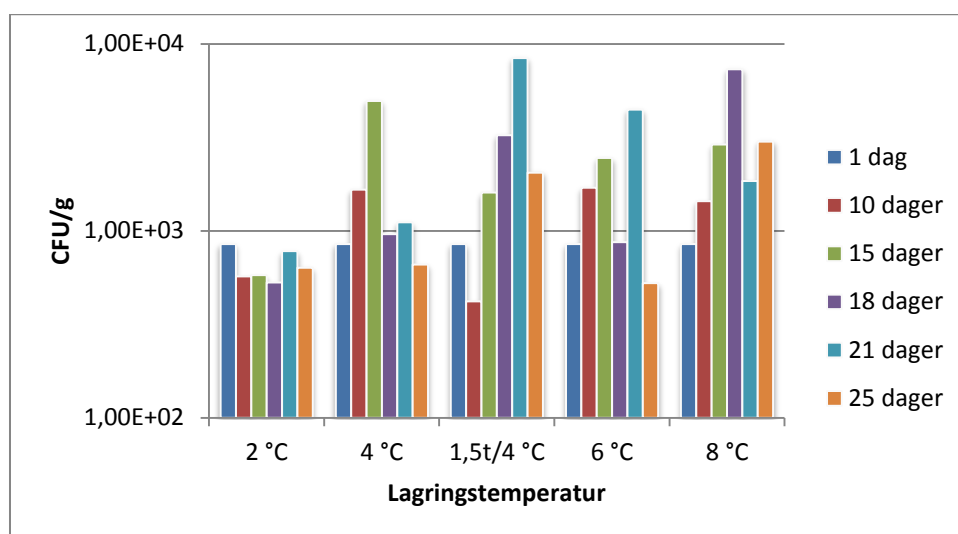


Figur 11. Melkesyrebakterier i pizza produsert 05.11.12 gjennom lagringstiden.

Antall levende melkesyrebakterier ble 1 dag etter produksjon målt til  $5,4 \cdot 10^5$  CFU/g. For alle lagringstemperaturer, bortsett fra 2 °C, ble det observert en rask økning i antall CFU/g fram til 10 dagers lagring, hvorfra det flatet ut og stabiliserte seg rundt  $7 \cdot 10^8$  CFU/g. For pizza lagret ved 2 °C var det en jevn stigning gjennom hele lagringstiden. Denne vekstkurven skiller seg derfor fra de andre.



Tilstedeværelse av mugg og gjær ble undersøkt. Resultatet er vist i figur 12.



Figur 12. Mugg/gjær i pizza produsert 05.11.12.

Mugg/gjær ble 1 dag etter produksjon målt til 850 CFU/g. For pizza lagret ved 4 °C ble høyeste antall CFU/g observert etter 15 dager ( $4,95 \cdot 10^3$  CFU/g), og laveste observert etter 25 dager (660 CFU/g). Med unntak av observasjon gjort etter 15 dager, er antall CFU/g for pizza lagret ved 4 °C relativt stabilt. For pizza lagret ved 1,5t/4 °C stiger CFU/g fram til 21 dager ( $8,4 \cdot 10^3$  CFU/g) før antallet reduseres. Tilsvarende ble observert for pizza lagret ved 8 °C. CFU/g stiger fram til 18 dager ( $7,3 \cdot 10^3$  CFU/g) før antallet reduseres. Antall CFU/g for pizza lagret ved 6 °C er varierende gjennom lagringstiden. For pizza lagret ved 2 °C ble det ikke observert økning i antall CFU/g. Denne lagringstemperaturen skiller seg derfor fra de andre. På enkelte skåler ble det identifisert mugg/spredere.

Antall koliforme bakterier ble bestemt. Resultat er gjengitt i tabell 15.

Tabell 15. Koliforme bakterier i pizza produsert 05.11.12.

Lagringstid (dager)	2 °C	4 °C	1,5t/4 °C	6 °C	8 °C
1	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
10	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
15	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
18	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
21	<10 CFU/g	2250 CFU/g	235 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g
25	40 CFU/g	40 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g	<10 CFU/g

Av pizza produsert 05.11.12 ble det identifisert koliforme bakterier i 4 pizzaer. Lagringstid og temperatur for disse pizzaene var 25 dager/2 °C (40 CFU/g), 21 dager/4 °C (2250 CFU/g), 25 dager/4 °C (40 CFU/g) og 21 dager/1,5t/4 °C (235 CFU/g).

Det ble ikke identifisert *Bacillus cereus* i pizza produsert 05.11.12.

*Listeria monocytogenes* ble identifisert. Resultat er gjengitt i tabell 16.

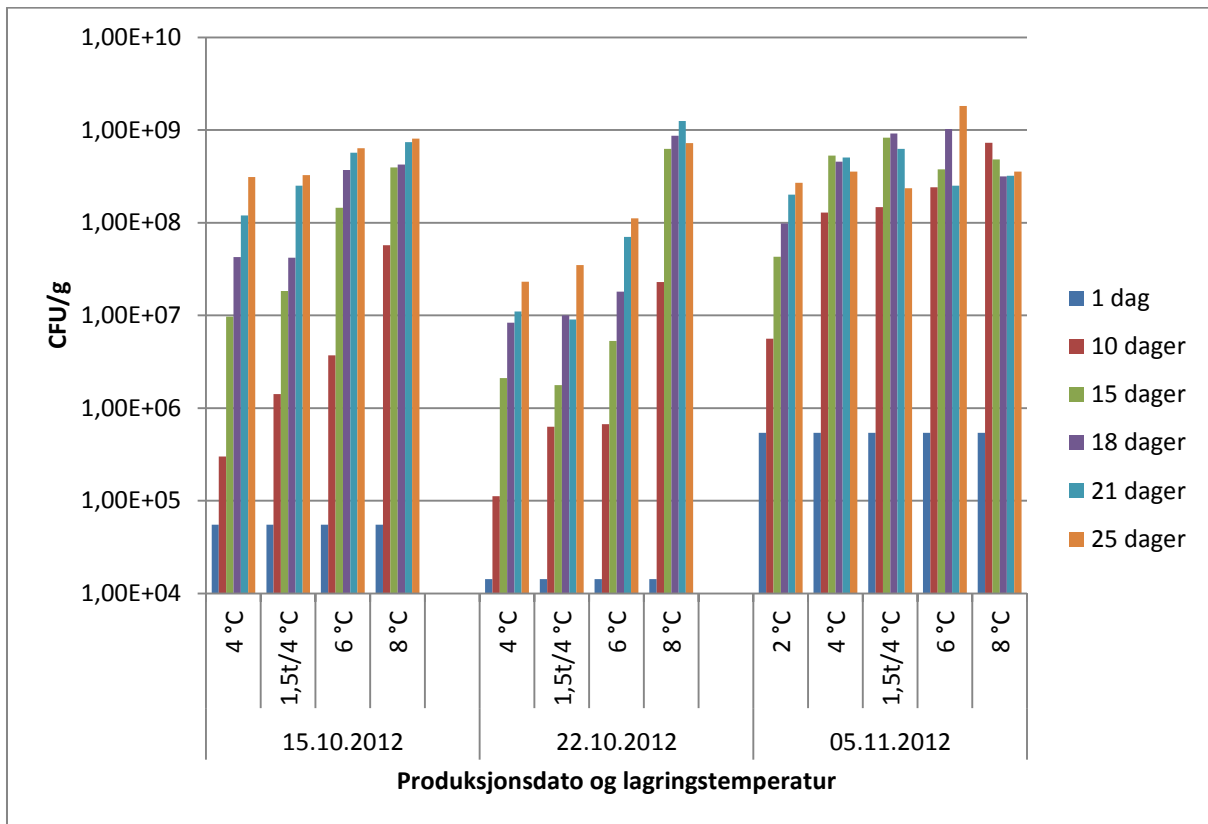
Tabell 16. *Listeria monocytogenes* i pizza produsert 05.11.12.

Lagringstid (dager)	4 °C	2t/4 °C	8 °C
3	Negativ	Negativ	Negativ
9	Negativ	Negativ	Negativ
16	Negativ	Negativ	Negativ
21	Negativ	Negativ	Negativ
23	Positiv <10 CFU/g	Negativ	Negativ
30	Negativ	Negativ	Negativ

Av pizza produsert 05.11.12 ble det identifisert *Listeria monocytogenes* i 1 pizza (<10 CFU/g). Pizzaen hadde vært lagret ved 4 °C i 23 dager.

#### 4.3.4 Sammenligning alle produksjonsdager

En sammenligning mellom pizza fra alle produksjonsdager er gjengitt i figur 13. Figuren viser resultat for aerobt mesofilt celletall.

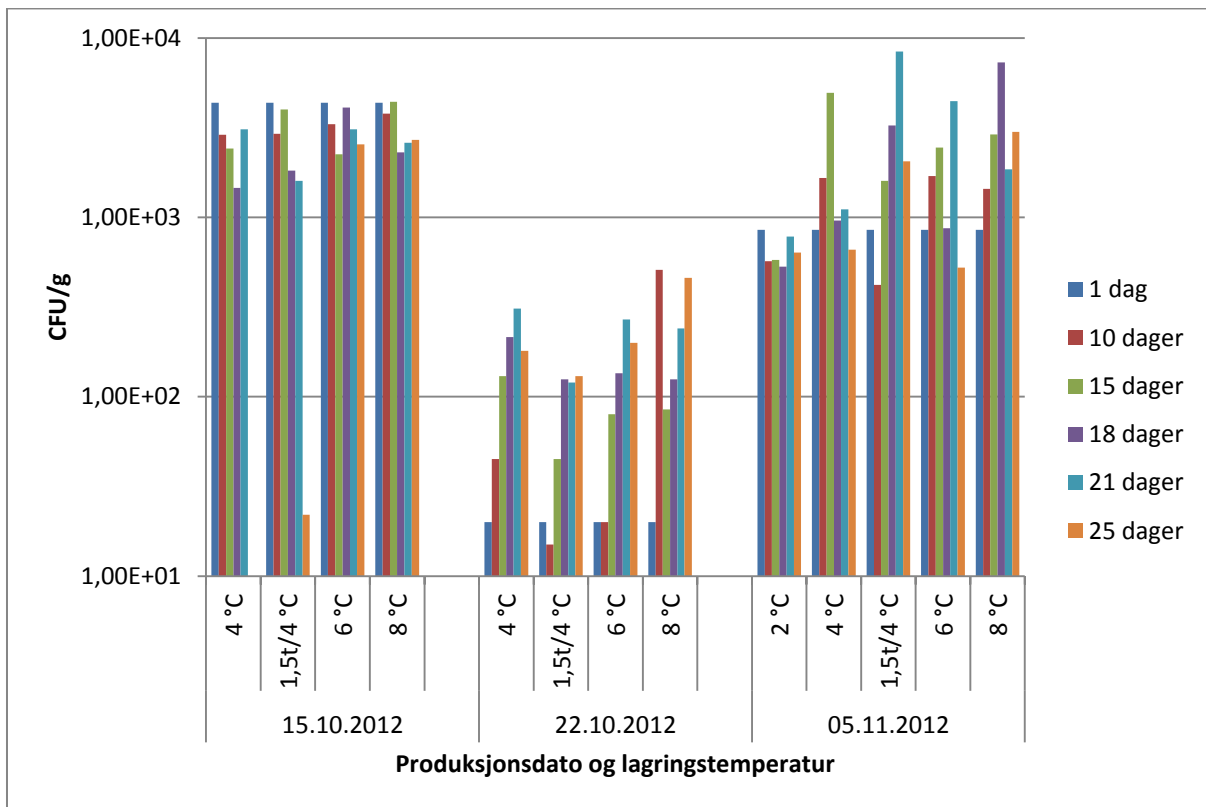


Figur 13. Aerobt mesofilt celletall for alle produksjonsdager.

Pizza med produksjonsdato 05.11.12 har høyere aerobt mesofilt celletall sammenlignet med pizza produsert 15.10.12 og 22.10.12. Pizza produsert 22.10.12 har lavest kimtall for lagringstemperaturer under 8 °C, men et høyt kimtall for pizza lagret ved 8 °C. For pizza produsert 05.11.12 ble det observert generelt høye celletall etter 10 dagers lagring for lagringstemperaturer høyere enn 2 °C ( $>10^8$  CFU/g).

Resultatene er tilsvarende for psykrotrofe bakterier og melkesyrebakterier, og vil ikke bli vist.

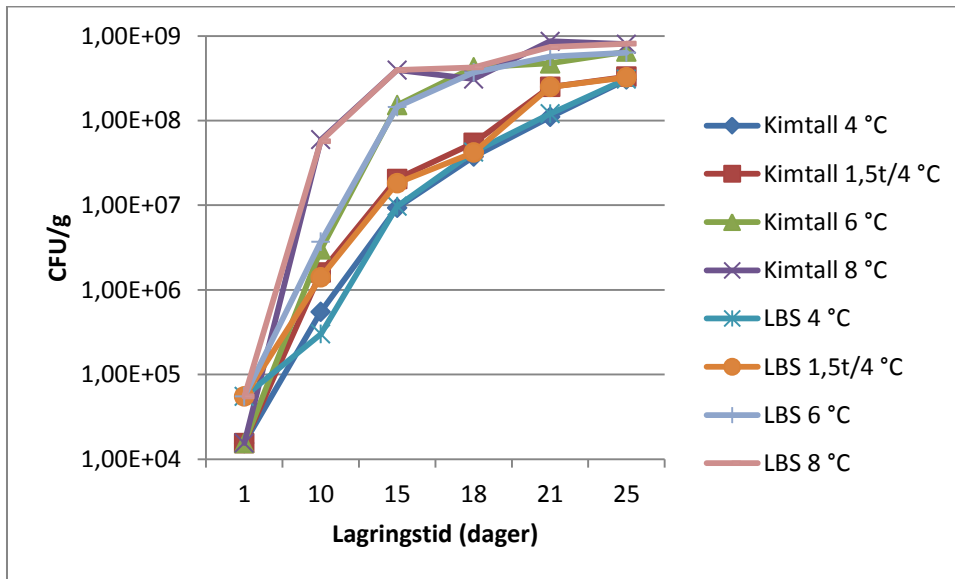
En sammenligning mellom pizza fra alle produksjonsdager med hensyn på mugg/gjær er gjengitt i figur 14.



Figur 14. Mugg/gjær i pizza fra alle produksjonsdager.

Av tre produksjonsdager, er det pizza produsert 22.10.12 som inneholder færrest antall mugg/gjær. Tilstedeværelse av mugg/gjær er relativ lik i pizza fra de to resterende produksjonsdagene. Ser man på vekst lå antall mugg/gjær stabilt over  $10^3$  CFU/g for pizza produsert 15.10.12, mens det ble observert vekst gjennom lagringstiden for pizza produsert 22.10.12 (celletall varierte mellom 15 og 510 CFU/g), og for pizza produsert 05.11.12 (celletall varierte mellom 420 og  $8,4 \cdot 10^3$  CFU/g). Figuren viser at det er stor variasjon mellom ulike produksjonsdager.

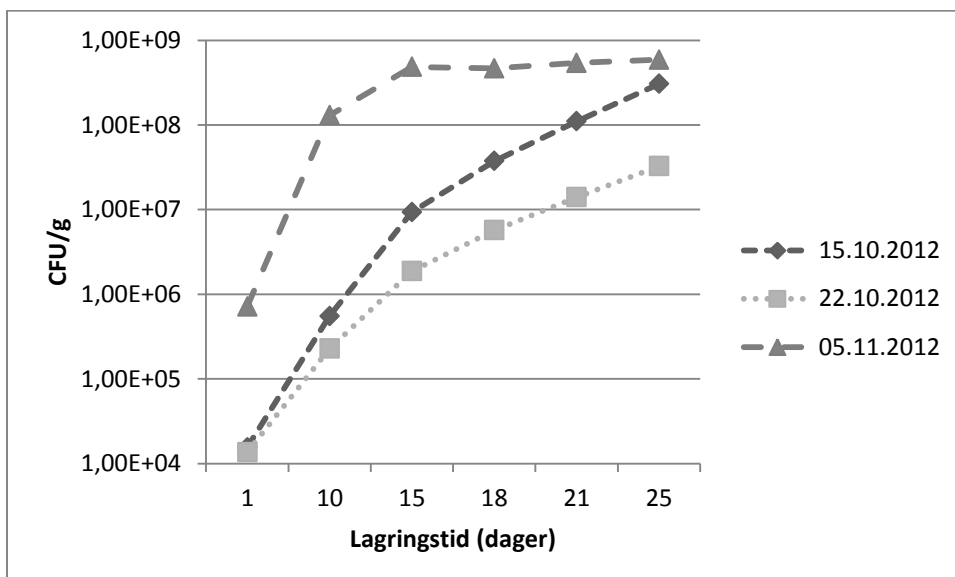
Påfølgende figur viser en sammenligning mellom aerobt mesofilt celletall og melkesyrebakterier for pizza produsert 15.10.12.



Figur 15. Aerobt mesofilt celletall sammenlignet med antall melkesyrebakterier (CFU/g) for pizza produsert 15.10.12.

Figuren viser at det var liten eller ingen forskjell mellom aerobt mesofilt celletall og antall melkesyrebakterier. Eneste tydelige forskjell ble observert ved første uttak, hvor det ble registrert et noe høyere antall melkesyrebakterier.

Aerobt mesofilt celletall ble bestemt, og en sammenligning mellom alle produksjonsdager for pizza lagret ved 4 °C gjengis i figuren under.

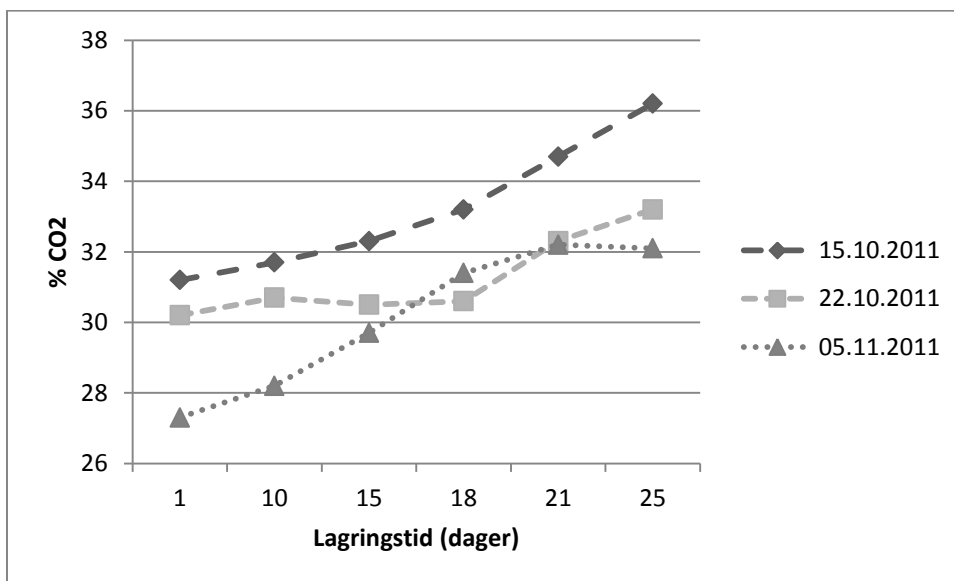


Figur 16. Aerobt mesofilt celletall i pizza lagret ved 4 °C for alle tre produksjonsdager.

Figuren viser at det er stor mikrobiologisk variasjon mellom ulike produksjonsdager. Høyest celletall ble registrert i pizza produsert 05.11.12. Lavest celletall ble registrert i pizza produsert 22.10.12. For pizza produsert 15.10.12 og 22.10.12 skjer det vekst gjennom hele lagringsperioden, mens i pizza produsert 05.11.12 nås veksttopp etter 10–15 dagers lagring. Aerobt mesofilt celletall er også langt høyere ved første uttak i pizza produsert 05.11.12 enn i pizza fra resterende produksjonsdager.

#### 4.3 MAP måling

Analysen ble foretatt i forkant av hvert mikrobiologisk uttak for pizza lagret ved 6 °C. Resultat for alle tre produksjonsdager er gjengitt i figuren under.

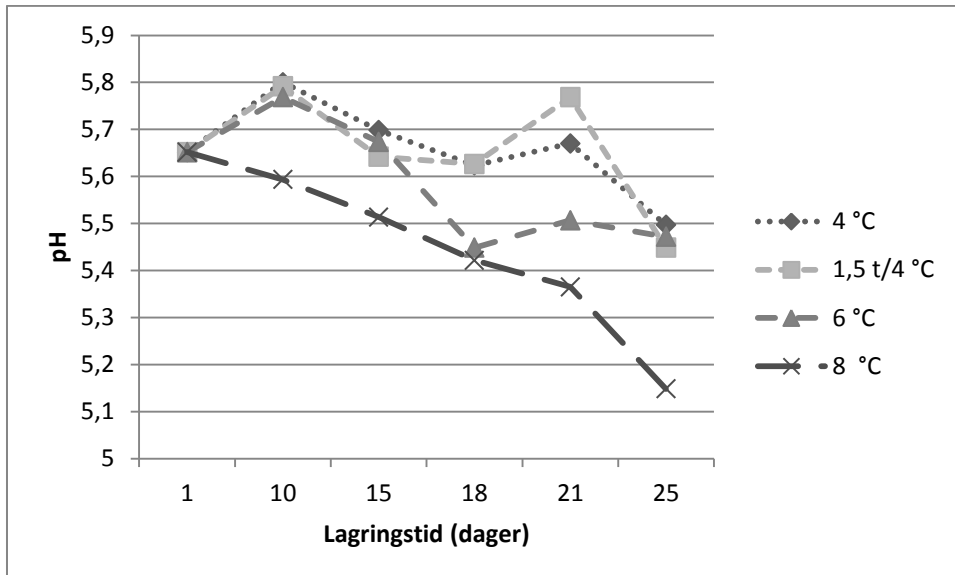


Figur 17. Endring i andel CO<sub>2</sub> (%) i atmosfæren rundt pizza lagret ved 6 °C gjennom lagringstiden.

For pizza produsert 15.10.12 steg % CO<sub>2</sub> i atmosfæren jevnt gjennom lagringstiden fra 31,2 % ved første uttak til 36,2 % etter 25 dagers lagring. Tilsvarende var tilfelle for pizza produsert 05.11.12. CO<sub>2</sub> i atmosfæren økte fra 27,3 % til 32,1 %. For pizza produsert 22.10.12 ble det ikke observert vesentlig økning i andel CO<sub>2</sub> i atmosfæren før etter 18 dager (fra 30,6 % til 33,2 %).

#### 4.4 pH

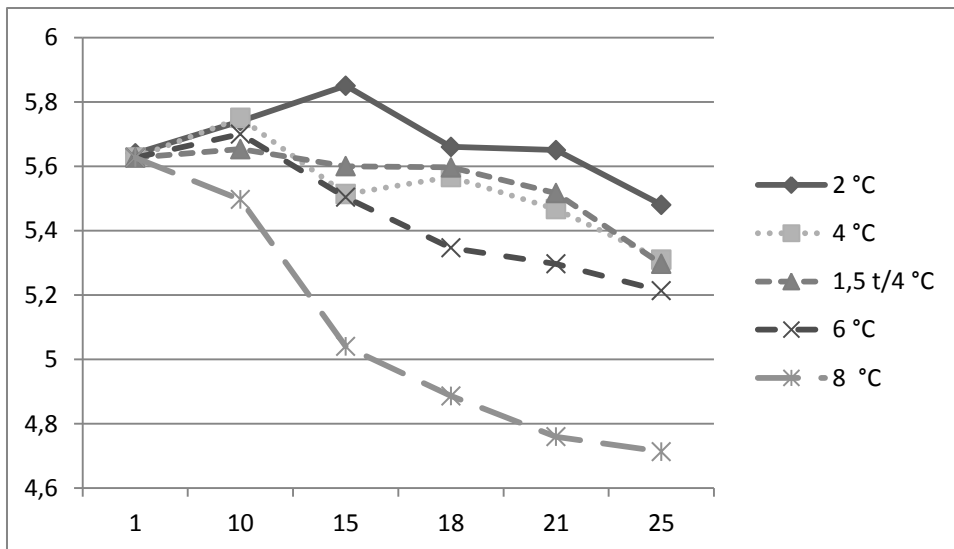
pH ble registrert i forkant av hvert uttak for alle lagringstemperaturer og produksjonsdager. Figur 18 gjengir gjennomsnitt av målinger fra alle produksjonsdager og lagringstemperaturer.



Figur 18. pH-utvikling i pizzaene gjennom lagringsperioden. Verdiene er gjennomsnitt av målinger fra alle produksjonsdager.

pH etter en dag var 5,65. Figur viser at pH synker jevnt for pizza lagret ved 8 °C til pH 5,18 etter 21 dager, mens pH er varierende for resterende lagringstemperaturer. pH i pizza lagret ved 4 °C og 1,5t/4 °C er relativ lik gjennom lagringsperioden, mens pH i pizza lagret ved 6 °C er noe lavere i perioden 15-25 dager. For lagringstemperaturer 4 °C 1,5t/4 °C og 6 °C stiger pH fram til 10 dager etter produksjon, før pH begynner å avta. For pizza lagret ved 1,5t/4 og 4 °C er det observert en økning i pH etter 21 dagers lagring.

Det ble videre målt pH i løsning som ble benyttet til den mikrobiologiske analysen. pH ble registrert ved hvert uttak for alle lagringstemperaturer og produksjonsdager. Resultat er gjengitt i figur 19.



Figur 19. Endring pH i løsning med 25 g pizza pluss 225 ml Ringers løsning. Gjennomsnitts pH verdier fra alle produksjonsdagene.

Resultat viser at pH i Ringers løsning synker jevnt for pizza lagret ved 8 °C fra pH 5.6 til pH 4.7 etter 25 dager. For pizza lagret ved 6 °C stiger pH noe fram til 10 dagers lagring, før pH synker jevnt. Lavest pH-reduksjon ble registrert i pizza lagret ved 2 °C. Det var liten forskjell mellom pizza lagret ved 1,5 t/4 °C og 4 °C.

#### 4.5 Identifisering av mikrobiologisk flora (klassiske metoder)

##### 4.5.1 Katalasetest og Gramfarging

Det ble foretatt en katalasetest for å avgjøre om mikroorganismer var katalase positive eller katalase negative. I tillegg ble preparater Gramfarget og studert i mikroskop for å avklare om bakterier var Gram positive eller Gram negative. Resultat fra katalasetest og Gramfarging er gjengitt i tabell 17.



Tabell 17. Oversikt over isolatnr., Katalase +/- eller Gram +/-

Isolat nr.	katalase +/-	Gram +/-	Isolat nr.	katalase +/-	Gram +/-
1	-	+	16	-	+
2	-	+	18	+	?
3	-	+	19	-	+
4	-	+	20	-	+
5	-	+	21	-	+
6	-	+	22	-	+
7	-	+	23	-	+
9	-	+	27	-	+
10	-	+	28	-	+
11	-	+	29	-	+
12	-	+			

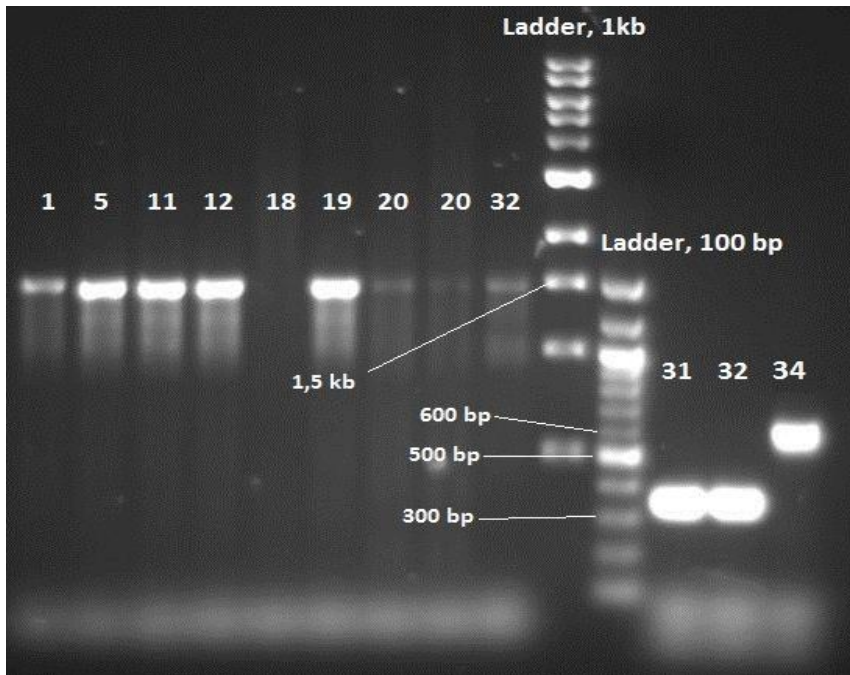
Som det fremgår i tabellen var bare isolat nr. 18 katalase positiv. De resterende isolatene inneholdt ikke enzymet katalase, og ga dermed ikke utslag på denne testen.

Med unntak av isolat nr. 18, var samtlige isolater Gram positive.

#### 4.6 Identifisering av mikrobiologisk flora (16S/18S rDNA sekvensering)

##### 4.6.1 PCR

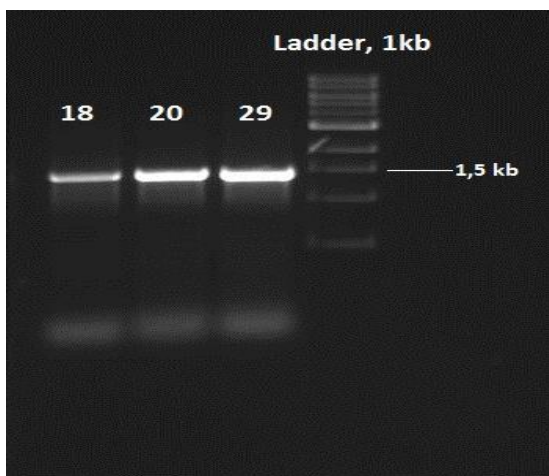
DNA ble isolert fra prøvematerialet før PCR-reaksjon ble satt opp. For å teste om vi hadde fått PCR-produkt eller ikke, ble det utført en gelelektroforese av PCR-produktet. Ladder som ble benyttet var 1kb for bakterier og 100 bp for gjær. Figur 20 gjengir resultat for alle isolater.



Figur 20. Gel elektroforese av PCR-produkt. Isolat nr. 1, 5, 11, 18, 19, 20, og 32 etter PCR med prokaryot primer, og isolat nr. 31, 32 og 34 etter PCR med eukaryot primer. Prokaryot ladder (1kb) og eukaryot ladder (100bp) ble benyttet.

For isolat nr. 1, 5, 11, 12 og 19 ble det observert bånd ved ca 1,5 kb. Vi hadde med det fått PCR-produkt for disse isolatene. For isolat 18, 20 og 29 hadde vi ikke fått PCR-produkt da det ikke ble observert tydelige bånd for disse isolatene. Isolat nr. 32, som ble kjørt med primere for både prokaryote og eukaryote organismer, hadde et tydelig bånd ved ca 350 bp. Det samme hadde isolat nr. 31, mens isolat nr. 34 hadde bånd ved ca 600 bp.

For isolater, der det ikke ble observert tydelig bånd, ble det kjørt ny PCR, denne gang tilsatt 1  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  for at primer skulle bli mindre spesifikk. Resultater er gjengitt i figur 21.



Figur 21. Ny gel elektroforese av PCR-produkt for isolat 18, 20 og 29 med prokaryot primer. Prokaryot ladder (1kb) ble benyttet.

Etter ny PCR hadde vi fått produkt for isolat 18, 20 og 29. Alle isolater hadde tydelige bånd ved ca 1,5 kb.

#### 4.6.2 16S/18S rDNA sekvensering

Påfølgende tabell gjengir resultater fra 16S/18S rDNA sekvensering. I tillegg vises en oversikt over hvor isolater er isolert fra, samt morfologi observert ved mikroskopering.

Tabell 18. Resultater fra fra 16S/18S rDNA sekvensering. Isolater er hentet fra og morfologi observert ved mikroskopering. Isolaten er isolert fra pizza fra alle produksjonsdager..

Prøve nr	Morfologi	Isolert fra	Resultat 16S rDNA sekvensering	Kommentar
1	Bøyde staver i kjeder	1,5 t/4 °C PCA	<i>Lactobacillus sakei/curvatus</i>	
5	Kokker i kjeder	6 °C PCA	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
11	Ovale kokker i kjeder	8 °C PCA	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
12	Kokker, ikke i kjeder	8 °C R&B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Isolert fra på R&B, men vokser på mrs
18	Staver/ovale kokker	4 °C R&B	<i>Rahnella aquatillis</i>	Isolert fra R&B, men vokser på BHI
19	Staver/ovale kokker	4 °C R&B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Isolert fra R&B, men vokser på mrs
20	Bøyde staver	8 °C LBS	<i>Lactobacillus sakei/curvatus</i>	
29	Staver	8 °C LBS	<i>Lactobacillus sakei/curvatus</i>	
			Resultat 18S rDNA sekvensering	
31	Gjær, synlige organeller	6 °C R&B	<i>Yarrowia lipolytica/Debaryomyces hansenii</i>	
32	Små ovale gjærceller	6 °C R&B	<i>Yarrowia lipolytica/Debaryomyces hansenii</i>	
34	Gjær, synlige organeller	2 °C R&B	<i>Candida zeylanoides</i>	

Bakterier var enten *Lactobacillus sakei/curvatus* eller *Leuconostoc mesenteroides*. Gjærisolater var enten *Yarrowia lipolytica/Debaryomyces hansenii* eller *Candida zeylanoides*.

## 5. Diskusjon

### 5.1 Bedriftsbesøk på stranda

I forbindelse med gjennomføring av denne masteroppgaven ble det foretatt et bedriftsbesøk til Stranda. Hensikten med besøket var å få et innblikk i hvordan Stabburets Dagens pizza m/kjøttdeig, bacon og løk blir produsert.

Pizza produseres på åpen linje hvor pizzabunner stanses ut maskinelt og plasseres i form manuelt. Steking, nedkjøling og plassering av pizzabunner på produksjonslinje gjøres manuelt, mens pizzafyll påføres ved hjelp av toppingmaskiner. Manuelt arbeid kan være problematisk dersom hygiene blant produksjonsarbeidere er dårlig, da mikroorganismer lett kan overføres til pizza. Tilsvarende kan åpen produksjonslinje føre til utfordringer knyttet til kontaminering av pizza fra mikroorganismer allerede etablert i produksjonsmiljøet. Dette gjelder da særlig luftbårne bakterier og mugg (Adams & Moss 2008).

Blant viktige observasjoner gjort den dagen var høy temperatur på pizzasausen. For at ikke pizzasausen skal trekke ned i pizzabunnen under lagring, blir denne tilsatt gelatin. Gelatin er et protein som utvinnes ved hydrolyse av kollagen hvor kilde til kollagen og type kollagen benyttet vil påvirke egenskapene til gelatinen. Smeltepunkt er en viktig egenskap som påvirkes. Det er vist at en høy andel prolin og hydroksyprolin i opprinnelig kollagen vil resultere i gelatin med høyere smeltepunkt enn om andelen av de nevnte aminosyrene hadde vært lav (Gilsenan & Ross-Murphy 2000).

