



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

## **Masteroppgave 2019 30 stp**

Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap  
Hovedveileder: Anne-Grethe Johansen

# **Effekt av vasketid på kjemisk-, fysisk- og mikrobiell renhet av keramiske MF-membraner og sensitiviteten til *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager ovenfor alkaliske vaskemidler**

Effect of cleaning time on chemical, physical and microbial cleanliness of ceramic MF-membranes and the sensitivity of *Lactococcus lactis* specific bacteriophages to alkaline detergents

Morten Lønvik

Matvitenskap – Matvaretrygghet, kvalitet og- hygiene



## Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet som en avsluttende del av mastergradsstudiet i matvitenskap ved fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Jeg vil rette en stor takk til hovedveileder Anne-Grethe Johansen og biveileder Elling-Olav Rukke for god veiledning gjennom hele perioden med gode innspill til den faglige delen av oppgaven. Men også for gjennomlesing og for gode innspill underveis til den strukturelle delen av oppgaven.

Når det gjelder den praktiske delen av oppgaven vil jeg vil takke May Helene Aalberg og Ahmed Abdelghani for god hjelp til gjennomføring av arbeidet på laboratoriet. Og ikke minst vil jeg takke Ola Tjåland for god hjelp i gjennomføringen av arbeidet i pilotanlegget ved NBMU. Samtidig ønsker jeg også å takke Helge Holo for utleverte medier, bakteriekultur og bakteriofagprøver til oppgaven. Men også på grunn av gode tips og innspill til analysene for innholdet av bakteriofager.

Jeg ønsker også å takke TINE for økonomisk støtte til gjennomføring av denne oppgaven, samtidig som jeg også vil takke TINE Meieriet Jæren for kjernemelk til filtreringsforsøk.

Til slutt ønsker jeg å takke min gode venn Erik Trøen for hjelp med figurer til resultat kapittelet. I tillegg vil jeg takke venner og familie for god støtte i løpet av denne perioden. Spesielt støtten jeg fikk fra mine gode venner i kollektivet. Uten dere hadde denne perioden blitt tyngre. Tusen takk til dere alle!

Ås, mai 2019

---

Morten Lønvik

## Sammendrag

En god rengjøring av MF-membraner er viktig for å sikre trygg produksjon av fraksjoner av melk og kjernemelk. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke effekten ulike råstoffer og vaskeprosedyrer hadde på den kjemiske-, fysiske- og mikrobielle renheten til keramiske MF-membraner. I tillegg ble toleransen til *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager ovenfor alkaliske vaskemidler undersøkt på grunn av hypotesen som påsto at lut kan eliminere bakteriofag.

Skummet melk og kjernemelk ble mikrofiltrert ved å bruke en keramisk MF-membran med porestørrelse på 0,14 µm til konsentrering av protein. Målet med filtreringsforsøkene var å konsentrere skummet melk til 8 % protein, og skummet kjernemelk til 6 % protein. Det ble totalt gjennomført åtte filtreringsforsøk, fordelt på fire blokker. Både skummet melk og kjernemelk ble mikrofiltrert ved fire av forsøkene. Mikrofiltreringsforløpet ble vurdert gjennom registrering av parametere som temperatur, trykk og flow. Basert på disse registreringene ble parameterne transmembrantrykk (TMP) og permeat flux beregnet. Hvert filtreringsforsøk ble etterfulgt av en vaskeprosedyre. Membranen ble vasket ved å alternere mellom to ulike vaskeprosedyrer, hvor forskjellen mellom disse to vaskeprosedyrene var sirkuleringstiden for kjemikaliene. Den ene vaskeprosedyren var den originale vaskeprosedyren, som mikrofiltreringsanlegget ved pilotanlegget ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ble vasket med til vanlig. På bakgrunn av industriell vask av MF-membraner, ble den alternative vaskeprosedyren utviklet. Sirkuleringstiden for kjemikaliene ved denne prosedyren var halvert sammenlignet med den originale prosedyren. Begge vaskeprosedyrene ble benyttet etter fire filtreringsforsøk. Hvor de ble benyttet etter to runder med filtrering av både skummet melk og kjernemelk.

Det ble tatt ut prøver av skummet melk og kjernemelk, retentat, permeat og av skyllevann (før og etter rengjøring av mikrofiltreringsanlegget). For å undersøke den mikrobielle sammensetningen til prøvene ble det gjennomført flere analyser. Den mikrobielle kvaliteten ble undersøkt gjennom innholdet av mesofile mikroorganismer, psykrotrofe mikroorganismer, bakteriofager og sporedannende mikroorganismer (aerobe og anaerobe). Vurderingen av den kjemiske sammensetningen til prøvene ble gjennomført ved å analysere innholdet av brix (løselig tørrstoff), tørrstoff, protein og mineraler. I tillegg ble pH målt. Prøvene av skyllevannet etter vask ble analysert for å få en indikasjon på den mikrobielle og kjemiske

renheten til membranen. På grunn av påstanden om at bakteriofag kunne elimineres av lut, ble toleransen *Lactococcus lactis* spesifikke fager hadde til alkaliske vaskemidler undersøkt gjennom en stresstest. En utvalgt bakteriofagprøve ( $\phi$ -Voss 15.00) som var spesifikk mot melkesyrebakterier ble dyrket opp, og toleransen for lut ble undersøkt gjennom å utsette fag for ulike konsentrasjoner av et alkalisk vaskemiddel brukt til vasking av MF-membraner. Konsentrasjonen til vaskemiddelet ble undersøkt i kombinasjon med ulike sirkuleringstider.

Resultatene viste at de fleste mikrobielle indikatorene med unntak av bakteriofager og psykotrofe mikroorganismer var tilstede i prøvene av skummet melk og kjernemelk. Samtidig viste de fleste resultatene at separeringsprosessen var god med tanke på at bakterier i henhold til teori skal holdes igjen av MF-membraner. I tillegg til at permeatet i høy grad skal være fri for mikroorganismer. Skyllenvannet etter endt vask viste til lave kimtall og ble antatt å ha en god mikrobiell renhet. Resultatene viste til en forventet endring av den kjemiske sammensetningen til skummet melk og kjernemelk i retentatet og permeatet, hvor innholdet av tørrstoff, brix og protein økte i retentatet og ble redusert i permeatet. Separeringsprosessen viste ikke til samme effekt på endringen i mineralinnhold, men denne endringen var ikke forventet for alle mineralene. Økningen av blant annet protein- og kalsium i retentatet, ga økt bufferkapasitet i retentatet. På grunn av denne økningen var det mulig å forvente pH-økning i retentatet, men dette var ikke alltid tilfellet. Som forventet var det ikke bakteriofager tilstede i prøvene som ble tatt ut i forbindelse med filtreringsforsøkene. Analysen for bakteriofagenes toleranse til alkaliske vaskemidler viste ingen plakkdannelse, og det kunne dermed tyde på at fag ble eliminert av alkaliske vaskemidler.

Det ble konkludert med at effekten av å alternere mellom vaskeprosedyrer ikke ga signifikante forskjeller med tanke på renhet. Den alternative vaskeprosedyren viste i likhet med den originale vaskeprosedyren å gi god kjemisk-, fysisk og mikrobiell renhet. På bakgrunn av disse resultatene ble det med forbehold konkludert med at det kan være mulig å redusere sirkulasjonstiden til kjemikaliene, og fortsatt gi tilstrekkelig og god renhet. Det ble også konkludert med at *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager ble eliminert av alkaliske vaskemidler. På bakgrunn av få publikasjoner og usikkerheter ved metoden, ble det anbefalt videre forskning. Slik at toleransen slike bakteriofager har til alkaliske vaskemidler i større grad ble kartlagt.

## Abstract

A good cleaning of MF-membranes is important to ensure safe production of fractions of milk and buttermilk. The aim of this thesis was to investigate the effect of various raw materials and cleaning procedures on the chemical-, physical- and microbial cleanliness of ceramic MF-membranes. In addition, the tolerance of *Lactococcus lactis* specific bacteriophages to alkaline detergents was investigated due to the hypothesis that lye may eliminate bacteriophages.

Skimmed milk and buttermilk were microfiltered using a 0,14 µm ceramic MF-membrane to concentrate protein. The goal of the filtration experiments was to concentrate skimmed milk to 8 % protein, and skimmed buttermilk to 6 % protein. A total of eight filtration experiments were carried out, divided into four blocks. Both skimmed milk and buttermilk were microfiltered by four of the filtration experiments. The microfiltration process was assessed by registration parameters such as temperature, pressure and flow. Based on these registrations, parameters such as transmembrane pressure (TMP) and permeate flux were calculated. Each filtration experiments were followed by a cleaning procedure. The membrane was cleaned by alternating between two different cleaning procedures, the difference between these two cleaning procedures being the circulation time of each detergents. One of the cleaning procedures, was the original procedure, which the microfiltration plant at the Norwegian University of Life Sciences (NMBU), usually was cleaned with. Based on industrial cleaning of MF-membranes, the alternative cleaning procedure was developed. The circulation of the chemicals in this procedure was halved compared to the original procedure. Both cleaning procedures were used after four cleaning experiments. They were used after two rounds of filtration of both skimmed milk and buttermilk.

Samples of skimmed milk and buttermilk, retentate, permeate and rinse water (before and after cleaning the microfiltration plant) were collected. To analyze the microbial composition of the samples, several analyses were performed. The microbial quality was examined through the content of mesophilic microorganisms, psychrotropic microorganisms, bacteriophages and spore forming microorganisms (aerobic and anaerobic). The evaluation of the chemical composition of the samples, was carried out by analyzing for the content of brix (soluble solids), dry matter, protein and minerals. In addition, the pH was measured. The samples of the rinse water cleaning were analyzed to give an indication of the microbial and

chemical cleanliness of the membrane. Due to the claim that bacteriophage could be eliminated by lye, the tolerance of *Lactococcus lactis* specific phage to alkaline detergents was examined through a stress test. A selected bacteriophage sample ( $\phi$ -Voss 15.00) specific to lactic acid bacteria was cultured and the tolerance for lye was examined by exposing phage to various concentrations of an alkaline detergent used for cleaning MF-membranes. The concentration of the detergent was investigated in combination with different circulation times.

The results showed that most microbial indicators with the exception of bacteriophage and psychrotrophic microorganisms were present in the samples of skimmed milk and buttermilk. Simultaneously, most results showed that the separation process was good considering that bacteria according to theory should be retained by MF-membranes. In addition, the permeate must be highly free of microorganisms. The rinse water after cleaning was shown to have low colony counts and was assumed to have a good microbiological cleanliness. The results indicated an expected change in the chemical composition of skimmed milk and buttermilk in the retentate and permeate, where the dry matter, brix and protein content increased in the retentate and decreased in the permeate. The separation process did not show the same effect on the change in mineral content, but this change was not expected for all minerals. The increase of protein and calcium in the retentate, among other things, increased the buffer capacity in the retentate. Due to this increase, it was possible to expect pH increase in the retentate, but this was not always the case. As expected, bacteriophages were not present in the samples collected during the filtration experiments. The analysis of bacteriophage tolerance to alkaline detergents showed no plaque formation, and it could thus indicate that phage was eliminated by alkaline detergents.