Dersom pizzasausen inneholder gelatin må temperatur på pizzasausen være høyere enn gelatinens smeltepunkt i det øyeblikk den dryppes ned på pizzaen. I dette tilfelle ble temperatur på pizzasausen målt til mellom 40 og 50 °C, avhengig av hvor i beholder det ble målt. Med 170 g utgjør pizzasausen omtrent 19 % av pizzaens totale vekt på 900. Med et høyt vanninnhold har pizzasausen relativt høy varmekapasitet i forhold til pizzabunnen, kjøttet og osten (Fellows 2009). En annen faktor som bidrar til temperaturøkning i pizzaen inntreffer i forbindelse med emballering. Ved emballering stanses underformen ut med varme fra en slett film, noe som bidrar til temperaturøkningen under pakking. Dette kan være en årsak til at Coop kort tid før omvisning hadde avvist et parti pizza med begrunnelse i at disse hadde holdt 7 °C 3 dager etter produksjon. For å oppnå ønsket kjøletemperatur (4 °C) på ferdig emballert

pizza, har pizzaene karantenetid på Stranda i minimum 24 timer. Pizza stables og holdes ved 4 °C før utekspering fra Stranda.

Av ytre faktorer som i størst grad påvirker mikrobiell vekst, er temperatur den viktigste (Montville & Matthews 2007). For å sikre produktet høy mikrobiologisk kvalitet, må derfor nedkjølingstiden reduseres betraktelig slik at pizza raskest mulig når ønsket temperatur på 4 °C. Det er ikke registrert tid det tar før pizzaen når ønsket temperatur, men ved utekspering fra Stranda skal den holde temperatur under 4 °C. Raskere nedkjøling kan gjøres ved å kjøle pizza før den pakkes på pall eller ved å redusere temperatur på pizzasausen. Ved å benytte gelatin med lavere innhold av prolin og hydroksyprolin, vil det være mulig å redusere temperaturen på pizzasausen betraktelig. Kollagen i torsk inneholder veldig lite prolin og hydroksyprolin og vil gi gelatin med smeltepunkt ned mot 2 °C (Gilsenan & Ross-Murphy 2000). Det vites ikke hvorvidt denne typen gelatin vil påvirke pizzaens sensoriske egenskaper. Egenskaper knyttet til sensorikk må derfor studeres i forkant av eventuell bruk.

## **5.2 Analyseplan og lagringsbetingelser**

Pizzaene ble lagret ved 2 °C, 4 °C, 1,5t/4, 6 °C og 8 °C. Det ble valgt å gjøre å prøveuttak etter 1, 10, 15, 18, 21 og 25 dagers lagring. Lagringstemperaturer ble valgt med følgende begrunnelse: 4 °C er anbefalt lagringstemperatur for pizza, og 1,5t/4 °C vil gjenspeile eksponering for høyere temperatur en kort tid før kjøling. 6 °C og 8 °C ble valgt for å se hvilken effekt lagring ved høyere temperaturer enn anbefalt lagringstemperatur vil ha på pizzaens mikrobiologiske kvalitet. På grunn av høyt kimtall ( $>10^4$  CFU/g) observert i pizza fra de to første produksjonsdagene, ble det i tillegg valgt å lagre pizza fra siste produksjonsdag ved 2 °C. Avstand mellom produksjonssted og analyselaboratorium var for stor til at det kunne gjøres uttak samme dag som produksjon; første uttak ble derfor foretatt 1 dag etter produksjon.

Pizzaens holdbarhet var oppgitt til 21 dager, og det var derfor naturlig med et uttak på siste forbruksdato. For å se om det skjer videre vekst etter 21 dager, ble det også valgt å foreta et uttak etter 25 dager. Videre ble det foretatt flere uttak i forkant av siste forbruksdato. Det ble valgt å gjøre uttak fra ulike 3 produksjonsdatoer for å se på variasjon mellom ulike produksjoner. Da det ble observert store variasjoner mellom produksjonene, var det ikke

hensiktsmessig å beregne et gjennomsnittresultat. Resultater fra de ulike produksjonsdagene ble derfor behandlet hver for seg.

### **5.3 Mikrobiologiske analyser**

Pizza er et sammensatt produkt, og det finnes ingen oppgitte mikrobiologiske grenseverdier som beskriver pizza. I diskusjonsdelen er det derfor kun tatt hensyn til Stabburets mikrobiologiske krav og retningslinjer for produkter som skal varmebehandles før konsum og de generelle hygienekriteriene. I sistnevnte tas det utgangspunkt i verdier for kvernet kjøtt, mekanisk utbeinet kjøtt og ost fremstilt av varmebehandlet melke eller myse.

For oversikt over krav og retningslinjer for Stabburet henvises det til vedlegg 1

For generelle hygienekrav henvises det til «Kommisjonsforordning (EF) nr. 2073/2005 av 15. november 2005 om mikrobiologiske kriterier for næringsmidler» (vedlegg 2)

#### **5.3.1 Kimtall (mesofile og psykrotrofe bakterier)**

Resultater viser at mesofiltall og psykrotroftall var relativt like. De vil derfor bli diskutert sammen i påfølgende avsnitt.

I følge «oversikt over mikrobiologiske krav og retningslinjer» for Stabburet skal kimtall i «produkter som skal varmebehandles før konsum» ikke overskride  $10^5$  CFU/g. Retningslinjer angir ikke tilfredsstillende akseptabel kvalitet med hensyn på kimtall, bare at tiltak skal diskuteres ved overskridelse av anbefalte grenseverdier. For kvernet kjøtt og mekanisk utbeinet kjøtt skal ikke kimtall overskride  $5 \cdot 10^6$  CFU/g. Det er ikke oppgitt grenseverdier for kimtall i ost i de generelle hygienekriteriene.

Med hensyn på mikrobiologiske krav og retningslinjer, var det forventet at kimtall skulle være lavere enn grenseverdi på  $10^5$  CFU/g for pizza med lagringstemperatur på 4 °C eller lavere. For pizza lagret ved henholdsvis 6 og 8 °C var det forventet at kimtall ville overskride grenseverdi for tilfredsstillende kvalitet i løpet av lagringsperioden, og før siste forbruksdato. Videre har sensoriske analyser utført i forkant av dette studiet indikert at pizzaens sensoriske egenskaper endres etter lagring i 10-14 dager. Hvorvidt dette skyldes mikrobiologiske effekter eller andre faktorer (retrogradering av stivelse etc.) er usikkert.

For pizza produsert 15.10.12 og 22.10.12 er kimtall i pizza for begge produksjonene, henholdsvis  $1,55 \cdot 10^4$  CFU/g og  $1,36 \cdot 10^4$  CFU/g, lavere enn Stabburets grenseverdi på  $10^5$  CFU/g første dag etter produksjon. Analyse ble utført umiddelbart etter overlevering av pizza som ved dette tidspunktet skulle holde 4 °C. Resultater fra uttak 10 dager etter produksjon gir kimtall på henholdsvis  $5,5 \cdot 10^5$  CFU/g og  $2,27 \cdot 10^5$  CFU/g for pizza lagret ved 4 °C, hvilket tyder på at grenseverdi på  $10^5$  CFU/g overstiges i løpet av 10 dager etter produksjon for pizza produsert 15.10.12 og 22.10.12. Med unntak av pizza lagret ved 8 °C, ble det registrert en jevn økning i antall CFU/g i pizza lagret ved 4 °C, 1,5t/4 °C, 6 °C og 8 °C. For pizza lagret ved 8 °C flater veksten ut i begge tilfeller etter 15 dager. Kimtall stabiliserer seg mellom  $10^8$  og  $10^9$  CFU/g.

For pizza produsert 05.11.12 er kimtall høyere enn grenseverdi på  $10^5$  CFU/g allerede ved første uttak ( $7,15 \cdot 10^5$  CFU/g). Etter lagring i 15 dager er det relativt liten forskjell i kimtall for pizza lagret ved temperaturer høyere enn 2 °C; vekstkurver flater ut og stabiliserer seg mellom  $10^8$  og  $10^9$  CFU/g. Dette gjaldt også for pizza lagret ved 4 °C, som er anbefalt lagringstemperatur. Til tross for relativt høye verdier, ble det ikke observert dårlig lukt; trolig fordi lukten av løk var svært fremtredende. For pizza lagret ved 2 °C ble det observert en jevn økning i kimtall fram til 21 dager hvor vekst flater ut mellom  $10^8$  og  $10^9$  CFU/g. Etter 15 dagers lagring ble det observert kimtall på  $4,10 \cdot 10^7$  CFU/g. I dette tilfellet er det tydelig at lagring ved 2 °C har hatt positiv effekt på kimtallet i forhold til resterende lagringstemperaturer.

For sikkert å kunne si noe om fordeler vedrørende lagring ved 2 °C, burde denne lagringstemperaturen i tillegg ha blitt benyttet for pizza produsert 15.10.12 og 22.10.12 hvor kimtall 1 dag etter produksjon er ca 1,5 log CFU/g lavere enn i pizza produsert 05.11.12. Det hadde vært interessant å se hvordan vekstkurven ville ha utviklet seg dersom utgangspunktet hadde vært annerledes. Dersom tendens er den samme som for pizza lagret ved 05.11.12, hvor lagring ved 2 °C skiller seg klart fra lagring ved 4 °C, er det mulig at kimtall for pizza lagret ved 2 °C ikke ville ha nådd toppen i løpet av lagringsperioden. Lagring ved 2 °C vil uansett ikke være aktuelt i praksis.

Det var forventet at ulike lagringstemperaturer ville påvirke kimtallet. Resultater fra dette studiet viser at lagringstemperatur har påvirket den mikrobiologiske veksten. Størst vekst ble som forventet observert i pizza lagret ved 8 °C, mens lavest vekst ble observert i pizza lagret

ved 2 °C. Sammenlignet med pizza lagret ved 4 °C, ble det i pizza lagret ved 1,5t/4 °C observert et noe høyere kimtall fram til 15-18 dager etter produksjon (<0,5 log CFU/g forskjell). For pizza produsert 05.11.12, hvor kimtall ved første uttak var svært høyt, ble det observert liten forskjell i vekst for lagringstemperaturer høyere enn 2 °C.

Som tidligere nevnt, ble pizza til dette studiet levert for mikrobiologisk analyse 24 timer etter produksjon. Fram til overlevering hadde den blitt kjølelagret på Stranda og fraktet med kjølebil til laboratoriet. Umiddelbart etter overlevering ble pizza fordelt med hensyn på tiltenkte lagringstemperaturer, og lagt ut i separate inkubatorskap/kjølerom for at den raskest mulig skulle nå ønsket temperatur. Med tanke på at Coop har registrert temperatur på 7 °C 3 dager etter produksjon, er det stor sannsynlighet for at nedkjølingstiden i virkeligheten er lenger. Dersom nedkjølingstiden for pizza levert til Coop i realiteten er lenger enn Stabburets antatte tid på 24 t ved 4 °C, er det grunn til å tro at kimtallet vil nå grenseverdien på 10<sup>5</sup> CFU/g for tilfredsstillende kvalitet enda raskere enn hva resultat i dette studiet skulle tilsi. Det ble dessverre ikke målt temperatur ved ankomst.

### **5.3.2 Melkesyrebakterier**

Ost er en vesentlig del av all pizza, og utgjør i dette tilfellet omtrent 21 % av pizzaens totale vekt. Osten som benyttes er revet Mozzarella og Edamer, med en andel på 50 % hver. I dette tilfellet er ost en ingrediens som ikke gjennomgår varmebehandling før den påføres pizzaen, og det var forventet at melkesyrebakterier fra blant annet starterkulturer ville bli identifisert i dette studiet. Melkesyrebakterier finnes også i lavt antall i kjøtt. Ved vakuumpakking eller pakking i modifisert atmosfære uten oksygen vil disse selekteres frem (Adams & Moss 2008)

I dette tilfellet vil pakking i modifisert atmosfære med CO<sub>2</sub> favorisere vekst av anaerobe mikroorganismer, mens lav pH i pizzasausen vil favorisere syretolerante mikroorganismer (pH i pizzasaus er målt til 4,3-4,5). Melkesyrebakterier faller inn under denne gruppen, og det er derfor nærliggende å tro at vekstforhold for melkesyrebakterier er gode. Det er i tillegg flere faktorer som gjør at melkesyrebakterier inhiberer vekst av andre mikroorganismer. Den viktigste av disse er deres evne til å produsere melkesyre og eddiksyre med konsekvens at pH reduseres (Adams & Moss 2008). Dersom melkesyrebakterier stammer fra osten eller kjøttet, vil varme fra pizzasausen gi melkesyrebakteriene gode etableringsforhold.



Det ble raskt observert at antall melkesyrebakterier identifisert var relativt likt mesofiltall og psykrotroftall for alle tre produksjonsdager og samtlige lagringstemperaturer.

For pizza produsert 15.10.12 ble antall melkesyrebakterier ved første uttak bestemt til  $5,5 \cdot 10^4$  CFU/g (kimtall  $1,55 \cdot 10^4$  CFU/g), mens antall melkesyrebakterier etter 21 dagers lagring ved 4 °C var  $1,2 \cdot 10^8$  CFU/g (kimtall  $1,1 \cdot 10^8$  CFU/g). For pizza produsert 22.10.12 ble antall melkesyrebakterier ved første uttak bestemt til  $1,43 \cdot 10^4$  CFU/g (kimtall  $1,36 \cdot 10^4$  CFU/g), mens antall melkesyrebakterier etter 21 dagers lagring ved 4 °C var  $1,1 \cdot 10^7$  CFU/g (kimtall  $1,4 \cdot 10^7$  CFU/g). Tilsvarende likheter mellom antall melkesyrebakterier og kimtall ble observert i pizza produsert 05.11.12, der antall melkesyrebakterier ved første uttak ble bestemt til  $5,4 \cdot 10^5$  CFU/g (kimtall  $7,15 \cdot 10^5$  CFU/g). Antall melkesyrebakterier etter lagring i 21 dager var  $5,05 \cdot 10^8$  CFU/g (kimtall  $5,4 \cdot 10^8$  CFU/g).

Dette kan tyde på at melkesyrebakterier utgjør en stor andel av mikroorganismer tilstede på pizzaen. Alle melkesyrebakterier vokser anaerobt, men i motsetning til mange andre anaerobe organismer er melkesyrebakterier aerotolerante mikroorganismer som kan håndtere utfordringer knyttet til oksygen og oksygenmetabolitter (superoksid, hydrogenperoksid). Melkesyrebakterier kan derfor vokse ved tilstedeværelse av oksygen (Walstra et al. 2006). Skåler med PCA for bestemmelse av kimtall skulle inkuberes under aerobe forhold med oppgitt inkuberingstid på henholdsvis 3 og 10 døgn for mesofile og psykrotrofe bakterier. Realiteten var at skåler med PCA måtte inkuberes lenger enn oppgitt inkuberingstid fordi kolonier var for små til å kunne telles etter 3 og 10 døgn. Dette var særlig gjeldende for skåler med PCA som skulle inkuberes i 3 døgn. Skåler ble inkubert i inntil 5 døgn før det var mulig å telle dem. Redusert vekst på PCA bidrar til å styrke mistanken om at melkesyrebakterier utgjorde en vesentlig andel av mikroorganismer tilstede på pizzaen.

Enkelte bakterier blir gjerne hengende sammen etter celledeling, hvilket gjør at tellbare kolonier på agar kan indikere et lavere bakterietall enn i realiteten. Dette gjelder særlig for arter av *Lactococcus*, *Streptococcus* og noen arter *Lactobacillus* (Walstra et al. 2006). Dersom dette er tilfellet, kan kimtall og antall melkesyrebakterier i realiteten være høyere enn det resultatene i dette studiet indikerer. Resultat fra mikroskopering bekrefter at flere bakterier var både sammenhengende staver og kokker.

### 5.3.4 Mugg og gjær

Fabrikker der det produseres produkter med lav pH og/eller lav vannaktivitet som bakverk (pizzabunn) og fermenterte produkter er særlig utsatt for kontaminering av mugg og gjær. I slike produksjonslokaler er det ekstra viktig at produksjonsutstyr blir nøye vasket, og at tiltak for å hindre rekontaminering av ferdig produkt fra råvarer utføres. Mugg reprodukeres ved sporedannelse og selv små nivåer mugg og gjær kan føre til store skader på produktet. Slike organismer er meget godt tilpasset de nisjene slike produksjonsmiljøer gir (Betts 2010).

Til produksjon av bunnen benyttes vanlig bakegjær som består av *Saccharomyces cerevisiae*. Ved identifisering av gjær fra pizzaen er det sannsynlig at denne arten vil bli identifisert. Med hensyn på at produksjonslinjen er helt åpen, kan funn av mugg/gjær gjenspeile organismer etablert i produksjonslokalet. I oversikt over mikrobiologiske krav og retningslinjer for Stabburet oppgis det ingen grenseverdier for mugg og gjær i ferdige retter som skal varmebehandles før konsum.

Tilstedeværelse av mugg og gjær ble undersøkt ved bruk av Rose & Bengal Agar og innstøping. Det ble identifisert mugg/gjær på samtlige pizza. For pizza produsert 15.10.12 ble antall mugg/gjær funnet å ligge mellom  $10^3$  og  $10^4$  CFU/g for samtlige pizzaer gjennom hele lagringsperioden; lagringstid og temperatur syntes altså ikke å påvirke veksten i særlig grad. For pizza produsert 22.10.12 var antall mugg/gjær langt lavere (fra  $10$ - $10^3$  CFU/g), mens det i pizza produsert 05.11.12 ble observert større variasjon mellom de ulike pizzaene (fra  $420$ - $8,4 \cdot 10^3$  CFU/g).

Ulike lagringstemperaturer har heller ikke her gitt særlig utslag i antall CFU/g. For pizza produsert 05.11.12 var antall mugg/gjær ved første uttak noe lavere enn for pizza produsert 15.10.12 (henholdsvis  $8,5 \cdot 10^2$  CFU/g og  $4,35 \cdot 10^3$  CFU/g), men i løpet av lagringstiden nådde antall mugg og gjær omtrent samme nivå. For pizza lagret ved  $2$  °C ble det observert et stabilt nivå mellom  $530$  og  $850$  CFU/g gjennom hele lagringsperioden; ingen tydelig økning i antall CFU/g etter 25 dager.

Resultater viser at lagringstemperatur har liten innvirkning på vekst av mugg/gjær. Det viktigste tiltaket mot mugg/gjær vil antagelig være å hindre tilstedeværelse av mugg/gjærsopp fra begynnelsen av. Dersom det finnes etablerte stammer i produksjonslokalet, vil et tiltak være å beskytte produksjonslinjen slik at denne ikke lenger er åpen.

### 5.3.5 Koliforme bakterier

Personlig hygiene hos linjearbeidere, og et godt renhold er avgjørende for å sikre at produktene holder god mikrobiologisk kvalitet. Ved å undersøke tilstedeværelse av en indikatororganisme i et produkt, kan en tilegne seg enkel, pålitelig og hurtig informasjon vedrørende eventuelle produksjonsfeil, kontaminering under og etter produksjon samt kunnskap om generell hygiene relatert til hvordan produktet er produsert og lagret (Pierson et al. 2007).

Kolonier som vokser på VRBA kan være både *Escherichia coli* og andre arter av *Enterobacteriaceae*. I følge «oversikt over mikrobiologiske krav og retningslinjer» for Stabburet skal *E. coli* i «produkter som skal varmebehandles før konsum» ikke overskride 10 CFU/g. I hygieneforskriften står det at tilfredsstillende verdi er <50 CFU/g, mens nivået ikke skal overskride 500 CFU/g. Av totalt 78 pizzaer analysert ble koliforme bakterier kun identifisert i 8 pizzaer. Samtlige av disse var pizzaer lagret i 15 dager eller lenger. I tilfeller hvor koliforme bakterier ble identifisert var antall mellom 10 og 65 CFU/g for 5 pizzaer (4 av disse var innenfor tilfredsstillende nivå på 50 CFU/g), mens det i en pizza ble observert 2250 CFU/g. Dette er langt høyere enn akseptabelt nivå på 500 CFU/g. I de to resterende pizzaene ble antall koliforme bakterier bestemt til 235 og 380 CFU/g.

Observerte koliforme bakterier stammer trolig fra kjøttet på pizzaene. Resultatet indikerer videre at så vel hygienen blant linjearbeidere som den generelle produksjonshygienen er god.

### 5.3.6 *Bacillus cereus* og *Listeria monocytogenes*

I oversikt over mikrobiologiske krav og retningslinjer for Stabburet oppgis følgende anbefalte grenseverdier for *B. cereus* og *L. monocytogenes* i ferdige retter som skal varmebehandles før konsum: < 500 CFU/g for *B. cereus* og negativ i 25 g prøve for *L. monocytogenes*.

*B. cereus* ble identifisert ved bruk av *Bacillus cereus* Selektiv Agar. I dette studiet ble det kun identifisert *B. cereus* i en pizza som hadde blitt lagret ved 1,5/4 °C i 18 dager. Antallet ble målt til 30 CFU/g, hvilket er godt under anbefalt grenseverdi. Identifisering av *L. monocytogenes* ble utført av Stabburet, og ga positivt resultat i 5 pizzaer av totalt 54 pizzaer analysert. I tilfeller hvor *L. monocytogenes* ble identifisert var antallet < 10 CFU/g.

### **5.3.7 Variasjon mellom produksjonsdager**

For samtlige næringsmiddelprodusenter er det ønskelig at deres produkter holder stabil kvalitet over tid. I tillegg til å påvirke den generelle mattryggheten, vil en stabil mikrobiologisk kvalitet gi produktet en forutsigbar holdbarhet. En forutsigbar kvalitet er viktig for forbrukers oppfattelse av et produkt, og for gjenkjøp. Dette studiet gir en indikasjon på variasjon i produktets mikrobiologiske kvalitet.

Med hensyn på kimtall og antall melkesyrebakterier ble det observert store forskjeller mellom ulike produksjonsdager. Dårligst mikrobiologisk kvalitet ble observert i pizza produsert 05.11.12. Her viser resultatene at antall mikroorganismer allerede ved første uttak nærmet seg  $10^6$  CFU/g. For resterende produksjonsdager var antall mikroorganismer litt i overkant av  $10^4$  CFU/g ved første uttak. For mugg/gjær ble det observert store variasjoner mellom ulike produksjonsdager. Lavest mugg/gjær celletall ble observert i pizza produsert 22.10.12 (20-510 CFU/g), mens langt flere ble identifisert i pizza produsert 15.10.12 og 05.11.12 ( $4,35 \cdot 10^3$  CFU/g og  $8,4 \cdot 10^3$  CFU/g).

For å kunne vurdere hvorvidt variasjon skyldes varierende mikrobiologisk kvalitet i ingredienser eller ulike temperaturer i pizza fram til første uttak, hadde det vært hensiktsmessig med et uttak umiddelbart etter produksjon i tillegg til undersøkelse av de ulike råvarene. Resultater fra slike undersøkelser vil gi et bedre grunnlag for diskusjon om årsaker til den mikrobiologiske variasjonen som ble observert. Mikrobiologisk variasjon synes uansett å være en utfordring for dette produktet.

### **5.4 Endring – MAP**

På grunn av utfordringer med logistikk i forbindelse med mikrobiologiske analyser, ble det i denne oppgaven valgt å undersøke  $\text{CO}_2$  konsentrasjon i pizza lagret ved  $6^\circ\text{C}$ . Pizzaer til måling av konsentrasjon  $\text{CO}_2$  ble ikke benyttet til mikrobiologiske analyser.

Pizzaene var pakket i modifisert atmosfære (MA) bestående av 40 %  $\text{CO}_2$  og 60 %  $\text{N}_2$ . Umiddelbart etter emballering på Stranda ble konsentrasjon  $\text{CO}_2$  i MA målt til 35 %, hvilket er lavere enn i opprinnelig gassblanding. Med hensyn på konsentrasjon  $\text{CO}_2$  i MA, opererer Stabburet med aksjonsverdier. Verdier mellom 35-45 %  $\text{CO}_2$  godkjennes. Ved lavere verdier skal teknisk avdeling kontaktes. For  $\text{O}_2$  godkjennes verdier mellom 0,0-0,6 %.

Ved første uttak, 1 dag etter produksjon, ble konsentrasjon CO<sub>2</sub> i MA for pizza lagret ved 6 °C målt til 29,6 % (snitt alle produksjonsdager) som er lavere enn verdi målt umiddelbart etter produksjon. Reduksjon var forventet og skyldes at CO<sub>2</sub> løses i pizzaens vannfase (Rotabakk et al. 2006). Lagringstemperatur vil påvirke hvor mye CO<sub>2</sub> som løses i pizzaen. Det er trolig at reduksjon hadde vært enda større dersom målinger hadde blitt utført på pizza lagret ved 2 °C (Jay, J. M. 2000). I løpet av lagringsperioden ble det observert en jevn økning i CO<sub>2</sub>-konsentrasjon. Etter 25 dagers lagring ble CO<sub>2</sub>-konsentrasjon i MA målt til 33,8 %.

Heterofermentative melkesyrebakterier omdanner laktose til melkesyre, etanol og CO<sub>2</sub> (Walstra et al. 2006). I mikrobiologiske analyser ble det observert et høyt antall melkesyrebakterier i pizzaene (>10<sup>8</sup> CFU/g ved alle lagringstemperaturer etter 21 dager for pizza produsert 15.10.12 og 05.11.12, og >10<sup>7</sup> CFU/g ved alle lagringstemperaturer etter 21 dager for pizza produsert 22.10.12). Med hensyn på utført sekvensering er det sannsynlig at flere av disse er heterofermentative. Blant isolater sekvensert var alle bakterier enten *Leuconostoc mesenteroides* eller *Lactobacillus sakei/curvatus* med unntak av et isolat. *Leuconostoc mesenteroides* er en heterofermentativ melkesyrebakterie, mens *Lactobacillus sakei/curvatus* er fakultativ heterofermentative (Rimaux et al. 2012; Torriani et al. 1996; Walstra et al. 2006). Dersom andel heterofermentative melkesyrebakterier i pizzaene er stor, kan observert økning i CO<sub>2</sub>-konsentrasjon skyldes disse. Isolater som ble identifisert ved 16S rRNA sekvensering representerer kun et lite utvalg, men kan gi en pekepinn på hvilke mikroorganismer som er tilstede i pizzaen.

CO<sub>2</sub> har ulik effekt på ulike grupper mikroorganismer. Mugg og Gram-negative bakterier er mest sensitive, mens Gram-positive bakterier er mer resistente mot CO<sub>2</sub> (Adams & Moss 2008). Med hensyn på sensitivitet for CO<sub>2</sub>, var det ikke overraskende at melkesyrebakterier utgjorde en vesentlig andel av identifiserte mikroorganismer (Jay, J. M. 2000). *Pseudomonas* spp. blir i stor grad inhibert av CO<sub>2</sub>, *Enterobacteriaceae* blir i mindre grad inhibert av CO<sub>2</sub>, mens melkesyrebakterier er CO<sub>2</sub> tolerante (Rotabakk et al. 2006).

Det ble ikke observert O<sub>2</sub> verdier over 0,6 %, hvilket indikerer at emballasjen som ble benyttet har vært tett.

## 5.5 Endring – pH

pH i pizza ble registrert ved direkte måling i pizza løst i destillert vann. Det ble registrert pH i forkant av hvert mikrobiologiske uttak for alle lagringstemperaturer og produksjonsdager. To prøver á 10 gram ble stanset ut og lagt i et begerglass med 8 ml sterilt vann. Da løsningen ikke var homogen, ble det foretatt 2 pH-målinger i hver prøve (totalt 4 målinger for hver pizza). Gjennomsnittet av disse ble notert. At prøvene ikke var homogene viste seg å føre til store variasjoner i målt pH da elektrodens plassering i prøven hadde stor betydning for hvilket resultat som ble registrert. Prøvene ble i alle tilfeller plassert med bunnen ned, og det ble lagt vekt på å plassere elektroden likt i alle prøver.

Til tross for variasjoner mellom målinger, ble det observert at pH i pizzaene ble redusert gjennom lagringstiden. For pizza lagret ved 8 °C ble det observert en jevn reduksjon i pH fra 5,6 -5,4, mens pH var varierende for resterende lagringstemperaturer. For pizza lagret ved 4 °C varierte pH fra 5,8-5,5. I pizza lagret ved 6 °C varierte pH fra 5,8-5,4. Fordi prøvene ikke var homogene, ble det også målt pH i løsningen som ble benyttet til den mikrobiologiske analysen (25 g pizza + 225 ml Ringers løsning). pH ble registrert ved hvert uttak for alle lagringstemperaturer og produksjonsdager. Også her ble det observert en jevn reduksjon i pH for pizza lagret ved 8 °C fra 5,6-4,7. En liten nedgang ble observert for pizza lagret ved 4 °C og 1,5t/4 °C (fra pH 5,6-5,3), mens pH-nedgang i pizza lagret ved 6 °C var størst i perioden 10-25 dager (fra pH 5,7-5-2). For lagringstemperaturer under 8 °C ble det i begge tilfeller registrert en økning i pH fram til 10 dager (15 dager for pizza lagret ved 2 °C) før pH begynte å synke. Antagelig er det endring i mikrobiell flora som fører til nedgang i pH etter 10 og 15 dager.

Det var forventet at pH i pizzaene ville reduseres i løpet av lagringstiden, først og fremst på grunn av et høyt antall observerte melkesyrebakterier. Felles for melkesyrebakterier er at de kan omdanne glukose til melkesyre (Walstra et al. 2006). Resultater fra dette studiet tyder på at melkesyrebakterier utgjør en stor andel av kimtallet, og at deres metabolisme av karbohydrater kan være årsak til observert reduksjon i pH gjennom lagringstiden. En annen faktor som kan bidra til reduksjon i pH, er CO<sub>2</sub> fra MA som løses i pizzaens vannfase (Rotabakk et al. 2006). Avhengig av matens bufferkapasitet vil pH reduseres ved at det dannes karbonsyre når CO<sub>2</sub> løses i vannfasen.

For et mer korrekt bilde på pH-utvikling i pizzaene burde målinger ha blitt gjort i en homogen løsning med pizza og sterilt vann. Dette kunne gitt mindre variasjoner mellom målinger og derfor mer pålitelige resultater. Det er ukjent hvilken buffereffekt Ringers løsning har, men løsningen var homogen og ga slik sett et mer korrekt bilde av utviklingen av pH. pH i Ringers løsning uten pizza ble målt til 6,9.

## **5.6 Identifisering av mikrobiell flora**

Til identifisering av mikrobiell flora ble det benyttet tradisjonelle og molekylære metoder.

### **5.6.1 Utvelging av kolonier og isolering av mikroorganismer**

Kolonier ble plukket fra skåler fra samtlige 3 produksjonsdager, og etter 21 og 25 dagers lagring av pizza ved alle lagringstemperaturer. Skåler fra 21 og 25 dagers lagring ble valgt fordi mikroorganismer på dette tidspunktet antas å utgjøre den dominerende floraen på pizzaene i tillegg til at 21 dager er oppgitt holdbarhetstid på pizzaen. Det var derfor interessant å finne ut hvilke mikroorganismer som fantes på pizzaene ved dette tidspunktet. For at utvalget skulle representere størst mulig bredde ble det valgt å plukke kolonier fra skåler med PCA (mesofile og psykrotrofe), LBS og Rose & Bengal Agar. Det ble forsøkt plukket ulike kolonier fra de ulike skålene, hvor synlige forskjeller var størst blant kolonier fra Rose & Bengal Agar. Det ble valgt ut totalt 34 kolonier for videre analyse.

### **5.6.2 Katalasetest og Gramfarging**

Det ble utført katalasetest på alle isolater med unntak av antatte mugg/gjær for å se om disse var katalase positive eller katalase negative. Med hensyn på resultater fra den mikrobiologiske utplatingen, hvor det ble antatt at melkesyrebakterier utgjorde en vesentlig del av totaltallet, var det forventet at de fleste isolatene var katalase negative. Melkesyrebakterier er ikke i stand til å produsere katalase (Walstra et al. 2006).

Det ble videre utført Gramfarging og mikroskopering av isolater. Det var forventet at flertallet av isolatene ville være Gram positive da melkesyrebakterier blant annet blir definert som Gram-positive bakterier. Med hensyn på cellemorfologi finnes det både kokker (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*) og staver (*Lactobacillus*) blant melkesyrebakterier. Det var derfor forventet å finne en blanding av disse (Walstra et al. 2006).

Resultatet fra katalasetest var som forventet. Kun 1 isolat (av totalt 21 isolater) var katalase positiv. Isolatet, som var katalase positiv, var isolat nr. 18 med opprinnelse fra pizza produsert

22.10.12 som hadde vært lagret i 21 dager ved 4 °C. Isolatet ble plukket fra Rose & Bengal agar, men ved fremstilling av renkulturer ble det observert best vekst i BHI. Resten av isolatene var katalase negative, hvilket er forenelig med antakelsen om at melkesyrebakterier utgjør en vesentlig del av totaltallet.

Blant 22 isolater studert i mikroskop ble det observert at 11 var staver og 11 var kokker. Utforming på staver og kokker var varierende, med både bøyde staver og ovale kokker. Det er sannsynlig at stavformede bakterier tilhørte slekten *Lactobacillus* eller *Carnobacterium*, mens det er vanskeligere å si noe om hvilke slekter av kokker det kunne være (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* *Streptococcus* eller andre katalase negative kokker). Av isolater som ble Gramfarget var alle, med unntak av 1 isolat, Gram positive. For isolat nr. 18 var det vanskelig å avgjøre om den var Gram positiv eller Gram negativ. Resultatene stemmer med forventning om at flertallet av isolatene ville være Gram positive.

Antatte mugg/gjær ble også studert i mikroskop. Det ble studert 4 isolat, hvor 2 av disse var tydelige gjærceller med knoppskyting og synlige organeller. Resterende 2 isolater lignet mer på bakterier. Det var usikkert om dette var bakterier eller gjær da størrelsen på disse lå mellom det som var forventet for bakterier og gjær.

#### **5.6.4 Sekvensering**

Med hensyn på resultater fra katalasetest, Gramfarging og mikroskopering ble 11 isolater valgt ut til sekvensering. Dersom det antas at pizza er produsert forskriftsmessig med hensyn på god produksjonspraksis, forventes det å finne mikroorganismer som forbindes med ingredienser benyttet på pizzaene i tillegg til mikroorganismer som påvirkes av pakking i modifisert atmosfære. MAP vil medføre seleksjon av G positive bakterier, og da spesielt melkesyrebakterer (Adams & Moss 2008). I det følgende gis det en redegjørelse for ingredienser og mikroorganismer som forbindes med disse.

På pizzaen benyttes en revet osteblanding bestående av Mozzarella og Edamer (50 % av hver). Ved produksjon av Mozzarella benyttes en starterkultur bestående av *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, og i noen tilfeller enkelte mesofile *Lactococcus*. Før starterkultur tilsettes, blir ystemelken standardisert og pasteurisert i 15 sekunder ved 72 °C. Ved produksjon av Edamer benyttes en mesofil DL-starterkultur bestående av ulike stammer *Lactococcus* og *Leuconostoc*. DL-starterkultur



produserer CO<sub>2</sub>, hovedsakelig fra sitronsyre og fra heterofermentering fra *Leuconostoc*, som fører til at det blir dannet huller i den ferdige osten. Ystemelken standardiseres og pasteuriseres i 20 sekunder ved 72 °C før den tilsettes starterkultur (Walstra et al. 2006).

To typer kjøtt benyttes på pizzaen; kvernet kjøttdeig med løk og bacon/carbonarakjøtt. Antall bakterier som i utgangspunktet finnes på ferskt kjøtt er estimert til å ligge mellom 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> CFU/g. Blant bakterier i flora som forbindes med forringelse av ferskt kjøtt finnes *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudomonas* spp. og *Shewanella putrefaciens* (Borch et al. 1996). Hvor lenge kjøtt er lagret vil ha noe å si for hvilke bakterier en kan forvente å identifisere. Til å begynne med vil det være et stort arts mangfold, men etter hvert som ulike faktorer gjør seg gjeldende vil enkelte arter dominere bakteriefloraen. I en studie fra 2003 ble bakterieflora i kjøttdeig identifisert etter 0, 5, 9, 13, 16 og 21 dagers lagring. Etter lagring i 21 dager var det *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Morganella*, *Providencia*, *Psychrobacter* og *Pantoea* som dominerte bakteriefloraen (Jay et al. 2003)

Løkterninger som benyttes på denne pizzaen fremstilles av frisk løk av god kvalitet, fri for mekaniske skader, insektangrep og sykdomsflekker. Løken blir rensset før den skrelles, vaskes og kuttes i terninger. Etter sortering og tørking blir den dypfrost og lagret ved -21 °C. Ved mangelfull vasking kan løken bidra til at typiske jordbakterier havner i pizzaen. Til bunnen benyttes vanlig bakegjær som består av stammer fra *Saccharomyces cerevisiae*. Ved identifisering av gjær er det sannsynlig at det er stammer innenfor denne arten.

Totalt 11 isolater ble sekvensert, hvorav 8 av disse var bakterier. På isolat nr. 11, 12, 29, 31, 32 og 34 ble det kun benyttet sekvens fra 1 primer, mens på isolat nr. 1, 5 og 19 ble sammensatt sekvens fra begge primere benyttet ved søk i database.

Blant bakteriene som ble identifisert ved 16 S rRNA sekvensering var 4 isolater *Leuconostoc mesenteroides*. *Leuconostoc mesenteroides* er en heterofermentativ, Gram positiv kokk, som ofte forbindes med fermentering av grønnsaker (Adams & Moss 2008; Walstra et al. 2006). *Leuconostoc mesenteroides* er blant de melkesyrebakteriene med lavest syre- og salttoleranse. De er ofte dominerende i starten av en fermenteringsprosess før lav pH fører til at andre melkesyrebakterier overtar (Adams & Moss 2008; Mc Donald et al. 1990). *Leuconostoc*

*mesenteroides* kan også komme fra starterkulturer som ble benyttet ved produksjon av ost på pizzaene.

Videre ble 3 sekvenserte isolater identifisert til å være *Lactobacillus sakei/curvatus*. *Lactobacillus sakei* er en melkesyrebakterie som er vanlig i næringsmiddel miljøer. Den utgjør en viktig del av kommersielle starterkulturer benyttet ved fermentering av kjøtt (Hüfner et al. 2007). *Lactobacillus curvatus* er en melkesyrebakterie som kjennetegnes ved bøye staver som foreligger i par eller korte kjeder hvor enkelte stammer kan vokse ned mot 2 °C (Torriani et al. 1996). Dersom isolater er *L. sakei*, kan disse ha kommet over i pizzaene via kjøttet.

Isolat nr. 18, som ga positivt resultat ved katalasetest, var *Rahnella aquatillis*. *Rahnella aquatillis* er en Gram negativ stavbakterie som tilhører familien *Enterobacteriaceae* og har vann som naturlig habitat (Harrel et al. 1989). Bakterien er å betrakte som et patogen, den er fakultativt anaerob og kan vokse ved temperaturer ned mot 4 °C, trolig fordi dens naturlige habitat er jord og vann (Tash 2005). Da dette er en bakterie med jord/vann som naturlig habitat, kan denne ha blitt overført til pizzaen via løken som ikke har blitt vasket tilstrekkelig.

Blant 3 gjærisolater som ble sekvensert, var to av disse *Yarrowia lipolytica* eller *Debaryomyces hansenii*. *Yarrowia lipolytica* er en gjær som er kjent for å leve i fettrike habitater. Den blir på grunn av dens svært gode evne til å metabolisere hydrofobe substrater benyttet som modellorganisme i studier av lipidmetabolisme (Beopoulos et al. 2009). *Debaryomyces hansenii* forbindes også med høy evne til å metabolisere lipider, og finnes naturlig i habitater med lav vannaktivitet som ost, kjøtt, vin, øl, frukt og jord (Breuer & Harms 2006). Med hensyn på trivsel i fettrike habitater med lav vannaktivitet, kan det tenkes at *Yarrowia lipolytica/Debaryomyces hansenii* har kommet inn i pizzaen via osten.

Det er ikke tilstrekkelig med sekvensering av 11 isolater for å kunne si noe sikkert om mikrobiell flora på pizzaen, da disse kun representerer et utvalg av et utvalg. Det ble forsøkt å gjøre isolater så representative som mulig, men materialet blir likevel alt for lite. Tradisjonelle metoder antyder at melkesyrebakterier utgjør en vesentlig del av totaltallet, noe som også bekreftes av resultater fra denne sekvenseringen

## 6. Videre arbeid

Her følger forslag til videre arbeid.

- For bedre å kunne si noe om høye celletall skyldes lang nedkjølingstid eller dårlig mikrobiologisk kvalitet på ingrediensene, vil det være interessant med et uttak til mikrobiologiske analyser umiddelbart etter produksjon.
- For å få et innblikk i hvor mikrobiologiske utfordringer ligger, vil det være interessant med mikrobiologiske analyser av ingrediensene separat. Det ville da være naturlig at ingredienser pakkes på samme måte som hele pizzaer og lagres ved samme betingelser som pizzaene i denne oppgaven.
- Lang nedkjølingstid er et problem for dette produktet. For å kunne fastsette hvor lang den reelle nedkjølingstiden er, ville det vært ønskelig med temperaturlogging av produktene i tiden etter produksjon.
- For å kunne ta stilling til om det vil være hensiktsmessig å benytte gelatin med lavere smeltepunkt i pizzasausen, bør det utredes hvorvidt dette vil påvirke pizzaens sensoriske egenskaper.
- For å se om den mikrobielle floraen har endret seg i løpet av lagringstiden, burde det også ha vært plukket kolonier fra skåler fra uttak tidligere i lagringsperioden.

## 7. Referanser

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology*. 3. utg. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 463 s.
- Barbosa-Canovas, G. V., Fontana, A. J. & Schmidt, S. J. (2007). Minimum Water Activity Limits for Growth of Microorganisms. I: Barbosa-Canovas, G. V., Fontana, A. J. & Schmidt, S. J. (red.) *Water Activity in Foods - Fundamentals and Applications*, s. 405-406. Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- Beopoulos, A., Chardot, T. & Nicaud, J. (2009). *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91 (6): 692–696.
- Betts, R. (2010). Microbial update - yeasts and moulds. 21 (5): 11-13. Tilgjengelig fra: <http://www.campdenbri.co.uk/news/yeasts21-5.pdf> (lest 18.04.13).
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L. & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 103-120.
- Breuer, U. & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23 (6): 415–437.
- Brul, S. & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods, mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 1-17.
- Davidson, P. M. & Harrison, M. A. (2002). Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. *Food Technology*, 56 (11): 69-78.
- Devlighere, F. & Debevere, J. (2000). Influence of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Spoilage Bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 33: 531-537.
- Fellows, P. J. (2009). *Food processing technology*. 3 utg. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited. 913 s.
- Foster, J. W. (2001). Acid Stress Responses of Salmonella and E. coli : Survival Mechanisms, Regulation, and Implications for Pathogenesis. *The Journal of Microbiology*, 39 (2): 89-94.
- Gilsenan, P. M. & Ross-Murphy, S. B. (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14 (3): 191-195.
- Harrel, L. J., Cameron, M. L. & O'Hara, C. M. (1989). *Rahnella aquatilis*, an unusual gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (7): 1671–1672.
- Hüfner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq, A.-M., Zagorec, M. & Hertel, C. (2007). Identification of *Lactobacillus sakei* Genes Induced during Meat Fermentation and Their Role in Survival and Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (8): 2522-2531.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9): 2761–2764.
- Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology*. 6 utg. Aspen Food Science Text Series 2000. Gaithersburg, Md: Springer US.
- Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology*. 6 utg. Aspen, USA: Aspen Publishers Inc. 625 s.
- Jay, J. M., Vilai, J. P. & Hughes, M. E. (2003). Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 105-11.
- Kurokawa, K., Goto, N. & Yasunaga, T. (2000). Searching the Most Conserved Sequence in Bacterial Whole Genomes. *Genome Informatics* (11): 309-310.

- Mc Donald, L. C., Fleming, H. P. & Hassan, H. M. (1990). Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (7): 2120-2124.
- Montville, T. J. & Matthews, K. R. (2007). Growth, Survival and Death of Microbes in Foods. I: Doyle, M. P. & Beuchat, L. R. (red.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, s. 3-22. Washington: ASM Press.
- Paruch, A. M. & Mæhlum, T. (2011). Fekale indikatorbakterier. 6: 4. Tilgjengelig fra: <http://bioweb07.bioforsk.no/Artikler/Fekale%20indikatorbakterier.pdf> (lest 05.04.13).
- Phadtare, S., Alsina, J. & Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 175-190.
- Pierson, M. D., Zink, D. L. & Smoot, J. M. (2007). Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. I: Doyle, M. P. & Beuchat, L. R. (red.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: ASM Press.
- Rimaux, T., Rivièrè, A., Illeghems, K., Weckx, S., De Vuyst, L. & Leroy, F. (2012). Expression of the arginine deiminase pathway genes in *Lactobacillus sakei* is strain dependent and is affected by the environmental pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (14): 4874-4883.
- Rotabakk, B. T., Birkeland, S., Jeksrud, W. K. & Sivertsvik, M. (2006). Effect of Modified Atmosphere Packaging and Soluble Gas Stabilization on the Shelf Life of Skinless Chicken Breast Fillets. *Journal of Food Science*, 71 (2): 124-131.
- Rushing, J. E., Curtis, P. A., Fraser, A. M., Green, D. P., Pilkington, D. H., Ward, D. R. & Turner, L. G. (2013). Basic Food Microbiology. *Food Safety*: 5. Tilgjengelig fra: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/foodsci/ext/pubs/microbiologybasic.html> (lest 30.04.20013).
- Schiraldi, A., Fessas, D. & Signorelli, M. (2012). Water Activity in Biological Systems – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62 (1): 5-13.
- Tash, K. (2005). *Rahnella aquatilis* Bacteremia from a Suspected Urinary Source *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (5): 2526-2528.
- Thieringer, H. A., Jones, P. G. & Inoye, M. (1998). Cold shock and adaption. *BioEssays*, 20: 49-57.
- Torriani, S., Van Reenen, C. A., Klein, G., Reuter, G., Dellaglio, F. & Dicks, L. M. T. (1996). *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* subsp. nov. and *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus* subsp. nov., new subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sakei* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein et al. 1996, emended descriptions), respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (4): 1158-1163.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2. utg. Florida, USA: CRC Press.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*. 6 utg. San Fransisco, USA: Pearson Education. 841 s.

## 8. Vedlegg

### 8.1 Elektroniske vedlegg

Vedleggsnummer	Tittel
Vedlegg 1	Oversikt over mikrobiologiske krav og retningslinjer (Stabburet)
Vedlegg 2	Kommisjonsforordning (EF) nr. 2073/2005 av 15. november 2005 om mikrobiologiske kriterier for næringsmidler
Vedlegg 3	Ferdigvarespesifikasjon for Dagens Pizza med kjøttdeig, bacon og løk
Vedlegg 8	VIDAS
Vedlegg 9	Kvantitativ Listeria
Vedlegg 10	QIAprep® Miniprep Handbook
Vedlegg 11	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up



## Oversikt over mikrobiologiske krav og retningslinjer

Produktgruppe	<i>E. coli</i> (NMKL 125/147)	Total kim (NMKL 86/146)	Sulfitred. Clostr. (NMKL 95)	HK blodskål aerobt/anaerobt
1. Kjøttråvarer til varmebehandlede produkter <sup>§</sup>	<50 (m:<100, M:<1 000)	<10 <sup>5</sup> (m:<10 <sup>5</sup> , M:<10 <sup>6</sup> )	<200	<1000
2. Kjøttråvarer til rå produkter <sup>§</sup>	<10 (m:<10, M:100)	<10 <sup>5</sup>	<200	<1000
3. Kjøttråvarer av fjørfe til varmebehandlede produkter	<50	<10 <sup>5</sup>	<100 <sup>*</sup>	
4. Kjøttråvarer av fjørfe til rå produkter	<50	<10 <sup>5</sup>	<100 <sup>z</sup>	
5. Ferskt kjøtt generelt til varmebehandlede produkter	<50 (m:<50, <500)			
6. Ferskt kjøtt generelt til rå produkter	<10 (m:<50, M:<500)			
7. Import kjøtt	<50 <sup>¶</sup> (m:<50, M:<500)	<10 <sup>5</sup> (m:<10 <sup>5</sup> , M:<10 <sup>6</sup> )		
8. Innmat til varmebehandlede produkter	Se "Krav til leverandører"		<200	<1000
9. Vann	0/100 ml	<100/ml	0/100 ml	
10. Krydder <sup>▲</sup>	<10	<10 <sup>4</sup>	<100	<1000
11. Rå løk	<100	<10 <sup>7</sup>		<1000
12. Kvernet kjøtt/farser til varmebehandlede produkter	<50	<5x10 <sup>5</sup>	<100 <sup>*</sup>	
13. Kvernet kjøtt/farser til rå produkter	<10 (m:<50, M:<500, n:5, c:2)	<5x10 <sup>5</sup> (m:<5x10 <sup>5</sup> , M:<5x10 <sup>6</sup> , n:5, c:2)	<100 <sup>*</sup>	
14. Kvernet/tilberedt kjøtt	<10 (m:<50, M:<500, n:5, c:2)	<5x10 <sup>5</sup> (m:<5x10 <sup>5</sup> , M:<5x10 <sup>6</sup> , n:5, c:2)		
15. Biffsnadder, rå	<50 (m:<50, M:<500, n:5, c:2)	<10 <sup>6</sup>		
16. Varmebehandlede kjøttfarseprodukter	<10	<1000 (m:<10 <sup>4</sup> , M:<10 <sup>5</sup> , n:5, c:3)	<100 (m:<100, M:<1000, n:5, c:2)	
17. Hermetikk		0 (n:5, c:0) <sup>4</sup>		
18. Ferdige retter, skal varmebehandles før konsum	<10 (m:<100, M:<10 <sup>4</sup> )	<10 <sup>5</sup>	<1000 (m:<1000, M:<10 <sup>4</sup> )	
19. Ferdige retter, skal ikke varmebehandles før konsum	<10 (m:<100, M:<1000)	<10 <sup>5</sup> (m:<10 <sup>5</sup> , M:<10 <sup>6</sup> )		
20. Halvfabrikata til egne og andre anlegg	<10	<1000 (m:<10 <sup>4</sup> , M:<10 <sup>5</sup> , n:5, c:3)	<100 (m:<100, M:<1000, n:5, c:2)	

Mattilsynes mikrobiologiske grenseverdier, n og c er angitt i parentes der disse er oppgitt. Verdier angitt i rødt er krav fastsatt i forskrift fra Mattilsynet eller SFM som ikke må overskrides. Ved overskridelse av anbefalte grenseverdier (angitt i sort) må tiltak diskuteres i hvert enkelt tilfelle.

<sup>§</sup> Gjelder ikke fjørfe

<sup>¶</sup> Gjelder ved bruk av kjøttet til varmebehandlede produkter, hvis ikke må det vurderes for Enterohemorragisk *E. coli* (EHEC)

<sup>\*</sup> Råstoff til picnic kalkun og Stabburet leverpostei kylling

<sup>■</sup> NMKL 59

<sup>▲</sup> Gjelder ikke oleosiner. Anbefalte mikrobiologiske grenseverdier gjelder også for tørket løk.

<sup>#</sup> Når halvfabrikata til egne og andre anlegg går til ferdige retter som ikke skal varmebehandles før konsum (gruppe 19)

<sup>♣</sup> For *Salmonella* (NMKL 71) er det et absolutt krav med negativ analyse i 25 g prøve for alle produktgrupper

<sup>◇</sup> Vil trolig endres til <100/g ved siste forbruksdag for ferdige retter som ikke skal varmebehandles før konsum når Hygienepakka trer i kraft

<sup>\*</sup> Hemolytisk kim aerobt/anaerobt etter varmesjokk (70°C i 20 minutter)



<i>S. aureus</i> (NMKL 66)	Mugg/gjær	<i>B. cereus</i> (NMKL 67)	Bakterielle sporer*	<i>Salmonella</i> (NMKL 71)*	<i>Campylobacter</i> (NMKL 119)	<i>Listeria monocytogenes</i> (NMKL 136) <sup>∇</sup>
<500 (m:<500, M:<5000)			<1000	neg. i 25 g		
<500 (m:<500, M:<5000)			<1000	neg. i 25 g		
<500				neg. i 25 g (n:10, c:0)	neg. i 25 g	
<500				neg. i 25 g (n:10, c:0)	neg. i 25 g	
<500 (m:<500, M:<5000)				neg. i 25 g		
<500 (m:<500, M:<5000)				neg. i 25 g		
<500 (m:<500, M:<5000)				neg. i 25 g		
<500			<1000	neg. i 25 g		
			<10/ml			
	<500		<1000			
<500				neg. i 25 g		
<500 (m:500, M:5000, n:5, c:2)				neg. i 25 g (n:5, c:0)		
<500 (m:500, M:5000, n:5, c:2)				neg. i 25 g (n:5, c:0)		
<500 (m:<500, M:<5000, n:5, c:1)				neg. i 25 g (n:5, c:0)		
<100 (m:<100, M:<1000, n:5, c:2)		<500 (m:<500, M:<10 <sup>4</sup> , n:5, c:2)	<1000	neg. i 25 g (n:5, c:0)		
			0 (n:5, c:0) <sup>■</sup>			
		<500 (m:<1000, M:<10 <sup>4</sup> )	<1000	neg. i 25 g		
<100 (m:<100, M:<1000)		<500 (m:<1000, M:<10 <sup>4</sup> )	<1000	neg. i 25 g		neg. i 25 g
<100 (m:<100, M:<1000, n:5, c:2)		<500 (m:<500, M:<10 <sup>4</sup> , n:5, c:2)	<1000	neg. i 25 g		neg. i 25 g <sup>#</sup>

Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological  
criteria for foodstuffs

**KOMMISJONSFORORDNING (EF) nr. 2073/2005**  
**av 15. november 2005**  
**om mikrobiologiske kriterier for næringsmidler**

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESSKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 852/2004 av 29. april 2004 om næringsmiddelhygiene<sup>(1)</sup>, særlig artikkel 4 nr. 4 og artikkel 12, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Et av de grunnleggende målene med næringsmiddelregelverket er å oppnå et høyt vernnivå for folkehelsen, som fastsatt i europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 178/2002 av 28. januar 2002 om fastsettelse av allmenne prinsipper og krav i næringsmiddelregelverket, om opprettelse av Den europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet og om fastsettelse av framgangsmåter i forbindelse med næringsmiddeltrygghet<sup>(2)</sup>. Mikrobiologiske farer i næringsmidler utgjør en vesentlig kilde til sykdommer som overføres gjennom næringsmidler, hos mennesker.
- 2) Næringsmidler skal ikke inneholde mikroorganismer eller toksiner eller metabolitter av disse i mengder som innebærer en uakseptabel risiko for menneskers helse.
- 3) Ved forordning (EF) nr. 178/2002 er det fastsatt allmenne krav for næringsmiddeltrygghet som medfører at næringsmidler ikke kan omsettes dersom de er utrygge. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak er forpliktet til å trekke utrygge næringsmidler tilbake fra markedet. For å kunne verne om folkehelsen og unngå avvikende fortolkninger, bør det fastsettes harmoniserte trygghetskriterier for å kunne fastslå når næringsmidlene er akseptable, særlig med hensyn til forekomst av visse sykdomsframkallende mikroorganismer.
- 4) Mikrobiologiske kriterier gir også retningslinjer for om næringsmidlene og prosessene for framstilling, håndtering og distribusjon er akseptable. Bruk av mikrobiologiske kriterier skal være en integrert del av gjennomføringen av HACCP-baserte framgangsmåter og andre tiltak for hygienekontroll.
- 5) Næringsmiddeltrygghet oppnås hovedsakelig ved forebyggende tiltak, som ved gjennomføring av god hygienep praksis og anvendelse av framgangsmåter basert på prinsippene om fareanalyse og kritiske styringspunkter (HACCP-prinsippene). Mikrobiologiske kriterier kan brukes for å validere og verifisere HACCP-framgangsmåter og andre tiltak for hygienekontroll. Det bør derfor fastsettes mikrobiologiske kriterier som definerer når prosessene er akseptable, samt mikrobiologiske kriterier for næringsmiddeltrygghet som fastsetter en grenseverdi, som dersom den overskrides, medfører at næringsmiddelet skal anses som uakseptabelt forurenset av de mikroorganismene som disse kriteriene er fastsatt for.

---

<sup>(1)</sup> EUT L 139 av 30.4.2004, s. 1, rettet i EUT L 226 av 25.6.2004, s. 3.

<sup>(2)</sup> EFT L 31 av 1.2.2002, s. 1. Forordningen endret ved forordning (EF) nr. 1642/2003 (EUT L 245 av 29.9.2003, s. 4).

- 6) I samsvar med artikkel 4 i forordning (EF) nr. 852/2004 skal driftsansvarlige for næringsmiddelforetak oppfylle mikrobiologiske kriterier. Dette bør omfatte prøving mot de grenseverdiene som er fastsatt for kriteriene, ved prøvetaking, analyser og gjennomføring av korrigerende tiltak i samsvar med næringsmiddelregelverket og retningslinjene fra vedkommende myndighet. Det bør derfor fastsettes gjennomføringstiltak for analysemetodene, herunder om nødvendig måleusikkerheten, prøvetakingsplanen, de mikrobiologiske grenseverdiene og antall analyseenheter som skal oppfylle disse grenseverdiene. Videre bør det fastsettes gjennomføringstiltak for de næringsmidlene som kriteriet får anvendelse på, de nivåene i næringsmiddelkjeden som kriteriet får anvendelse på, samt hvilke tiltak som skal treffes dersom kriteriet ikke blir oppfylt. De tiltakene som driftsansvarlige for næringsmiddelforetak skal treffe for å sikre at kriteriene som definerer når en prosess er akseptabel, er oppfylt, kan blant annet omfatte kontroll av råvarer, hygiene, temperatur og produktets holdbarhetstid.
- 7) I henhold til europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 882/2004 av 29. april 2004 om offentlig kontroll for å sikre at føvare- og næringsmiddelregelverket samt bestemmelsene om dyrs helse og velferd overholdes<sup>(1)</sup>, skal medlemsstatene sikre at offentlig kontroll foretas regelmessig på grunnlag av en risikovurdering og så ofte som det er hensiktsmessig. Slike kontroller skal finne sted på hensiktsmessige ledd i produksjonen, foredlingen og distribusjonen av næringsmidler for å sikre at driftsansvarlige for næringsmiddelforetak oppfyller kriteriene fastsatt i denne forordning.
- 8) Meldingen fra Kommisjonen om fellesskapsstrategien for fastsettelse av mikrobiologiske kriterier for næringsmidler<sup>(2)</sup> beskriver strategien for å fastsette og revidere kriteriene i Fellesskapets regelverk, samt prinsippene for å utvikle og anvende kriteriene. Denne strategien skal følges når det fastsettes mikrobiologiske kriterier.
- 9) Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen, avgav 23. september 1999 en uttalelse om evaluering av mikrobiologiske kriterier for næringsmidler av animalsk opprinnelse beregnet på konsum. Komiteen understreket betydningen av at mikrobiologiske kriterier bygger på formelle risikovurderinger og internasjonalt godkjente prinsipper. I uttalelsen anbefales det at mikrobiologiske kriterier skal være relevante og virkningsfulle med hensyn til vern av forbrukernes helse. Komiteen foreslo enkelte reviderte kriterier som midlertidige tiltak i påvente av formelle risikovurderinger.
- 10) Samtidig avgav Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen en egen uttalelse om *Listeria monocytogenes*. I denne uttalelsen anbefales et mål om å holde konsentrasjonen av *Listeria monocytogenes* i næringsmidler under 100 kde/g. Vitenskapskomiteen for næringsmidler sluttet seg til disse anbefalingene i sin uttalelse av 22. juni 2000.
- 11) Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen avgav 19. og 20. september 2001 en uttalelse om *Vibrio vulnificus* og *Vibrio parahaemolyticus*. Komiteen konkluderte med at det ikke kan fastsettes særlige kriterier for sykdomsframkallende *V. vulnificus* og *parahaemolyticus* i sjømat på grunnlag av

---

<sup>(1)</sup> EUT L 165 av 30.4.2004, s. 1, rettet i EUT L 191 av 28.5.2004, s. 1.

<sup>(2)</sup> SANCO/1252/2001. Diskusjonsnotat om strategien for fastsettelse av mikrobiologiske kriterier for næringsmidler i Fellesskapets regelverk, s. 34.

tilgjengelige vitenskapelige opplysninger. Den anbefalte imidlertid å fastsette regler for god praksis for å sikre at det anvendes god hygienep praksis.

- 12) Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen avgav 30.-31. januar 2002 en uttalelse om norwalklignende virus (NLV, norovirus). I denne uttalelsen konkluderer komiteen med at konvensjonelle fekale indikatorer ikke er pålitelige når det gjelder å avdekke forekomst eller fravær av norwalkvirus, og at det er forbundet med usikkerhet å følge praksis med å fjerne fekale indikatorbakterier for å bestemme skjellenes rensetid. Komiteen anbefalte også å bruke *E. coli* framfor fekale koliforme bakterier for å angi fekal forurensning i områder hvor det høstes skjell, når det anvendes indikatorbakterier.
- 13) Vitenskapskomiteen for næringsmidler avgav 27. februar 2002 en uttalelse om spesifikasjoner for gelatin med hensyn til forbrukernes helse. Komiteen konkluderte med at de mikrobiologiske kriteriene fastsatt i kapittel 4 i vedlegg II til rådsdirektiv 92/118/EØF av 17. desember 1992 om fastsettelse av krav til dyrehelse og folkehelse ved handel innenfor Fellesskapet med og innførsel til Fellesskapet av produkter som ikke omfattes av nevnte krav fastsatt i særlige fellesskapsregler nevnt i vedlegg A avsnitt I i direktiv 89/662/EØF og, med hensyn til sykdomsframkallende smittestoffer, i direktiv 90/425/EØF<sup>(1)</sup>, var overdrevne med hensyn til forbrukernes helse, og vurderte det som tilstrekkelig å anvende et obligatorisk mikrobiologisk kriterium utelukkende for salmonella.
- 14) Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen avgav 21. og 22. januar 2003 en uttalelse om verotoksinproduserende *E. coli* (VTEC) i næringsmidler. I uttalelsen konkluderte komiteen med at det er lite sannsynlig at anvendelse av en mikrobiologisk standard for VTEC O157 i sluttproduktet vil redusere den tilhørende risikoen for forbrukerne nevneverdig. Mikrobiologiske retningslinjer som har som mål å redusere fekal forurensning i næringsmiddelkjeden, kan derimot bidra til å redusere risikoene for folkehelsen, herunder VTEC. Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen identifiserte følgende næringsmiddelkategorier der VTEC utgjør en fare for folkehelsen: rått eller for lite kokt eller stekt storfekjøtt og muligens kjøtt fra andre drøvtyggere, kvernet kjøtt og fermentert storfekjøtt og produkter basert på fermentert storfekjøtt, rå melk og rå melkeprodukter, friske produkter, særlig spirer og upasteurisert frukt- og grønnsaksjuice.
- 15) Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen avgav 26. og 27. mars 2003 en uttalelse om enterotoksiner framkalt av stafylokokker i melkeprodukter, særlig i ost. Komiteen anbefalte å revidere kriteriene for koagulasepositive stafylokokker i ost, rå melk beregnet på foredling, samt i melkepulver. Det bør videre fastsettes kriterier for enterotoksiner framkalt av stafylokokker i ost og melkepulver.
- 16) Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen avgav 14. og 15. april 2003 en uttalelse om salmonella i næringsmidler. I henhold til uttalelsen omfatter de næringsmiddelkategoriene som muligens utgjør en stor risiko for folkehelsen, rått kjøtt og enkelte produkter som skal spises rå, fjørfekjøttprodukter som er rå eller for lite kokt eller stekt, egg og produkter som inneholder rå egg, upasteurisert melk og enkelte produkter av upasteurisert melk. Spirer og upasteurisert fruktjuice kan også utgjøre en risiko. Komiteen anbefalte at vedtaket om behovet for mikrobiologiske kriterier gjøres

---

<sup>(1)</sup> EFT L 62 av 15.3.1993, s. 49. Direktivet sist endret ved kommisjonsforordning (EF) nr. 445/2004 (EUT L 72 av 11.3.2004, s. 60).

på grunnlag av kriterienes evne til å verne forbrukerne, og om det er mulig å gjennomføre vedtaket.

- 17) Vitenskapsgruppen for biologiske farer under Den europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet (EFSA) avgav 9. september 2004 en uttalelse om mikrobiologiske farer i morsmelkerstatninger og tilskuddsblandinger. Vitenskapsgruppen konkluderte med at *Salmonella* og *Enterobacter sakazakii* er de mikroorganismene som skaper flest problemer i morsmelkerstatninger, tilskuddsblandinger til spesielle medisinske formål og tilskuddsblandinger. Forekomsten av disse sykdomsframkallende mikroorganismene utgjør en betydelig risiko dersom forholdene etter rekonstituering tillater formering. Enterobacteriaceae, som forekommer hyppigere, kan anvendes som en risikoindikator. EFSA har anbefalt overvåking og undersøkelse av enterobacteriaceae både i produksjonsmiljøet og i sluttproduktet. I tillegg til sykdomsframkallende arter omfatter imidlertid enterobacteriaceae-familien også arter som opptrer i miljøet, og disse opptrer ofte i næringsmidlenes produksjonsmiljø uten at de medfører noen helsefare. Enterobacteriaceae-familien kan derfor anvendes til rutineovervåking, og dersom enterobacteriaceae forekommer, kan det igangsettes undersøkelse av spesifikke sykdomsframkallende mikroorganismer.
- 18) For mange næringsmidler er det ennå ikke fastsatt internasjonale retningslinjer for mikrobiologiske kriterier. Kommisjonen har imidlertid fulgt Codex Alimentarius' retningslinjer «Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods CAC/GL 21 — 1997», samt rådene fra Vitenskapskomiteen for veterinære tiltak knyttet til folkehelsen og Vitenskapskomiteen for næringsmidler, for å fastsette mikrobiologiske kriterier. Det er tatt hensyn til eksisterende Codex-spesifikasjoner for tørkede melkeprodukter, barnemat, samt kriteriet for histamin som får anvendelse på visse fiskeprodukter og fiskerivarer. Handelen bør dra nytte av at det vedtas fellesskapskriterier, ettersom det blir fastsatt harmoniserte mikrobiologiske krav for næringsmidler som erstatter nasjonale kriterier.
- 19) De mikrobiologiske kriteriene som ble fastsatt for visse kategorier av næringsmidler av animalsk opprinnelse i direktiver som ble opphevet ved europaparlaments- og rådsdirektiv 2004/41/EF av 21. april 2004 om oppheving av visse direktiver om næringsmiddelhygiene og hygieneregler for produksjon og omsetning av visse produkter av animalsk opprinnelse beregnet på konsum, og om endring av rådsdirektiv 89/662/EØF og 92/118/EØF samt rådsvedtak 95/408/EF<sup>(1)</sup>, bør revideres, og det bør fastsettes enkelte nye kriterier på grunnlag av vitenskapelige råd.
- 20) De mikrobiologiske kriteriene fastsatt i kommisjonsvedtak 93/51/EØF av 15. desember 1992 om mikrobiologiske kriterier for produksjon av kokte krepsdyr og bløtdyr<sup>(2)</sup> er innarbeidet i denne forordning. Nevnte vedtak bør derfor oppheves. Ettersom kommisjonsvedtak 2001/471/EF av 8. juni 2001 om fastsettelse av regler for den regelmessige kontrollen av den alminnelige hygien, som skal foretas av den driftsansvarlige ved en bedrift i samsvar med direktiv 64/433/EØF om hygienekrav til produksjon og omsetning av ferskt kjøtt og direktiv 71/118/EØF om helseproblemer ved produksjon og markedsføring av ferskt fjørfekjøtt<sup>(3)</sup>, er opphevet med virkning fra 1. januar 2006, bør mikrobiologiske kriterier for skrotter innarbeides i denne forordning.

<sup>(1)</sup> EUT L 157 av 30.4.2004, s. 33, rettet i EUT L 195 av 2.6.2004, s. 12.

<sup>(2)</sup> EFT L 13 av 21.1.1993, s. 11.

<sup>(3)</sup> EFT L 165 av 21.6.2001, s. 48. Vedtaket endret ved vedtak 2004/379/EF (EUT L 144 av 30.4.2004, s. 1).

- 21) Produsenten eller fabrikanten av et næringsmiddel må avgjøre om det kan spises slik det er, uten koking eller steking eller annen tilberedning for å sikre at det er trygt og at det oppfyller de mikrobiologiske kriteriene. I samsvar med artikkel 3 i europaparlaments- og rådsdirektiv 2000/13/EF av 20. mars 2000 om tilnærming av medlemsstatenes lovgivning om merking og presentasjon av samt reklamerings for næringsmidler<sup>(1)</sup>, er det nødvendig med en bruksanvisning på næringsmiddelets etikett dersom forsvarlig bruk av næringsmiddelet ellers ikke er mulig. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak må ta hensyn til slike bruksanvisninger når de skal fastsette hensiktsmessig prøvetakingsfrekvens for undersøkelse på grunnlag av mikrobiologiske kriterier.
- 22) Prøvetaking fra produksjons- og foredlingsmiljøet kan være et nyttig redskap for å identifisere og forebygge forekomst av sykdomsframkallende mikroorganismer i næringsmidler.
- 23) Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak må selv avgjøre hvor ofte det er nødvendig å foreta prøvetaking og prøving innenfor rammen av sine framgangsmåter basert på HACCP-prinsipper og andre framgangsmåter for hygienekontroll. I enkelte tilfeller kan det imidlertid være nødvendig å fastsette harmoniserte prøvetakingsfrekvenser på fellesskapsplan, særlig for å sikre at kontrollnivået er likt i hele Fellesskapet.
- 24) Prøvningsresultatene avhenger av den analysemetoden som benyttes, og en gitt referansemetode bør derfor knyttes til hvert mikrobiologisk kriterium. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak bør imidlertid ha anledning til å bruke andre analysemetoder enn referansemetodene, særlig raskere metoder, så lenge bruken av disse alternative metodene gir likeverdige resultater. Det er dessuten nødvendig å fastsette en prøvetakingsplan for hvert kriterium for å sikre en harmonisert gjennomføring. Det er likevel nødvendig å tillate bruk av andre prøvetakings- og prøvningsordninger, herunder bruk av alternative indikatororganismer dersom disse ordningene kan garantere samme næringsmiddeltrygghet.
- 25) Utviklingstrekk i prøvningsresultatene skal analyseres, siden de kan avdekke uønsket utvikling i framstillingsprosessen og gi den driftsansvarlige for næringsmiddelforetaket anledning til å treffe korrigerende tiltak før prosessen kommer ut av kontroll.
- 26) De mikrobiologiske kriteriene fastsatt i denne forordning, bør kunne gjennomgås på nytt og eventuelt endres eller suppleres for å ta hensyn til utviklingen innen næringsmiddeltrygghet og næringsmiddelmikrobiologi. Dette omfatter vitenskapelige, teknologiske og metodologiske framskritt, endringer av prevalens- og forurensningsnivåer, endringer i gruppen av utsatte forbrukere, samt eventuelle resultater fra risikovurderinger.
- 27) Det bør særlig fastsettes kriterier for sykdomsframkallende virus i levende muslinger når analysemetodene er tilstrekkelig utviklet. Det er også behov for å utvikle pålitelige metoder for andre mikrobielle farer, for eksempel *Vibrio parahaemolyticus*.
- 28) Det er godtgjort at gjennomføring av kontrollprogrammer kan bidra betydelig til å redusere prevalensen av salmonella hos produksjonsdyr og produkter av disse. Formålet med europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 2160/2003 av 17. november 2003

---

<sup>(1)</sup> EFT L 109 av 6.5.2000, s. 29. Direktivet sist endret ved direktiv 2003/89/EF (EUT L 308 av 25.11.2003, s. 15).

om kontroll av salmonella og andre spesifiserte zoonotiske smittestoffer som overføres gjennom næringsmidler<sup>(1)</sup>, er å sikre at det treffes korrekte og virkningsfulle tiltak for å bekjempe salmonella på relevante nivåer i næringsmiddelkjeden. Kriterier for kjøtt og kjøttprodukter skal ta hensyn til forventet bedring i salmonellasituasjonen på primærproduksjonsnivå.