It was concluded that the effect of alternating between cleaning procedures did not give significant differences in terms of cleanliness. The alternative cleaning procedure, like the original cleaning procedure, showed good chemical, physical and microbial cleanliness. Based on these results, it was provisionally concluded that it may be possible to reduce the circulation time of the chemicals, and still provide sufficient and good cleanliness. It was also concluded that *Lactococcus lactis* specific bacteriophages were eliminated by alkaline detergents. However, due to few publications and uncertainties in the method, further research was recommended. So that the tolerance of such bacteriophages to alkaline detergents was more widely mapped.

## Forkortelser

Mikrofiltrering	MF
Konsentrasjonsfaktor	CF
Transmembrantrykk	TMP
Kolonidannende enheter	Kde
Plakkdannende enheter (Plaque forming units)	PFU
Most probable number	MPN
Plate Count Agar	PCA
Brain Heart Infusion	BHI
Reinforced Clostridial Medium	RCM
Fourier-transform infrared spectroscopy	FTIR
S1	Skyllevann før vask (skyllevann 1)
S2	Skyllevann etter endt vask (skyllevann 2)
S1 <sub>M-R</sub>	Skyllevann 1 etter MF av melk – retentat strøm
S1 <sub>M-P</sub>	Skyllevann 1 etter MF av melk –permeat strøm
S2 <sub>M-R</sub>	Skyllevann 2 etter MF av melk – retentat strøm
S2 <sub>M-P</sub>	Skyllevann 2 etter MF av melk – permeat strøm
S1 <sub>KM-R</sub>	Skyllevann 1 etter MF av kjernemelk – retentat strøm
S1 <sub>KM-P</sub>	Skyllevann 1 etter MF av kjernemelk – permeat strøm
S2 <sub>KM-R</sub>	Skyllevann 2 etter MF av kjernemelk – retentat strøm
S2 <sub>KM-P</sub>	Skyllevann 2 etter MF av kjernemelk – permeat strøm



# Innholdsfortegnelse

<b>1.</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Teori</b> .....	<b>3</b>
2.1	<i>Membranfiltrering</i> .....	3
2.1.1	Konsentrasjonspolarisering og fouling.....	4
2.1.2	Mikrofiltrering (MF) .....	8
2.2	<i>Vask av membranfiltreringsanlegg</i> .....	9
2.2.1	Industriell vask av membraner .....	9
2.2.2	Typisk vaskeprosedyre .....	10
2.2.3	Vaskemidler .....	11
2.3	<i>Melk</i> .....	12
2.3.1	Melkens sammensetning .....	12
2.3.2	Melk som substrat for mikroorganismer .....	14
2.4	<i>Kjernemelk</i> .....	14
2.4.1	Kjernemelkens sammensetning .....	14
2.4.2	Kjernemelk sammenlignet med skummet melk .....	15
2.5	<i>Mikrobielle kontaminanter</i> .....	16
2.5.1	Biofilm .....	17
2.5.2	Bakteriofag .....	18
2.5.3	Sporedannende mikroorganismer .....	21
2.5.4	Psykrotrofe mikroorganismer .....	23
<b>3.</b>	<b>Materialer og metoder</b> .....	<b>25</b>
3.1	<i>Forsøksdesign</i> .....	25
3.2	<i>Mikrofiltrering og vasking</i> .....	26
3.2.1	Melkebehandling .....	26
3.2.2	Mikrofiltrering .....	27
3.2.3	Vasking av mikrofiltreringsanlegget .....	27
3.3	<i>Prøveuttak</i> .....	30
3.4	<i>Mikrobiologiske analyser</i> .....	31
3.4.1	Bakteriofag.....	31
3.4.2	Stresstesting av bakteriofager .....	32
3.4.3	Psykrotrofe mikroorganismer .....	35
3.4.4	Mesofile mikroorganismer .....	36
3.4.5	Anaerobe sporedannere .....	37
3.4.6	Aerobe sporedannere .....	39
3.5	<i>Kjemiske analyser</i> .....	40
3.5.1	Proteininnhold (Kjeldahl).....	40
3.5.2	Tørrestoff (TS).....	40
3.5.3	Brix .....	41
3.5.4	Mineraler .....	41
3.5.5	pH .....	41
3.5.6	Milkoscan (FTIR).....	41
3.6	<i>Statistiske analyser</i> .....	42
<b>4</b>	<b>Resultater</b> .....	<b>43</b>
4.1	<i>Mikrofiltrering</i> .....	43
4.1.1	Vannflux.....	44

4.1.2	Endringen av permeat flux .....	45
4.1.3	Transmembrantrykk (TMP) .....	46
4.1.4	Permeatflow .....	47
4.2	<i>Mikrobiologiske analyser</i> .....	48
4.2.1	Mesofile mikroorganismer .....	48
4.2.2	Psykrotrofe mikroorganismer .....	50
4.2.3	Bakteriofag .....	50
4.2.4	Aerobe sporedannere .....	51
4.2.5	Anaerobe sporedannere .....	53
4.3	<i>Kjemiske analyser</i> .....	55
4.3.1	Tørrstoff (TS) .....	55
4.3.2	Proteininnhold .....	57
4.3.3	pH .....	59
4.3.4	Mineralinnhold .....	60
5	<b>Diskusjon</b> .....	<b>69</b>
5.1	<i>Mikrofiltrering og vask av MF-anlegg</i> .....	69
5.2	<i>Mikrobiologisk sammensetning</i> .....	72
5.2.1	Mikrobiologisk kvalitet i skummet melk før og etter mikrofiltrering, samt etter vask .....	72
5.2.2	Mikrobiologisk kvalitet i skummet kjernemelk før og etter mikrofiltrering, samt etter vask ..	75
5.2.3	Bakteriofag som indikator for mikrobiell kvalitet før og etter mikrofiltrering, og etter vask ..	78
5.3	<i>Kjemisk sammensetning</i> .....	81
5.3.1	Melkens kjemiske sammensetning før og etter mikrofiltrering, samt etter vask .....	81
5.3.2	Kjernemelkens kjemiske sammensetning før og etter mikrofiltrering, samt etter vask .....	85
6	<b>Konklusjon</b> .....	<b>89</b>
7	<b>Forslag til videre arbeid</b> .....	<b>90</b>
8	<b>Referanser</b> .....	<b>92</b>
9	<b>Vedlegg</b> .....	<b>100</b>
	<i>Vedlegg 1</i> .....	101
	<i>Vedlegg 2</i> .....	102

# 1. Innledning

Membranfiltrering er en teknikk hvor en separerer en væske ved hjelp av en semipermeabel membran (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003). Separeringen gir to fraksjoner, der en holdes igjen av membranen (retentat) og en passerer membranen (permeat). Dette er en teknikk som er utbredt og anvendes i flere næringsmiddelindustrier. En skiller mellom fire ulike teknikker; mikrofiltrering (MF), ultrafiltrering (UF), nanofiltrering (NF) og omvendt osmose (RO) (Walstra et al., 2006). Slike separeringsprosesser er viktige i meieriindustrien, spesielt ved framstilling av fermenterte produkter. Mikrofiltrering er en teknikk som blant annet brukes i framstillingen av fermenterte meieriprodukter, slik som løpefelte oster. Ved hjelp av mikrofiltrering av skummet melk kan en fraksjonere kasein, samt fjerne bakterier og sporer (Rosenberg, 1995; Tomasula et al., 2011).

Et problem som ofte blir forbundet med produksjonen av fermenterte meieriprodukter er forekomsten av bakteriofager. Dette er et virus som angriper spesifikke bakterier, som kan resultere i at bakterier lyserer. *Lactococcus lactis* er en melkesyrebakterie (MSB) som vanligvis brukes i starterkulturer og er svært utsatt for angrep av fag (Marcó et al., 2012). Bakteriofager kan angripe bakterier i starterkulturer som blir brukt i framstillingen av fermenterte meieriprodukter. Dersom starterkulturen infiseres av fag, kan fermenteringsprosessen enten hemmes eller stanses. På grunn av dette blir bakteriofager sett på som et stort problem for meieriindustrien.

Fraksjonering er en relativt ny melkebehandlingsmetode, som blant annet blir brukt i framstilling av fermenterte meieriprodukter. For å sikre trygg produksjon av de ulike fraksjonene er det viktig med en god risikoanalyse. En slik analyse inkluderer blant annet en vaskeprosedyre. Bruken av fraksjoneringsmetoder ved framstilling av fermenterte meieriprodukter gjør det viktig å ha en god vaskeprosedyre, slik at fraksjonene blir produsert på en trygg måte. Summen av dette gjør det viktig med en god vaskeprosedyre for trygg produksjon av fermenterte meieriprodukter. Gjennom kjemisk rengjøring av et membranfiltreringsanlegg, skal anlegget bli kjemisk-, fysisk- og mikrobiologisk rent (D'Souza & Mawson, 2005). Vasken skal derfor sørge for at anlegget blant annet blir fritt for rester av kjemikalier og mikroorganismer.

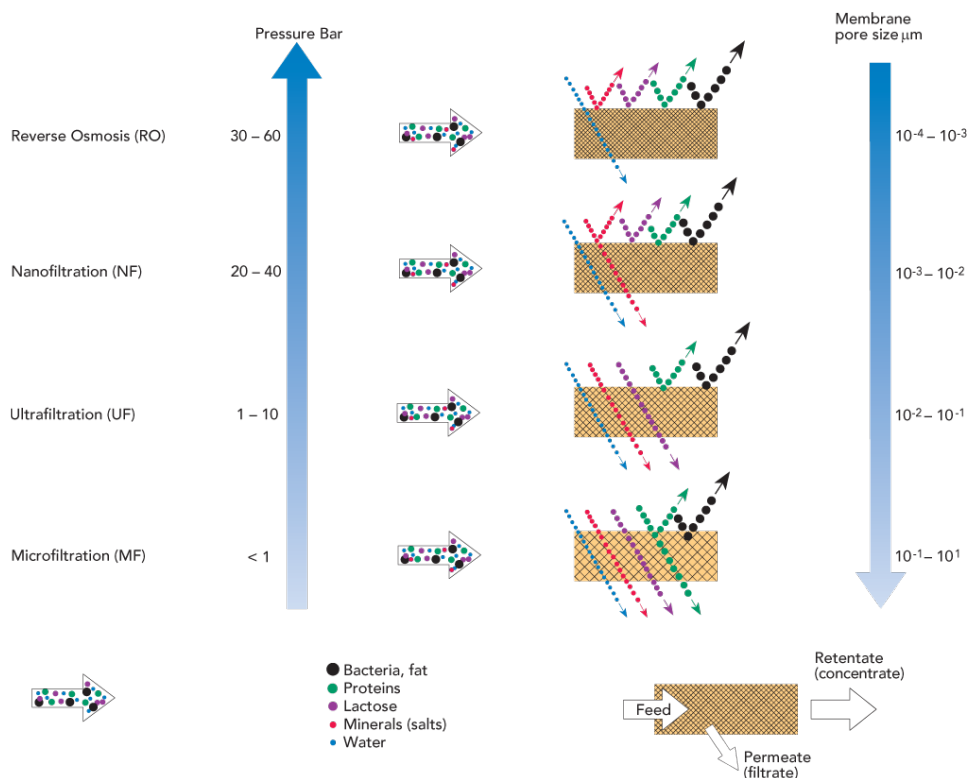
Hensikten med denne oppgaven var å undersøke effekten ulike råstoffer og vaskeprosedyrer hadde på den kjemiske-, fysiske- og mikrobielle renheten til keramiske MF-membraner. En viktig indikatororganisme med tanke på den mikrobielle renheten var bakteriofager. På grunn av problematikken rundt bakteriofag ble mye fokus lagt på denne indikatororganismen.