- 29) For enkelte av kriteriene for næringsmiddeltrygghet bør medlemsstatene gis et midlertidig unntak som gir dem anledning til å oppfylle mindre strenge kriterier, forutsatt at næringsmidlene bare omsettes på det nasjonale markedet. Medlemsstatene skal underrette Kommisjonen og andre medlemsstater når de benytter seg av dette midlertidige unntaket.
- 30) Tiltakene fastsatt i denne forordning er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen —

VEDTATT DENNE FORORDNING:

### *Artikkel 1*

#### **Formål og virkeområde**

Ved denne forordning fastsettes mikrobiologiske kriterier for visse mikroorganismer og de gjennomføringsreglene som driftsansvarlige for næringsmiddelforetak skal overholde når de gjennomfører allmenne og særlige hygienetiltak nevnt i artikkel 4 i forordning (EF) nr. 852/2004. Vedkommende myndighet skal i samsvar med forordning (EF) nr. 882/2004 sikre at reglene og kriteriene fastsatt i denne forordning overholdes, med forbehold for myndighetens rett til å foreta ytterligere prøvetaking og analyser for å påvise og måle forekomst av andre mikroorganismer eller toksiner eller metabolitter av disse, enten som en kontroll av prosessen, når næringsmidler mistenkes for å være utrygge, eller som et ledd i en risikoanalyse.

Denne forordning får anvendelse med forbehold for andre særlige bestemmelser om kontroll av mikroorganismer fastsatt i Fellesskapets regelverk, særlig helsestandarder for næringsmidler fastsatt i europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 853/2004<sup>(2)</sup>, regler for parasitter fastsatt i europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 854/2004<sup>(3)</sup>, og de mikrobiologiske kriteriene fastsatt i rådsdirektiv 80/777/EØF<sup>(4)</sup>.

### *Artikkel 2*

#### **Definisjoner**

I denne forordning menes med:

- a) «mikroorganismer»: bakterier, virus, gjær, mugg, alger, parasittære protozoer, mikroskopiske parasittære helminter og toksiner og metabolitter av disse,

---

<sup>(1)</sup> EUT L 325 av 12.12.2003, s. 1.

<sup>(2)</sup> EUT L 139 av 30.4.2004, s. 55, rettet i EUT L 226 av 25.6.2004, s. 22.

<sup>(3)</sup> EUT L 139 av 30.4.2004, s. 206, rettet i EUT L 226 av 25.6.2004, s. 83.

<sup>(4)</sup> EFT L 229 av 30.8.1980, s. 1.



- b) «mikrobiologisk kriterium»: et kriterium som definerer når et produkt, et parti næringsmidler eller en prosess kan aksepteres, basert på fravær av, forekomst av eller antall mikroorganismer, og/eller mengden av toksiner/metabolitter av disse, per enhet(er) masse, volum, areal eller parti,
- c) «kriterium for næringsmiddeltrygghet»: et kriterium som definerer når et produkt eller et parti næringsmidler kan aksepteres, og som gjelder for produkter som er omsatt,
- d) «hygienekriterium for prosessen»: et kriterium som angir når produksjonsprosessen fungerer tilfredsstillende. Et slikt kriterium gjelder ikke for produkter som er omsatt på markedet. Kriteriet fastsetter en veiledende grenseverdi for forurensning, og ved overskridelse av denne kreves det korrigerende tiltak for at hygienen i prosessen fortsatt skal være i samsvar med næringsmiddelregelverket,
- e) «parti»: en gruppe eller en serie identifiserbare produkter som er framstilt i en gitt prosess under tilnærmet like forhold og produsert på et gitt sted innenfor en bestemt produksjonsperiode,
- f) «holdbarhetstid»: enten tidsrommet før siste forbruksdato eller holdbarhetsgrensen, som definert i henholdsvis artikkel 9 og 10 i direktiv 2000/13/EF,
- g) «spiseferdige næringsmidler»: næringsmidler som produsenten eller fabrikanten har framstilt med henblikk på direkte konsum uten at koking eller annen tilberedning er nødvendig for å fjerne, eller redusere til et akseptabelt nivå, uønskede mikroorganismer,
- h) «spedbarnsmat»: næringsmidler som særlig er beregnet på spedbarn, som definert i rådsdirektiv 91/321/EØF<sup>(1)</sup>,
- i) «næringsmiddel til spesielle medisinske formål»: næringsmidler til spesielle medisinske formål, som definert i rådsdirektiv 1999/21/EØF<sup>(2)</sup>,
- j) «prøve»: et sett med én eller flere enheter eller en porsjon av stoff utvalgt med forskjellige metoder i en populasjon eller i en stor mengde stoff, som har som mål å gi opplysninger om en gitt egenskap ved den populasjonen eller det stoffet som undersøkes, og å danne et grunnlag for en beslutning om populasjonen eller stoffet, eller om prosessen som har framstilt den/det,
- k) «representativ prøve»: en prøve der egenskapene i det partiet som prøven kommer fra, er bevart. Dette gjelder særlig for en tilfeldig prøve der hver enhet eller del i partiet har samme sannsynlighet for å utgjøre prøven,
- l) «overholdelse av mikrobiologiske kriterier»: oppnåelse av tilfredsstillende eller akseptable resultater nevnt i vedlegg I, ved prøving mot de grenseverdiene som er fastsatt for kriteriene, gjennom å ta prøver, foreta analyser og gjennomføre korrigerende tiltak i samsvar med næringsmiddelregelverket og retningslinjene fra vedkommende myndighet.

---

<sup>(1)</sup> EFT L 175 av 4.7.1991, s. 35.

<sup>(2)</sup> EFT L 91 av 7.4.1999, s. 29.

### Artikkel 3

#### Allmenne krav

1. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak skal sikre at næringsmidlene oppfyller de relevante mikrobiologiske kriteriene som er fastsatt i vedlegg I. For dette formål skal driftsansvarlige for næringsmiddelforetak i alle ledd i produksjonen, foredlingen og distribusjonen av næringsmidler, herunder detaljhandel, treffe tiltak innenfor rammen av egne framgangsmåter basert på HACCP-prinsipper, og samtidig gjennomføre god hygienep praksis, for å sikre at:

- a) forsyning, håndtering og foredling av råvarer og næringsmidler under deres kontroll blir utført slik at hygienekriteriene for prosessen blir oppfylt,
- b) de kriteriene for næringsmiddeltrygghet som gjelder for hele holdbarhetstiden til produktene, oppfylles under rimelig forutsigbare vilkår for distribusjon, lagring og bruk.

2. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak som har ansvaret for å framstille produktene, skal om nødvendig gjennomføre undersøkelser i samsvar med vedlegg II for å kontrollere om kriteriene oppfylles gjennom hele holdbarhetstiden. Dette gjelder særlig for spiseferdige næringsmidler der *Listeria monocytogenes* kan vokse, og som kan innebære risiko for folkehelsen gjennom *Listeria monocytogenes*.

Næringsmiddelforetak kan samarbeide om å foreta slike undersøkelser.

Retningslinjer for å utføre slike undersøkelser kan innlemmes i retningslinjene for god praksis nevnt i artikkel 7 i forordning (EF) nr. 852/2004.

### Artikkel 4

#### Prøving mot kriteriene

1. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak skal utføre hensiktsmessig prøving mot de mikrobiologiske kriteriene som er fastsatt i vedlegg I, når de validerer eller kontrollerer om deres framgangsmåter basert på HACCP-prinsippene og god hygienep praksis fungerer korrekt.

2. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak skal beslutte egnet prøvetakingsfrekvens, unntatt når det i vedlegg I er fastsatt spesifikke prøvetakingsfrekvenser, som i så tilfelle fastsetter at prøvetakingsfrekvensen skal være minst som fastsatt i vedlegg I. Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak skal treffe en slik beslutning innenfor rammen av framgangsmåtene basert på HACCP-prinsippene og god hygienep praksis, idet det tas hensyn til bruksanvisningene for næringsmidlene.

Prøvetakingsfrekvensen kan tilpasses næringsmiddelforetakenes karakter og størrelse, forutsatt at næringsmiddeltryggheten ivaretas.

### Artikkel 5

#### Særlige regler for prøving og prøvetaking

1. De analysemetodene og prøvetakingsplanene og -metodene som er oppført i vedlegg I, skal benyttes som referansemetoder.

2. Det skal tas prøver fra foredlingsområder og utstyr som benyttes i produksjonen av næringsmidler, når det er nødvendig med slik prøvetaking for å sikre at kriteriene blir oppfylt. Ved slik prøvetaking skal ISO-standard 18593 benyttes som referansem metode.

Driftsansvarlige for næringsmiddel foretak som framstiller spiseferdige næringsmidler som kan innebære risiko for folkehelsen gjennom *Listeria monocytogenes*, skal som et ledd i sin prøvetakingsplan, ta prøver fra foredlingsområdene og utstyret for å avdekke forekomst av *Listeria monocytogenes*.

Driftsansvarlige for næringsmiddel foretak som framstiller morsmelkerstatning i pulverform eller næringsmidler i pulverform til spesielle medisinske formål beregnet på spedbarn under seks måneder, og som kan innebære en risiko for *Enterobacter sakazakii*, skal som et ledd i sin prøvetakingsplan overvåke foredlingsområdene og utstyret for å avdekke forekomst av Enterobacteriaceae.

3. Antall prøveenheter i prøvetakingsplanene oppført i vedlegg I, kan reduseres dersom den driftsansvarlige for næringsmiddel foretaket kan framlegge historisk dokumentasjon som viser at vedkommende benytter effektive HACCP-baserte framgangsmåter.

4. Dersom formålet med prøvingen er å foreta en særlig vurdering av om et bestemt parti næringsmidler eller en prosess kan aksepteres, skal i det minste prøvetakingsplanene oppført i vedlegg I, overholdes.

5. Driftsansvarlige for næringsmiddel foretak kan benytte andre framgangsmåter for prøvetaking og prøving dersom de kan godtgjøre overfor vedkommende myndighet at disse framgangsmåtene gir minst likeverdige garantier. Disse framgangsmåtene kan omfatte bruk av alternative prøvetakingssteder og analyser av utviklingstrekk.

Prøving mot alternative mikroorganismer og tilhørende mikrobiologiske grenseverdier, samt prøving av ikke-mikrobiologiske analytter, skal tillates bare for hygienekriterier for prosessen.

Bruk av alternative analysemetoder er tillatt når metodene er validert i forhold til referansemetoden i vedlegg I, og dersom det benyttes en opphavsrettslig metode som er sertifisert av en tredjepart i samsvar med protokollen i EN/ISO-standard 16140 eller andre lignende internasjonalt anerkjente protokoller.

Dersom den driftsansvarlige for et næringsmiddel foretak ønsker å benytte andre analysemetoder enn dem som er validert og sertifisert som beskrevet i tredje ledd, skal metodene valideres i samsvar med internasjonalt anerkjente protokoller, og vedkommende myndighet skal ha gitt tillatelse at de kan brukes.

#### Artikkel 6

#### Krav til merking

1. Når kravene som gjelder forekomst av *Salmonella* i kvernet kjøtt, tilberedt kjøtt og kjøttprodukter beregnet på å spises etter koking, steking eller lignende, fra alle arter oppført i vedlegg I, er oppfylt, skal produsenten tydelig merke de partiene av disse produktene som skal omsettes, slik at forbrukeren opplyses om at det er nødvendig å koke eller steke produktet grundig før det spises.

2. Fra 1. januar 2010 kreves det ikke lenger merking som nevnt i nr. 1 av kvernet kjøtt, tilberedt kjøtt og kjøttprodukter av fjørfekjøtt.

## Artikkel 7

### Utilfredsstillende resultater

1. Dersom prøving mot kriteriene oppført i vedlegg I, gir utilfredsstillende resultater, skal driftsansvarlige for næringsmiddelforetak treffe de tiltakene som er fastsatt i nr. 2-4 i denne artikkel, samt andre korrigerende tiltak definert i deres HACCP-baserte framgangsmåter, og øvrige tiltak som er nødvendige for å verne forbrukernes helse.

De skal dessuten treffe tiltak for å finne årsaken til de utilfredsstillende resultatene, slik at gjentakelse av uakseptabel mikrobiologisk forurensning kan forebygges. Slike tiltak kan omfatte endringer av de HACCP-baserte framgangsmåtene eller andre eksisterende tiltak for kontroll av næringsmiddelhygienen.

2. Dersom prøving mot kriterier for næringsmiddeltrygghet oppført i kapittel 1 i vedlegg I gir utilfredsstillende resultater, skal produktet eller næringsmiddelpartiet trekkes tilbake eller kalles tilbake i samsvar med artikkel 19 i forordning (EF) nr. 178/2002. Produkter som omsettes og som ennå ikke har nådd detaljstnivået og ikke oppfyller kriteriene for næringsmiddeltrygghet, kan imidlertid underlegges ytterligere behandling som fjerner den aktuelle faren. Denne behandlingen kan bare utføres av andre driftsansvarlige for næringsmiddelforetak enn dem som opptrer på detaljstnivået.

Den driftsansvarlige for et næringsmiddelforetak kan bruke partiet til andre formål enn dem det opprinnelig var beregnet på, forutsatt at dette ikke innebærer noen risiko for folke- eller dyrehelsen, og forutsatt at slik bruk er besluttet innenfor rammen av framgangsmåtene basert på HACCP-prinsippene og god hygienep praksis, og er godkjent av vedkommende myndighet.

3. Et parti mekanisk utbeinet kjøtt (MSM) framstilt med teknikker nevnt i avsnitt V i kapittel III nr. 3 i vedlegg III til forordning (EF) nr. 853/2004, og som har gitt utilfredsstillende resultater med hensyn til *Salmonella*-kriteriet, kan i næringsmiddelkjeden bare benyttes til å framstille varmebehandlede kjøttprodukter i virksomheter som er godkjent i samsvar med forordning (EF) nr. 853/2004.

4. Dersom resultatene med hensyn til hygienekriteriene for prosessen er utilfredsstillende, skal det treffes tiltak som fastsatt i vedlegg I kapittel 2.

## Artikkel 8

### Midlertidig unntak

1. Fram til senest 31. desember 2009 er det i henhold til artikkel 12 i forordning (EF) nr. 852/2004 gitt et midlertidig unntak når det gjelder overholdelse av grenseverdien fastsatt i vedlegg I til denne forordning, for *Salmonella* i kvernet kjøtt, tilberedt kjøtt og kjøttprodukter som er beregnet på å spises kokt eller stekt, og som omsettes på det nasjonale markedet i en medlemsstat.

2. Medlemsstater som benytter seg av denne muligheten, skal underrette Kommisjonen og de andre medlemsstatene om dette. Medlemsstaten skal:

- a) garantere at det er truffet relevante tiltak, herunder merking og et særlig merke, som ikke kan forveksles med identifikasjonsmerket fastsatt i avsnitt I i vedlegg II til forordning (EF) nr. 853/2004, for å sikre at unntaket gjelder bare for de aktuelle

produktene når de omsettes på hjemmemarkedet, og at produkter som er ekspedert for handel innenfor Fellesskapet, oppfyller kriteriene fastsatt i vedlegg I,

- b) fastsette at de produktene som et slikt midlertidig unntak gjelder for, merkes tydelig med at de må kokes eller stekes grundig før de spises,
- c) forplikte seg til at høyst en av fem prøveenheter er positiv ved prøving mot *Salmonella*-kriteriet i henhold til artikkel 4, for at resultatet skal være akseptabelt med hensyn til det midlertidige unntaket.

#### *Artikkel 9*

### **Analyse av utviklingstrekk**

Driftsansvarlige for næringsmiddelforetak skal analysere utviklingstrekk i prøvingsresultatene. Dersom de konstaterer en utvikling mot utilfredsstillende resultater, skal de øyeblikkelig treffe nødvendige tiltak for å rette opp forholdene i den hensikt å forebygge forekomsten av mikrobiologiske risikoer.

#### *Artikkel 10*

### **Gjennomgåelse**

Denne forordning skal gjennomgås på nytt idet tas hensyn til vitenskapelige, teknologiske og metodologiske framskritt, nye sykdomsframkallende mikroorganismer i næringsmidler og opplysninger som framkommer som følge av risikovurderinger. Det er særlig kriterier og vilkår for forekomst av salmonella i skrotter av storfe, sauer, geiter, hester, svin og fjørfe som skal gjennomgås på nytt i lys av konstaterte endringer i salmonellaprevalensen.

#### *Artikkel 11*

### **Oppheving**

Vedtak 93/51/EØF oppheves.

#### *Artikkel 12*

Denne forordning trer i kraft den 20. dag etter at den er kunngjort i *Den europeiske unions tidende*.

Den får anvendelse fra 1. januar 2006.

Denne forordning er bindende i alle deler og kommer direkte til anvendelse i alle medlemsstater.

Utfærdiget i Brussel, 15. november 2005.

*For Kommisjonen*

Markos KYPRIANOU



*VEDLEGG I***Mikrobiologiske kriterier for næringsmidler**

Kapittel 1.	Kriterier for næringsmiddeltrygghet .....	9
Kapittel 2.	Hygienekriterier for prosessen .....	15
2.1	Kjøtt og kjøttprodukter .....	15
2.2	Melk og melkeprodukter .....	18
2.3	Eggprodukter .....	21
2.4	Fiskerivarer .....	22
2.5	Grønnsaker, frukt og produkter av grønnsaker og frukt .....	23
Kapittel 3.	Regler for prøvetaking og klargjøring av analyseprøver .....	24
3.1.	Allmenne regler for prøvetaking og klargjøring av analyseprøver ...	24
3.2.	Bakteriologisk prøvetaking i slakterier og lokaler der det framstilles kvernet kjøtt og tilberedt kjøtt .....	24

### Kapittel 1. Kriterier for næringsmiddeltrygghet

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer/toksiner, metabolitter av disse	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansem metode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes
		n	c	m	M		
1.1. Spiseferdige næringsmidler beregnet på spedbarn og spiseferdige næringsmidler til spesielle medisinske formål <sup>(4)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 11290-1	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.2. Andre spiseferdige næringsmidler der <i>L. monocytogenes</i> kan vokse, enn spiseferdige næringsmidler beregnet på spedbarn og til spesielle medisinske formål	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 kde/g <sup>(5)</sup>		EN/ISO 11290-2 <sup>(6)</sup>	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
		5	0	Ikke påvist i 25 g <sup>(7)</sup>		EN/ISO 11290-1	Mens næringsmiddelet fortsatt er under umiddelbar kontroll hos den driftsansvarlige for næringsmiddel foretaket som har framstilt det
1.3. Andre spiseferdige næringsmidler der <i>L. monocytogenes</i> ikke kan vokse, enn spiseferdige næringsmidler beregnet på spedbarn og til spesielle medisinske formål <sup>(4)</sup> <sup>(8)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 kde/g		EN/ISO 11290-2 <sup>(6)</sup>	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.4. Kvernet kjøtt og tilberedt kjøtt som er beregnet på å spises rått	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN-ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.5. Kvernet kjøtt og tilberedt kjøtt fra fjørfe, som er beregnet på å spises kokt eller stekt	<i>Salmonella</i>	5	0	Fra 1.1.2006 Ikke påvist i 10 g Fra 1.1.2010 Ikke påvist i 25 g		EN-ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.6. Kvernet kjøtt og tilberedt kjøtt fra andre arter enn fjørfe, som er beregnet på å spises kokt eller stekt	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 10 g		EN-ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper



Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer/toksiner, metabolitter av disse	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes
		n	c	m	M		
1.7. Mekanisk utbeinet kjøtt (MSM) <sup>(9)</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 10 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.8. Kjøttprodukter som er beregnet på å spises rå, unntatt produkter der framstillingsprosessen eller produktets sammensetning fjerner salmonellarisikoen	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.9. Kjøttprodukter fra fjørfe som er beregnet på å spises kokt eller stekt	<i>Salmonella</i>	5	0	Fra 1.1.2006 Ikke påvist i 10 g Fra 1.1.2010 Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.10. Gelatin og kollagen	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.11. Ost, smør og fløte framstilt av rå melk eller melk som har gjennomgått en varmebehandling ved lavere temperatur enn ved pasteurisering <sup>(10)</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.12. Melkepulver og mysepulver	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.13. Iskrem <sup>(11)</sup> , unntatt produkter der framstillingsprosessen eller produktets sammensetning fjerner salmonellarisikoen	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.14. Eggprodukter, unntatt produkter der framstillingsprosessen eller produktets sammensetning fjerner salmonellarisikoen	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer/toksiner, metabolitter av disse	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledder kriteriet anvendes
		n	c	m	M		
1.15. Spiseferdige næringsmidler som inneholder rå egg, unntatt produkter der framstillingsprosessen eller produktets sammensetning fjerner salmonellarisikoen	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g eller ml		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.16. Kokte krepsdyr og bløtdyr	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.17. Levende muslinger og levende pigghuder, kappedyr og sjøsnegler	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.18. Spirer (spiseferdige) <sup>(12)</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.19. Ferdig skåret frukt og grønnsaker (spiseferdige)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.20. Upasteurisert frukt- og grønnsakjuice (drikkeferdig)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.21. Ost, melkepulver og mysepulver, som nevnt i kriteriene for koagulasepositive stafylokokker i kapittel 2.2 i dette vedlegg	Enterotoksiner framkalt av stafylokokker	5	0	Ikke påvist i 25 g		Europeisk screening-metode av melk fra Fellesskapets referanselaboratorium <sup>(13)</sup>	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.22. Morsmelkerstatning i pulverform og næringsmidler til spesielle medisinske formål i pulverform beregnet på spedbarn under seks måneder, som nevnt i kriteriet for enterobacteriaceae i kapittel 2.2 i dette vedlegg	<i>Salmonella</i>	30	0	Ikke påvist i 25 g		EN/ISO 6579	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer/toksiner, metabolitter av disse	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledder kriteriet anvendes
		n	c	m	M		
1.23. Morsmelkerstatning i pulverform og næringsmidler til spesielle medisinske formål i pulverform beregnet på spedbarn under seks måneder, som nevnt i kriteriet for enterobacteriaceae i kapittel 2.2 i dette vedlegg	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	Ikke påvist i 10 g		ISO/DTS 22964	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.24. Levende muslinger og levende pigghuder, kappedyr og sjøsnegler	<i>E.coli</i> <sup>(14)</sup>	1 ( <sup>15</sup> )	0	230 MPN/100 g kjøtt og kappevann		ISO TS 16649-3	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.25. Fiskerivarer fra fiskearter som forbindes med store mengder histidin <sup>(16)</sup>	Histamin	9 ( <sup>17</sup> )	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC <sup>(18)</sup>	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper
1.26. Fiskerivarer som har gjennomgått en behandling med enzymmodning i saltlake, framstilt av fiskearter som forbindes med store mengder histidin <sup>(16)</sup>	Histamin	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC <sup>(18)</sup>	Produkter som omsettes innen holdbarhetstiden utløper

<sup>(1)</sup> n = antall enheter som utgjør prøven; c = antall prøveenheter med verdier over m eller mellom m og M.

<sup>(2)</sup> For nr. 1.1-1.24 m=M.

<sup>(3)</sup> Den siste versjonen av standarden skal benyttes.

<sup>(4)</sup> Regelmessig prøving mot kriteriet er under normale omstendigheter ikke hensiktsmessig for følgende spiseferdige næringsmidler:

- de som har gjennomgått varmebehandling eller annen foredling som effektivt fjerner *L. monocytogenes*, dersom rekontaminering er umulig etter behandlingen (for eksempel produkter som er varmebehandlet i endelig emballasje),
- friske, ikke skårne og uforedlede grønnsaker og frukter, unntatt spirer,
- brød, kjeks og lignende produkter,
- vann på flaske eller i annen emballasje, leskedrikker, øl, sider, vin, brennevin og lignende produkter,

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer/toksiner, metabolitter av disse	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledder kriteriet anvendes
		n	c	m	M		
<ul style="list-style-type: none"> <li>– sukker, honning og sukkervarer, herunder kakao og sjokoladeprodukter,</li> <li>– levende muslinger.</li> </ul>							
<p><sup>(5)</sup> Dette kriteriet anvendes dersom produsenten kan godtgjøre overfor vedkommende myndighet at produktet ikke vil overskride grenseverdien på 100 kde/g i holdbarhetstiden. Den driftsansvarlige kan underveis i prosessen fastsette foreløpige grenseverdier som er tilstrekkelig lave for å kunne garantere at grenseverdien på 100 kde/g ikke vil overskrides når holdbarhetstiden utløper.</p>							
<p><sup>(6)</sup> 1 ml podestoff overføres til en petriskål med en diameter på 140 mm eller til tre petriskåler med en diameter på 90 mm.</p>							
<p><sup>(7)</sup> Dette kriteriet gjelder for produkter mens de fortsatt er under umiddelbar kontroll hos den driftsansvarlige for næringsmiddelforetaket som har framstilt dem, og dersom produsenten ikke kan godtgjøre overfor vedkommende myndighet at produktet ikke vil overskride grenseverdien på 100 kde/g i holdbarhetstiden.</p>							
<p><sup>(8)</sup> Produkter med en pH-verdi på <math>\leq 4,4</math> eller <math>a_w \leq 0,92</math>, produkter med en pH-verdi på <math>\leq 5,0</math> og <math>a_w \leq 0,94</math> og produkter med en holdbarhetstid på under fem dager, hører automatisk til denne kategorien. Andre produktkategorier kan også høre til denne kategorien, dersom det er vitenskapelig begrunnet.</p>							
<p><sup>(9)</sup> Dette kriteriet gjelder for mekanisk utbeinet kjøtt (MSM), framstilt med teknikker nevnt i avsnitt Vi kapittel III nr. 3 i vedlegg III til europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 853/2004 av 29. april 2004 om fastsettelse av særlige hygieneregler for næringsmidler av animalsk opprinnelse.</p>							
<p><sup>(10)</sup> Unntatt produkter der produsenten kan godtgjøre overfor vedkommende myndighet at det for produkter som følge av modningstid og <math>a_w</math> ikke er noen salmonellarisiko for produktet.</p>							
<p><sup>(11)</sup> Bare iskrem som inneholder melkebestanddel.</p>							
<p><sup>(12)</sup> Analyse av frøpartiet før spiringsprosessen starter eller prøvetaking i den fasen der det forventes å være størst sannsynlighet for å påvise <i>Salmonella</i>.</p>							
<p><sup>(13)</sup> Henvisning: Hennekinne et al., J. AOAC Internat. Vol. 86, No 2, 2003.</p>							
<p><sup>(14)</sup> <i>E. coli</i> blir her brukt som indikator for fekal forurensning.</p>							
<p><sup>(15)</sup> En samleprøve som omfatter minst 10 dyr.</p>							
<p><sup>(16)</sup> Særlig fiskearter av familien: <i>Scombridae</i>, <i>Clupeidae</i>, <i>Engraulidae</i>, <i>Coryfenidae</i>, <i>Pomatomidae</i>, <i>Scombrosidae</i>.</p>							
<p><sup>(17)</sup> Enkeltprøver kan tas på detaljstnivå. I et slikt tilfelle vil ikke formodningen fastsatt i artikkel 14 nr. 6 i forordning (EF) nr. 178/2002, som fastsetter at hele partiet skal anses som utrygt, få anvendelse.</p>							
<p><sup>(18)</sup> Henvisninger: 1. Malle P., Valle M., Bouquelet S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Internat. 1996, 79, 43-49. 2. Duflos G., Dervin C., Malle P., Bouquelet S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (<i>Pleuronectes platessa</i>) and whiting (<i>Merlangus merlangus</i>). J. AOAC Internat. 1999, 82, 1097-1101.</p>							



### Tolkning av analyseresultatene

De angitte grenseverdiene viser til hver prøveenhet som er undersøkt, unntatt levende muslinger og levende pigghuder, kappedyr og sjøsnegler når det gjelder undersøkelse av *E. coli*, der grenseverdiene viser til en samleprøve.

Analyseresultatene viser den mikrobiologiske kvaliteten på det partiet som er undersøkt<sup>(1)</sup>.

*L. monocytogenes* i spiseferdige næringsmidler beregnet på spedbarn og spiseferdige næringsmidler til spesielle medisinske formål:

- tilfredsstillende dersom ingen av de målte verdiene viser forekomst av bakterien,
- utilfredsstillende dersom bakterien påvises i én eller flere prøveenheter.

*L. monocytogenes* i spiseferdige næringsmidler der *L. monocytogenes* kan vokse, mens næringsmiddelet fortsatt er under umiddelbar kontroll hos den driftsansvarlige for næringsmiddelforetaket som har framstilt det, dersom den driftsansvarlige ikke kan godtgjøre at produktet ikke vil overskride grenseverdien på 100 kde/g i holdbarhetstiden:

- tilfredsstillende dersom ingen av de målte verdiene viser forekomst av bakterien,
- utilfredsstillende dersom bakterien påvises i én eller flere prøveenheter.

*L. monocytogenes* i andre spiseferdige næringsmidler og *E. coli* i levende muslinger:

- tilfredsstillende dersom de målte verdiene er  $\leq$  grenseverdien,
- utilfredsstillende dersom alle de målte verdiene er  $>$  grenseverdien,

*Salmonella* i forskjellige næringsmiddelkategorier:

- tilfredsstillende dersom ingen av de målte verdiene viser forekomst av bakterien,

---

<sup>(1)</sup> Analyseresultatene kan også benyttes til å vise hvor virkningsfull HACCP eller god hygieneprosess er for prosessen.

- tilfredsstillende dersom bakterien påvises i én eller flere prøveenheter.

Enterotoksiner framkalt av stafylokokker i melkeprodukter:

- tilfredsstillende dersom det ikke påvises enterotoksiner i noen av prøveenheterne,
- tilfredsstillende dersom det påvises enterotoksiner i én eller flere prøveenheter.

*Enterobacter sakazakii* i morsmelkerstatning i pulverform og næringsmidler til spesielle medisinske formål i pulverform beregnet på spedbarn under seks måneder:

- tilfredsstillende dersom ingen av de målte verdiene viser forekomst av bakterien,
- tilfredsstillende dersom bakterien påvises i én eller flere prøveenheter.

Histamin i fiskerivarer fra fiskearter som forbindes med store mengder histidin:

- tilfredsstillende dersom følgende krav er oppfylt:
  1. den målte gjennomsnittsverdien er  $\leq m$
  2. antall verdier mellom  $m$  og  $M$  ikke større enn  $c$
  3. ingen av de målte verdiene overstiger grenseverdien  $M$ ,
- tilfredsstillende dersom den målte gjennomsnittsverdien overstiger  $m$ , dersom antall verdier mellom  $m$  og  $M$  er større enn  $c$ , eller dersom en eller flere av de målte verdiene er  $> M$ .

## Kapittel 2. Hygienekriterier for prosessen

### 2.1. Kjøtt og kjøttprodukter

Næringsmiddel-kategori	Mikroorganismer	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes	Tiltak dersom resultatene er utilfredsstillende
		n	c	m	M			
2.1.1. Skrotter av storfe, sauer, geiter og hester <sup>(4)</sup>	Aerobe kimtall			3,5 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	5,0 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	ISO 4833	Skrotter etter slaktebehandling, men før kjøling	Forbedre slaktehygienen og gjennomgå prosesskontrollene
	Enterobacteriaceae			1,5 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	2,5 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	ISO 21528-2	Skrotter etter slaktebehandling, men før kjøling	Forbedre slaktehygienen og gjennomgå prosesskontrollene
2.1.2. Skrotter av svin <sup>(4)</sup>	Aerobe kimtall			4,0 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	5,0 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	ISO 4833	Skrotter etter slaktebehandling, men før kjøling	Forbedre slaktehygienen og gjennomgå prosesskontrollene
	Enterobacteriaceae			2,0 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	3,0 log kde/cm <sup>2</sup> daglig logaritmisk gjennomsnittsverdi	ISO 21528-2	Skrotter etter slaktebehandling, men før kjøling	Forbedre slaktehygienen og gjennomgå prosesskontrollene
2.1.3. Skrotter av storfe, sauer, geiter og hester <sup>(4)</sup>	<i>Salmonella</i>	50 <sup>(5)</sup>	2 <sup>(6)</sup>	Ingen på det området som er undersøkt på hver skrott		EN/ISO 6579	Skrotter etter slaktebehandling, men før kjøling	Forbedre slaktehygienen og gjennomgå prosesskontrollene og dyrenes opprinnelse
2.1.4. Skrotter av svin	<i>Salmonella</i>	50 <sup>(5)</sup>	5 <sup>(6)</sup>	Ingen på det området som er undersøkt på hver skrott		EN/ISO 6579	Skrotter etter slaktebehandling, men før kjøling	Forbedre slaktehygienen og gjennomgå prosesskontrollene, dyrenes opprinnelse og biosikkerhetstiltakene på opprinnelsesenheter
2.1.5. Fjørteskrotter av broilere og kalkuner	<i>Salmonella</i>	50 <sup>(5)</sup>	7 <sup>(6)</sup>	Ikke påvist i 25 g i en samleprøve av halsskinn		EN/ISO 6579	Skrotter etter kjøling	Forbedre slaktehygienen og gjennomgå prosesskontrollene, dyrenes opprinnelse og biosikkerhetstiltakene på opprinnelsesenheter
2.1.6 Kvernet kjøtt	Aerobe kimtall <sup>(7)</sup>	5	2	5x10 <sup>5</sup> kde/g	5x10 <sup>6</sup> kde/g	ISO 4833	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygienen og utvelgingen og/eller råstoffenes



								opprinnelse
	<i>E.coli</i> <sup>(8)</sup>	5	2	50 kde/g	500 kde/g	EN/ISO 16649-1 eller 2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygienen og utvelgingen og/eller råstoffenes opprinnelse
2.1.7. Mekanisk utbeinet kjøtt (MSM) <sup>(9)</sup>	Aerobe kimtall	5	2	5x10 <sup>5</sup> kde/g	5x10 <sup>6</sup> kde/g	ISO 4833	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygienen og utvelgingen og/eller råstoffenes opprinnelse
	<i>E.coli</i> <sup>(8)</sup>	5	2	50 kde/g	500 kde/g	ISO 16649-1 eller 2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygienen og utvelgingen og/eller råstoffenes opprinnelse
2.1.8. Tilberedt kjøtt	<i>E.coli</i> <sup>(8)</sup>	5	2	500 kde/g eller cm <sup>2</sup>	5000 kde/g eller cm <sup>2</sup>	ISO 16649-1 eller 2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygienen og utvelgingen og/eller råstoffenes opprinnelse

<sup>(1)</sup> n = antall enheter som utgjør prøven; c = antall prøveenheter med verdier mellom m og M.