Tilstedeværelsen av *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager ble undersøkt i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Samtidig ble også toleransen slike fager har ovenfor alkaliske vaskemidler undersøkt på grunn av påstanden om at fag kan drepes av lut.

## 2. Teori

### 2.1 Membranfiltrering

Membranfiltrering er en trykkdrevet separeringsprosess som separerer partikler fra væsker ved hjelp av en semipermeabel membran (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003). Slike separeringsprosesser drives av en hydrostatisk trykkforskjell over membranen, kalt transmembrantrykk (TMP) (Walstra et al., 2006). TMP defineres som trykkforskjellen mellom retentat og permeat siden av membranen (Muro et al., 2012). Væsken som passerer membranen kalles for permeat. Mens væsken som holdes igjen av membranen blir kalt for retentat (også kalt konsentrat) (Walstra et al., 2006). Membranfiltrering kan deles inn i fire separeringsteknikker, som skiller etter porestørrelse og anvendt trykk, slik som figur 2.1.1 illustrerer. De fire teknikkene er; mikrofiltrering (MF), ultrafiltrering (UF), nanofiltrering (NF) og omvendt osmose (RO) (Walstra et al., 2006). Den semipermeable membranen gjør membranfiltrering til en selektiv prosess. Selektiviteten påvirkes av porestørrelsen til membranen, samt molekylvekten til komponenter i væsken som filtreres (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003).



**Figur 2.1.1:** Prinsipper for membranfiltrering inndelt etter membranenes porestørrelser (Bylund, 2015).

Membranfiltrering er en teknikk som kan anvendes i flere næringsmiddelindustrier. I meieriindustrien kan membranfiltrering brukes til fjerning av bakterier, redusere fettinnhold i myse og konsentrering av kasein (Saboya & Maubois, 2000). Andre anvendelser kan blant annet være klarning av vin og juice, samt produksjon av soyaprotein konsentrater (Hongyu & Chen, 2010).

Membranmaterialer blir som regel delt inn etter organiske og uorganiske membraner. Blant uorganiske membraner finner en keramiske membraner. Det er kun keramiske membraner som tilfredsstiller kravene til bruk industrielt (Saboya & Maubois, 2000). Årsaken til dette er robustheten slike membraner besitter, med tanke på blant annet pH toleranse og mekanisk resistens (Walstra et al., 2006). Organiske membraner har derimot lav mekanisk stabilitet, og er lite stabile ved høyere temperaturer (Galanakis, 2018). Dette gjør organiske membraner mindre egnet til industriell bruk.

### **2.1.1 Konsentrasjonspolarisering og fouling**

I begynnelsen vil konsentrasjonen av forbindelser som holdes igjen av membranen, være høyere på membranoverflaten sammenlignet med konsentrasjonen i væsken som filtreres (Song & Elimelech, 1995). Forskjellen i konsentrasjon som oppstår, blir omtalt som konsentrasjonspolarisering. Reduksjonen av permeat flux vil i begynnelsen være forårsaket av konsentrasjonspolariseringen (D'Souza & Mawson, 2005). Deretter vil videre reduksjon i permeat flux komme av et fenomen kalt fouling.

Fouling blir av flere sett på som den begrensende faktoren ved en membranfiltreringsprosess (Brans et al., 2004). Det er et fenomen som blir definert som tilstedeværelsen og vekst av mikroorganismer, samt en irreversibel akkumulering av forbindelser på membranoverflaten som resulterer i redusert flux (Mohammadi et al., 2003). Blant forbindelser som kan foule membraner, utgjør proteiner og mineraler en stor andel (D'Souza & Mawson, 2005). Fouling av membraner forårsaket av proteiner i melk, skyldes til en viss grad kasein (Mourouzis & Karabelas, 2006). Mens myseproteiner blir ansett som å være mer viktige når det gjelder fouling.

Mineraler er en forbindelse i melken som i stor grad kan foule membraner. De absorberes raskere til membranoverflaten sammenlignet med andre forbindelser som kan foule membraner (f.eks. fett og protein). Størrelsen på mineralene er vanligvis mindre enn porene til

MF-membraner. Dette gjør at mineraler i de fleste tilfeller ikke fouler membraner slik proteiner gjør. Proteiner og bakterier er større enn porene og vil derfor samles på overflaten til membranen. I motsetning til mineraler som fouler membraner, ved at de samles inne i porene. (Madaeni et al., 2011)

Membraner kan enten foules reversibelt eller irreversibelt i løpet av en separeringsprosess. Fouling av membraner kan kategoriseres etter hva som fouler membranen. Slike eksempler kan være organisk fouling, uorganisk fouling og biofouling. Biofouling er en variant av fouling som potensielt kan forårsake store problemer. Slik fouling kan blant annet påføre membranene irreversible skader, samt redusere membranens holdbarhet og effektivitet. Biofouling oppstår ved at en eller flere bakterier fester seg (adheres) irreversibelt til membranoverflaten. Over tid kan slik fouling medføre i dannelsen av et samfunn av mikroorganismer på membranoverflaten. Et slikt samfunn blir omtalt som biofilm. Organisk fouling forårsakes av at organiske forbindelser i væsken som filtreres, blir holdt igjen av membranen (Hongyu & Chen, 2010). Mens uorganisk fouling skyldes utfelling av uorganiske forbindelser som salter og mineraler. Blant mineraler er kalsiumfosfat en typisk foulant (forbindelse som fouler membraner) i meieriindustrien. (Hilal et al., 2007)

Fouling av membraner kan forklares gjennom to mekanismer; blokkering av porer og dannelsen av en «kake» (Hilal et al., 2007). Den initierende reduksjonen i permeat flux forårsakes av at porene blokkeres av partikler som holdes igjen av membranen. Blokkeringen av porer vil på dette stadiet trolig være en delvis blokkering. Den delvise blokkeringen av porene skyldes at størrelsen på partiklene som blokkerer porene er større enn porene. På et tidspunkt vil det skje en fullstendig blokkering av porene. Porene blokkeres fullstendig når partiklene er like store som porene. Videre vil reduksjon i permeat flux være forårsaket av dannelsen av et «kake»-lag på membranoverflaten. Dette laget dannes ved at antallet partikler som holdes igjen av membranen økes. På grunn av at antallet partikler som holdes igjen økes, øker også tykkelsen til dette laget. Dette resulterer i en ekstra barriere for permeatflowen. (Song, 1998)

Konsekvenser av fouling inkluderer at membranens permeabilitet eller permeat fluxen reduseres, men også reduksjon av membranens selektivitet (D'Souza & Mawson, 2005). For å kunne sette i gang tiltak mot fouling, må en forstå mekanismene bak fouling og hvordan ulike parametere påvirker fouling (Hilal et al., 2007). Parametere ved filtreringsprosessen vil

påvirke både konsentrasjonspolariseringen og fouling av membranene (Zhang et al., 2015). Trykk, permeat flux og temperatur er typiske prosess parametere som har innvirkning på fouling og konsentrasjonspolarisering. Dersom trykket eller permeat fluxen økes, vil konsentrasjonen av forbindelser på membranoverflaten øke. Dette gjør konsentrasjonspolariseringen mer alvorlig.

### **2.1.1.2 Permeat flux**

Permeat flux ( $L/hm^2$ ) kan defineres som volumet til væsken som strømmer gjennom membranen per tid over et gitt membranareal. Den maksimale permeat fluxen har en ved starten av filtreringen, og tilsvarer permeat fluxen til rent vann (vannflux) (Song, 1998). Permeatet avhenger av permeatflowen og membranarealet, slik som formelen under viser.

$$\text{Permeat flux} = \frac{\text{Permeatflow} \left[\frac{L}{h}\right]}{\text{Membranareal} [m^2]} \quad (\text{Water Environment Federation, 2005}).$$

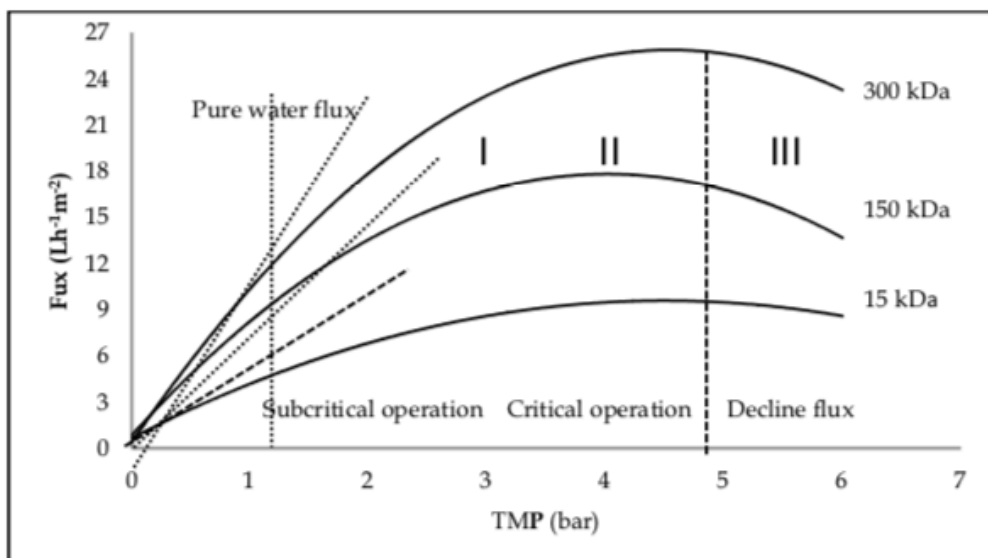
Permeat fluxen til rent vann (vannflux) blir ofte brukt til vurdering av effektiviteten til en rengjøringsprosess. Dette gjøres ved å sammenligne vannfluxen før og etter vask. Effektiviteten til vaskeprosedyren blir da vurdert gjennom effekten av fjerningen av forbindelser på membranoverflaten som fouler membraner. Men vannflux er derimot ikke en parameter som forteller noe om renheten til anlegget, årsaken til dette er flere. Partikler kan avsettes mellom porene uten at det vil påvirke permeat fluxen. Et annet moment er at permeat fluxen ikke gir noen indikasjoner angående egenskapene til membranoverflaten. I tillegg vil ikke god hydraulisk renhet indikere at renheten er god fra et mikrobiologisk synspunkt. (Blanpain-Avet et al., 2009)

Omfanget av den naturlige reduksjonen av permeat flux som vil oppstå under en filtreringsprosess, kan til en viss grad reduseres gjennom endringer av prosessparametere (D'Souza & Mawson, 2005). Eksempler på slike endringer kan være trinnvis økning av trykket ved filtreringen og fjerning av forbindelser som fouler membranen reversibelt ved hjelp av hydrauliske metoder.