<sup>(2)</sup> For nr. 2.1.3-2.1.5 m=M.

<sup>(3)</sup> Den siste versjonen av standarden skal benyttes.

<sup>(4)</sup> Grenseverdiene (m og M) gjelder bare for prøver som er tatt med den destruktive metoden. Den daglige logaritmiske gjennomsnittsverdien beregnes ved først å ta den logaritmiske verdien av hvert analyseresultat og deretter beregne gjennomsnittet av disse logaritmiske verdiene.

<sup>(5)</sup> De 50 prøvene stammer fra 10 fortløpende prøvetakinger i samsvar med prøvetakingsreglene og -frekvensene som er fastsatt i denne forordning.

<sup>(6)</sup> Antall prøver der det er påvist salmonella. Verdi c skal gjennomgås på nytt for å ta hensyn til de framskrittene som er gjort for å redusere salmonellaprevalensen. Medlemsstater eller regioner med lav salmonellaprevalens kan bruke lavere c-verdier også før gjennomgåelsen.

<sup>(7)</sup> Dette kriteriet gjelder ikke for kvernet kjøtt som er framstilt på detaljnivå, når produktets holdbarhetstid er under 24 timer.

<sup>(8)</sup> *E. coli* blir her brukt som indikator for fekal forurensning.

<sup>(9)</sup> Disse kriteriene gjelder for mekanisk utbeinet kjøtt (MSM), framstilt med teknikker nevnt i kapittel III nr. 3 i avsnitt V i vedlegg III til europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 853/2004 av 29. april 2004 om fastsettelse av særlige hygieneregler for næringsmidler av animalsk opprinnelse.

### Tolkning av analyseresultatene

De angitte grenseverdiene viser til hver prøveenhet som er undersøkt, unntatt ved undersøkelse av skrotter, der grenseverdiene viser til samleprøver.

Analyseresultatene viser den mikrobiologiske kvaliteten på den prosessen som er undersøkt.

Enterobacteriaceae og aerobe kimtall i skrotter av storfe, sauer, geiter, hester og svin:

- tilfredsstillende dersom den daglige logaritmiske gjennomsnittsverdien er  $< m$ ,
- akseptabel dersom den daglige logaritmiske gjennomsnittsverdien ligger mellom  $m$  og  $M$ ,
- utilfredsstillende dersom den daglige logaritmiske gjennomsnittsverdien er  $> M$ .

*Salmonella* i skrotter:

- tilfredsstillende dersom antall prøver der det påvises *Salmonella*, ikke overstiger  $c$ ,
- utilfredsstillende dersom antall prøver der det påvises *Salmonella*, er større enn  $c$ .

Etter hver prøvetaking blir resultatene fra de ti siste prøvetakingene analysert for å oppnå  $n$  antall prøver.

*E.coli* og aerobe kimtall i kvernet kjøtt, tilberedt kjøtt og mekanisk utbeinet kjøtt (MSM):

- tilfredsstillende dersom alle målte verdier er  $< m$ ,
- akseptabelt dersom antall verdier mellom  $m$  og  $M$  ikke er større enn  $c$ , og resten av de målte verdiene er  $< m$ ,
- utilfredsstillende dersom én eller flere av de målte verdiene er  $> M$ , eller dersom antall verdier mellom  $m$  og  $M$  er større enn  $c$ .

## 2.2. Melk og melkeprodukter

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes	Tiltak dersom resultatene er utilfredsstillende
		n	c	m	M			
2.2.1. Pasteurisert melk og andre pasteuriserte flytende melkeprodukter <sup>(4)</sup>	Enterobacteriaceae	5	2	<1 ml	5 ml	ISO 21528-1	Når framstillingsprosessen avsluttes	Kontrollere hvor virkningsfull varmebehandlingen og forebyggingen av rekontaminering er, samt kontrollere kvaliteten på råstoffene
2.2.2. Ost framstilt av melk eller myse som er varmebehandlet	<i>E.coli</i> <sup>(5)</sup>	5	2	100 kde/g	1000 kde/g	ISO 16649-1 eller 2	På det tidspunktet i framstillingsprosessen der antall <i>E. coli</i> antas å være høyest <sup>(6)</sup>	Forbedre produksjonshygiene og utvelgingen av råstoffer
2.2.3. Ost framstilt av rå melk	Koagulasepositive stafylokokker	5	2	10 <sup>4</sup> kde/g	10 <sup>5</sup> kde/g	EN/ISO 6888-2	På det tidspunktet i framstillingsprosessen der antall stafylokokker antas å være høyest	Forbedre produksjonshygiene og utvelgingen av råstoffer. Dersom det påvises verdier på >10 <sup>5</sup> kde/g, må ostepartiet undersøkes for enterotoksiner framkalt av stafylokokker
2.2.4. Ost framstilt av melk som har gjennomgått varmebehandling ved temperaturer som er lavere enn ved pasteurisering <sup>(7)</sup> , og modnet ost framstilt av melk eller myse som har gjennomgått pasteurisering eller kraftigere varmebehandling <sup>(7)</sup>	Koagulasepositive stafylokokker	5	2	100 kde/g	1000 kde/g	EN/ISO 6888-1 eller 2		
2.2.5. Myk ost som ikke er modnet (fersk ost), framstilt av melk eller myse som har gjennomgått pasteurisering eller kraftigere varmebehandling <sup>(7)</sup>	Koagulasepositive stafylokokker	5	2	10 kde/g	100 kde/g	EN/ISO 6888-1 eller 2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygiene. Dersom det påvises verdier på >10 <sup>5</sup> kde/g, må ostepartiet undersøkes for enterotoksiner framkalt av stafylokokker
2.2.6. Smør og fløte framstilt av rå melk eller melk som har	<i>E.coli</i> <sup>(5)</sup>	5	2	10	100	ISO 16649-1 eller	Når framstillings-	Forbedre produksjonshygiene og

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes	Tiltak dersom resultatene er utilfredsstillende
		n	c	m	M			
gjennomgått en varmebehandling ved lavere temperatur enn ved pasteurisering				kde/g	kde/g	2	prosessen avsluttes	utvelgingen av råstoffer
2.2.7. Melkepulver og mysepulver <sup>(4)</sup>	Enterobacteriaceae	5	0	10 kde/g		ISO 21528-2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Kontrollere hvor virkningsfull varmebehandlingen og forebyggingen av rekontaminering er
	Koagulasepositive stafylokokker	5	2	10 kde/g	100 kde/g	EN/ISO 6888-1 eller 2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygiene. Dersom det påvises verdier på >10 <sup>5</sup> kde/g, må ostepartiet undersøkes for enterotoksiner framkalt av stafylokokker
2.2.8. Iskrem <sup>(8)</sup> og fryste melkedesserter	Enterobacteriaceae	5	2	10 kde/g	100 kde/g	ISO 21528-2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygiene
2.2.9. Morsmelkerstatning i pulverform og næringsmidler til spesielle medisinske formål i pulverform beregnet på spedbarn under seks måneder:	Enterobacteriaceae	10	0	Ikke påvist i 10 g		ISO 21528-1	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygiene for minimere kontaminering. Dersom det påvises enterobacteriaceae i én eller flere prøveenheter, må partiet undersøkes for <i>E. sakazakii</i> og <i>Salmonella</i>

<sup>(1)</sup> n = antall enheter som utgjør prøven; c = antall prøveenheter med verdier mellom m og M.

<sup>(2)</sup> For nr. 2.2.7: m=M.

<sup>(3)</sup> Den siste versjonen av standarden skal benyttes.

<sup>(4)</sup> Kriteriet gjelder ikke for produkter beregnet på videre foredling i næringsmiddelindustrien.

<sup>(5)</sup> *E. coli* blir her brukt som indikator for hygienivå.

<sup>(6)</sup> For ost der *E. coli* ikke kan vokse, er antall *E. coli* vanligvis høyest i begynnelsen av modningsperioden, og for ost der *E. coli* kan vokse, er det vanligvis på slutten av

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier <sup>(2)</sup>		Referansemetode for analyse <sup>(3)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes	Tiltak dersom resultatene er utilfredsstillende
		n	c	m	M			

modningsperioden.

- (<sup>7</sup>) Unntatt ost dersom produsenten kan godtgjøre overfor vedkommende myndighet at produktet ikke utgjør noen risiko for enterotoksiner framkalt av stafylokokker.
- (<sup>8</sup>) Bare iskrem som inneholder melkebestanddel.

### Tolkning av analyseresultatene

De angitte grenseverdiene viser til hver prøveenheter som er undersøkt.

Analyseresultatene viser den mikrobiologiske kvaliteten på den prosessen som er undersøkt.

Enterobacteriaceae i morsmelkerstatning i pulverform og næringsmidler til spesielle medisinske formål i pulverform beregnet på spedbarn under seks måneder:

- tilfredsstillende dersom ingen av de målte verdiene viser forekomst av bakterien,
- utilfredsstillende dersom bakterien påvises i én eller flere prøveenheter.

*E.coli*, enterobacteriaceae (andre næringsmiddelkategorier) og koagulasepositive stafylokokker:

- tilfredsstillende dersom alle målte verdier er  $< m$ ,
- akseptabelt dersom antall verdier mellom  $m$  og  $M$  ikke er større enn  $c$ , og resten av de målte verdiene er  $< m$ ,
- utilfredsstillende dersom én eller flere av de målte verdiene er  $> M$ , eller dersom antall verdier mellom  $m$  og  $M$  er større enn  $c$ .

### 2.3. Eggprodukter

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier		Referansem metode for analyse <sup>(2)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes	Tiltak dersom resultatene er utilfredsstillende
		n	c	m	M			
2.3.1. Eggprodukter	Enterobacteriaceae	5	2	10 kde/g eller ml	100 kde/g eller ml	ISO 21528-2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Kontrollere hvor virkningsfull varmebehandlingen og forebyggingen av rekontaminering er

<sup>(1)</sup> n = antall enheter som utgjør prøven; c = antall prøveenheter med verdier mellom m og M.

<sup>(2)</sup> Den siste versjonen av standarden skal benyttes.

### Tolkning av analyseresultatene

De angitte grenseverdiene viser til hver prøveenheter som er undersøkt.

Analyseresultatene viser den mikrobiologiske kvaliteten på den prosessen som er undersøkt.

Enterobacteriaceae i eggprodukter:

- tilfredsstillende dersom alle målte verdier er < m,
- akseptabelt dersom antall verdier mellom m og M ikke er større enn c, og resten av de målte verdiene er < m,
- utilfredsstillende dersom én eller flere av de målte verdiene er > M, eller dersom antall verdier mellom m og M er større enn c.

## 2.4. Fiskerivarer

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier		Referansemetode for analyse <sup>(2)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes	Tiltak dersom resultatene er utilfredsstillende
		n	c	m	M			
2.4.1. Produkter uten skall fra kokte krepsdyr og bløtdyr	<i>E.coli</i>	5	2	1 kde/g	10 kde/g	ISO TS 16649-3	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygiene.
	Koagulasepositive stafylokokker	5	2	100 kde/g	1000 kde/g	EN/ISO 6888-1 eller 2	Når framstillingsprosessen avsluttes	Forbedre produksjonshygiene.

<sup>(1)</sup> n = antall enheter som utgjør prøven; c = antall prøveenheter med verdier mellom m og M.

<sup>(2)</sup> Den siste versjonen av standarden skal benyttes.

### Tolkning av analyseresultatene

De angitte grenseverdiene viser til hver prøveenheter som er undersøkt.

Analyseresultatene viser den mikrobiologiske kvaliteten på den prosessen som er undersøkt.

*E.coli* i produkter uten skall fra kokte krepsdyr og bløtdyr:

- tilfredsstillende dersom alle målte verdier er  $< m$ ,
- akseptabelt dersom antall verdier mellom m og M ikke er større enn c, og resten av de målte verdiene er  $\leq m$ ,
- utilfredsstillende dersom én eller flere av de målte verdiene er  $> M$ , eller dersom antall verdier mellom m og M er større enn c.

Koagulasepositive stafylokokker i produkter uten skall fra kokte krepsdyr og bløtdyr:



- tilfredsstillende dersom alle målte verdier er  $< m$ ,
- akseptabelt dersom antall verdier mellom  $m$  og  $M$  ikke er større enn  $c$ , og resten av de målte verdiene er  $< m$ ,
- utilfredsstillende dersom én eller flere av de målte verdiene er  $> M$ , eller dersom antall verdier mellom  $m$  og  $M$  er større enn  $c$ .

## 2.5. Grønnsaker, frukt og produkter av grønnsaker og frukt

Næringsmiddelkategori	Mikroorganismer	Prøvetakingsplan <sup>(1)</sup>		Grenseverdier		Referansem metode for analyse <sup>(1)</sup>	Ledd der kriteriet anvendes	Tiltak dersom resultatene er utilfredsstillende
		n	c	m	M			
2.5.1. Ferdig skåret frukt og grønnsaker (spiseferdige)	<i>E.coli</i>	5	2	100 kde/g	1000 kde/g	ISO 16649-1 eller 2	Framstillingsprosess	Forbedre produksjonshygiene og utvelgingen av råstoffer
2.5.2. Upasteurisert frukt- og grønnsaksjuice (drikkeferdig)	<i>E.coli</i>	5	2	100 kde/g	1000 kde/g	ISO 16649-1 eller 2	Framstillingsprosess	Forbedre produksjonshygiene og utvelgingen av råstoffer

<sup>(1)</sup> n = antall enheter som utgjør prøven; c = antall prøveenheter med verdier mellom m og M.

<sup>(2)</sup> Den siste versjonen av standarden skal benyttes.

### Tolkning av analyseresultatene

De angitte grenseverdiene viser til hver prøveenheter som er undersøkt.

Analyseresultatene viser den mikrobiologiske kvaliteten på den prosessen som er undersøkt.

*E.coli* i ferdig skåret frukt og grønnsaker (spiseferdige) og i upasteurisert frukt- og grønnsaksjuice (drikkeferdig):

- tilfredsstillende dersom alle målte verdier er  $< m$ ,
- akseptabelt dersom antall verdier mellom m og M ikke er større enn c, og resten av de målte verdiene er  $\leq m$ ,
- utilfredsstillende dersom én eller flere av de målte verdiene er  $> M$ , eller dersom antall verdier mellom m og M er større enn c.

### Kapittel 3. Regler for prøvetaking og klargjøring av analyseprøver

#### 3.1. Allmenne regler for prøvetaking og klargjøring av analyseprøver

Der det ikke finnes mer spesifikke regler for prøvetaking og klargjøring av prøver, skal relevante ISO-standarder (Den internasjonale standardiseringsorganisasjon) og retningslinjene fra Codex Alimentarius benyttes som referansemeter.

#### 3.2. Bakteriologisk prøvetaking i slakterier og lokaler der det framstilles kvernet kjøtt og tilberedt kjøtt

##### *Regler for prøvetaking av skrotter av storfe, svin, sauer, geiter og hester*

De destruktive og de ikke-destruktive prøvetakingsmetodene, utvelgingen av prøvetakingssteder og reglene for lagring og transport av prøver er beskrevet i standard ISO 17604.

Ved hver prøvetaking skal det tas prøver av fem tilfeldig utvalgte skrotter. Ved valg av prøvetakingssteder bør det tas hensyn til det enkelte anleggs slaktemetoder.

Ved prøvetaking for å analysere forekomsten av enterobacteriaceae og aerobe kimtall, skal det tas prøver fra fire steder på hver skrott. Fire vevsprøver som utgjør totalt 20 cm<sup>2</sup>, tas med den destruktive metoden. Dersom den ikke-destruktive metoden benyttes til dette, skal prøvetakingsområdet dekke minst 100 cm<sup>2</sup> (50 cm<sup>2</sup> for skrotter av små drøvtyggere) per prøvetakingssted.

Ved prøvetaking for å analysere *Salmonella* skal det benyttes en svamp med ru overflate. Prøvetakingsområdet skal dekke minst 100 cm<sup>2</sup> per utvalgt prøvetakingssted.

Når det tas prøver fra forskjellige prøvetakingssteder på skrotten, skal prøvene samles før de analyseres.

##### *Regler for prøvetaking av fjørfeskrotter*

For å analysere *Salmonella* skal det tas stikkprøver av minst 15 skrotter ved hver prøvetaking og etter kjøling. Det skal tas en prøve på ca. 10 g av halsskinnet på hver skrott. Hver gang skal det samles prøver av halsskinnet fra tre skrotter før undersøkelsen slik at det til slutt blir 5 prøver à 25 g.

##### *Retningslinjer for prøvetaking*

Nærmere retningslinjer for prøvetaking av skrotter, særlig med hensyn til prøvetakingssteder, kan innlemmes i retningslinjene for god praksis nevnt i artikkel 7 i forordning (EF) nr. 852/2004.

##### *Prøvetakingsfrekvenser for skrotter, kvernet kjøtt, tilberedt kjøtt og mekanisk utbeinet kjøtt*

Driftsansvarlige for slakterier eller virksomheter som framstiller kvernet kjøtt, tilberedt kjøtt eller mekanisk utbeinet kjøtt, skal ta prøver til mikrobiologisk analyse minst én gang per uke. Prøvetakingsdag skal endres hver uke for å sikre at alle ukedager dekkes.

Ved prøvetaking av kvernet kjøtt og tilberedt kjøtt for å analysere forekomst av *E. coli* og aerobe kimtall, og ved prøvetaking av skrotter for å analysere forekomst av enterobacteriaceae og aerobe kimtall, kan frekvensen settes ned til én gang hver fjortende dag dersom det oppnås tilfredsstillende resultater i seks sammenhengende uker.

Ved prøvetaking av kvernet kjøtt, tilberedt kjøtt og skrotter for å analysere forekomst av *Salmonella*, kan frekvensen settes ned til én gang hver fjortende dag dersom det oppnås tilfredsstillende resultater i 30 sammenhengende uker. Prøvetakingsfrekvensen for salmonella kan også settes ned dersom det finnes et nasjonalt eller regionalt program for å bekjempe salmonella, og dersom dette programmet omfatter prøving som erstatter den nevnte prøvetakingen. Prøvetakingsfrekvensen kan settes ned ytterligere dersom nasjonale eller regionale program for bekjempelse av salmonella viser at salmonellaprevalensen er lav hos dyr som er kjøpt av slakteriet.

Mindre slakterier og virksomheter som framstiller kvernet kjøtt og tilberedt kjøtt i små mengder, kan imidlertid unntas fra disse prøvetakingsfrekvensene dersom det er berettiget på grunnlag av en risikoanalyse og godkjent av vedkommende myndighet.

*VEDLEGG II*

Undersøkelsene nevnt i artikkel 3 nr. 2, skal omfatte:

- spesifikasjoner av produktets fysiske-kjemiske egenskaper, for eksempel pH,  $a_w$ , saltinnhold, konsentrasjon av konserveringsmidler og type emballasjesystem, idet det tas hensyn til vilkårene for lagring og foredling, mulighetene for forurensning og forventet holdbarhetstid, og
- opplysninger innhentet fra tilgjengelig vitenskapelig litteratur og forskningsdata om de aktuelle mikroorganismenes vekst- og overlevelsesegenskaper.

Dersom det på grunnlag av ovennevnte undersøkelser er nødvendig, skal den driftsansvarlige for næringsmiddelforetaket gjennomføre tilleggsundersøkelser som kan omfatte:

- utarbeiding av prediktive, matematiske modeller for det aktuelle næringsmiddelet, der det benyttes kritiske vekst- og overlevelsesfaktorer for de aktuelle mikroorganismene i produktet,
- prøving for å undersøke de aktuelle, korrekt podede mikroorganismenes evne til å vokse eller overleve i produktet under forskjellige, rimelig forutsigbare vilkår for lagring,
- undersøkelser for å evaluere vekst- eller overlevelsessevnen til de aktuelle mikroorganismene som måtte finnes i produktet i holdbarhetstiden under rimelig forutsigbare vilkår for distribusjon, lagring og bruk.

Ovennevnte undersøkelser skal ta hensyn til de variasjonene som nødvendigvis forekommer i forbindelse med produktet, de aktuelle mikroorganismene samt vilkårene for foredling og lagring.

## Product Specification Ferdigvarespesifikasjon

<b>Material name: Dages Pizza m/kjøttdeig, bacon og løk 900g x 6</b>		<b>Our material no.: 1902</b>
<b>Valid from: 07.09.2012</b>		
<b>Created by: Stein Arne Vadstein</b>		<b>Approved by: Knut Nåmdal</b>
<b>Date: 07.09.2012</b>		<b>07.09.2012</b>

Product definition / Materialbeskrivelse:	
<b>Product description:</b>	900 g kjølt pizza toppet med tomatsaus, revet osteblanding, kjøttdeig, bacon og løk.
<b>Production method:</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bunnene produseres kjølt på linje 5.</li> <li>2. Tomatsaus (Showerhead).</li> <li>3. Topping 1 (waterfall): revet osteblanding</li> <li>4. Topping 2 (waterfall): løk</li> <li>5. Topping 3 (waterfall): kjøttdeig</li> <li>6. Topping 4 (waterfall): bacon</li> <li>7. Kontroll og pakking i dyptrekker med modifisert atm.</li> <li>8. Kontroll og pakking i kartong</li> <li>9. Plassering på pall og inn på kjølelager.</li> </ol>
<b>Declaration:</b>	<b>Ingredienser</b> Hvetemel, vann, ost, kjøttdeig (8 %) (storfekjøtt, vann, stivelse, salt, løk, sukker, krydder og stabilisator (E450, E451)), bacon (4 %) (røkt bacon, svinekjøtt, vann, salt, dextrose, stabilisator (E450, E451), aroma, rosmarinekstrakt, antioksidant (E301) og konserveringsmiddel (E250)), tomatpuré, løk (2 %), krydder, bakehjelpemiddel (melkepulver, mysepulver, sukker, hvetemel, hvetestivelse, maisstivelse), rapsolje, gjær, gelatin (fra svin), salt.

Legislative requirements / Lovpålagte krav:		
Description	Value	Comments

Chemical characteristics / Kjemiske egenskaper:			
Parameter	Set value	Tolerance value	Comments
Water activity			
pH			
Brix			
Protein N x 6,25	11,8 g		
Carbohydrate	24,9 g		
Fat	8,2 g		
Ash (insoluble in HCL)			
Energy	927kJ (222 Kcal)		
Natrium			
Moisture			
Volatile fatty acid			
Others			

General Microbiologic requirements / Generelle mikrobiologiske myndighetskrav:
The Norwegian Food Safety Authorities' Microbiological Guidelines for Food, table

Specific Microbiologic requirements / Spesifikke mikrobiologiske krav:			
Parameter	Std. value (m)	Tolerance value (M)	Comments
E.coli	<10	100	Matilsynets retningslinjer
Salmonella sp	0	0	
B.cereus	1000	10 000	
Cl.perfringens	1000	10 000	

**Certificates at each delivery / Analysesertifikater medfølgende hver leveranse:**

Parameter	Set value (m)	Tolerance value (M)	Comments

Allergens / Allergener: (set 'x')	Present/Tilstede	Not present/Ikke tilstede
Cereals containing gluten and products thereof	X	
Crustaceans and products thereof		X
Eggs and products thereof	X*	
Fish and products thereof		X
Peanuts and product thereof		X
Soybeans and products thereof		X
Milk and products thereof (including lactose)	X	
Nuts and products thereof		X
Celery and products thereof		X
Mustard and products thereof		X
Sesame seeds and products thereof		X
Sulphur dioxide and sulphites at concentrations of more than 10 mg/kg or 10 mg/liter expressed as SO <sub>2</sub>		X
Lupine		X
Molluscs		X
	*Kan inneholde spor av egg	

<b>Packaging /Emballasje:</b>	Pakket i dyptrekker, fylt med N2 og CO2. Deretter pakket i ytterkartong. 6 pizzaer pakket i en ytterkartong. Ytterkartong må være hel og fin, og påført leselig merking.
-------------------------------	--

<b>Net weight / Nettovekt:</b>	900 g
--------------------------------	-------

<b>Transport conditions / Transportbetingelser</b>	0-4° C
--	--------

<b>Storage conditions / Lagringsbetingelser:</b>	0-4° C
--	--------

<b>Shelf life / Holdbarhet:</b>	21 dager
---------------------------------	----------

<b>Labelling / Merking:</b>	Se produktbeskrivelse i SAP
-----------------------------	-----------------------------

## 1902 Dagens Pizza m/kjøttdeig, bacon og løk 900g x 6

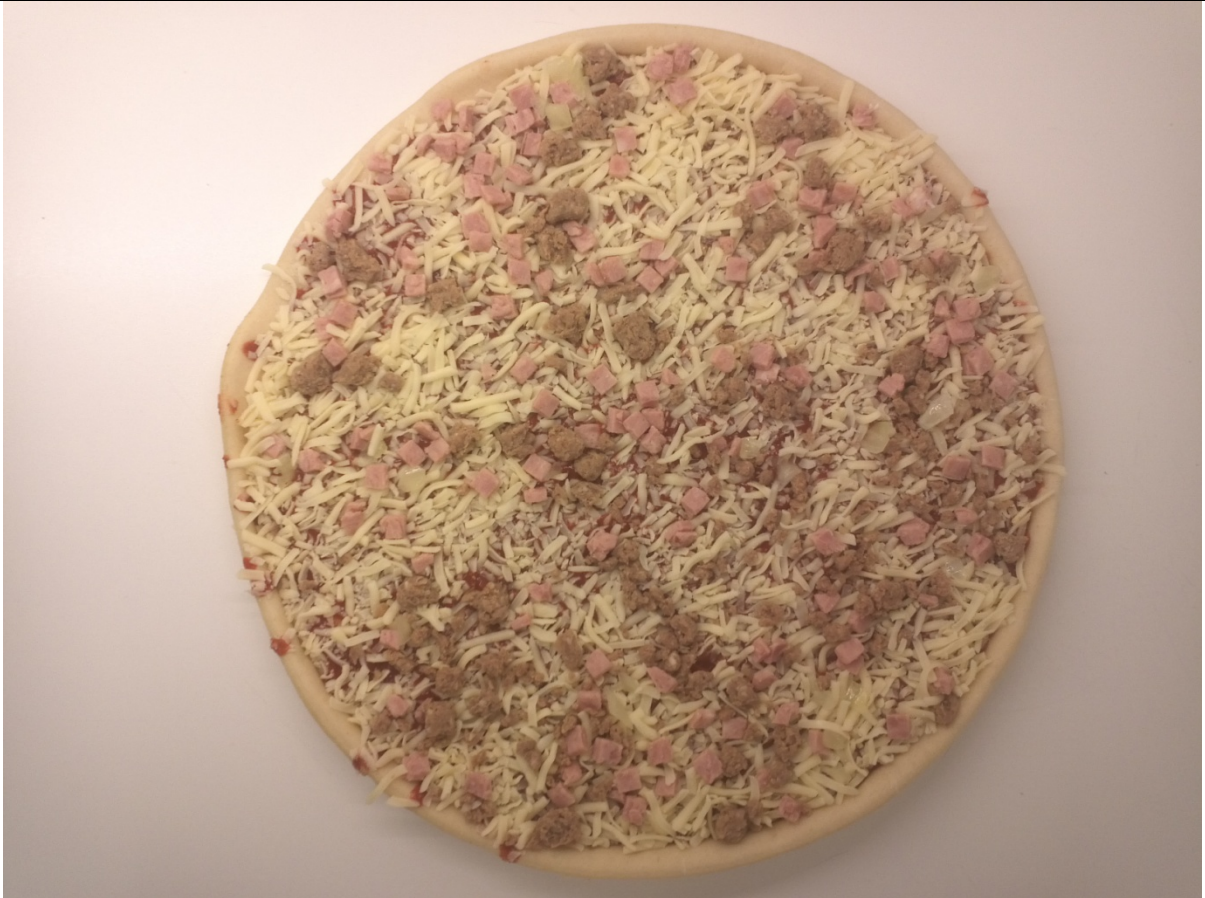
### Physical and sensorial characteristics / Fysiske og sensoriske egenskaper:

Parameter	Set value	Tolerance value	Comments/ Ikke godkjent
Colour strength /Fargestyrke	Pizzabunn: hvit/ gyllen gul. Noe mørkere på undersiden. Tomatsaus: skarp rød. Ost: hvit. Kjøttdeig m/løk: Brun. Bacon: lys rosa. Løk: hvit.	Pizzabunn: Se s. 4	Pizzabunn: Se s. 4
Taste / Smak	Saus: Tomat, pepper, oregano, salt Ost: mild, men fyldig ostesmak. Kjøttdeig m/løk: Kjøttsmak med løk. Bacon: Mild smak av bacon. Løk: Karakteristisk smak av løk.		
Aroma / Lukt	Nybakt bunn, kjøttdeig, løk og stekt bacon.		
Appearance / Utseende	Alle ingrediensene skal være jevnt fordelt på pizzaen Rekkefølge topping: Bunn, tomatsaus, osteblanding, kjøttdeig m/løk, bacon, løk		
Consistency / Konsistens	Luftig, saftig og lett bunn. Liten tyggemotstand. Kjøttdeig med smak av løk. Mørt bacon.		
Foreign bodies/ Fremmedlegem	Ingen		
Bunn	Bunnen skal: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Være rund uten synlig hakk</li> <li>• Luftig med jevn porestruktur</li> <li>• Jevn tykkelse</li> <li>• Tydelig gripekant rundt minimum 30 % av bunnen</li> </ul>	• Se s. 4	• Se s. 4
Saus	• Heldekkende utenom gripekanten	• Se s. 4	• Se s. 4
Topping	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tomatsaus</li> <li>• Revet osteblanding</li> <li>• Carbonarakjøtt og løk, begge ternet og 10x10 mm</li> <li>• Kjøttdeig med løk, kvernet 13 mm</li> </ul>		• Se s. 4



## 1902 Dagens Pizza m/kjøttdeig, bacon og løk 900g x 6

### Physical and sensorial characteristics / Fysiske og sensoriske egenskaper:

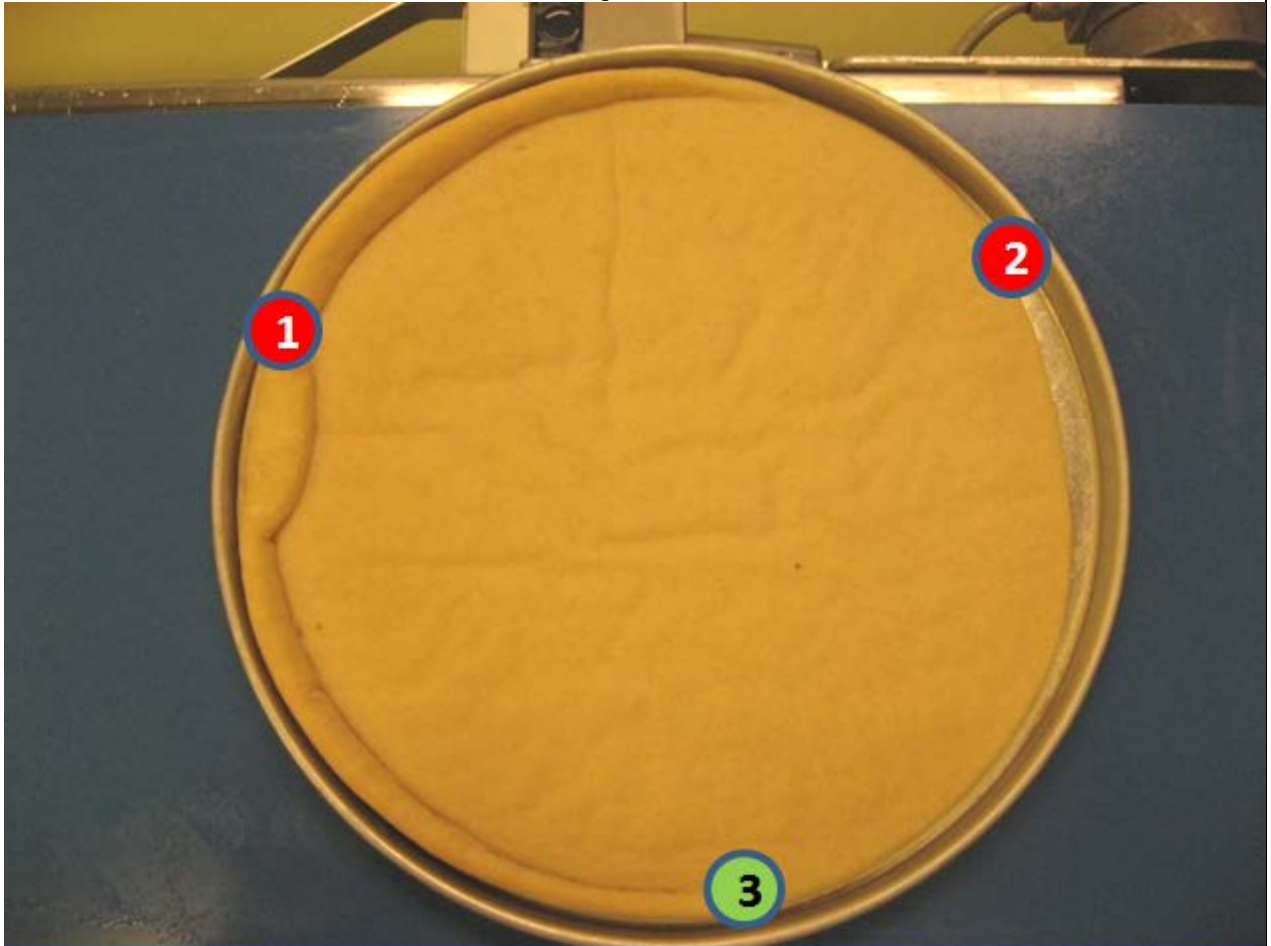


Parameter	Set value	Tolerance value	Comments/ Ikke godkjent
42224 Pizzabunn Dagens, 38 cm	410g	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H, senter: 15 mm +/- 3mm</li> <li>• H, kant: 22 mm +/- 3mm</li> <li>• D: 375 mm +/- 5 mm</li> <li>• V: 410g +20/-10 g</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gripekant på over 75 % av bunnen</li> <li>• Gripekant som henger over pannekanten.</li> <li>• Tilgrising av olje</li> <li>• Brente flekker</li> <li>• Oversteking</li> <li>• Brune/sorte flekker</li> <li>• Hull/ujevn tykkelse</li> <li>• Rester av gammel deig i bunnen</li> </ul>
43006 Pizzasaus Fersk	170g	Små dråper av sausdrypp på gripekant	B: Større flater uten saus B: Usentrert sauspåføring
40700 Revet osteblanding	190g		B: Klumper med ost B: Store synlige områder uten ost B: Store mengder tomatsausfarget ost
69309 Carbonarakjøtt, ternet	40g		B: Klumper med bacon B: For mye/lite bacon
69253 Kjøttdeig, m/løk	70g		B: Klumper med kjøttdeig B: For mye/lite kjøttdeig
18282 Løk, ternet	20g		B: For mye/ lite løk B: Klumper løk
54300 Underfilm Fersk Pizza			
54304 Overbane Oransje			
54003 Kasse fersk pizza			
<b>Vekt</b>	<b>900g</b>	<b>Dekl: 900g</b>	<b>TU1: 875g TU2: 860g</b>

## 1902 Dagens Pizza m/kjøttdeig, bacon og løk 900g x 6

Physical and sensorial characteristics / Fysiske og sensoriske egenskaper:

Underkjent bunn:



- 1) For høy gripekant, falt ned. 2) Dekker ikke pannen.  
3) 50 % forhøyet gripekant OK.