Som tidligere nevnt vil permeat fluxen reduseres i løpet av en filtreringsprosess. Endringen av permeat flux i løpet av en filtreringsprosess kan forklares gjennom begrepene kritisk og begrenset flux. Den maksimale permeat fluxen en kan oppnå gjennom å øke transmembrantrykket kan defineres som den begrensende fluxen (Adams et al., 2015).



Teorien som forklarer kritisk flux kan beskrives gjennom tre faser (Muro et al., 2012). Disse fasene er skissert i figur 2.1.2. Ved den første fasen (også omtalt som subkritisk flux) er transmembrantrykket lavere enn det kritiske trykket. Samtidig vil filtreringen på dette stadiet foregå uten at det dannes et «kake»-lag. En kan skille mellom to ulike former av kritisk flux, kalt svak og hard form. Ved den «harde» formen vil forholdet mellom transmembrantrykket (TMP) og flux være lineært, og samtidig lik for flux til rent vann. Forholdet mellom TMP og flux for den svake formen er også lineært. Men forskjellen er at den er lavere enn permeat flux til rent vann. I den andre fasen er TMP høyere enn det kritiske trykket, samtidig vil permeat fluxen ved dette stadiet være lik den begrensende fluxen. Ved dette stadiet vil permeat fluxen være uavhengig av TMP samt membranens porestørrelse. Forholdet mellom tykkelsen til membranen og transmembrantrykket vil påvirke dannelsen av et «kake»-lag og dermed blokkering av porene. Ved den tredje og siste fasen er TMP høyere enn det kritiske trykket. Dette resulterer i en flux som er tidsavhengig, hvor fluxen reduseres over tid. Ved en mikrofiltreringsprosess hvor en skal fjerne bakterier og sporer, samt konsentrere kaseinmiceller, er det vanlig å operere like over det kritiske trykket, ved begynnelsen av den andre fasen. (Brans et al., 2004)



**Figur 2.1.2:** Oversikt over faser som bidrar til forklaring av teoriene vedrørende kritisk flux (Muro et al., 2012).

### 2.1.2 Mikrofiltrering (MF)

Mikrofiltrering er en trykkdrevet separeringsprosess, hvor separeringen drives av trykkdifferansen på tvers av membranen som kalles for transmembrantrykket (TMP). MF-membraner har en porestørrelse som varierer fra 0,1 til 10  $\mu\text{m}$  (Da Silva Birion et al., 2018). Porene til MF-membraner er større sammenlignet med porene til UF-, NF- og RO-membraner, samtidig er trykket som anvendes lavere. Mikrofiltrering er en teknikk som blant annet brukes til å fjerne bakterier og sporer fra melken ved å bruke membraner med porestørrelser som er mindre enn størrelsen til bakterier og sporer (Tomasula et al., 2011). Dette resulterer da i at bakterier, sporer og andre mikroorganismer holdes igjen av membranen og konsentreres i retentatet (Da Silva Birion et al., 2018). Fraksjonering av kasein kan gjøres ved å mikrofiltrere skummet melk (Rosenberg, 1995). Dette gir et permeat med myseproteiner, og som er fritt for lipid forbindelser og kasein. Mens retentatet blant annet vil inneholde kasein i sin native tilstand. Årsaken til at kaseinet holdes igjen av membranen, mens myseproteiner vil passere den, er størrelsen til kasein (0,02-0,3  $\mu\text{m}$ ) og myseprotein (0,006-1,0  $\mu\text{m}$ ) (Tomasula et al., 2011).

En mikrofiltreringsprosess foregår vanligvis ved 50-55  $^{\circ}\text{C}$  (Griep et al., 2018). Dette er et temperaturområde som kan skape problemer med tanke på vekst av endosporedannende mikroorganismer. En ytterligere økning i temperatur til over 55  $^{\circ}\text{C}$  kan medføre i at den mikrobielle aktiviteten reduseres (Jørgensen et al., 2016). Ulempen ved å øke temperaturen vil være reduksjonen av permeat flux som følge av denaturering av myseproteiner (Jørgensen et al., 2016). Mikrofiltreringsprosesser kan også opereres ved temperaturer lavere enn 15  $^{\circ}\text{C}$  (kaldfiltrering) (Steinhauer et al., 2015), som kan redusere omfanget av mikrobiell forringelse forårsaket av mesofile- og termofile mikroorganismer. Filtringstemperaturer over 50  $^{\circ}\text{C}$  kan medføre i at enkelte varmetolerante (kalt termoduriske mikroorganismer) forringelsesorganismer overlever. Med termoduriske bakterier menes det bakterier som overlever ved høyere temperaturer (Nill, 2010). Noe som kan medføre i at de overlever pasteurisering.

## **2.2 Vask av membranfiltreringsanlegg**

Industrielle membranfiltreringsanlegg vaskes vanligvis ved hjelp av et lukket system kalt CIP (cleaning in place) (Hilal et al., 2007). Slike anlegg rengjøres vanligvis kjemisk ved bruk av lut og/eller syre. Reduksjonen av permeat flux i løpet av en filtreringsprosess som følge av fouling av membranen er et kjent problem. Permeabiliteten til membranen reduseres som følge av at partikler avsettes på membranen. Reduksjonen i permeabilitet kan også skyldes avsetning av partikler inne i porene (Popovic et al., 2009). På grunn av problematikken knyttet til reduksjonen av permeat flux er det viktig med en god vaskeprosedyre, for god gjenoppretting av permeat flux.

Målet med vask og desinfeksjon er å gjøre overflatene fysisk-, kjemisk- og biologisk rene. Fysisk rene membraner etter rengjøring gir et godt utgangspunkt for den neste filtreringsprosessen. Hvor god fysisk renhet skal sørge for at den neste filtreringsprosessen blir gjennomført med en tilstrekkelig separeringsevne og permeat flux. Kjemisk renhet innebærer at det ikke skal være rester av kjemikalier tilstede etter vask, som kan kontaminere produkter. Mens biologisk renhet innebærer at rengjøringen resulterer i tilstrekkelig reduksjon av mikrobiell aktivitet. Fysisk, kjemisk og biologisk rene overflater oppnås gjennom regelmessig kjemisk rengjøring. Både vaskeprosedyren og vaskefrekvensen må optimaliseres på en måte som ikke resulterer i at membranenes holdbarhet svekkes. (D'Souza & Mawson, 2005)

### **2.2.1 Industriell vask av membraner**

Industrielle membraner vaskes hovedsakelig kjemisk. Kjemiske rengjøring av keramiske MF-membraner involverer ofte kjemikalier som lut (NaOH), salpetersyre ( $\text{HNO}_3$ ), natriumhypokloritt (NaOCl) eller hydrogenperoksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Mourouzidis-Mourouzis & Karabelas, 2006). Alkaliske vaskemidler er effektive i fjerningen av organiske forbindelser som proteiner og fett (D'Souza & Mawson, 2005). Mens syrebaserte vaskemidler skal være effektiv i fjerningen av uorganiske forbindelser som mineraler og salter.

Effektiviteten til en kjemisk vaskeprosedyre kan ses på som en funksjon av kjemisk aktivitet og fysiske parametere (f.eks. temperatur og TMP). Den kjemiske aktiviteten avhenger av kjemikalie som brukes. Dette inkluderer konsentrasjonen til vaskemiddelet, pH og ionestyrken. Temperatur under vasking og konsentrasjonen til kjemikalie som brukes er som nevnt viktige faktorer for en rengjøringsprosess. Sirkuleringstiden for et vaskemiddel er en

annen viktig faktor, med tanke på hvor lenge kjemikaliene virker på fouling lagene på membranoverflaten. (Blanpain-Avet et al., 2009)

Rengjøring av membraner gjennomføres vanligvis ved et transmembrantrykk som er lavere enn det som anvendes under filtrering. Ved å enten vaske uten trykk eller med et lavt transmembrantrykk, er det mulig å forhindre at membranene foules på nytt. Trykket er også lavt i begynnelsen av rengjøring av MF-membraner. Ved en slik tilnærming kan løst bundne forbindelser fjernes fra membranoverflaten. Deretter økes kapasiteten, slik at porene rengjøres. (Blanpain-Avet et al., 2009)

### **2.2.2 Typisk vaskeprosedyre**

Det eksisterer flere vaskeprosedyrer for vask av membraner. Optimalisering av vaskeprosedyren og hyppigheten til bruken, er viktig av flere årsaker. Omfanget av membranenes holdbarhet som følge av eventuelle bivirkninger forårsaket av vaskemidlene kan reduseres. Andre årsaker kan knyttes til vannforbruket og kostnadene ved innkjøp samt utslipp av kjemikalier. (D'Souza & Mawson, 2005)

Ved utviklingen av en vaskeprosedyre er det en rekke faktorer en trenger kjennskap til. Slike faktorer kan inkludere kunnskap om interaksjonene mellom væsken som filtreres, forbindelsene som fouler membranen og membranen. Samtidig er det viktig med kunnskap angående hvordan ulike prosessparametere vil påvirke både rengjøringen og effektiviteten til filtreringsprosessen som gjennomføres etter vask. Stabiliteten til kjemikaliene som brukes er en annen viktig faktor som bør tas i betraktning. (D'Souza & Mawson, 2005)

Rengjøringsprosessen begynner vanligvis med et skylletrinn. Dette trinnet omtales ofte som forskylling (Walstra et al., 2006). Forskyllingen skjer ved å skylle anlegget med vann som holder 50 °C (Saboya & Maubois, 2000). Hensikten ved dette trinnet er å fjerne restprodukt, slik at en forhindrer inaktivering av kjemikalie eller reduksjon av vaskemiddelets effektivitet (Campagna et al., 2014; D'Souza & Mawson, 2005). En effektiv rengjøringsprosess kan sikres gjennom en god forskylling av filtreringssystemet. Forskyllingen etterfølges av sirkulasjon av alkaliske vaskemidler (Saboya & Maubois, 2000). Mellom hvert trinn med kjemikalier skylles filtreringssystemet godt med vann. Videre kommer ett eller flere vasketrinn med syre (Saboya & Maubois, 2000). Etter det siste trinnet med kjemikalier

skylles systemet godt med vann. Dette trinnet omtales som etterskylling og skal skylle bort rester av kjemikalier (Walstra et al., 2006).

Faktorer som påvirker en rengjøringsprosess er flere, men de viktigste er; konsentrasjon, temperatur, tid og mekanisk energi (trykk, flow). Dette er viktige faktorer for en effektiv rengjøring. Økning av temperatur ved vask vil resultere i at både vaskemiddelet og forbindelsene som fouler membranen blir mer løselig. Samtidig som at de kjemiske reaksjonene skjer ved økt hastighet. Mekaniske forhold ved vask er som nevnt flow og trykk. Det er anbefalt at trykket under en rengjøringsprosess skal være lavere enn trykket ved filtreringsprosessen, samtidig som at flowen skal være høyere. Kombinasjonen av disse faktorene vil øke effekten av den mekaniske rengjøringen. (D'Souza & Mawson, 2005)

### **2.2.3 Vaskemidler**

Generelt så stilles det noen krav til vaskemidler som brukes i industrien. Vaskemidlene skal være lett å skylle bort, de skal være kjemisk stabile, og tilfredsstillende krav som stilles angående trygghet (Madaeni & Mansourpanah, 2004). Når det gjelder eliminering av bakteriofager, har CEN (European Committee for Standardization) satt et krav til vaskemidler (Campagna et al., 2014). Vaskemidler skal i henhold til dette kravet vise til en reduksjon av plakkdannende enheter (PFU) på 4 log. Andre krav som kan stilles til vaskemidler, er at de skal kunne løse opp forbindelser som fouler membranen og forhindre at membranen foules på nytt (D'Souza & Mawson, 2005).

Kjemikalier som ofte brukes er alkalier, syrer, enzymer, tensider og desinfeksjonsmidler. Vaskemidler som brukes industrielt er i all hovedsak en blanding av flere komponenter. Disse er ofte satt sammen for å gi tilstrekkelig reduksjon av mikroorganismer. Slike vaskemidler er også skreddersydd for å på en best mulig måte fjerne forbindelser som fouler membraner (D'Souza & Mawson, 2005). Kjemisk vask av membraner består som regel av alkaliske vaskemidler og syrebaserte vaskemidler. Natriumhydroksid (NaOH) og kaliumhydroksid (KOH) er ofte brukte alkaliske vaskemidler. Slike vaskemidler løser opp organiske forbindelser som proteiner og fett gjennom henholdsvis hydrolyse og forsåpning. Alkaliske vaskemidler bør ha en pH på 11-12, dersom forbindelsene som fouler membranen skal fjernes. Effekten av alkaliske vaskemidler har vist seg å forbedres ved å tilføye natriumhypokloritt (NaOCl). Syrebaserte vaskemidler brukes til fjerning av utfelte uorganiske salter. Enzymatisk vask er et alternativ til den tradisjonelle kjemiske rengjøringen. Ved å

vaske membraner med enzymer som kan bryte ned spesifikke komponenter i fouling laget, kan slike vaskemidler effektivt løse opp forbindelser på/i membranen. Slike vaskemidler kan blant annet inneholde proteaser eller lipaser. (D'Souza & Mawson, 2005)

### **2.3 Melk**

Melk er en væske som skiller ut fra melkekjertler hos pattedyr. Formålet med denne væsken er å gi næring til avkommet. (Walstra et al., 2006)

#### **2.3.1 Melkens sammensetning**

Melken består hovedsakelig av vann (ca. 87 %), resterende bestanddeler er tørrstoff.

Tørrstoffet i melk er laktose (4,6 %), fett (4 %), protein (3,3 %) og mineraler (0,7 %) (Walstra et al., 2006). Proteiner i melken er hovedsakelig kasein (ca. 80 %) og myseprotein (ca. 20 %) (Bylund, 2015). Dette gjør kaseinet til hovedproteinet i melk. Kaseinet kan deles inn i fire typer;  $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - og  $\beta$ -kasein (Walstra et al., 2006). Myseproteinene er globulære proteiner og inkluderer;  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, serum albumin og immunoglobulin.

Sammensetningen til melken vil naturligvis variere. Den vil variere med faktorer som for eksempel rase, genetikk og helsen til kua. (Hurt & Barbano, 2010; Walstra et al., 2006)

I melken opptrer kaseinet som kaseinmiceller. Kaseinet vil sammen med blant annet kalsiumfosfat danne kaseinmiceller. Kaseinmiceller er aggregater av flere individuelle proteinmolekyler med varierende diameter. I micellene vil kaseinet være i en tilstand som kaseinat, og kan binde seg til kationer som kalsium og magnesium (Walstra et al., 2006). (Dalglish & Corredig, 2012)

Mineraler i melk inkluderer blant annet kalsium (Ca), magnesium (Mg, natrium (Na), kalium (K) og fosfor (P). Det typiske innholdet av disse mineralene i melk er presentert i tabell 2.3.1.

**Tabell 2.3.1:** Innholdet (mg/100g) av utvalgte mineraler i melk (Walstra et al., 2006). Konsentrasjonen til mineralene er omregnet til g/kg.

Mineraler	mg/100g	g/kg
Kalsium (Ca)	117	1,17
Magnesium (Mg)	11	0,11
Natrium (Na)	48	0,48
Kalium (K)	143	1,43
Fosfor (P)	63-102 (Zamberlin et al., 2012)	0,63-1,02

I melk vil mineralene være ulikt fordelt, hvor de fordeles ulikt mellom vannfasen og den micellære fasen. Kalsium, uorganisk fosfat og magnesium delvis er bundet til kaseinmicellene (Mekmene et al., 2009). Mesteparten av kalium i melk befinner seg i serumfasen, og kun en liten del i micellene (Walstra et al., 2006). Fosforet i melken er distribuert slik at det befinner seg flere steder, blant annet i serumet og i kaseinmiceller (Walstra et al., 2006).

I melken er kalsium og fosfat er tilstede i kolloidal form i kaseinmicellene, hvor det kolloidale kalsiumfosfatet er i likevekt med kalsiumet i serum fasen (Li & Corredig, 2014). Når det gjelder kalsium i melk, så eksisterer omtrent 2/3 av innholdet i uoppløst form. Denne andelen er også inkorporert i kaseinmicellene, hvor også uorganisk fosfat befinner seg. Resten av kalsiumet er distribuert i serum fasen. (S. Y. Ng et al., 2017)

Mineraler i melken er ofte forbundet med kasein, myseprotein og fettkulemembranen. Ved mikrofiltrering av melk vil kalsiuminnholdet øke i retentatet. Samtidig vil også bufferkapasiteten øke i retentatet (Svanborg et al., 2014). Melkens bufferkapasitet er en viktig fysiokjemisk egenskap (Salün et al., 2005). Denne egenskapen kan forklare evnen pH for et produkt har til å øke eller reduseres. Bufferkapasiteten avhenger av sammensetningen til melken. Deriblant innholdet av mineraler, organiske syrer og proteiner. Membranfiltrering er en teknikk som vil endre bufferkapasiteten til melken. Bufferkapasiteten er en viktig faktor når endringer i pH skal forklares. Summen av bufferkapasitetene til hver enkelt komponent i meieriprodukter avgjør bufferkapasiteten til produktet.

### 2.3.2 Melk som substrat for mikroorganismer

Melk er på grunn av sitt høye innhold av næringsstoffer, nøytrale pH, samt høye vanninnhold, et egnet vekstmedium for flere mikroorganismer. Selv om næringsinnholdet i melk gir gode vekstforhold for mikroorganismer, vil ikke alle greie å vokse i melk. Dette skyldes blant annet det lave innholdet av frie aminosyrer. Mikroorganismer som er avhengige av frie aminosyrer som nitrogen-kilde for vekst kan dermed få problemer med å vokse i melk. Samtidig evner ikke alle bakterier å utnytte laktosen (metabolisere laktosen), og vil dermed ha behov andre karbon- og energikilder. (Doyle & Buchanan, 2013)

## 2.4 Kjernemelk

Kjernemelk er et biprodukt som kommer fra framstillingen av smør (Walstra et al., 2006). Ved kjerning av fløte utsettes den for mekanisk behandling. Som følge av den mekaniske behandlingen blir fettkulemembranen destabilisert. Bestanddeler i fettkulemembranen vil sammen med vannløselige forbindelser slippe ut i vannfasen. Denne vannfasen omtales som kjernemelk. (Corredig et al., 2003)

### 2.4.1 Kjernemelkens sammensetning

Sammensetningen til kjernemelken vil blant annet variere med råstoffet, om fløten som kjernes er søt eller syrnet. Kjernemelken inneholder vannløselige forbindelser som en finner i fløten. Dette inkluderer blant annet protein, laktose, mineraler og derivater fra fettkulemembranen (Sodini et al., 2006). Sammensetningen til kjernemelk er presentert i tabell 2.4.1.

**Tabell 1.4.1:** Sammensetningen av kjernemelk og skummet melk.

Komponent	Kjernemelk (Fuquay et al., 2011)	Skummet melk (Walstra et al., 2006)
Tørrstoff (%)	7-10	12,7 (Fox et al., 2015)
Fett (%)	0,3-1,0	0,07
Laktose (%)	3,5-4,9	4,8
Protein (%)	2,66-3,75	3,3
Mineraler (%)	0,6-0,75	0,7
Fosfolipider (%)	0,075-0,25	0,015 (Conway et al., 2014)



Kjernemelkens innhold av komponenter fra fettkulemembranen gjør det til et interessant biprodukt (Conway et al., 2014). Spesielt er kjernemelkens høye innhold av fosfolipider av stor interesse, og bidrar til å gjøre kjernemelken til et biprodukt med gode funksjonelle egenskaper (Sodini et al., 2006). Eksempler på funksjonelle egenskaper er emulgerende effekt, løselighet og viskositet (Sodini et al., 2006). Fettkulemembranen inneholder proteiner (20-60 %), karbohydrater, triglyserider og fosfolipider (ca. 33 %) (Roesch et al., 2004). Ved destabilisering av fettkulemembranen slipper fettkulemembranproteiner ut av membranen og utgjør en del av proteininnholdet i kjernemelk (Jukkola et al., 2016). Fettkulemembranens struktur omtales å være globulær. Det har vist seg at fettkulemembranen fortsatt er strukturelt intakt etter varmebehandling. Ved kjerning er det kjent at denne strukturen blir destabilisert, og gjør den blant annet mer utsatt for varme (Morin et al., 2007b).

Mikrofiltrering av kjernemelk kan separere kaseiner og komponenter fra fettkulemembranen, fra myseproteiner. Retentatet etter en slik separeringsprosess kan brukes videre til ekstrahering av fosfolipider. Men utfordringen ved å fraksjonere dette retentatet, er at kaseinmicellene og komponentene fra fettkulemembranen er lik i størrelse (Svanborg et al., 2015). Komponentene i fettkulemembranen varierer i størrelse (fra 0,1 til flere  $\mu\text{m}$ ) (Morin et al., 2007a). Av denne grunnen vil det være svært vanskelig å holde igjen alle komponentene ved mikrofiltrering, med membraner med porer større enn 0,1  $\mu\text{m}$ .

Til tross for at komponentene i fettkulemembranen gjør kjernemelken til et interessant biprodukt. Er det viktig å tenke på at det nettopp er et biprodukt og en må derfor ta den mikrobielle kvaliteten i betraktning. Kjernemelken inneholder næringsstoffer som gjør den til et gunstig vekstmedium for mikroorganismer (Fauquant et al., 2014). Dette inkluderer både forringelsesbakterier og patogene mikroorganismer. Blant patogene mikroorganismer kan *Listeria* og *Salmonella* vokse i kjernemelk. Den mikrobielle floraen til kjernemelken vil påvirkes av kontaminasjoner som kan oppstå ved framstillingen av smør.