## Listeria

Metode: VIDAS

Substrater:

Half-Faser broth

Fraser broth

Strips til vidasinstrument

Utstyr:

Stomacher

Inkubator 30°C

Inkubator 37°C

Mini Vidas med brukermanual

Arbeidsbeskrivelse:

Dag 1, Vei ut 25g prøve, og fortynn med 225ml Half-Fraser broth. Homogeniser i stomacher. Ta vare på resten av prøven, i tilfelle positivt resultat.



Inkuber ved 30°C i 24-26 timer.



Dag 2, Overfør 0,1 ml til Fraser broth.



Inkuber Fraser broth 24-26 timer ved 37°C



Dag 3. Prøvene kjøres på Vidas. For beskrivelse av fremgangsmåte Mini-Vidas, se brukermanual.



Prøver med positivt resultat, tas det kvantitative analyser av.



Resultater, med utskrift fra Vidas, lagres i Listeriaperm og føres inn i reelt regneark.

## Kvantitativ Listeria

Metode: ISO 16140

Substrater:

One broth-Listeria

Brilliance Listeria agar plate

Utstyr:

Stomacher

Inkubator 37 °C

L-spatel

Arbeidsbeskrivelse:

Vei inn 25g prøve, og fortynn med 225ml one broth-Listeria.  
Homogeniser i stomacher.



Inkuber ved 20 °C i 1 time.



Overfør 1ml til ferdigstøpte Brilliance Listeria plater. Bruk  
L-Spatel til å fordele prøven utover.



Inkuber ved 37 °C i 45-51 timer.



Blå kolonier med synlig sone telles. Se vedlegg i  
metodeperm.

# QIAprep<sup>®</sup> Miniprep Handbook

For purification of molecular biology grade DNA

Plasmid

Large plasmids (>10 kb)

Low-copy plasmids and cosmids

Plasmid DNA prepared by other methods



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN is the leading provider of innovative sample and assay technologies, enabling the isolation and detection of contents of any biological sample. Our advanced, high-quality products and services ensure success from sample to result.

### **QIAGEN sets standards in:**

- Purification of DNA, RNA, and proteins
- Nucleic acid and protein assays
- microRNA research and RNAi
- Automation of sample and assay technologies

Our mission is to enable you to achieve outstanding success and breakthroughs. For more information, visit [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Contents

<b>Kit Contents</b>	<b>4</b>
<b>Storage</b>	<b>5</b>
<b>Intended Use</b>	<b>5</b>
<b>Safety Information</b>	<b>5</b>
<b>Quality Control</b>	<b>6</b>
<b>Introduction</b>	<b>7</b>
Principle	8
Using LyseBlue reagent	11
<b>Important Notes</b>	<b>12</b>
Guidelines for QIAvac manifolds	15
<b>Protocols</b>	
■ <b>Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit</b>	
and a microcentrifuge	19
and 5 ml collection tubes	20
and a vacuum manifold	21
■ <b>Plasmid DNA Purification using the QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit</b>	<b>23</b>
<b>Troubleshooting Guide</b>	<b>26</b>
<b>Appendix A: Background Information</b>	<b>29</b>
Growth of bacterial cultures	29
Preparation of cell lysates	32
<b>Appendix B: Agarose Gel Analysis of Plasmid DNA</b>	<b>33</b>
<b>Appendix C: Special Applications</b>	<b>34</b>
Purification of low-copy plasmids and cosmids	34
Purification of plasmid DNA prepared by other methods	34
<b>References</b>	<b>35</b>
<b>Ordering Information</b>	<b>36</b>

## Kit Contents

<b>QIAprep Spin Miniprep Kit</b>	<b>(50)</b>	<b>(250)</b>
<b>Catalog no.</b>	<b>27104</b>	<b>27106</b>
QIAprep Spin Columns	50	250
Buffer P1	20 ml	1 x 20 ml, 1 x 50 ml
Buffer P2	20 ml	1 x 20 ml, 1 x 50 ml
Buffer N3*	30 ml	140 ml
Buffer PB*	30 ml	150 ml
Buffer PE (concentrate)	2 x 6 ml	55 ml
Buffer EB	15 ml	55 ml
LyseBlue®	20 µl	1 x 20 µl, 1 x 50 µl
RNase A†	2 mg	1 x 2 mg, 1 x 5 mg
Collection Tubes (2 ml)	50	250
Quick-Start Protocol	1	1

<b>QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit</b>	<b>(4)</b>	<b>(24)</b>
<b>Catalog no.</b>	<b>27191</b>	<b>27193</b>
TurboFilter® 96 Plates	4	24
QIAprep 96 Plates	4	24
Buffer P1	125 ml	1 x 150 ml, 3 x 250 ml
Buffer P2	125 ml	1 x 150 ml, 3 x 250 ml
Buffer N3*	2 x 80 ml	3 x 30 ml, 2 x 500 ml
Buffer PB*	500 ml	6 x 500 ml
Buffer PE (concentrate)	2 x 100 ml	6 x 200 ml
Buffer EB	2 x 55 ml	1 x 55 ml, 2 x 250 ml
RNase A†	1 x 125 µl	1 x 15 mg, 3 x 25 mg
Tape Pads	1	6
Rack of Collection Microtubes (1.2 ml)	4	24
Caps for Collection Microtubes	55 x 8	6 x 55 x 8
Flat-Bottom Blocks and Lids	4	24
Quick-Start Protocol	1	1

\* Buffers N3 and PB contain chaotropic salts which are irritants and not compatible with disinfecting agents containing bleach. Take appropriate laboratory safety measures and wear gloves when handling. See page 5 for safety information.

† Provided as a 100 mg/ml solution.



## Storage

QIAprep Miniprep Kits should be stored dry at room temperature (15–25°C). Kits can be stored for up to 12 months without showing any reduction in performance and quality. For longer storage these kits can be kept at 2–8°C. If any precipitate forms in the buffers after storage at 2–8°C it should be redissolved by warming the buffers to 37°C before use.

After addition of RNase A and optional LyseBlue reagent, Buffer P1 is stable for 6 months when stored at 2–8°C. RNase A stock solution can be stored for two years at room temperature.

## Intended Use

QIAprep Miniprep Kits are intended for molecular biology applications. These products are not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

All due care and attention should be exercised in the handling of the products. We recommend all users of QIAGEN® products to adhere to the NIH guidelines that have been developed for recombinant DNA experiments, or to other applicable guidelines.

## Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs). These are available online in convenient and compact PDF format at [www.qiagen.com/ts/msds.asp](http://www.qiagen.com/ts/msds.asp) where you can find, view, and print the MSDS for each QIAGEN kit and kit component.

**CAUTION: DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.**

Buffers N3 and PB contain guanidine hydrochloride, which can form highly reactive compounds when combined with bleach.

If liquid containing these buffers is spilt, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilt liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite.

### 24-hour emergency information

Emergency medical information in English, French, and German can be obtained 24 hours a day from:

Poison Information Center Mainz, Germany

Tel: +49-6131-19240

## Quality Control

In accordance with QIAGEN's ISO-certified Total Quality Management System, each lot of the QIAprep Miniprep Kit is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

## Introduction

The QIAprep Miniprep system provides a fast, simple, and cost-effective plasmid miniprep method for routine molecular biology laboratory applications. QIAprep Miniprep Kits use silica membrane technology to eliminate the cumbersome steps associated with loose resins or slurries. Plasmid DNA purified with QIAprep Miniprep Kits is immediately ready for use. Phenol extraction and ethanol precipitation are not required, and high-quality plasmid DNA is eluted in a small volume of Tris buffer or water. The QIAprep system consists of 2 products with different handling options to suit every throughput need.

### Low throughput

The **QIAprep Spin Miniprep Kit** is designed for quick and convenient processing of 1–24 samples simultaneously in less than 30 minutes. QIAprep spin columns can be used in a microcentrifuge or on any vacuum manifold with luer connectors (e.g., QIAvac 24 Plus).

The **QIAprep Spin Miniprep Kit** can be fully automated on the **QIAcube®**. The innovative QIAcube uses advanced technology to process QIAGEN spin columns, enabling seamless integration of automated, low-throughput sample prep into your laboratory workflow. Sample preparation using the QIAcube follows the same steps as the manual procedure (i.e., lyse, bind, wash, and elute) enabling you to continue using the QIAprep Spin Miniprep Kit for purification of high-quality plasmid DNA.

The QIAcube is preinstalled with protocols for purification of plasmid DNA, genomic DNA, RNA, viral nucleic acids, and proteins, plus DNA and RNA cleanup. The range of protocols available is continually expanding, and additional QIAGEN protocols can be downloaded free of charge at [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

## High throughput

The **QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit** enables up to 96 minipreps to be performed simultaneously in less than 45 minutes on the QIAvac 96. For automated high-throughput plasmid purification the **QIAprep 96 Turbo BioRobot® Kit** enables up to 96 minipreps to be processed in 70 minutes.

## Applications using QIAprep purified DNA

Plasmid DNA prepared using the QIAprep system is suitable for a variety of routine applications including:

- Restriction enzyme digestion
- Library screening
- In vitro translation
- Sequencing
- Ligation and transformation
- Transfection of robust cells

## Principle

The QIAprep miniprep procedure is based on alkaline lysis of bacterial cells followed by adsorption of DNA onto silica in the presence of high salt (1). The unique silica membrane used in QIAprep Miniprep Kits completely replaces glass or silica slurries for plasmid minipreps.

The procedure consists of three basic steps:

- Preparation and clearing of a bacterial lysate
- Adsorption of DNA onto the QIAprep membrane
- Washing and elution of plasmid DNA

All steps are performed without the use of phenol, chloroform, CsCl, ethidium bromide, and without alcohol precipitation.

## Preparation and clearing of bacterial lysate

The QIAprep miniprep procedure uses the modified alkaline lysis method of Birnboim and Doly (2). Bacteria are lysed under alkaline conditions, and the lysate is subsequently neutralized and adjusted to high-salt binding conditions in one step. After lysate clearing, the sample is ready for purification on the QIAprep silica membrane. For more details on growth of bacterial cultures and alkaline lysis, please refer to Appendix A starting on page 29. In the QIAprep Spin procedure, lysates are cleared by centrifugation, while the QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit provides TurboFilter strips or plates for lysate clearing by filtration.

## LyseBlue reagent\*

Use of LyseBlue is optional and is not required to successfully perform plasmid preparations. See “Using LyseBlue reagent” on page 11 for more information.

LyseBlue is a color indicator that provides visual identification of optimum buffer mixing. This prevents common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, genomic DNA, and cell debris. This makes LyseBlue ideal for use by researchers who have not had much experience with plasmid preparations, as well as experienced scientists who want to be assured of maximum product yield.

## DNA adsorption to the QIAprep membrane

QIAprep columns, strips, and plates use a silica membrane for selective adsorption of plasmid DNA in high-salt buffer and elution in low-salt buffer. The optimized buffers in the lysis procedure, combined with the unique silica membrane, ensure that only DNA will be adsorbed, while RNA, cellular proteins, and metabolites are not retained on the membrane but are found in the flow-through.

## Washing and elution of plasmid DNA

Endonucleases are efficiently removed by a brief wash step with Buffer PB. This step is essential when working with *endA*<sup>+</sup> strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, to ensure that plasmid DNA is not degraded. The Buffer PB wash step is also necessary when purifying low-copy plasmids, where large culture volumes are used.

Salts are efficiently removed by a brief wash step with Buffer PE. High-quality plasmid DNA is then eluted from the QIAprep column with 50–100 µl of Buffer EB or water. The purified DNA is ready for immediate use in a range of applications — no need to precipitate, concentrate, or desalt.

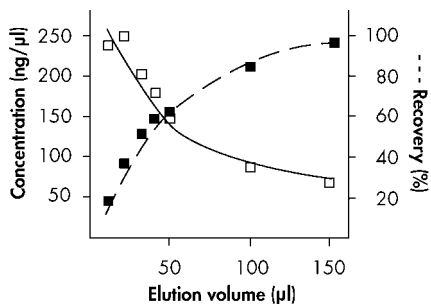
**Note:** Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water for elution, make sure that the pH value is within this range. Store DNA at –20°C when eluted with water since DNA may degrade in the absence of a buffering agent.

## DNA yield

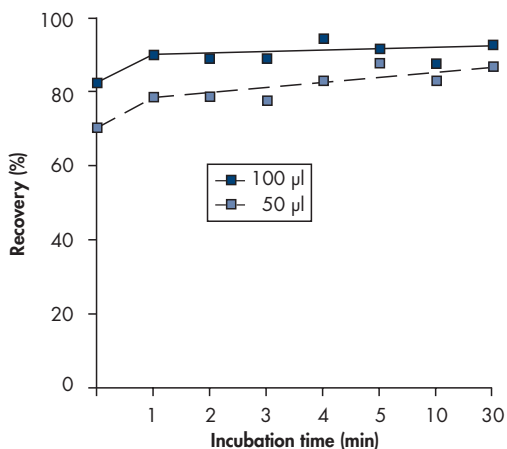
Plasmid yield with the QIAprep miniprep system varies depending on plasmid copy number per cell (see page 29), the individual insert in a plasmid, factors that affect growth of the bacterial culture (see page 29), the elution volume (Figure 1), and the elution incubation time (Figure 2). A 1.5 ml overnight culture can yield from 5 to

\* LyseBlue reagent is only supplied with the QIAprep Spin Miniprep Kit since multiwell or automated formats do not allow visual control of individual samples.

15  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA (Table 1, page 11). To obtain the optimum combination of DNA quality, yield, and concentration, we recommend using Luria Bertani (LB) medium for growth of cultures (for composition see page 31), eluting plasmid DNA in a volume of 50  $\mu\text{l}$ , and performing a short incubation after addition of the elution buffer.



**Figure 1. Elution volume versus DNA concentration and recovery.** Using the QIAprep Spin protocol, 10  $\mu\text{g}$  pUC18 DNA was purified and eluted with the indicated volumes of Buffer EB. The standard protocol uses 50  $\mu\text{l}$  Buffer EB for elution, since this combines high yield with high concentration. However the yield can be increased by increasing the elution volume.



**Figure 2. Incubation time versus DNA recovery.** Using the QIAprep Spin Miniprep protocol, 10  $\mu\text{g}$  pBluescript DNA was purified and eluted after the indicated incubation times with either 50  $\mu\text{l}$  or 100  $\mu\text{l}$  Buffer EB. The graph shows that an incubation time of 1 minute and doubling the elution buffer volume increases yield.

**Table 1. Effect of different compositions of growth medium LB on DNA yield**

Culture media	Yield
LB (containing 10 g/liter NaCl)	11.5 µg
LB (containing 5 g/liter NaCl)	9.5 µg

QIAprep Spin Miniprep Kit was used to purify DNA from 1.5 ml LB overnight cultures of XL1-Blue containing pBluescript<sup>®</sup>. Elution was performed according to the standard protocol (50 µl Buffer EB and 1 min incubation). Use of the recommended LB composition (with 10 g/liter NaCl, also see Appendix A, p. 43) provides optimal plasmid yield.

## Using LyseBlue reagent

Using a simple visual identification system, LyseBlue reagent prevents common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, cell debris, and genomic DNA.

LyseBlue can be added to the resuspension buffer (Buffer P1) bottle before use. Alternatively, smaller amounts of LyseBlue can be added to aliquots of Buffer P1, enabling single plasmid preparations incorporating visual lysis control to be performed.

LyseBlue reagent should be added to Buffer P1 at a ratio of 1:1000 to achieve the required working concentration (e.g., 10 µl LyseBlue into 10 ml Buffer P1). Make sufficient LyseBlue/Buffer P1 working solution for the number of plasmid preps being performed.

LyseBlue precipitates after addition into Buffer P1. This precipitate will completely dissolve after addition of Buffer P2. Shake Buffer P1 before use to resuspend LyseBlue particles.

The plasmid preparation procedure is performed as usual. After addition of Buffer P2 to Buffer P1, the color of the suspension changes to blue. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized regions of colorless solution or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

Upon addition of neutralization buffer (Buffer N3), LyseBlue turns colorless. The presence of a homogeneous solution with no traces of blue indicates that SDS from the lysis buffer has been effectively precipitated.

## Important Notes

Please read the following notes before starting any of the QIAprep procedures.

### Growth of bacterial cultures in tubes or flasks

1. **Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a culture of 1–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for 12–16 h at 37°C with vigorous shaking.**

Growth for more than 16 h is not recommended since cells begin to lyse and plasmid yields may be reduced. Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.

2. **Harvest the bacterial cells by centrifugation at > 8000 rpm (6800 x g) in a conventional, table-top microcentrifuge for 3 min at room temperature (15–25°C).**

The bacterial cells can also be harvested in 15 ml centrifuge tubes at 5400 x g for 10 min at 4°C. Remove all traces of supernatant by inverting the open centrifuge tube until all medium has been drained.

### Cell Cultivation in a 96-Well Block for QIAprep Turbo 96

1. **Fill each well of a 96-well flat-bottom block with 1.3 ml of growth medium containing the appropriate selective agent. Inoculate each well from a single bacterial colony. Incubate the cultures for 20–24 h at 37°C with vigorous shaking.**

The wells in the block may be protected against spill-over by covering the block with a plastic lid or adhesive tape. AirPore microporous tape sheets promote gas exchange during culturing (see ordering information, page 37). If non-porous tape is used, pierce 2–3 holes in the tape with a needle above each well for aeration.

2. **Harvest the bacterial cells in the block by centrifugation for 5 min at 2100 x g in a centrifuge with a rotor for microtiter plates (e.g., QIAGEN Centrifuge 4K15C, or Heraeus® Minifuge GL), preferably at 4–10°C. The block should be covered with adhesive tape during centrifugation. Remove media by inverting the block.**

To remove the media, peel off the tape and quickly invert the block over a waste container. Tap the inverted block firmly on a paper towel to remove any remaining droplets of medium.

**WARNING:** Ensure that the buckets on the rotor have sufficient clearance to accommodate the 2 ml flat-bottom blocks before starting the centrifuge.



## Buffer notes

- Add the provided RNase A solution to Buffer P1 before use. Use 1 vial RNase A (centrifuge briefly before use) per bottle Buffer P1 for a final concentration of 100 µg/ml. Mix and store at 2–8°C.
- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- Check Buffers P2 and N3 before use for salt precipitation. Redissolve any precipitate by warming to 37°C. Do not shake Buffer P2 vigorously.
- Close the bottle containing Buffer P2 immediately after use to avoid acidification of Buffer P2 from CO<sub>2</sub> in the air.
- Buffers P2, N3, and PB contain irritants. Wear gloves when handling these buffers.
- **Optional:** Add the provided LyseBlue reagent to Buffer P1 and mix before use. Use 1 vial LyseBlue reagent per bottle Buffer P1 for a final dilution of 1:1000 (e.g., 10 µl LyseBlue into 10 ml Buffer P1). LyseBlue provides visual identification of optimum buffer mixing, thereby preventing the common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, genomic DNA, and cell debris. For more details see “Using LyseBlue reagent” on page 11.

## Centrifugation notes

- All centrifugation steps are carried out at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a conventional, table-top microcentrifuge.

## Vacuum notes

- Switch off vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during manipulations.
- Wear safety glasses when working near a manifold under pressure.
- For safety reasons, do not use 96-well plates that have been damaged in any way.
- For the QIAprep 96 Turbo miniprep procedure, the negative pressure (vacuum) should be regulated before beginning the procedure by applying the vacuum to the appropriate number of **empty** QIAprep modules (indicated in Table 2) on the QIAvac manifold.

The vacuum pressure is the pressure differential between the inside of the manifold and the atmosphere (standard atmospheric pressure: 1013 millibar or 760 mm Hg) and can be measured using a vacuum regulator (see ordering information, page 37). Vacuum recommendations are given in negative units (Table 2) to indicate the required reduction in pressure with respect to the atmosphere. Table 3 provides pressure conversions to other units.

- Use of a vacuum pressure lower than recommended may reduce DNA yield and purity.

**Table 2. Regulation of vacuum pressures for QIAprep multiwell procedures**

Procedure	Vacuum manifold	Module used for checking pressure*	Vacuum pressure <sup>†</sup>	
			mbar	mm Hg
QIAprep 96 Turbo	QIAvac 96	QIAprep 96 plate	-40 to -200	-30 to -150

\* Pressure should be regulated using empty modules on the manifold.

<sup>†</sup> Values apply to empty modules on QIAvac. During the working procedure the vacuum may exceed the values indicated.

**Table 3. Pressure conversions**

To convert from millibars (mbar) to	Multiply by:
Millimeters of mercury (mm Hg)	0.75
Kilopascals (kPa)	0.1
Inches of mercury (inch Hg)	0.0295
Torr (Torr)	0.75
Atmospheres (atm)	0.000987
Pounds per square inch (psi)	0.0145

**Elution notes**

- Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the center of the QIAprep membrane for optimal elution of DNA. Average eluate volume is 48  $\mu$ l from an elution buffer volume of 50  $\mu$ l (QIAprep spin procedures), and 60  $\mu$ l from an elution buffer volume of 100  $\mu$ l (QIAprep multiwell procedures).
- For increased DNA yield, use a higher elution-buffer volume. For increased DNA concentration, use a lower elution-buffer volume (see “DNA yield”, page 9).
- If water is used for elution, make sure that its pH is between 7.0 and 8.5. Elution efficiency is dependent on pH and the maximum elution efficiency is achieved within this range. A pH <7.0 can decrease yield.  
**Note:** Store DNA at -20°C when eluted with water, as DNA may degrade in the absence of a buffering agent.
- DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

## Multichannel pipet recommendations

Many steps of the QIAprep 96 Turbo procedure require repeated pipetting, and a reservoir or multichannel pipet can greatly facilitate liquid handling. The Matrix Impact cordless multichannel pipet can be purchased with an optional expandable tip-spacing system for direct liquid transfer from tubes to microtiter plates.

These can be purchased from Matrix Technologies Corporation:

[www.matrixtechcorp.com](http://www.matrixtechcorp.com).

## Pipet tip recommendations

Some standard 1 ml pipet tips are not easily accommodated in the flat-bottom blocks that are used in the QIAprep 96 Turbo Miniprep protocol. When pipetting into flat-bottom blocks, we recommend using pipet tips with 1.25 ml or 1.5 ml fill volume, such as:

- Matrix pipet tips (cat. no. 8051) for use with the Matrix pipet mentioned above. These can be purchased from the supplier listed above.
- FinnTip® Multistep® pipet tips for use with single-channel pipets. These are available from Thermo Electron Corporation: [www.thermo.com](http://www.thermo.com).

## Guidelines for QIAvac manifolds

QIAvac 24 Plus and QIAvac 96 facilitate DNA minipreps by providing a convenient modular vacuum manifold for use with the QIAprep system. The following recommendations should be followed when handling QIAvac manifolds.

- QIAvac manifolds operate with a house vacuum or Vacuum Pump (e.g., Vacuum Pump, cat. no. 84010 [USA and Canada], 84000 [Japan], or 84020 [rest of world]).
- Always store QIAvac manifolds clean and dry. To clean, simply rinse all components with water and dry with paper towels. Do not air dry, as the screws may rust and need to be replaced. Do not use abrasives or solvents.
- Always place the QIAvac manifold on a secure bench top or work area. If dropped, the manifold may crack.
- The components of QIAvac manifolds are not resistant to ethanol, methanol, or other organic solvents (Table 4). Do not bring solvents into contact with the vacuum manifold. If solvents are spilled on the unit, rinse thoroughly with distilled water. Ensure that no residual Buffer PE remains in the vacuum manifold.

- To ensure consistent performance, do not apply silicone or vacuum grease to any part of a QIAvac manifold. The spring lock on the top plate and the self-sealing gasket (QIAvac 96) provide an airtight seal when vacuum is applied to the assembled unit. To maximize gasket lifetime, rinse the gasket free of salts and buffers after each use and dry with paper towels before storage.

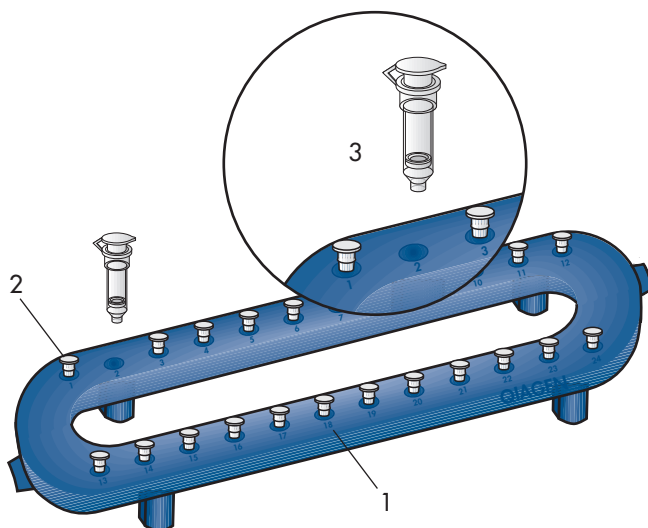
**Table 4. Chemical-resistance properties of QIAvac manifolds**

Resistant to:	Not resistant to:	
Chlorine bleach (12%)	Acetic acid*	Benzene
Hydrochloric acid	Acetone	Chloroform
Sodium chloride	Chromic acid*	Ethers
Sodium hydroxide	Phenol	Toluene
Urea	Concentrated alcohols*	

\* QIAvac 24 Plus is resistant to these chemicals.

## QIAvac vacuum manifolds

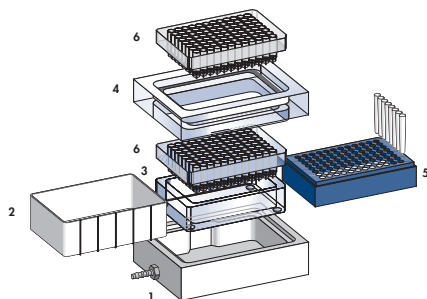
### QIAvac 24 Plus Manifold



**Figure 3. Components of the QIAvac 24 Plus manifold.**

1. QIAvac 24 Plus vacuum manifold
2. Luer slot closed with luer plug
3. Spin column

## QIAvac 96 Manifold

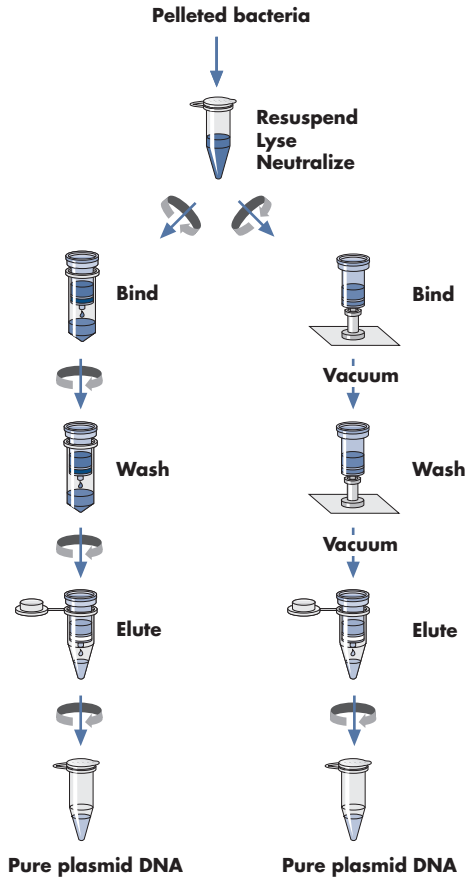


**Figure 4. Components of the QIAvac 96 manifold.**

1. QIAvac base, which holds a waste tray, a plate holder, or a microtube rack
2. Waste tray
3. Plate holder (shown with 96-well plate)
4. QIAvac 96 top plate with aperture for 96-well plate
5. Microtube rack
6. 96-well plate\*

\* Not included with QIAvac 96. Included in QIAprep 96 Turbo Miniprep Kits.

# QIAprep Spin Procedure in microcentrifuges on vacuum manifolds



# Protocol: Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge

This protocol is designed for purification of up to 20 µg of high-copy plasmid DNA from 1–5 ml overnight cultures of *E. coli* in LB medium. For purification of low-copy plasmids and cosmids, large plasmids (>10 kb), and DNA prepared using other methods, refer to the recommendations on page 34.

**Please read “Important Notes” on pages 12–18 before starting.**

**Note: All protocol steps should be carried out at room temperature (15–25°C).**

## Procedure

### 1. Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to a microcentrifuge tube.

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet.

If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle to ensure LyseBlue particles are completely dissolved. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

### 2. Add 250 µl Buffer P2 and mix thoroughly by inverting the tube 4–6 times.

Mix gently by inverting the tube. Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min.

If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

### 3. Add 350 µl Buffer N3 and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4–6 times.

To avoid localized precipitation, mix the solution thoroughly, immediately after addition of Buffer N3. Large culture volumes (e.g. ≥ 5 ml) may require inverting up to 10 times. The solution should become cloudy.

If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

### 4. Centrifuge for 10 min at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a table-top microcentrifuge.

A compact white pellet will form.

5. Apply the supernatants from step 4 to the QIAprep spin column by decanting or pipetting.
6. Centrifuge for 30–60 s. Discard the flow-through.
7. Recommended: Wash the QIAprep spin column by adding 0.5 ml Buffer PB and centrifuging for 30–60 s. Discard the flow-through.

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using *endA*<sup>+</sup> strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5<sup>α</sup> do not require this additional wash step.

8. Wash QIAprep spin column by adding 0.75 ml Buffer PE and centrifuging for 30–60 s.
9. Discard the flow-through, and centrifuge at full speed for an additional 1 min to remove residual wash buffer.

**Important:** Residual wash buffer will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic reactions.

10. Place the QIAprep column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 50  $\mu$ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of each QIAprep spin column, let stand for 1 min, and centrifuge for 1 min.

## Protocol: Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and 5 ml Collection Tubes

The QIAprep Spin Miniprep procedure can be performed using 5 ml centrifuge tubes (e.g., Greiner, cat. no. 115101 or 115261) as collection tubes to decrease handling. The standard protocol on pages 19–20 should be followed with the following modifications:

- Step 4:** Place a QIAprep spin column in a 5 ml centrifuge tube instead of a 2 ml collection tube.
- Step 6:** Centrifuge at 3000  $\times$  *g* for 1 min using a suitable rotor (e.g., Beckman<sup>®</sup> GS-6KR centrifuge at ~4000 rpm). (The flow-through does not need to be discarded.)
- Steps 7 and 8:** For washing steps, centrifugation should be performed at 3000  $\times$  *g* for 1 min. (The flow-through does not need to be discarded.)
- Step 9:** Transfer the QIAprep spin column to a microcentrifuge tube. Centrifuge at maximum speed for 1 min. Continue with step 10 of the protocol.



## Protocol: Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Vacuum Manifold

This protocol is designed for purification of up to 20 µg high-copy plasmid DNA from 1–5 ml overnight cultures of *E. coli* grown in LB medium, using QIAprep spin columns on QIAvac 24 Plus or other vacuum manifolds with luer connectors. For purification of low-copy plasmids and cosmids, large plasmids (>10 kb), and DNA prepared using other methods, refer to the recommendations on page 34.

**Please read “Important Notes” on pages 12–18 before starting.**

**Note: All protocol steps should be carried out at room temperature (15–25°C).**

### Procedure

**1. Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to a microcentrifuge tube.**

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet.

If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle to ensure LyseBlue particles are completely dissolved. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

**2. Add 250 µl Buffer P2 and mix thoroughly by inverting the tube gently 4–6 times.**

Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min.

If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

**3. Add 350 µl Buffer N3 and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4–6 times.**

To avoid localized precipitation, immediately after addition of Buffer N3 mix the solution gently but thoroughly. Large culture volumes (e.g. ≥5 ml) may require inverting up to 10 times. The solution should become cloudy.

If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

**4. Centrifuge for 10 min at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a table-top microcentrifuge.**

A compact white pellet will form.

**During centrifugation, prepare the vacuum manifold and QIAprep spin columns: QIAvac 24 Plus (see pages 13 and 15–17):**

- Ensure that the vacuum source is connected to the upper threaded hole of the QIAvac 24 Plus and the lower threaded hole is tightly sealed using the screw cap.
- If using the QIAvac Connecting System, connect the system to the manifold and vacuum source as described in the *QIAvac 24 Plus Handbook*.
- Insert up to 24 spin columns into the luer slots of the QIAvac 24 Plus. Close unused luer slots with luer plugs.

**Other vacuum manifolds:** Follow the supplier's instructions. Insert each QIAprep column into a luer connector.

5. **Apply the supernatant from step 4 to the QIAprep spin column by decanting or pipetting.**
6. **Switch on vacuum source to draw the solution through the QIAprep spin columns, and then switch off vacuum source.**
7. **Recommended: Wash the QIAprep spin column by adding 0.5 ml Buffer PB. Switch on vacuum source. After the solution has moved through the column, switch off vacuum source.**

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using *endA*<sup>+</sup> strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5 $\alpha$  do not require this additional wash step.

8. **Wash the QIAprep spin column by adding 0.75 ml Buffer PE. Switch on vacuum source to draw the wash solution through the column, and then switch off vacuum source.**
9. **Transfer the QIAprep spin columns to a microcentrifuge tube. Centrifuge for 1 min.**  
**Important:** This extra spin is necessary to remove residual Buffer PE. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic reactions.
10. **Place the QIAprep column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 50  $\mu$ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of the QIAprep spin column, let stand for 1 min, and centrifuge for 1 min.**

# Protocol: Plasmid DNA Purification using the QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit

This protocol is designed for high-throughput plasmid DNA minipreps using TurboFilter 96 and QIAprep 96 plates on QIAvac 96. The kit accommodates up to 96 parallel preparations of up to 20 µg of high-copy plasmid DNA from 1–5 ml overnight cultures of *E. coli* grown in LB medium. If 1.3 ml overnight cultures are used, up to 96 cultures can be grown in a flat-bottom block (see page 12 for protocol). For purification of low-copy plasmids and cosmids, large plasmids (>10 kb), and DNA prepared using other methods, refer to the recommendations on page 34. DNA purification can be automated, please call QIAGEN for more details.

**Please read “Important Notes” on pages 12–18 before starting.**

**Note: All protocol steps should be carried out at room temperature (15–25°C).**

## Procedure

- 1. Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to the flat-bottom block (if cells were not harvested in this block) provided with the kit.**

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet.

- 2. Add 250 µl Buffer P2 to each sample. Dry the top of the flat-bottom block with a paper towel, seal the block with the tape provided, gently invert the block 4–6 times to mix, and incubate at room temperature for 5 min.**

It is important to mix gently by inverting the block. Do not shake vigorously, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the block until the solution becomes viscous and slightly clear.

**During incubation prepare QIAvac 96 (see pages 13 and 15–17):**

- Place the TurboFilter 96 plate in the QIAvac top plate, make sure that the plate is seated securely. Seal unused wells of the TurboFilter with tape.
- Place the plate holder inside the QIAvac base. Place QIAprep 96 plate into the plate holder.
- Place QIAvac 96 top plate squarely over base. The QIAprep plate should now be positioned under the TurboFilter plate. Attach QIAvac to a vacuum source.

- 3. Remove the tape from the block. Add 350 µl Buffer N3 to each sample, dry the top of the flat-bottom block with a paper towel, and seal the block with a new tape sheet. Gently invert the block 4–6 times.**

To avoid localized precipitation, mix the samples gently but thoroughly, immediately after addition of Buffer N3. The solutions should become cloudy.

4. **Remove the tape from the block. Pipet the lysates from step 3 (850  $\mu$ l per well) into the wells of the TurboFilter plate. Unused wells of the TurboFilter plate should be sealed with tape. Apply vacuum until all samples have passed through.**

The optimal flow rate is approximately 1–2 drops/s, which can be regulated by using a 3-way valve or vacuum regulator (see page 37) between the QIAvac and the vacuum source.