#### **2.4.2 Kjernemelk sammenlignet med skummet melk**

Kjernemelk har en sammensetning som er veldig lik skummet melk. De store proteingruppene i melk utgjør ca. 80 % i kjernemelk, mens proteiner fra fettkulemembranen utgjør ca. 20 % (Conway et al., 2014). Forholdet mellom kasein og myseproteiner er også lik skummet melk (Svanborg et al., 2015). Tabell 2.4.1 sammenligner sammensetningen til kjernemelk med skummet melk.

Når det gjelder innholdet av fett så finnes det forskjeller mellom skummet melk og kjernemelk. Fettinnholdet er forskjellig både med tanke på mengde og sammensetning (Conway et al., 2014). Blant annet er fosfolipidinnholdet høyere i kjernemelk sammenlignet med skummet melk (Svanborg et al., 2015). I tillegg inneholder kjernemelk store mengder av flerumettede fettsyrer, noe som gjør kjernemelk utsatt for oksidering (O'Connell & Fox, 2000).

Mineralinnholdet i kjernemelken er også noe lik innholdet i skummet melk. Det er derimot noen forskjeller i innholdet av enkelte mineraler. Kjernemelk inneholder mindre kalsium sammenlignet med skummet melk. Innholdet av kalsium i kjernemelk er rapportert til å ligge på 0,948 g/kg i kjernemelken mot melkens 1,17 g/kg (O'Connell & Fox, 2000; Walstra et al., 2006).

## **2.5 Mikrobielle kontaminanter**

Melk er som tidligere nevnt en god vekstkilde for de fleste mikroorganismer. Under de rette betingelsene (temperatur, pH,  $a_w$ , oksygen osv.) kan mikroorganismer kontaminere melk og endre produktets mikrobielle og sensoriske kvalitet. Inne i juret er melken steril (Adams & Moss, 2008). I forbindelse med melkingen kan melk kontamineres på flere måter, og av ulike kilder. Eksempler på kontaminasjon av melk kan blant annet være gjennom tilstedeværende mikroorganismer på juret, fôret, avføring, jord, utstyr og vann (Walstra et al., 2006).

Den mikrobiologiske kvaliteten kan undersøkes på flere måter. Totaltallsmåling er et eksempel. Ved slike analyser blir innholdet av aerobe mesofile mikroorganismer undersøkt (Frøyen, 2016). En svakhet ved denne metoden er at den ikke skiller mellom levende og døde celler (Frøyen, 2016). I henhold til en EU-standard for kvaliteten på upasteurisert melk, skal innholdet av aerobe mesofile mikroorganismer være lavere enn  $3,0 \times 10^4$  CFU/mL (kde/mL) (Samarzija et al., 2012). Samtidig skal bakterietallet i upasteurisert melk som brukes til produksjon av meieriprodukter i Norge være lavere enn  $3,0 \times 10^5$  kde/mL (Animaliehygieneforskriften, 2009).

Bestemmelse av mengdene den anaerobe sporedanneren *Clostridium* ble gjort ved hjelp av en MPN (Most Probable Number) metode. Dette er en metode en benytter i tilfeller hvor det er forventet et lavt antall ( $< 10$  MPN/ml). MPN-metoder er statistisk baserte metoder for påvisning av vekst i flytende medier i rør (Frøyen, 2016). Etter inkubering av rør til denne

metoden blir det observert om det har skjedd gassdannelse eller ikke. Det mest sannsynlige antallet *Clostridium* i dette tilfellet bestemmes ved å se på kombinasjonen av positive/negative rør opp mot en tabell (vedlegg 2) som er laget på statistisk grunnlag.

### 2.5.1 Biofilm

Biofouling av membraner kan som tidligere nevnt gå over i dannelsen av en biofilm på membranoverflaten. En biofilm er et komplekst samfunn av mikroorganismer som er festet til en overflate (López et al., 2010). De aller fleste mikroorganismer (99 %) lever i slike strukturerte samfunn (Cogan, 2006). Slike samfunn av mikroorganismer utgjør blant annet en trussel på grunn av utvikling av resistens ovenfor antimikrobielle midler. Biofilmen omslutes av en slimaktig matriks kalt eksopolymerisk substans (EPS), som holder filmen sammen (Lönn-Stensrud, 2018). EPS laget består av hovedsakelig av polysakkarider, proteiner og ekstracellulært DNA (eDNA).

Dannelsen av en biofilm er en komplisert prosess som involverer 5 trinn; initierende reversibel festing av bakterie til et substrat (adhesjon), irreversibel festing (kolonisering), tidlig utvikling av biofilm, modning av biofilmen og avslutningsvis dispersjon (oppløsning) av biofilmen. En forutsetning for dannelse av biofilm er næring tilstede på en overflate i form av en kondisjoneringsfilm. Denne overflaten er rik på næringsstoffer (som regel karbonrike forbindelser). Dannelsen av biofilm initieres ved at planktoniske celler (fritt flytende celler) festes til en overflate rik på næringsstoffer. Koloniseringen (irreversibel festing) av bakterier skjer blant annet som en konsekvens av EPS-produksjonen (Karunakaran & Biggs, 2011). Etterhvert som filmen modnes blir den større, og har vannkanaler slik at næringsstoffer samt signalmolekyler for cellekommunikasjon kan fordeles (Lönn-Stensrud, 2018). Slik kan filmen fortsette å vokse. På et tidspunkt når filmen en fase hvor den ikke kan vokse mer, og vil da løses opp (dispersjon) (Lönn-Stensrud, 2018). Bakterier i filmen vil da gjenta sin planktoniske form og spres til andre overflater hvor en ny biofilm kan dannes. (Kanematsu & Barry, 2015) Bakterier i en biofilm har vist seg å være mer resistent ovenfor antimikrobielle midler sammenlignet med planktoniske celler. Biofilm celler kan være opp mot 1000 ganger mer resistent enn planktoniske celler (Drenkard, 2003). Planktoniske celler som frigjøres fra en oppløst biofilm har en fenotype, som er forskjellig fra planktoniske cellen som festet seg til overflaten (Bridier et al., 2011). Årsaken til resistensen biofilm bakterier viser er usikkert. Men endringen i fenotype kan bidra til å forklare forskjellen i resistens sammenlignet med

planktoniske celler. Resistensutviklingen kan også forklares gjennom EPS-laget, som gjør det vanskelig for antimikrobielle midler å trenge gjennom filmen (Bridier et al., 2011).

Blant patogene mikroorganismer som kan forekomme i næringsmiddelindustrien, er *Bacillus cereus* en god biofilmdanner (Majed et al., 2016). *B. cereus* er svært hydrofob, som er en egenskap som gjør den til en god biofilmdanner.

### **2.5.2 Bakteriofag**

Bakteriofager (fag) er virus som angriper spesifikke vertsbakterier. Fagen er et virus som består av et hode og en hale. Arvestoffet er pakket inne i en proteinkappe i hodet til fagen, og kan enten være DNA eller RNA. Ved hjelp av halen kan fagen festes til utsiden av en vertsbakterie, og overføre arvestoffet sitt til verten. Genomet til fagene er lite og de replikeres i en spesifikk vertsorganisme etter injeksjon av fagens arvestoff. Bakteriofager kan deles inn i to typer etter deres livssyklus, som enten kan være lytiske eller temperate. (Watson et al., 2013)

Lytisk kan fag replikeres ved at de festes på utsiden av en vertsorganisme. Fagen injiserer deretter sitt genom (vanligvis DNA). Inne i verten replikeres fag genomet, og det uttrykkes gener for produksjon av fag partikler. Etter at partiklene er modne vil verten lysere, og de nye fag partiklene kan festes til en ny vert. Den lysogene livssyklusen til fag initieres på lik måte som lytiske fag. Men når genomet er injisert i verten, integreres fag genomet i vertkromosomet. Fag genomet replikeres da som en del av genomet den er integrert i. I denne tilstanden kalles fagen for en profag. (Watson et al., 2013)

#### **2.5.2.1 Melkesyrebakterie spesifikke bakteriofager**

Bakteriofager som er spesifikke mot melkesyrebakterier (MSB) har forårsaket meieriindustrien store problemer. Slike fager kan angripe MSB i en starterkultur og dermed enten hemme eller stanse fermenteringer.

Taksonomisk er bakteriofager kjent for å infisere melkesyrebakterier, plassert under *Caudovirales* ordenen. Fagene er videre fordelt på tre familier; *Podoviridae*, *Myoviridae* og *Siphoviridae*. Bakteriofager som er kjent for å angripe laktokokker er en del av *Siphoviridae* famlien. Basert på morfologien til fager og genomiske analyser, kan slike bakteriofager deles inn i ti grupper. Blant identifiserte fag som er identifisert, er medlemmer av gruppene 936,

P335 og c2 oftest forbundet med meierier (Oliveira et al., 2018). Fag som er en del av c2 og 936 gruppene er lytiske fag, mens P335 enten kan være lytisk eller temperat (Murphy et al., 2014). 936 gruppen er rapportert til å være den mest problematiske laktokokk spesifikke fagen i forbindelse med fermenteringer (Oliveira et al., 2018). (Marcó et al., 2012)

Blant melkesyrebakterier er *Lactococcus* arter de som er mest utsatt for bakteriofag infeksjon (Marcó et al., 2012). Fager som kan infisere *Lactococcus lactis* har vanligvis et dobbeltrådet (ds) DNA (Oliveira et al., 2018). Disse tilhører ordenen *Caudovirales*, og er enten en del av familien *Siphoviridae* eller *Podoviridae*. Fager som er kjent for å infisere *L.lactis* er klassifisert i tre typer; 936, c2 og P335 (Murphy et al., 2013). Slike fager kommer oftest inn til meierier gjennom den upasteuriserte melken, som naturlig inneholder bakteriofager (Kleppen et al., 2011; Murphy et al., 2013). Mengden fag i upasteurisert melk er anslått å være  $10^1$ - $10^4$  fag per mL (Marcó et al., 2012).

#### **2.5.2.2 Toleranse mot miljøfaktorer**

Kunnskapen om toleransen bakteriofag har til faktorer som blant annet temperatur og pH er viktig i bekjempelsen mot fag.

Fager av 936 gruppen har vist seg å gi størst problemer for laktokokker. 936-gruppen har vist seg å være signifikant mer resistent ovenfor temperaturbehandling sammenlignet med c2 og P335. Enkelte fager av 936-gruppen har vist overlevelse etter pasteurisering. Samtidig har også noen bakteriofager vist til overlevelse ved høyere temperaturer. De fleste MSB spesifikke bakteriofager kan overleve pasteurisering (Campagna et al., 2014). Melk som medium er en annen faktor som kan påvirke den termiske inaktivering av fag. Det er bevist at dersom fag i melk påføres termisk behandling, virker melken beskyttende for fagen og hindrer inaktivering. (Mahoney et al., 2012)

Murphy et al. (2014) undersøkte effekten varmebehandling ved 85 °C hadde på fag gruppen 936. En av grunnene bak dette var evnen enkelte bakteriofager har til å overleve pasteurisering. Samtidig er det også dokumentert at melk som medium gir bakteriofag beskyttelse mot inaktivering ved høyere temperaturer. Gruppen 936 inneholder fager som anses å utgjøre den største trusselen for meieriindustrien. Slike fag er anslått å være svært resistent mot høyere temperaturer. Resultatene viste at ulike isolerte fag hadde ulik sensitivitet til høyere temperaturer, hvor enkelte ble eliminert av denne temperaturen, mens andre

overlevde. Overlevelse av bakteriofager ved høyere temperaturer varierer dermed med faktorer som f.eks. medium og isolater av fag.

Murphy et al. (2014) undersøkte også effekten ulike biocider hadde på bakteriofager i gruppen 936. Effekten av NaOH ble undersøkt ved å bruke en konsentrasjon på 0,2 % w/v med en pH på 12,64. Resultatet viste for enkelte fag ingen plakkdannelse, som indikerte drap av bakteriofag.

### **2.5.2.3 Tiltak mot bakteriofag**

Tiltak mot bakteriofaginfeksjoner kan være å variere hvilken starterkultur som brukes, bruk av isolerte stammer som ikke er sensitiv mot bakteriofag, kjemisk vasking og termisk behandling (Murphy et al., 2013). Et annet tiltak er å bruke en starterkultur bestående av flere stammer (Kleppen et al., 2011).

Det er viktig med strenge prosedyrer for vask og desinfeksjon av overflater som et forebyggende tiltak mot bakteriofager. Kravene som stilles til vaskemidler er flere. Blant annet skal de vise til en god antimikrobiell aktivitet, være lett å bruke, være billig, skal ikke påvirke sluttproduktet negativt og skal ikke brytes ned til forbindelser som er ikke er skadelig (Marcó et al., 2012).

Som tidligere nevnt kan NaOH ha en effekt på eliminering av fag. Men effekten er lite undersøkt. Evnen biocider har til å inaktivere bakteriofager er for det meste dokumentert ved bruk av pereddiksyre og natriumhypokloritt (Hayes et al., 2017). Blant kjemikalier som kan eliminere bakteriofager, er effekten av pereddiksyre dokumentert til å ofte være den mest effektive (Marcó et al., 2012).

Effekten et alkalisk vaskemiddel med natriumhydroksid (NaOH) som hovedkomponent (30-60 %), ble undersøkt mot inaktivering av fag. Dette alkaliske vaskemiddelet viste seg å ha en svært god inaktiverende evne på bakteriofag, selv ved lave konsentrasjoner. Dette viste seg ved bruk av konsentrasjoner som var lavere enn anbefalt konsentrasjon fra leverandør. Anbefalt konsentrasjon var 0,5 – 2,0 % av dette kjemikalie. Effekten av å kombinere to biocider var sannsynligvis viktig for å inaktivere fag. Alene vil trolig ingen av disse komponentene hatt den samme inaktiverende virkningen. (Hayes et al., 2017)

Blant biocider er pereddiksyre et kjemikalie som brukes kommersielt i meieriindustrien. Pereddiksyre er dokumentert som det praktisk beste middelet for inaktivering av fag. Det er et biocid som kan vise til effektiv inaktivering av de fleste mikroorganismer. På grunn av egenskapene til pereddiksyre, er den også godt egnet i en CIP prosedyre. Dette biocidet kan også vise til en rask og effektiv inaktivering av melkesyre spesifikke fager, inkludert fager spesifikke mot *Lactococcus lactis*. (Guglielmotti et al., 2012)

Termisk behandling kan endre fagpartiklens morfologi. Enkelte bakteriofager som er spesifikke mot *Lactococcus lactis* har vist seg å bli inaktivert ved 63 °C, mens andre fager er mer resistent ovenfor varme. Resistensen *L.lactis* spesifikke fager viser til temperatur/tid kombinasjoner er ulik, hvor 40 % av slike fager har vist seg å overleve en varmebehandling ved 80 °C i 5 minutter. Når det gjelder den termiske stabiliteten til fag, så vil den blant annet variere med tanke på mediet som brukes. Melk som medium har for eksempel vist seg å ha en beskyttende virkning ovenfor fag. (Guglielmotti et al., 2012)

### **2.5.3 Sporedannende mikroorganismer**

Som en respons på svekkede miljøforhold som følge av mangel på næring eller på grunn av ekstreme temperaturer, kan enkelte mikroorganismer produsere endosporer (sporer) (Doyle et al., 2015). Prosessen hvor sporer dannes kalles for sporulering (Granum, 2015). Aktivisering og germinering av sporene skjer ved høyere temperaturer og ved tilstedeværelse av næring (Granum, 2015). Sporene germinerer vanligvis ved temperaturer på 75 °C, og ved tilstedeværelse av aminosyrer (spesielt alanin). Endosporer er svært resistente ovenfor miljøfaktorer som varme, stråling, kjemikalier og tørking (Doyle & Buchanan, 2013). På grunn av robustheten og toksisiteten som endosporer viser, kan de gi næringsmiddelindustrien store problemer (Doyle et al., 2015). Toleransen sporer har til høyere temperaturer er ulik, hvor enkelte sporer blant annet kan overleve lav-pasteurisering. Dette er temperaturer som kan fremme germinering av sporer (Doyle et al., 2015). UHT (ultrahøy temperatur) behandling er en varmebehandling som de mest varmestabile sporene kan overleve (Stoeckel et al., 2016). Men de fleste sporene (99,99 %) elimineres av en UHT behandling. Ved termisering av melk, blir den varmebehandlet ved 60-69 °C i 20 sekunder (Walstra et al., 2006). Denne varmebehandlingen kan resultere i germinering av sporer (Doyle et al., 2015). Alternativer til termiske prosesser for å fjerne sporedannende mikroorganismer fra upasteurisert melk, er mikrofiltrering og baktofugering (Doyle et al., 2015).

Gram-positive mikroorganismer som *Bacillus*- og *Clostridium*-arter er endosporedannende mikroorganismer. Arter innen disse slektene er kjent for å forringe melk (Doyle et al., 2015). På grunn av forekomsten til både *Bacillus* og *Clostridium* i naturen kan de kontaminere melken på flere måter. Melken kan kontamineres før den ankommer meieriet. Silofôr, jord og dårlig jurhygiene er kontaminanter som ofte forbindes med sporer (Doyle et al., 2015). Upasteurisert melk inneholder vanligvis større mengder *Bacillus*-arter enn *Clostridium*-arter. (Doyle & Buchanan, 2013)

#### **2.5.3.1 *Bacillus* spp.**

*Bacillus* er en aerob, gram-positiv, endosporedannende mikroorganisme (Doyle & Buchanan, 2013). De fleste *Bacillus* arter er aerobe, men det finnes også noen arter som er fakultativt anaerobe (Samarzija et al., 2012). *Bacillus cereus* er vidt spredt i naturen, og har jord som et vanlig reservoar (Doyle & Buchanan, 2013). *B.cereus* og *Bacillus weihenstephanensis* er arter i *Bacillus cereus* gruppen som er vanlige kontaminanter av melk (Doyle & Buchanan, 2013). *Bacillus* blir per dags dato sett på som hovedårsaken til mikrobiell forringelse av melk og melkeprodukter (Samarzija et al., 2012).

Matforgiftning forårsaket av *Bacillus cereus* forekommer i to former, enten diaré type eller emetisk type (oppkast). Sykdom av diaré typen kommer av at bakterien produserer enterotoksiner under vegetativ vekst i maten. Diarétypen forårsakes av enterotoksinene Hemolytisk enterotoksin (HBL), ikke hemolytisk enterotoksin (Nhe) og Cytotoksin K (CytK). Matforgiftning forårsaket av den emetiske typen skyldes det emetiske toksinet cereulid. Sykdom forårsaket av *B.cereus* krever trolig  $10^5$ - $10^8$  celler per mL (Doyle & Buchanan, 2013).

Generelt sett vokser ikke *Bacillus cereus* ved temperaturer under  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Granum, 2015). Men det er blitt oppdaget psykrotrofe *B.cereus* stammer, som for eksempel *Bacillus weihenstephanensis* (Doyle & Buchanan, 2013). Dette er en *Bacillus* art som vokser ved  $4$ - $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Granum, 2015). Samtidig er ikke *B.weihenstephanensis* en art som er kjent for å forårsake matforgiftning (Doyle & Buchanan, 2013). De fleste basiller har en øvrig veksttemperatur på over  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Granum, 2015). Dette gir *Bacillus* et bredt temperaturområde for vekst. Det finnes både psykrotrofe- og termoduriske *Bacillus* arter (Doyle et al., 2015). Dette gjør de til organismer som kan utgjøre store problemer på grunn av deres evne til å overleve kjøleskapstemperatur og pasteurisering.



*Bacillus cereus* sporer har vist seg å være veldig hydrofobe. Denne egenskapen gjør at de lettere kan feste seg til overflater. Sporenes hydrofobisitet gjør de vanskelig å fjerne ved vasking (Andersson et al., 1995). *Bacillus* arter i sin vegetative tilstand har evnen til å produsere ekstracellulære enzymer som også er termostabile. Evnen *Bacillus* har til å produsere slike enzymer er større sammenlignet med *Pseudomonas* (Samarzija et al., 2012). Enzymene *Bacillus* kan produsere inkluderer proteolytiske og lipolytiske enzymer. Slike enzymer kan forringe produktets sensoriske- og ernæringsmessige egenskaper. Proteasene kan bryte ned kasein i melken og blant annet gi melken en bitter smak (Samarzija et al., 2012). Mens lipolytisk aktivitet ofte forbindes med en harsk bismak (Samarzija et al., 2012). (Janstová et al., 2006)

#### **2.5.3.2 *Clostridium* spp.**

*Clostridium botulinum* er en anaerob sporedanner, som i likhet med *Bacillus cereus* har jord som reservoar. Sykdom grunnet denne bakterien skyldes et nevrotoksin. Matbåren botulisme er en intoksikasjon, som vil si at sykdom skyldes produksjon av nevrotoksinet i maten. (Granum, 2015)

*Clostridium tyrobutyricum* er en organisme som produserer smørsyre (butansyre), og som oftest forbindes med kvalitetsforringelse av oster som Jarlsberg. Kvaliteten forringes på grunn av gass defekter. Enkelte stammer av denne organismen har også evnen til å produsere botulinumtoksinet. Summen av dette gjør *C.tyrobutyricum* til en bakterie meieriindustrien må forhindre vekst av. (Doyle et al., 2015)

#### **2.5.4 Psykrotrofe mikroorganismer**

Psykrotrofe mikroorganismer som forbindes med kvalitetsforringelse av melk er stort sett gram-negative staver (Doyle & Buchanan, 2013). Dette er en gruppe kuldetolerante mikroorganismer. De kan vokse ved temperaturer på 7 °C eller lavere. Men den optimale temperaturen for denne gruppen mikroorganismer ligger ved 20-30 °C. Psykrotrof kontaminasjon domineres av *Pseudomonas* arter. Blant *Pseudomonas* arter er *Pseudomonas fluorescens* oftest isolert fra rå melk og pasteurisert melk. Psykrotrofe arter anses å utgjøre 90 % av den mikrobielle floraen i nedkjølt rå melk. (Samarzija et al., 2012)

De fleste psykrotrofe mikroorganismer er produsenter av termostabile hydrolytiske enzymer, som for eksempel proteaser og lipaser (Doyle & Buchanan, 2013; Samarzija et al., 2012).