5. **Switch off vacuum and ventilate the QIAvac 96 slowly. Discard the TurboFilter plate. Transfer the QIAprep plate containing the cleared lysates to the top plate of the manifold. Seal any unused wells of the QIAprep plate with tape. Replace plate holder in the base with waste tray. Place the top plate squarely over the base, making sure that the QIAprep plate is seated securely. Apply vacuum.**

The flow-through is collected in the waste tray.

6. **Recommended: Switch off vacuum, and wash QIAprep plate by adding 0.9 ml Buffer PB to each well and applying vacuum.**

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using *endA*<sup>+</sup> strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5 $\alpha$  do not require this additional step.

7. **Switch off vacuum. Wash QIAprep plate by adding 0.9 ml of Buffer PE to each well and applying vacuum. Repeat once.**
8. **After Buffer PE has been drawn through all wells, apply maximum vacuum for an additional 10 min to dry the membrane.**

**Important:** This step removes residual Buffer PE from the membrane. The removal is only effective when maximum vacuum is used (i.e., turn off vacuum regulator or leakage valves if they are used), allowing maximum airflow to go through the wells.

9. **Switch off vacuum, and ventilate the QIAvac 96 slowly. Lift the top plate from the base (not the QIAprep plate from the top plate), vigorously tap the top plate on a stack of absorbent paper until no drops come out, and blot the nozzles of the QIAprep plate with clean absorbent paper. Proceed either to step 10a, or 10b, as desired.**

This step removes residual Buffer PE, which may be present around the outlet nozzles and collars of QIAprep plate. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic reactions.

**10a. For elution into provided collection microtubes:**

Replace waste tray with the blue collection microtube rack containing 1.2 ml collection microtubes. Place the top plate back on the base, making sure that the QIAprep plate is seated securely.

**10b. For elution into a 96-well microplate:**

Replace waste tray with an empty blue collection microtube rack (provided with the QIAvac 96). Place a 96-well microplate directly on the rack. Place the top plate back on the base, making sure that the QIAprep plate is positioned securely.

**11. To elute DNA, add 100  $\mu$ l of Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of each well of the QIAprep plate, let stand for 1 min, and apply maximum vacuum for 5 min. Switch off vacuum and ventilate QIAvac 96 slowly.**

For increased DNA concentration, an elution volume of 75  $\mu$ l can be used.

# Troubleshooting Guide

This troubleshooting guide may be helpful in solving any problems that may arise. For more information, see also the Frequently Asked Questions page at our Technical Support Center: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocols in this handbook or sample and assay technologies (for contact information, see back cover or visit [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Comments and suggestions

---

### Low or no yield

#### General

Low yields may be caused by a number of factors. To find the source of the problem, analyze fractions saved from each step in the procedure on an agarose gel (e.g., Figure 5, page 33). A small amount of the cleared lysate and the entire flow-through can be precipitated by adding 0.7 volumes isopropanol and centrifuging at maximum speed (13,000 rpm or  $\sim 17,000 \times g$ ) for 30 minutes. The entire wash flow-through can be precipitated by adding 0.1 volumes of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and 0.7 volumes of isopropanol.

### No DNA in the cleared lysate before loading

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| a) Plasmid did not propagate    | Read "Growth of bacterial cultures" (page 29) and check that the conditions for optimal growth were met.                 |
| b) Lysate prepared incorrectly  | Check storage conditions and age of buffers.   |
| c) Buffer P2 precipitated       | Redissolve by warming to 37°C.   |
| d) Cell resuspension incomplete | Pelleted cells should be completely resuspended in Buffer P1. Do not add Buffer P2 until an even suspension is obtained. |

### DNA is found in the flow-through of cleared lysate

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| a) QIAprep membrane overloaded | If rich culture media, such as TB or 2x YT are used, culture volumes must be reduced. It may be necessary to adjust LB culture volume if the plasmid and host strain show extremely high copy number or growth rates. See "Culture media" on page 31. |
|--------------------------------|---|

## Comments and suggestions

---

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| b) RNase A digestion omitted      | Ensure that RNase A is added to Buffer P1 before use.  |
| c) RNase A digestion insufficient | Reduce culture volume if necessary. If Buffer P1 containing RNase A is more than 6 months old, add additional RNase A. |

### DNA is found in the wash flow-through

Ethanol omitted from wash buffer	Repeat procedure with correctly prepared wash buffer (Buffer PE).
----------------------------------	---

### Little or no DNA in eluate

- |   |   |
|---|---|
| a) Elution buffer incorrect                           | DNA is eluted only in the presence of low-salt buffer (e.g., Buffer EB [10 mM Tris-Cl, pH 8.5] or water). Elution efficiency is dependent on pH. The maximum efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water for elution, make sure that the pH value is within this range. |
| b) Elution buffer incorrectly dispensed onto membrane | Add elution buffer to the center of the QIAprep membrane to ensure that the buffer completely covers the surface of the membrane for maximum elution efficiency.  |

### Low DNA quality

#### DNA does not perform well in downstream applications

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| a) Eluate salt concentration too high | For the QIAprep spin column, modify the wash step by incubating the column for 5 minutes at room temperature (15–25°C) after adding 0.75 ml of Buffer PE and then centrifuging. For QIAprep 96 Turbo preparations, ensure that two wash steps are carried out prior to elution. |
| b) Nuclease contamination             | When using <i>endA</i> <sup>+</sup> host strains such as HB101 and its derivatives, the JM series, or any wild-type strain, ensure that the wash step with Buffer PB is performed.  |
| c) Eluate contains residual ethanol   | Ensure that step 9 in the QIAprep Spin Miniprep protocol and steps 9 and 10 in the QIAprep 96 Turbo Miniprep protocol are performed.  |

## Comments and suggestions

---

### RNA in the eluate

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| a) RNase A digestion omitted      | Ensure that RNase A is added to Buffer P1 before use.  |
| b) RNase A digestion insufficient | Reduce culture volume if necessary. If Buffer P1 containing RNase A is more than 6 months old, add additional RNase A. |

### Genomic DNA in the eluate

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| a) Buffer P2 added incorrectly | The lysate must be handled gently after addition of Buffer P2 to prevent shearing. Reduce culture volume if lysate is too viscous for gentle mixing. |
| b) Buffer N3 added incorrectly | Upon addition of Buffer N3 in step 3, mix immediately but gently.  |
| c) Lysis too long              | Lysis in step 2 must not exceed 5 minutes.   |
| d) Culture overgrown           | Overgrown cultures contain lysed cells and degraded DNA. Do not grow cultures for longer than 12–16 hours.   |



# Appendix A: Background Information

## Growth of bacterial cultures

Plasmids are generally prepared from bacterial cultures grown in the presence of a selective agent such as an antibiotic (3,4). The yield and quality of plasmid DNA may depend on factors such as plasmid copy number, host strain, inoculation, antibiotic, and type of culture medium.

### Plasmid copy number

Plasmids vary widely in their copy number per cell (Table 5), depending on their origin of replication (e.g., pMB1, ColE1, or pSC101) which determines whether they are under relaxed or stringent control; and depending on the size of the plasmid and its associated insert. Some plasmids, such as the pUC series and derivatives, have mutations which allow them to reach very high copy numbers within the bacterial cell. Plasmids based on pBR322 and cosmids are generally present in lower copy numbers. Very large plasmids and cosmids are often maintained at very low copy numbers per cell.

**Table 5. Origins of replication and copy numbers of various plasmids (3)**

DNA construct	Origin of replication	Copy number	Classification
<b>Plasmids</b>			
pUC vectors	pMB1 *	500–700	High copy
pBluescript vectors	ColE1	300–500	High copy
pGEM® vectors	pMB1 *	300–400	High copy
pTZ vectors	pMB1 *	>1000	High copy
pBR322 and derivatives	pMB1 *	15–20	Low copy
pACYC and derivatives	p15A	10–12	Low copy
pSC101 and derivatives	pSC101	~5	Very low copy
<b>Cosmids</b>			
SuperCos	ColE1	10–20	Low copy
pWE15	ColE1	10–20	Low copy

\* The pMB1 origin of replication is closely related to that of ColE1 and falls in the same incompatibility group. The high-copy-number plasmids listed here contain mutated versions of this origin.

## Host strains

Most *E. coli* strains can be used successfully to isolate plasmid DNA, although the strain used to propagate a plasmid has an effect on the quality of the purified DNA. Host strains such as DH1, DH5 $\alpha$ , and C600 give high-quality DNA. The slower growing strain XL1-Blue also yields DNA of very high-quality which works extremely well for sequencing. Strain HB101 and its derivatives, such as TG1 and the JM series, produce large amounts of carbohydrates, which are released during lysis and can inhibit enzyme activities if not completely removed (4). In addition, these strains have high levels of endonuclease activity which can reduce DNA quality. The methylation and growth characteristics of the strain should also be taken into account when selecting a host strain. XL1-Blue and DH5 $\alpha$  are highly recommended for reproducible and reliable results.

## Inoculation

Bacterial cultures for plasmid preparation should always be grown from a single colony picked from a freshly streaked selective plate. Subculturing directly from glycerol stocks, agar stabs, and liquid cultures may lead to uneven plasmid yield or loss of the plasmid. Inoculation from plates that have been stored for a long time may also lead to loss or mutation of the plasmid.

The desired clone should be streaked from a glycerol stock onto a freshly prepared agar plate containing the appropriate selective agent so that single colonies can be isolated. This procedure should then be repeated to ensure that a single colony of an antibiotic-resistant clone can be picked. A single colony should be inoculated into 1–5 ml of media containing the appropriate selective agent, and grown with vigorous shaking for 12–16 hours. Growth for more than 16 hours is not recommended since cells begin to lyse and plasmid yields may be reduced.

## Antibiotics

Antibiotic selection should be applied at all stages of growth. Many plasmids in use today do not contain the *par* locus which ensures that the plasmids segregate equally during cell division. Daughter cells that do not receive plasmids will replicate much faster than plasmid-containing cells in the absence of selective pressure, and can quickly take over the culture.

The stability of the selective agent should also be taken into account. Resistance to ampicillin, for example, is mediated by  $\beta$ -lactamase which is encoded by the plasmid-linked *bla* gene and which hydrolyzes ampicillin. Levels of ampicillin in the culture medium are thus continually depleted. This phenomenon is clearly demonstrated on ampicillin plates, where “satellite colonies” appear as the ampicillin is hydrolyzed in the vicinity of a growing colony. Ampicillin is also very sensitive to temperature, and when in solution should be stored frozen in single-use aliquots. The recommendations given in Table 6 are based on these considerations.

**Table 6. Concentrations of commonly used antibiotics**

Antibiotic	Stock solutions		Working concentration (dilution)
	Concentration	Storage	
Ampicillin (sodium salt)	50 mg/ml in water	-20°C	100 µg/ml (1/500)
Chloramphenicol	34 mg/ml in ethanol	-20°C	170 µg/ml (1/200)
Kanamycin	10 mg/ml in water	-20°C	50 µg/ml (1/200)
Streptomycin	10 mg/ml in water	-20°C	50 µg/ml (1/200)
Tetracycline HCl	5 mg/ml in ethanol	-20°C	50 µg/ml (1/100)

**Culture media**

LB broth is the recommended culture medium for use with QIAprep Kits, since richer broths such as TB (Terrific Broth) or 2x YT lead to extremely high cell densities, which can overload the purification system. It should be noted that cultures grown in TB may yield 2–5 times the number of cells compared to cultures grown in LB broth. If these media are used, recommended culture volumes must be reduced to match the capacity of the QIAprep membrane. If excess culture volume is used, alkaline lysis will be inefficient, the QIAprep membrane will be overloaded, and the performance of the system will be unsatisfactory. Furthermore, the excessive viscosity of the lysate will require vigorous mixing, which may result in shearing of bacterial genomic DNA and contamination of the plasmid DNA. Care must also be taken if strains are used which grow unusually fast or to very high cell densities. In such cases, doubling the volumes of Buffers P1, P2, and N3 may be beneficial. It is best to calculate culture cell density and adjust the volume accordingly.

Please note that a number of slightly different LB culture broths, containing different concentrations of NaCl, are in common use. Although different LB broths produce similar cell densities after overnight culture, plasmid yields can vary significantly.

**Table 7. Recommended composition of Luria Bertani medium**

Contents	Per liter
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

## Preparation of cell lysates

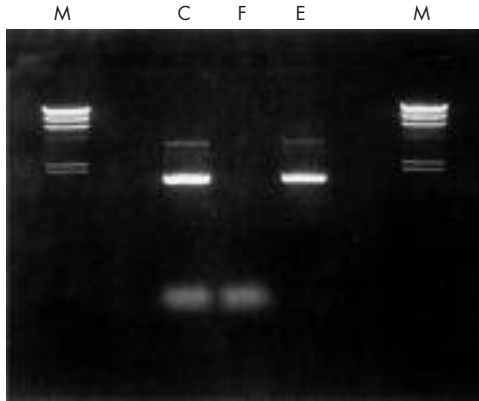
Bacteria are lysed under alkaline conditions. After harvesting and resuspension, the bacterial cells are lysed in NaOH/SDS (Buffer P2) in the presence of RNase A (2, 5). SDS solubilizes the phospholipid and protein components of the cell membrane, leading to lysis and release of the cell contents while the alkaline conditions denature the chromosomal and plasmid DNAs, as well as proteins. The optimized lysis time allows maximum release of plasmid DNA without release of chromosomal DNA, while minimizing the exposure of the plasmid to denaturing conditions. Long exposure to alkaline conditions may cause the plasmid to become irreversibly denatured (2). This denatured form of the plasmid runs faster on agarose gels and is resistant to restriction enzyme digestion.

The lysate is neutralized and adjusted to high-salt binding conditions in one step by the addition of Buffer N3. The high salt concentration causes denatured proteins, chromosomal DNA, cellular debris, and SDS to precipitate, while the smaller plasmid DNA renatures correctly and stays in solution. It is important that the solution is thoroughly and gently mixed to ensure complete precipitation.

To prevent contamination of plasmid DNA with chromosomal DNA, vigorous stirring and vortexing must be avoided during lysis. Separation of plasmid from chromosomal DNA is based on coprecipitation of the cell wall-bound chromosomal DNA with insoluble complexes containing salt, detergent, and protein. Plasmid DNA remains in the clear supernatant. Vigorous treatment during the lysis procedure will shear the bacterial chromosome, leaving free chromosomal DNA fragments in the supernatant. Since chromosomal fragments are chemically indistinguishable from plasmid DNA under the conditions used, the two species will not be separated on QIAprep membrane and will elute under the same low-salt conditions. Mixing during the lysis procedure must therefore be carried out by slow, gentle inversion of the tube.

# Appendix B: Agarose Gel Analysis of Plasmid DNA

The QIAprep Miniprep procedure can be analyzed using agarose gel electrophoresis as shown in Figure 5. Samples can be taken from the cleared lysate and its flow-through, precipitated with isopropanol and resuspended in a minimal volume of TE buffer. In Figure 5, the cleared lysate shows closed circular plasmid DNA and degraded RNase A-resistant RNA. The flow-through contains only degraded RNA and no plasmid DNA is present. The eluted pure plasmid DNA shows no contamination with other nucleic acids.



**Figure 5. Agarose gel analysis of the QIAprep Miniprep procedure. C:** cleared lysate; **F:** flow-through; **E:** eluted plasmid; **M:** markers.

## Appendix C: Special Applications

### Purification of low-copy plasmids and cosmids

All QIAprep miniprep protocols in this handbook can be used for preparation of low-copy-number plasmid or cosmids from 1–10 ml overnight *E. coli* cultures grown in LB medium.

Only two slight modifications to the protocols are required:

- The wash step with Buffer PB is required for all strains.
- When plasmid or cosmids are >10 kb, pre-heat Buffer EB (or water) to 70°C prior to eluting DNA from the QIAprep membrane. A 10 ml overnight LB culture typically yields 5–10 µg DNA.

**Note:** When using 10 ml culture volume, it is recommended to double the volumes of Buffers P1, P2, and N3 used.

### Purification of very large plasmids (>50 kb)

Plasmids that are >50 kb in size elute less efficiently from silica than smaller plasmids, but do elute efficiently from the QIAGEN anion-exchange resin. QIAGEN provides the anion-exchange-based QIAGEN Large-Construct Kit for efficient large-scale purification of ultrapure genomic DNA-free BAC, PAC, P1, or cosmid DNA. For high-throughput, small-scale purification of BACs, PACs, and P1s, an optimized alkaline lysis protocol in R.E.A.L.® Prep 96 Kits yields DNA suitable for sequencing and screening. Call QIAGEN Technical Services or your local distributor for more information on these kits, or see ordering information on page 37.

### Purification of plasmid DNA prepared by other methods

Plasmid DNA isolated by other methods can be further purified using QIAprep modules and any of the QIAprep protocols in this handbook.

- C1. Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the DNA solution and mix (e.g., add 500 µl Buffer PB to 100 µl of DNA sample).
- C2. Apply the samples to QIAprep spin columns or to the wells of a QIAprep 96-well plate. Draw the samples through the QIAprep membrane by centrifugation or vacuum, and continue the appropriate protocol at the Buffer PE wash step. The optional wash step with Buffer PB is not necessary.

## References

1. Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615–619.
2. Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1522.
3. Sambrook, J. et al., eds. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Ausubel, F.M. et al., eds. (1991) *Current protocols in molecular biology*. Wiley Interscience, New York.
5. Birnboim, H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**, 243–255.

## Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	For 50 plasmid minipreps: 50 QIAprep Spin Columns, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	27104
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	For 250 plasmid minipreps: 250 QIAprep Spin Columns, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	27106
QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (4)*	For 4 x 96 plasmid minipreps: 4 TurboFilter 96 Plates, 4 QIAprep 96 Plates, 4 Flat-Bottom Blocks with Lids, Reagents, Buffers, Collection Microtubes (1.2 ml), Caps	27191
QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (24)*	For 24 x 96 Plasmid minipreps: 24 x TurboFilter 96 Plates, 24 x QIAprep 96 Plates, 24 Flat-Bottom Blocks with Lids, Reagents, Buffers, Collection Microtubes (1.2 ml), Caps	27193
QIAprep 96 Turbo BioRobot Kit (4)	For 4 x 96 plasmid minipreps, 4 each: TurboFilter 96 and QIAprep 96 Plates, Flat-Bottom Blocks and Lids, Reagents, Buffers, Collection Microtubes (1.2 ml), Caps, 96-Well Microplates RB and Lids, Tape Pads	962141
<b>QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> 96 Miniprep and BioRobot Kits — for purification of transfection grade plasmid DNA in 96-well format</b>		
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> 96 BioRobot Kit (4)	For 4 x 96 plasmid minipreps: TurboFilter 96 Plates and Plasmid <i>Plus</i> 96 Plates, Buffers, Reagents, Flat- Bottom Blocks, S-Blocks, and Elution Microtubes; for use with the BioRobot Universal System	960241
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> 96 Miniprep Kit (4)	For 4 x 96 plasmid minipreps: TurboFilter 96 Plates, Plasmid <i>Plus</i> 96 Plates, Buffers, Reagents, Flat-Bottom Blocks, S-Blocks, and Elution Microtubes; requires use of QIAvac 96 and Elution Microtube Adapter,* or a centrifugation system suitable for 96-well blocks	16181

\* Requires the use of QIAvac 96.



# Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
<b>DirectPrep® 96 Kits — for high-throughput plasmid DNA purification</b>		
DirectPrep 96 Miniprep Kit (4)*	For 4 x 96 plasmid Minipreps: 4 DirectPrep 96 Plates, Reagents, Buffers, Flat-Bottom Blocks and Lids, Air Pore Tape Sheets, Tape Pads, Elution Microtubes RS, Caps	27361
DirectPrep 96 BioRobot Kit (4)†	For 4 x 96 plasmid Minipreps: 4 DirectPrep 96 Plates, Reagents, Buffers, Flat-Bottom Blocks and Lids, 96-Well Microplates RB, AirPore Tape Sheets, Tape Pads	962341
<b>Related products for BAC/PAC/P1 purification</b>		
QIAGEN Large-Construct Kit (10)	10 QIAGEN-tip 500, Reagents, Buffers, ATP-Dependent Exonuclease‡	12462
<b>QIAvac and accessories</b>		
QIAvac 24 Plus	Vacuum manifold for processing 1–24 spin columns: includes QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold, Luer Plugs, Quick Couplings	19413
QIAvac 96	Vacuum manifold for processing QIAGEN 96-well plates: includes QIAvac 96 Top Plate, Base, Waste Tray, Plate Holder Rock of Collection Microtubes (1.2 ml)	19504
QIAvac Luer Adapter Set§	For processing 1–24 QIAprep Spin Columns: 6 adapters, each with 4 luer connectors, 24 plugs	19541

\* Requires use of QIAvac Multiwell. Larger kit sizes available, please inquire.

† For use with BioRobot 3000 or 8000 workstations. Larger kit sizes available, please inquire.

‡ ATP solution required for exonuclease digestion is not provided.

§ Compatible only with QIAvac Top Plates containing flip-up lid.

## Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
Vacuum Regulator	For use with QIAvac manifolds	19530
Vacuum Pump (100 V, 50/60 Hz)	Universal vacuum pump	84000
Vacuum Pump (115 V, 60 Hz)	Universal vacuum pump	84010
Vacuum Pump (230 V, 50 Hz)	Universal vacuum pump	84020
<b>Automated low-throughput plasmid purification</b>		
QIAcube (110 V)*	Robotic workstation for automated purification of nucleic acids or proteins using QIAGEN spin-column kits, 1-year warranty on parts and labor†	9001292‡
QIAcube (230 V)†		9001293§
<b>Accessories</b>		
Starter Pack, QIAcube	Pack includes: reagent bottle racks (3); rack labeling strips (8); 200 µl filter-tips (1024); 1000 µl filter-tips (1024); 1000 µl filter-tips, wide-bore (1024); 30 ml reagent bottles (18); rotor adapters (240); rotor adapter holder	990395
<b>Individual Buffers and accessories</b>		
Buffer N3	500 ml Buffer N3	19064
Buffer PB	500 ml Buffer PB	19066
Buffer PE (concentrate)	100 ml Buffer PE (concentrate)	19065
RNase A	250 mg RNase A (70 U/mg; 100 mg/ml)	19101
Collection Tubes (2 ml)	1000 collection tubes (2 ml)	19201
Collection Microtubes (racked)	Nonsterile polypropylene tubes (1.2 ml), 960 in racks of 96	19560

\* US, Canada, and Japan.

† Rest of world.

‡ Agreements for comprehensive service coverage are available; please inquire.

## Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
Collection Microtube Caps	Nonsterile polypropylene caps for collection collection microtubes (1.2 ml), 960 in strips of 8, loose in bag	19566
Flat-Bottom Blocks (24)	96-well blocks with 2 ml wells, 24 blocks per case	19579
Tape Pads (5)	Adhesive tape sheets for sealing multiwell plates and blocks: 25 sheets per pad, 5 pads per pack	19570
AirPore Tape Sheets (50)	Microporous tape sheets for covering 96-well blocks during bacterial cultivation: 50 sheets per pack	19571

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.

## Notes

## Notes

## Notes

**Trademarks:**

QIAGEN®, QIAcube®, QIAprep®, BioRobot®, DirectPrep®, LyseBlue®, R.E.A.L.®, TurboFilter® (QIAGEN Group); DH5® (Life Technologies, Inc.); Heraeus® (Heraeus Holding GmbH); pBluescript® (Agilent Technologies, Inc.); pGEM® (Promega Corp.); Beckman® (Beckman Instruments, Inc); FinnTip®, Multistep® (Thermo Electron Oy Corporation).

**Limited License Agreement for QIAprep Miniprep Kits**

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

1. The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this handbook and for use with components contained in the kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this handbook, and additional protocols available at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Some of these additional protocols have been provided by QIAGEN users for QIAGEN users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by QIAGEN. QIAGEN neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

For updated license terms, see [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2002–2012 QIAGEN, all rights reserved.

**www.qiagen.com**

**Australia** = techservice-au@qiagen.com

**Austria** = techservice-at@qiagen.com

**Belgium** = techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** = suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** = techservice-ca@qiagen.com

**China** = techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** = techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** = techservice-nordic@qiagen.com

**France** = techservice-fr@qiagen.com

**Germany** = techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** = techservice-hk@qiagen.com

**India** = techservice-india@qiagen.com

**Ireland** = techservice-uk@qiagen.com

**Italy** = techservice-it@qiagen.com

**Japan** = techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** = techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** = techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** = techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** = techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** = techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** = techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** = techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** = techservice-ch@qiagen.com

**UK** = techservice-uk@qiagen.com

**USA** = techservice-us@qiagen.com







# PCR clean-up Gel extraction

## User manual

NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up

January 2012 / Rev. 02














**MACHEREY-NAGEL**

[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)



# PCR clean-up, gel extraction

## Protocol-at-a-glance (Rev.02)

	PCR clean-up	Gel extraction	DNA clean-up (with SDS)	Single stranded DNA clean-up
<p><b>1</b> <u>PCR clean-up, DNA clean-up, or single stranded DNA clean-up:</u> Adjust binding condition</p> <p><u>Gel extraction:</u> Excise DNA fragment / solubilize gel slice</p>	 200 µL NT1/ 100 µL PCR	  200 µL NT1/ 100 µg gel 50 °C 5–10 min	 500 µL NTB/ 100 µL sample	 200 µL NTC/ 100 µL sample
<p><b>2</b> Bind DNA</p>			11,000 x <i>g</i> 30 s	
<p><b>3</b> Wash silica membrane</p>			700 µL NT3 11,000 x <i>g</i> 30 s  <u>Recommended:</u> 2 <sup>nd</sup> wash 700 µL NT3 11,000 x <i>g</i> 30 s	
<p><b>4</b> Dry silica membrane</p>			11,000 x <i>g</i> 1 min	
<p><b>5</b> Elute DNA</p>			15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x <i>g</i> 1 min	

## Table of contents

1	Components	4
1.1	Kit contents	4
1.2	Reagents, consumables, and equipment to be supplied by user	5
1.3	About this user manual	5
2	Product description	6
2.1	The basic principle	6
2.2	Kit specifications	6
2.3	Removal of small DNA fragments and primer-dimers	8
2.4	pH indicator	9
2.5	Tips and tricks for extractions from agarose gels	10
2.6	DNA recovery depends on fragment size and elution volume	11
2.7	Salt carry-over and low $A_{260}/A_{230}$	13
3	Storage conditions and preparation of working solutions	15
4	Safety instructions	16
4.1	Risk and safety phrases	16
4.2	GHS classification	17
5	Protocols	18
5.1	PCR clean-up	18
5.2	DNA extraction from agarose gels	20
5.3	DNA extraction from polyacrylamide gels	22
5.4	RNA extraction from agarose gels (Buffer NTC)	24
5.5	DNA clean-up of samples containing SDS (Buffer NTB)	25
5.6	Single stranded DNA clean-up (Buffer NTC)	26
6	Appendix	27
6.1	Troubleshooting	27
6.2	Ordering information	30
6.3	References	30
6.4	Product use restriction/warranty	31

# 1 Components

## 1.1 Kit contents

<b>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</b>			
<b>REF</b>	<b>10 preps 740609.10</b>	<b>50 preps 740609.50</b>	<b>250 preps 740609.250</b>
Binding Buffer NT1	10 mL	2 x 25 mL	2 x 120 mL
Wash Buffer NT3 (Concentrate)*	6 mL	20 mL	2 x 50 mL
Elution Buffer NE**	5 mL	15 mL	50 mL
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Columns (yellow rings)	10	50	250
Collection Tubes (2 mL)	10	50	250
User manual	1	1	1

\* For preparation of working solutions and storage conditions see section 3.

\*\*Composition of Elution Buffer NE: 5 mM Tris/HCl, pH 8.5

## 1.2 Reagents, consumables, and equipment to be supplied by user

### Reagents

- 96–100 % ethanol

### Consumables

- 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Disposable pipette tips

### Equipment

- Manual pipettors
- Centrifuge for microcentrifuge tubes
- Heating block, water bath, or thermomixer for gel extraction
- Scalpel to cut agarose gels
- Vortex mixer
- Personal protection equipment (lab coat, gloves, goggles)

## 1.3 About this user manual

It is strongly recommended reading the detailed protocol sections of this user manual if the **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** kit is used for the first time. Experienced users, however, may refer to the Protocol-at-a-glance instead. The Protocol-at-a-glance is designed to be used only as a supplemental tool for quick referencing while performing the purification procedure.

All technical literature is available on the internet at **[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)**.

Please contact Technical Service regarding information about changes of the current user manual compared to previous revisions.

## 2 Product description

### 2.1 The basic principle

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up is developed as a 2-in-1 kit allowing DNA fragments to be purified from enzymatic reactions, such as PCR, as well as from agarose gels.

The sample is mixed with Binding Buffer NT1 and in case of a cut-out gel band, it is heated to dissolve the agarose. In the presence of chaotropic salt, the DNA is bound to the silica membrane of a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Contaminations are removed by simple washing steps with ethanolic Wash Buffer NT3. Finally, the pure DNA is eluted under low salt conditions with slightly alkaline Elution Buffer NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

### 2.2 Kit specifications

- **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** is designed for fast purification of PCR products, such as DNA from enzymatic reactions, as well as the extraction of DNA fragments from TAE or TBE agarose gels.
- Only two volumes of binding buffer per volume of sample are needed to process up to 200 µL of PCR/enzymatic reaction, or 200 mg of agarose gel, with only one loading step. By adding additional Binding Buffer NT1 (see ordering information) it is possible to load an unlimited amount of sample volumes onto a single column (tips and tricks in section 2.5).
- Up to ~ 15 µg DNA from 50 bp to at least ~ 20 kbp can be purified efficiently in 10–20 min with average recoveries from ~ 60 to ~ 90 % depending on the fragment size and elution procedure (details in section 2.6).
- The **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** buffer formulation ensures complete removal of all kinds of contaminations such as
  - nucleotides, primers
  - enzymes
  - mineral oil
  - PCR additives (e.g., salts, betaine, DMSO)
  - detergents (e.g., Tween 20, Triton X-100)
  - dyes (e.g., ethidiumbromide, crystal violet, Stain G, Midori Green, Roti®-Safe GelStain, DNA SafeStain)
  - unbound labels and tags
- Primers from PCR reactions are quantitatively eliminated while small DNA fragments are still bound and purified with high recovery (details in section 2.6).

- The cut-off for small DNA fragments can be shifted from < 50 bp to several hundred bp by diluting Binding Buffer NTI to remove primer-dimers from target PCR products (details in section 2.3).
- The pH-indicator in Binding Buffer NTI ensures optimal binding conditions with pH < 7.0 (details in section 2.4). The yellow color makes it easier to identify undissolved agarose during DNA gel extraction.
- **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** can be used with all kinds of agarose gels (high or low melting) with 1 % to 5 % agarose and a variety of buffer systems like TAE or TBE (tips and tricks in section 2.5). The kit also works with low conductivity borate electrophoresis systems.
- Concentrated elution in down to 10 µL Elution Buffer NE (details in section 2.6).
- Several support protocols extend the application range of **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** to
  - Clean-up of DNA from reaction mixtures containing SDS (section 5.5)
  - Clean-up of single stranded DNA (section 5.6)
  - Extraction of RNA from agarose gels (section 5.4)
  - Extraction of DNA from polyacrylamide gels (section 5.3)
- The purified and concentrated DNA can directly be used for hybridization, sequencing, PCR, restriction, ligation, *in vitro* transcription, labeling or any other kind of enzymatic reaction.

**Table 1: Kit specifications at a glance**

Parameter	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up
Sample material	Up to 200 µL of PCR reaction or 200 mg of gel (more sample with additional Binding Buffer NTI and multiple loading steps)
Binding capacity	25 µg
Fragment length	50 bp – ~ 20 kbp
Elution volume	10–30 µL
Optimal recovery	< 15 µg, 100–500 bp, 30 µL
Preparation time	10 min for 6 PCR purifications 20 min for 6 gel extractions

## 2.3 Removal of small DNA fragments and primer-dimers

**NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** is designed to remove even traces of unused primer while purifying PCR products down to 50 bp at the same time. However, in some cases it is necessary to exclude these small fragments. For example, primer dimers, or side products resulting from unspecific annealing, may interfere with downstream sequencing or cloning applications.

Removal of double stranded DNA >50 bp can be achieved by diluting an aliquot of Buffer NTI with sterile water in an appropriate ratio and then proceeding with the standard protocol (see section 5.1). Diluting Buffer NTI in a certain range lowers the binding efficiency for small fragments without compromising the recovery of larger PCR products. However, the dilution ratio will highly depend on the fragment. Therefore, for each size of small fragments >50 bp that has to be removed, as well as for each PCR system, the appropriate ratio of Buffer NTI dilution can be determined in advance.

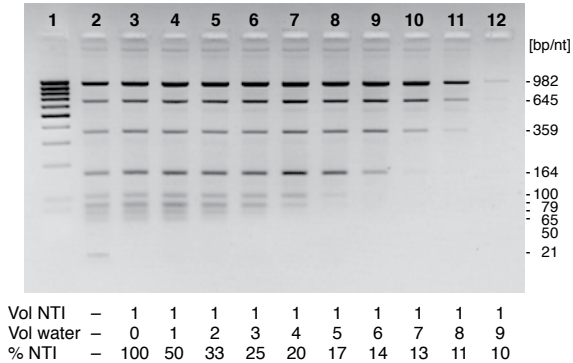
**Influence of fragment size:** *The smaller the fragment in question, the less you have to dilute Buffer NTI.*

**Influence of PCR buffer system:** The influence of the PCR buffer system on the removal of small fragments is more complex. Some reaction buffers contain detergents like Tween or high concentrations of additives like betaine to lower the melting temperature of the DNA template. These substances can usually be found in PCR buffers for high fidelity or long range PCR. They tend to lower the binding efficiency of DNA to the silica membrane and therefore have to be considered when choosing a dilution ratio of Buffer NTI. ***As a rule of thumb, if a PCR buffer system without special additives is used, adding 3 to 5 volumes of water to 1 volume of Buffer NTI will lead to removal of small fragments up to 100 bp. Otherwise adding 1 to 3 volumes of water to 1 volume of Buffer NTI will be sufficient.***

Therefore, for each size of small fragments > 50 bp that has to be removed, and for each PCR system, you can determine the appropriate ratio of Buffer NTI dilution, in advance.

Figure 1 shows a purification result with a Buffer NTI dilution series. Pure Buffer NTI (lane 3), as well as Buffer NTI plus one volume of water (lane 4), lead to 100 % recovery of a PCR fragment ladder (lane 2). More diluted Buffer NTI cuts off more and more of the low molecular mass bands. Usually a dilution with 5 volumes of water should be sufficient to eliminate even larger unwanted primer-dimer fragments while purifying the 164 bp fragment with > 90 %.





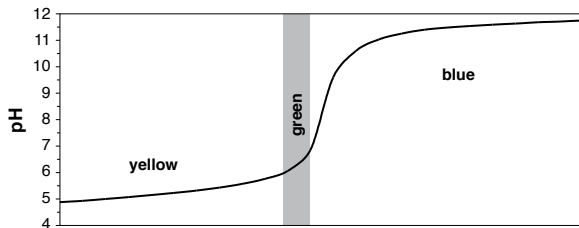
**Figure 1: Purification of PCR reactions using Buffer NTI dilutions**

- Lane 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)
- Lane 2: DNA ladder input (21 base primer, 50, 65, 79, 100, 164, 359, 645 and 982 bp fragment) amplified using Biotaq DNA Polymerase (Bioline)
- Lane 3: Purification with 100% Buffer NTI
- Lane 4-12: Purification with Buffer NTI diluted with 1–9 volumes of water

## 2.4 pH indicator

The optimal pH to bind even small DNA fragments to the silica membrane of the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Columns is approximately 5.0–6.0. The Binding Buffer NTI is sufficiently buffered to maintain this pH for all standard PCR reaction buffers or agarose gel buffer systems.

In addition, the colored binding buffer helps identify undissolved pieces of agarose during DNA gel extraction.



**Figure 2: Titration curve of Binding Buffer NTI with pH indicator**

A yellow color indicates the optimal pH < 6.0 (Figure 2). If the pH increases to around 7 after adding the sample, the solution will turn green. In addition, an even higher pH will be signaled by a blue color. If a change in color is observed, the pH should be corrected by adding more Buffer NTI or by titrating the pH back to < 6.0 with 4 M sodium acetate pH 5.0 or small amounts of hydrochloric acid (HCl).

## 2.5 Tips and tricks for extractions from agarose gels

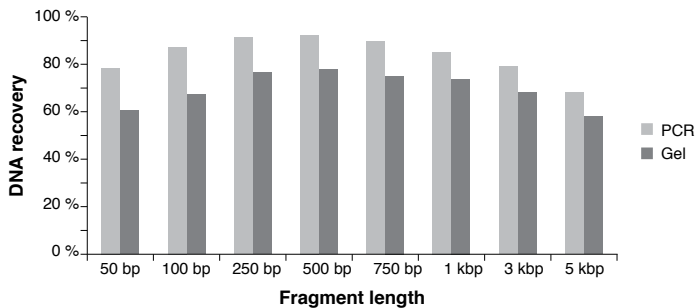
Subject	Recommendation
Buffer system	<p>TBE (Tris-Borate-EDTA) buffer has a higher buffering capacity than TAE (Tris-Acetate-EDTA) which is needed for runs overnight and offers a better resolution for small DNA fragments. TBE buffer can be used in combination with NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up.</p> <p>However, it is preferred to use <b>fresh TAE buffer over TBE</b> for preparative agarose gels. TAE does not interact with agarose, resulting in <b>higher DNA yields</b>. Additionally, linear DNA runs faster and the resolution of large DNA fragments is higher. Furthermore, supercoiled plasmid is separated better from linear and open circle DNA.</p>
Running conditions	<p><b>The temperature during electrophoresis should be low</b> in order to increase the resolution of the DNA separation and avoid melting of the gel, thus causing denaturation of the DNA. Use fresh buffer and run the gel at low voltage (&lt; 60 V), for as short as possible. As soon as the DNA band of interest is sufficiently separated from the rest, stop the gel and cut out the band.</p>
Cutting out the band	<p><b>Expose the gel to UV light as short as possible.</b> Use the longest UV wave length that is allowed by your gel documentation system. Prolonged exposure and short wave lengths can damage the DNA. Wear gloves and a face mask to protect your skin and eyes from UV light. Make sure to cut through the gel vertically and remove all excess agarose. Use 0.7–1.0 % agarose gels rather than higher percentages.</p>
Size of gel piece	<p>Make sure to actually <b>weigh the gel</b> since its weight is easily underestimated. Up to 200 mg of agarose gel can be dissolved with 400 µL of Buffer NTI and loaded onto the column in one step. However, virtually unlimited amounts of gel can be loaded without clogging the column by increasing Buffer NTI proportionally (see ordering information) and adding multiple loading steps.</p>

## 2.6 DNA recovery depends on fragment size and elution volume

Upon completion of the wash steps with Buffer NT3, the DNA will adhere to the silica membrane. The number of interactions with Si-OH groups of the silica increase with the size of the DNA fragment. As a result, large DNA with several kilo base pairs binds much stronger and is much more difficult to elute than small DNA with just several hundred base pairs. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up is recommended for DNA up 10–15 kbp. Longer fragments can be purified but recovery may be low. In addition, fragments larger than 20 kbp may be mechanically damaged by the fast centrifugation through the membrane. For very large fragments, consider using NucleoTrap® or NucleoTraP®CR (see ordering information).

To elute the DNA, water with a pH > 7 is needed to reestablish the hydrate shell. It is highly recommended to **elute DNA with Elution Buffer NE** (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) which is provided with the kit. However, a standard TE buffer may also be used to ensure best elution efficiency. Please note that EDTA in TE buffer may cause problems in subsequent enzymatic reactions. Do not use deionized water since its pH is usually too acidic. If even less salt than the 5 mM Tris has to be used, dilute Elution Buffer NE with distilled water and make sure the pH is still > 7. Unbuffered elution buffer should not be used.

The **standard elution buffer volume is 15–30 µL** which is the best compromise for high DNA recovery and high DNA concentration for fragments < 1000 bp (Figure 3).

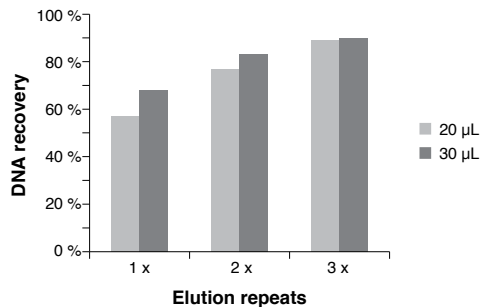


**Figure 3: Fragment length dependent DNA recovery**

2 µg of 100 bp DNA ladder (Fermentas) or 2 µg of linearized vectors of 3 and 5 kbp were purified from standard PCR buffer or 200 mg 1% TAE agarose gel. DNA was eluted in 30 µL Elution Buffer NE.

Elution after gel extraction is 10–20 % less efficient than elution of purified PCR products. In addition, elution of several kbp long DNA fragments is 10–30 % less efficient than elution of 500 bp fragments. To improve the DNA recovery after gel extraction, and/or for large DNA fragments, the following modifications can be applied to the standard elution procedure:

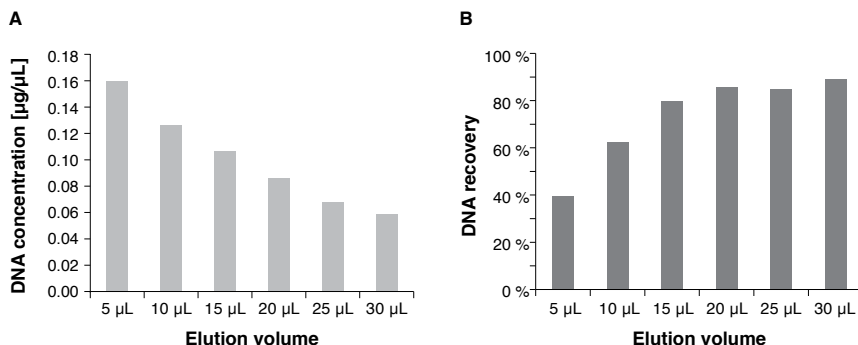
- Heat elution buffer to 70 °C and incubate elution buffer on the column at 70 °C for 5 minutes.
- Apply elution buffer to the column and centrifuge first at 30–50 x *g* for 1 min and then at 11.000 x *g* for 1 min.
- **Do 2 or better 3 elution steps with 20 or 30 µL fresh elution buffer.** Figure 4 demonstrates the increase in recovery for a 5 kbp fragment by 20–30 %.



**Figure 4: Multiple elution steps increase recovery**

3 µg of a 5 kbp fragment were purified from standard PCR buffer and eluted 1, 2 or 3 times with 20 or 30 µL of fresh elution buffer.

If higher DNA concentrations are required, elution volumes < 30 µL can be used. Keep in mind that although the concentration can be more than doubled (Figure 5 A), total DNA recovery will be significantly reduced for volumes < 15 µL (Figure 5 B). For large DNA fragments and results after gel extraction, the losses may be even more pronounced.

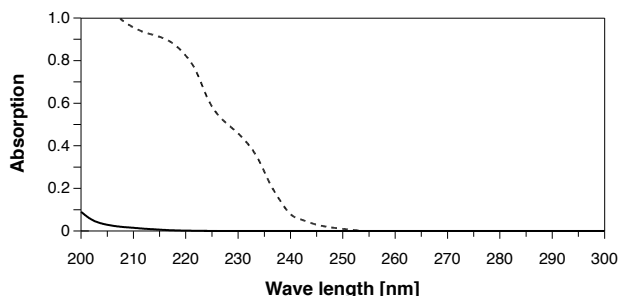


**Figure 5: Elution volume dependent DNA recovery and concentration**

2 µg of 100 bp DNA ladder (Fermentas) were purified from standard PCR buffer and eluted with increasing volumes.

## 2.7 Salt carry-over and low $A_{260}/A_{230}$

The silica membrane technology to purify RNA or DNA is based on the ability of chaotropic salts to destroy the water shell around nucleic acids. Two commonly used chaotropic salts are guanidine hydrochloride (GuHCl) and guanidinium thiocyanate (GuSCN). In solution they both have the same guanidinium cation but different anions. These anions are not only responsible for their different behavior towards nucleic acids but also for their different UV absorption spectra. GuHCl exhibits only minimal absorption < 220 nm even at a concentration of 1 M, whereas GuSCN already shows significant absorption < 240 nm (1 mM, Figure 6) and even < 260 nm (1 M).

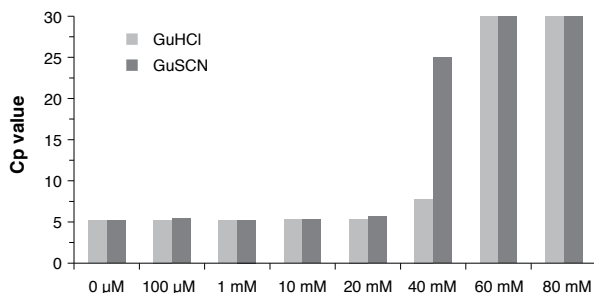


**Figure 6: UV absorption spectra of 1 mM GuHCl (solid line) and 1 mM GuSCN (dotted line)**

Especially the difference in absorption at 230 nm can have a huge impact on the purity ratio  $A_{260}/A_{230}$  if DNA is contaminated with chaotropic salts. Carry-over of GuSCN can lower the ratio from its ideal value of > 2.0 to below 1.5 or even 1.0. GuHCl on the other hand is invisible at this wave length and does not alter the ratio at all. This effect,

however, is only detectable with very small amounts of DNA such as typical yields of PCR reactions or gel extractions. Technical advances in UV-VIS spectrometry now allows measuring these small amounts of DNA in small volumes, thus raising concerns that the DNA might be too “dirty”. However, this problem does not usually occur with larger amounts of DNA since its own absorption at 230 nm masks small contributions of any contamination.

The concentration of contaminating chaotropic salt is usually in the range of 100  $\mu$ M to 1 mM and does not have any negative influence on enzymatic downstream applications, for example, PCR, restriction or ligation. Figure 7 shows qPCR inhibition by GuSCN and GuHCl, demonstrating that PCR only starts to be inhibited by chaotropic salts with approximately a 100-fold higher concentration (40 mM). In addition, it distinctly shows that not only can GuSCN cause inhibition, but also that photometrically invisible GuHCl can as well.



**Figure 7: qPCR inhibition by GuHCl (light gray) and GuSCN (dark gray)**

A 164 bp DNA fragment was amplified from 5 ng pBS template with DyNAmo Capillary Master Mix (NEB) in a Lightcycler real-time PCR machine (Roche) in the presence of 0–80 mM GuHCl or GuSCN.

Salt carry-over always happens, with both GuSCN and GuHCl, and could only be minimized by extensive washing. This, however, is unnecessary, since the final concentration of chaotropic salt in eluates is much too small to have any negative effect. As a result, a non-ideal  $A_{260}/A_{230}$  can simply be ignored.

### 3 Storage conditions and preparation of working solutions

**Attention:**

*Buffer NT1 contains chaotropic salt. Wear gloves and goggles!*

*CAUTION: Buffer NT1 contains guanidinium thiocyanate which can form highly reactive compounds when combined with bleach (sodium hypochlorite). DO NOT add bleach or acidic solutions directly to the sample-preparation waste.*

Storage conditions:

- The **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** kit should be stored at room temperature and is stable for at least one year.

Before starting any **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** protocol prepare the following:

- **Wash Buffer NT3:** Add the indicated volume of ethanol (96–100%) to **Buffer NT3 Concentrate**. Mark the label of the bottle to indicate that ethanol was added. Wash Buffer NT3 is stable at room temperature (18–25 °C) for at least one year.

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up			
REF	10 preps 740609.10	50 preps 740609.50	250 preps 740609.250
Wash Buffer NT3 (Concentrate)	6 mL Add 24 mL ethanol	20 mL Add 80 mL ethanol	2 x 50 mL Add 200 mL ethanol to each bottle

## 4 Safety instructions

The following components of the **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** kits contain hazardous contents. *Wear gloves and goggles and follow the safety instructions given in this section.*

### 4.1 Risk and safety phrases

Component	Hazard contents	Hazard symbol	Risk phrases	Safety phrases
<i>Inhalt</i>	<i>Gefahrstoff</i>	<i>Gefahrstoff-symbol</i>	<i>R-Sätze</i>	<i>S-Sätze</i>
NTI	Guanidinium thiocyanate <i>Guanidiniumthiocyanat</i>	✘ Xn*	R 20/21/22-32-52/53	S 13-61

#### Risk phrases

- R 20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin, and if swallowed.  
*Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.*
- R 32 Contact with acids liberates very toxic gas.  
*Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.*
- R 52/53 Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.  
*Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.*

#### Safety phrases


- S 13 Keep away from food, drink, and animal feedstuffs.  
*Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.*
- R 61 Avoid release to the environment. Refer to special instructions / safety data sheet.  
*Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.*

\* Hazard labeling not necessary if quantity per bottle below 125 g or mL (certificate of exemption according to 67/548/EEC Art. 25, 1999/45/EC Art. 12 and German GefStoffV § 20 (3) and TRGS 200 7.1). For further information see Material Safety Data Sheet.



## 4.2 GHS classification

Only harmful features must not be labeled with H and P phrases until 125 mL or 125 g.  
*Mindergefährliche Eigenschaften müssen bis 125 mL oder 125 g nicht mit H- und P-Sätzen gekennzeichnet werden.*

Component	Hazard contents	GHS symbol	Hazard phrases	Precaution phrases
<i>Inhalt</i>	<i>Gefahrstoff</i>	<i>GHS Symbol</i>	<i>H-Sätze</i>	<i>P-Sätze</i>
NTI	Guanidinium thiocyanate 30–60 % <i>Guanidiniumthiocyanat 30–60 %</i>	 Warning <i>Achtung</i>	302, 412, EUH031	260, 273, 301+312, 330

### Hazard phrases

- H 302 Harmful if swallowed.  
*Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.*
- H 412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.  
*Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.*
- EUH 031 Contact with acids liberates toxic gas.  
*Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Säure.*

### Precaution phrases

- P 260 Do not breathe vapours.  
*Dampf nicht einatmen.*
- P 272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.  
*Freisetzung in die Umwelt vermeiden.*
- P 301+312 IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor /physician if you feel unwell.  
*Bei VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.*
- P 330 Rinse mouth.  
*Mund ausspülen.*

For further information please see Material Safety Data Sheets ([www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)).  
*Weiterführende Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern ([www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)).*

## 5 Protocols

### 5.1 PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as DNA concentration and removal of salts, enzymes, etc. from enzymatic reactions (SDS < 0.1 %).

#### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

#### 1 Adjust DNA binding condition

*For very small sample volumes < 30 µL adjust the volume of the reaction mixture to 50–100 µL with water.  
It is not necessary to remove mineral oil.*

Mix **1 volume of sample** with **2 volumes of Buffer NT1** (e.g., mix 100 µL PCR reaction and 200 µL Buffer NT1).

*Note: For removal of small fragments like primer dimers dilutions of Buffer NT1 can be used instead of 100% Buffer NT1. Please refer to section 2.3.*



**+ 2 vol NT1  
per  
1 vol sample**

#### 2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column** into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.



**Load sample**



**11,000 x g  
30 s**

#### 3 Wash silica membrane

Add **700 µL Buffer NT3** to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

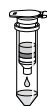


**+ 700 µL NT3**



**11,000 x g  
30 s**

**Recommended:** Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and improve  $A_{260}/A_{230}$  values (see section 2.7 for detailed information).



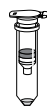
+ 700  $\mu$ L NT3



11,000 x g  
30 s

#### 4 Dry silica membrane

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove **Buffer NT3** completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



*Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.*



11,000 x g  
1 min

#### 5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a **new** 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–30  $\mu$ L Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



+ 15–30  $\mu$ L NE

RT  
1 min

*Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.*



11,000 x g  
1 min

## 5.2 DNA extraction from agarose gels

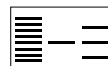
### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

### 1 Excise DNA fragment/solubilize gel slice

*Note: Minimize UV exposure time to avoid damaging the DNA. Refer to section 2.5 for more tips on agarose gel extraction.*

Take a clean scalpel to excise the DNA fragment from an agarose gel. Remove all excess agarose.



Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

For each **100 mg of agarose gel < 2%** add **200 µL Buffer NT1**.

For gels containing > 2% agarose, double the volume of Buffer NT1.

Incubate sample for **5–10 min** at **50 °C**. Vortex the sample briefly every 2–3 min until the gel slice is **completely** dissolved!



**+ 200 µL NT1  
per  
100 mg gel**

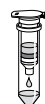
**50 °C  
5–10 min**

### 2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column** into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.



**Load sample**



**11,000 x g  
30 s**

### 3 Wash silica membrane

Add **700 µL Buffer NT3** to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

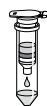


**+ 700 µL NT3**



**11,000 x g  
30 s**

**Recommended:** Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and low  $A_{260}/A_{230}$  (see section 2.7 for detailed information).



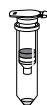
+ 700  $\mu$ L NT3



11,000 x g  
30 s

#### 4 Dry silica membrane

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove **Buffer NT3** completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



*Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.*



11,000 x g  
1 min

#### 5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a **new** 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–30  $\mu$ L Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



+ 15–30  $\mu$ L NE

RT  
1 min

*Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.*



11,000 x g  
1 min

### 5.3 DNA extraction from polyacrylamide gels

In polyacrylamide gels, the acrylamide monomers are covalently linked in a chemical reaction. Therefore, the gel cannot be dissolved like agarose gels to extract the trapped DNA.

Polyacrylamide gels are usually extracted by the “crush and soak” method where a small piece of gel is crushed and incubated in a diffusion buffer. The DNA is then allowed to passively diffuse out of the gel and is then purified from the diffusion buffer. The **diffusion buffer** (500 mM ammonium acetate, pH 8.0, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, 10 mM magnesium acetate) is not provided with the kit.

#### 1 Prepare sample

Excise the DNA fragment with a scalpel or razor blade in a minimal amount of polyacrylamide. Weigh the gel slice and transfer it to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

**Excise DNA fragment**

#### 2 Crush gel

Crush the gel slice using a disposable pipette tip with a melted end to resemble a pestle for the microcentrifuge tube “mortar”. The smaller the pieces, the better the DNA recovery.

**Crush gel slice**

#### 3 Extract DNA

Add **200 µL of diffusion buffer** to each **100 mg** of crushed gel. Make sure that all gel pieces are submerged in diffusion buffer.

Incubate for **30–60 min** at **50 °C** or **over night** at **37 °C**.

**50 °C**  
**30–60 min**  
  
**or**  
  
**37 °C**  
**over night**

#### 4 Remove polyacrylamide

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g** to pellet the polyacrylamide and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (not provided).



**11,000 x g**  
**1 min**

**Transfer supernatant**

Alternatively, transfer the mixture to a **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column** and centrifuge **1 min** at **14,000 x g** to retain the gel on the column. Keep the flow-through which contains the DNA!



**11,000 x g**  
**1 min**

**Keep flow-through**

*Optional: To increase the final yield, repeat step 3 and 4 and combine both supernatants or flow-throughs.*



---

**5 Adjust DNA binding condition**

Mix **1 volume** of sample with **2 volumes** of **Buffer NTI**.  
(e.g., 200 µL diffusion buffer and 400 µL of Buffer NTI).

Small amounts of precipitating SDS do not influence the purification. Do not remove the precipitate.

*Note: To obtain higher yields for small fragments < 50 bp add two volumes of ethanol or use Buffer NTC instead of Buffer NTI. Buffer NTC is not provided with the kit but can be ordered separately (see ordering information).*

**+ 2 vol NTI  
per 1 vol  
sample**

***Optional:***  
**+ 2 vol  
ethanol**

**or**

**+ 2 vol NTC  
per 1 vol  
sample**

---

**6 Bind DNA**

Continue with **step 2** of the protocol for PCR clean-up  
(section 5.1).

---

## 5.4 RNA extraction from agarose gels (Buffer NTC)

Not only DNA but also RNA can be extracted from agarose gels. To efficiently bind especially the small, single stranded RNA, **Binding Buffer NTC** has to be used instead of standard Binding Buffer NT1.

To fractionate RNA, run a standard RNA gel with denaturing RNA loading buffer, but **do not use formaldehyde or glyoxal**. These compounds not only inactivate RNases and denature RNA, but also modify RNA. As a result, the RNA yield is significantly reduced and more important the RNA may not work properly in enzymatic downstream applications, such as RT-PCR or *in vitro* transcriptions.

Without formaldehyde, the RNA is very sensitive to contaminating RNases. Use gloves and make sure all equipment is RNase-free, especially the agarose, and the running buffers. Run the gel as short and as cold (low voltage, cold room) as possible. Note that the RNA may form secondary structures and may run differently from denaturing agarose gels.

**Note:** Buffer NTC has to be ordered separately (100 mL Buffer NTC, REF 740654.100, see ordering information)

### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

#### 1 Excise RNA fragment/solubilize gel slice

*Note: Minimize UV exposure time to avoid damaging the RNA. Refer to section 2.5 for more tips on agarose gel extraction.*

Take a clean scalpel to excise the RNA fragment from an agarose gel. Remove all excess agarose.

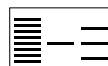


Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

For each **100 mg of agarose gel < 2%** add **200 µL Buffer NTC**.

For gels containing **> 2%** agarose, double the volume of Buffer NTC.

Incubate sample for **5–10 min** at **50 °C**. Vortex the sample briefly every 2–3 min until the gel slice is **completely** dissolved!



**+ 200 µL NTC  
per  
100 mg gel**

**50 °C  
5–10 min**

#### 2 Bind RNA

Continue with **step 2** of the protocol for DNA extraction from agarose gels (section 5.2).



## 5.5 DNA clean-up of samples containing SDS (Buffer NTB)

Buffer NTI, from the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit, is compatible with most commonly used detergents with the exception sodium dodecyl sulfate (SDS). For purification of DNA from samples without SDS the standard protocol for PCR clean-up can be used (see section 5.1). For purification of DNA from SDS containing buffers, for example in applications like “Chromatin Immunoprecipitation” (ChIP), the SDS compatible Binding Buffer NTB can be used.

**Note:** Buffer NTB has to be ordered separately (150 mL Buffer NTB, REF 740595.150, see ordering information).

### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

---

#### 1 Adjust DNA binding condition

Mix **1 volume of sample** with **5 volumes of Buffer NTB** (e.g., 100 µL reaction mix with 500 µL Buffer NTB).

*Note: If SDS starts to precipitate add 1 volume of isopropanol or warm sample to 20–30 °C.*



**+ 5 vol NTB  
per  
1 vol sample**

---

#### 2 Bind DNA

Continue with **step 2** of the protocol for PCR clean-up (section 5.1).

---

## 5.6 Single stranded DNA clean-up (Buffer NTC)

Buffer NTI, from the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit, is able to bind single stranded DNA (ssDNA) > 150 bases. Shorter oligonucleotides, especially primers, are completely removed. If you need to purify short ssDNA, the additional Binding Buffer NTC can be used (see Figure 8).

**Note:** Buffer NTC has to be ordered separately (100 mL Buffer NTC, REF 740654.100, see ordering information).

### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

### 1 Adjust DNA binding condition

Mix **1 volume of sample** with **2 volumes of Buffer NTC** (e.g., 100 µL PCR reaction mix and 200 µL Buffer NTC).

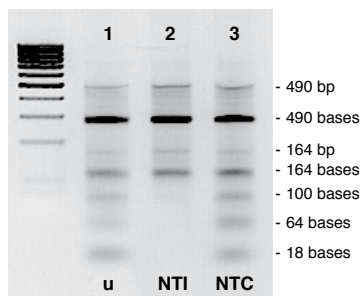
*If your sample contains large amounts of detergents or other critical substances, double the volume of Buffer NTC.*



**+ 2 vol NTC  
per  
1 vol sample**

### 2 Bind DNA

Continue with **step 2** of the protocol for PCR clean-up (section 5.1).



**Figure 8: Purification of dsDNA and ssDNA using buffers NTI and NTC**

PCR fragments, amplified using one phosphorylated and one dephosphorylated primer, were partially digested with  $\lambda$ -Exonuclease to yield single stranded DNA. Samples were purified using Binding Buffer NTI and NTC and run on a 1 % TAE agarose gel. Remaining double stranded DNA can be seen as faint bands. The corresponding single stranded DNA is running slightly faster due to secondary structure formation. Compared to the input DNA (u, lane 1), Buffer NTI removes ssDNA < 150 bases (NTI, lane 2), whereas Buffer NTC leads to full recovery of even primer oligonucleotides (NTC, lane 3).

## 6 Appendix

### 6.1 Troubleshooting

Problem	Possible cause and suggestions
Incomplete dissolving of gel slice	<p><i>Time and temperature</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Check incubation temperature and volume of Buffer NT1. Increase incubation time. Vortex every 2 min and check integrity of the gel slice. Very large gel slices can be crushed before addition of Buffer NT1 to shorten the melting time.</li> </ul>
	<p><i>Reagents not prepared properly</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Add indicated volume of 96–100% ethanol to Buffer NT3 Concentrate and mix well before use.</li> </ul>
	<p><i>Incompletely dissolved gel slice</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase time or add another two volumes of Buffer NT1 and vortex the tube every 2 minutes during incubation at 50 °C. Small pieces of gel are hardly visible and contain DNA that will be lost for purification.</li> </ul>
Low DNA yield	<p><i>Insufficient drying of the <b>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</b> silica membrane</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifuge 5 min at 11,000 x <i>g</i> or incubate column for 2–5 min at 70 °C before elution to remove ethanolic Buffer NT3 completely. Ethanolic contaminations are also indicated by gel-loading problems (samples float out of gel slots). Remove the spin cup carefully from the centrifuge and collection tube and avoid contact of spin cup with flow-through.</li> </ul>
	<p><i>Incomplete elution</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Especially for larger amounts of DNA (&gt; 5 µg), long DNA fragments (&gt; 1000 bp), or after gel extraction, do multiple elution steps with fresh buffer, heat to 70 °C, and incubate for 5 min. See section 2.6 for detailed information.</li> </ul>

Problem	Possible cause and suggestions
---------	--------------------------------

---

Appearance of additional bands on agarose gel after gel extraction

*DNA was denatured during purification*

- In case where water is used for elution or agarose with a low ion content is used for agarose gel electrophoresis, the formation of denatured (single-stranded) DNA might be promoted. To re-anneal the DNA, add all components of the subsequent enzymatic reaction omitting the enzyme. Incubate at 95 °C for 2 min and let the mixture cool slowly to room temperature (at this step the DNA re-anneals). Add the enzyme and continue with your downstream application.
  - Use fresh running buffer and run at low voltage to lower the temperature. High temperature might promote DNA denaturation during electrophoresis.
- 

Suboptimal performance of DNA in sequencing, restriction, or ligation reactions

*Carry-over of ethanol / ethanolic Buffer NT3*

- Before elution, centrifuge 5 min at 11,000 x *g* or incubate column for 5–10 min at 70 °C to remove ethanolic Buffer NT3 completely. Ethanolic contaminations are also indicated by gel loading problems (samples float out of gel slots). Remove the spin cup carefully from the centrifuge and collection tube without having the spin cup make contact with the flow-through.
- Use either a different brand of ethanol to reconstitute Buffer NT3 or ethanol that is not denatured. The denaturing components may not evaporate as fast as ethanol and end up concentrated in the eluate, inhibiting enzymes like ligase.

*Carry-over of chaotropic salts*

- Perform the optional washing step.
- Additionally, 250 µL NT3 can be loaded before the drying step. (**Note:** The volume of Buffer NT3 included in the kit is not sufficient for this modification for all preparations but can be ordered separately, see ordering information.)

*Elution of DNA with buffers other than Buffer NE, for example TE buffer (Tris/EDTA)*

- EDTA might inhibit sequencing reactions. In this case it is recommended to re-purify DNA and elute in Buffer NE or water.

*Not enough DNA used for sequencing reaction*

- Quantify DNA by agarose gel electrophoresis before setting up sequencing reactions.
-

Problem	Possible cause and suggestions
Suboptimal performance of DNA in sequencing, restriction, or ligation reactions <i>(continued)</i>	<i>DNA was damaged by UV light</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce UV exposure time to a minimum when excising a DNA fragment from an agarose gel.</li> </ul>
Suboptimal performance of DNA in NanoDrop® Spectrophotometer Analysis or Agilent's Bioanalyzer	<i>Carry-over of traces of silica particles</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NanoDrop® Spectrophotometer technology is very sensitive to any particles included in the sample material. To pellet the silica particles centrifuge &gt; 2 min at 11,000 x g and take the supernatant for further use.</li> </ul>
Low ratio $A_{260}/A_{230}$	<i>Carry-over of chaotropic salts</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Refer to detailed troubleshooting “Suboptimal performance of DNA in sequencing, restriction, or ligation reactions - Carry-over of chaotropic salts” and see section 2.7 for detailed information.</li> </ul>

## 6.2 Ordering information

Product	REF	Pack of
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	740609.10/.50/.250	10/50/250
Buffer NT1	740305.120	120 mL
Buffer NTB	740595.150	150 mL
Buffer NTC	740654.100	100 mL
Buffer NT3 Concentrate (for 100 mL Buffer NT3)	740598	20 mL
Collection Tubes (2 mL)	740600	1000
NucleoTrap®	740584.10/.50/.250	10/50/250
NucleoTrap®CR	740587.10/.50/.250	10/50/250

Visit [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) for more detailed product information.

## 6.3 References

**Vogelstein B., and D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 615-619.

## 6.4 Product use restriction/warranty

**NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** kit components are intended, developed, designed, and sold FOR RESEARCH PURPOSES ONLY, except, however, any other function of the product being expressly described in original MACHEREY-NAGEL product leaflets.

MACHEREY-NAGEL products are intended for GENERAL LABORATORY USE ONLY! MACHEREY-NAGEL products are suited for QUALIFIED PERSONNEL ONLY! MACHEREY-NAGEL products shall in any event only be used wearing adequate PROTECTIVE CLOTHING. For detailed information please refer to the respective Material Safety Data Sheet of the product! MACHEREY-NAGEL products shall exclusively be used in an ADEQUATE TEST ENVIRONMENT. MACHEREY-NAGEL does not assume any responsibility for damages due to improper application of our products in other fields of application. Application on the human body is STRICTLY FORBIDDEN. The respective user is liable for any and all damages resulting from such application.

DNA/RNA/PROTEIN purification products of MACHEREY-NAGEL are suitable for *IN VITRO*-USES ONLY!

ONLY MACHEREY-NAGEL products specially labeled as IVD are also suitable for *IN VITRO*-diagnostic use. Please pay attention to the package of the product. *IN VITRO*-diagnostic products are expressly marked as IVD on the packaging.

IF THERE IS NO IVD SIGN, THE PRODUCT SHALL NOT BE SUITABLE FOR *IN VITRO*-DIAGNOSTIC USE!

ALL OTHER PRODUCTS NOT LABELED AS IVD ARE NOT SUITED FOR ANY CLINICAL USE (INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO DIAGNOSTIC, THERAPEUTIC AND/OR PROGNOSTIC USE).

No claim or representations is intended for its use to identify any specific organism or for clinical use (included, but not limited to diagnostic, prognostic, therapeutic, or blood banking). It is rather in the responsibility of the user or - in any case of resale of the products - in the responsibility of the reseller to inspect and assure the use of the DNA/RNA/protein purification products of MACHEREY-NAGEL for a well-defined and specific application.

MACHEREY-NAGEL shall only be responsible for the product specifications and the performance range of MN products according to the specifications of in-house quality control, product documentation and marketing material.

This MACHEREY-NAGEL product is shipped with documentation stating specifications and other technical information. MACHEREY-NAGEL warrants to meet the stated specifications. MACHEREY-NAGEL's sole obligation and the customer's sole remedy is limited to replacement of products free of charge in the event products fail to perform as warranted. Supplementary reference is made to the general business terms and conditions of MACHEREY-NAGEL, which are printed on the price list. Please contact us if you wish to get an extra copy.

There is no warranty for and MACHEREY-NAGEL is not liable for damages or defects arising in shipping and handling (transport insurance for customers excluded), or

out of accident or improper or abnormal use of this product; defects in products or components not manufactured by MACHEREY-NAGEL, or damages resulting from such non-MACHEREY-NAGEL components or products.

MACHEREY-NAGEL makes no other warranty of any kind whatsoever, and SPECIFICALLY DISCLAIMS AND EXCLUDES ALL OTHER WARRANTIES OF ANY KIND OR NATURE WHATSOEVER, DIRECTLY OR INDIRECTLY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, AS TO THE SUITABILITY, REPRODUCTIVITY, DURABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR USE, MERCHANTABILITY, CONDITION, OR ANY OTHER MATTER WITH RESPECT TO MACHEREY-NAGEL PRODUCTS.

In no event shall MACHEREY-NAGEL be liable for claims for any other damages, whether direct, indirect, incidental, compensatory, foreseeable, consequential, or special (including but not limited to loss of use, revenue or profit), whether based upon warranty, contract, tort (including negligence) or strict liability arising in connection with the sale or the failure of MACHEREY-NAGEL products to perform in accordance with the stated specifications. This warranty is exclusive and MACHEREY-NAGEL makes no other warranty expressed or implied.

The warranty provided herein and the data, specifications and descriptions of this MACHEREY-NAGEL product appearing in MACHEREY-NAGEL published catalogues and product literature are MACHEREY-NAGEL's sole representations concerning the product and warranty. No other statements or representations, written or oral, by MACHEREY-NAGEL's employees, agent or representatives, except written statements signed by a duly authorized officer of MACHEREY-NAGEL are authorized; they should not be relied upon by the customer and are not a part of the contract of sale or of this warranty.

Product claims are subject to change. Therefore please contact our Technical Service Team for the most up-to-date information on MACHEREY-NAGEL products. You may also contact your local distributor for general scientific information. Applications mentioned in MACHEREY-NAGEL literature are provided for informational purposes only. MACHEREY-NAGEL does not warrant that all applications have been tested in MACHEREY-NAGEL laboratories using MACHEREY-NAGEL products. MACHEREY-NAGEL does not warrant the correctness of any of those applications.

Last updated: 07/2010, Rev. 03

Please contact:  
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  
Tel.: +49 24 21 969-270  
[e-mail: tech-bio@mn-net.com](mailto:tech-bio@mn-net.com)

**Trademarks:**

NanoDrop® is a registered trademark of NanoDrop Technologies, Inc.

NucleoSpin® is a registered trademark of MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

Roti® is a registered trademark of Carl Roth GmbH & Co. KG

All used names and denotations can be brands, trademarks, or registered labels of their respective owner – also if they are not special denotation. To mention products and brands is only a kind of information (i.e., it does not offend against trademarks and brands and can not be seen as a kind of recommendation or assessment). Regarding these products or services we can not grant any guarantees regarding selection, efficiency, or operation.