Produksjonen av disse enzymene kan forringe meieriprodukter. Proteolytisk nedbrytning av kaseinet kan resultere i dannelsen av bitre peptider som gir melken en bitter smak. Lipolytisk nedbrytning av lipider kan resultere i harsk smak. (Doyle & Buchanan, 2013)

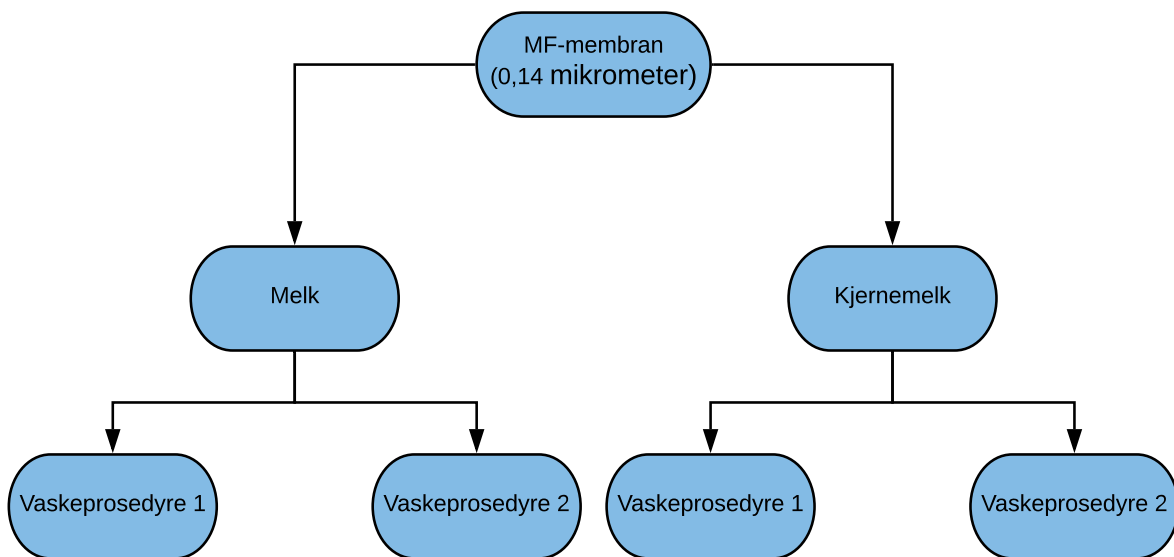
Dersom mengdene av psykrotrofe mikroorganismer øker til over  $5 \times 10^5$  per ml melk, kan det være skadelig for produktet med tanke på forringelse (Walstra et al., 2006). For at smaks defekter skal oppstå bør bakterietallet være over  $10^7$  per mL melk (Walstra et al., 2006).

Termotolerante hydrolytiske enzymer produsert av *Pseudomonas spp.* og *Bacillus spp.* er av størst bekymring for meierier (Samarzija et al., 2012).

### 3. Materialer og metoder

#### 3.1 Forsøksdesign

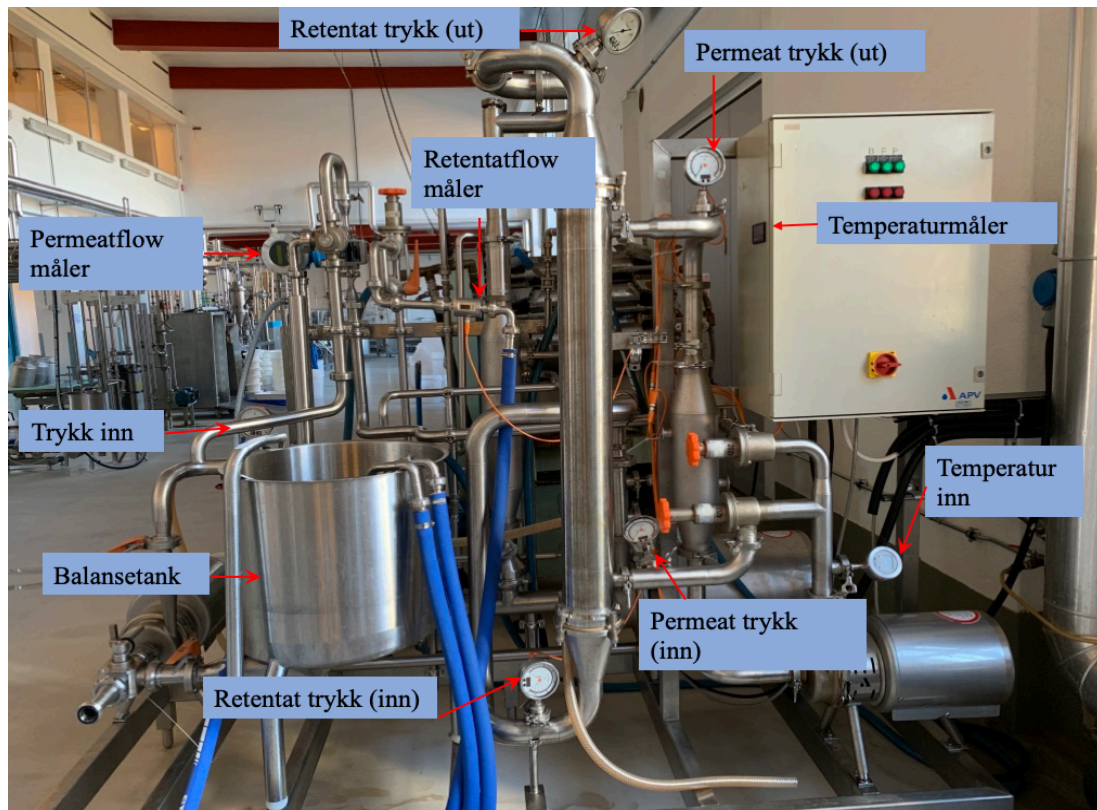
Det ble gjennomført åtte filtreringsforsøk. Hvor filtreringsforsøkene ble fordelt ut over 4 uker. I denne oppgaven blir ukene omtalt som blokker. Skummet melk ble mikrofiltrert ved blokk 1 (uke 5) og blokk 3 (uke 9). Mens skummet kjernemelk ble filtrert ved blokk 2 (uke 6) og blokk 4 (uke 10). Videre er de to filtreringsforsøkene ved hver blokk omtalt som dag 1 og dag 2. Skummet melk og kjernemelk ble mikrofiltrert ved å bruke en keramisk MF-membran med porestørrelse på 0,14  $\mu\text{m}$ . Retentat og permeat fra filtreringsforsøkene ble samlet opp i separate tanker. Etter et filtreringsforsøk ble anlegget vasket. For hver blokk ble filtreringssystemet vasket med den originale vaskeprosedyren en dag, og vasket med den alternative vaskeprosedyren neste dag. Totalt ble filtreringssystemet vasket med den originale vaskeprosedyren (vaskeprosedyre 1) to ganger etter filtrering av både skummet melk og kjernemelk. Filtreringssystemet ble også vasket med den alternative vaskeprosedyren to ganger etter filtrering av skummet melk og kjernemelk. En forenklet oversikt over forsøksdesignet er presentert i figur 3.1.1.



**Figur 3.1.2:** Forsøksdesignet for vaskeprosedyrene av MF-membranene i dette studiet.

## 3.2 Mikrofiltrering og vasking

Mikrofiltreringen og vaskingen foregikk i pilotanlegget ved Norges miljø- og biovitenskapelige Universitet (NMBU), ved fakultetet for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Figur 3.2.1 viser hvilke parametere som ble registrert ved hvert filtreringsforsøk.



*Figur 3.2.1: Mikrofiltreringsanlegget i pilotanlegget ved NMBU. Parameterne som ble registrert under filtreringsforsøkene er merket. I tillegg er balansetanken merket (Foto: Morten Lønvik).*

### 3.2.1 Melkebehandling

Melk fra Ås gård ble transportert til piloten og separert (Westfalia Separator AG, MSD50–01–076, Oelde, Tyskland). Melken som ikke ble filtrert samme dag som ankomst, ble kjølelageret (4 °C) til neste filtreringsforsøk. Kjernemelken ble tappet uken før filtreringsforsøkene, og fraktet fra TINE Meieriet Jæren til NMBU. Før hvert filtreringsforsøk ble kjernemelken separert (Westfalia Separator AG, MSD50–01–076, Oelde, Tyskland). I likhet med melken, ble kjernemelken som ikke ble filtrert første dag, kjølelageret (4 °C) til neste forsøk.

### **3.2.2 Mikrofiltrering**

Mikrofiltreringen ble gjennomført ved hjelp av et småskala mikrofiltreringsanlegg-anlegg (APV UF/MF pilot MCC RV 00109921 RKA 01118340, APV, Silkeborg, Danmark), med et Uniformt transmembran trykk (UTP) system. MF-anlegget var utstyrt med et permeat avkjølingssystem i henhold til den norske patenten nr. 330181 (Hoffmann, 2011).

Dødvolumet til dette anlegget var satt til 35 liter. For hvert filtreringsforsøk ble 400 L skummet melk og kjernemelk filtrert. Filtreringsforsøkene ble gjennomført ved å bruke tubulære keramiske MF-membraner (Tami Industries, Frankrike) med en porestørrelse på 0,14  $\mu\text{m}$  og med et areal på 2,12  $\text{m}^2$ . Før filtreringsforsøkene ble både skummet melk og kjernemelk temperert til ca. 50  $^{\circ}\text{C}$  i fødetanken. Temperaturen under filtreringsforløpet varierte mellom 49-56  $^{\circ}\text{C}$ .

Konsentrasjonsfaktoren (CF) varierte med tanke på proteinkonsentrasjonen til råstoffet som ble filtrert, og ut ifra hvor mye råstoffene skulle konsentreres. Skummet melk ble konsentrert til et proteininnhold på 8 %, og med en gjennomsnittlig CF for alle filtreringene av skummet melk var 2,6 ( $\pm 0,46$ ). Skummet kjernemelk ble konsentrert til et proteininnhold på 6 %, og med en gjennomsnittlig CF på 2,0 ( $\pm 0,28$ ). Transmembrantrykket (TMP) varierte for hver filtrering, men et gjennomsnittlig TMP var 0,18 ( $\pm 0,04$ ) bar ved filtrering av skummet melk og 0,23 ( $\pm 0,14$ ) bar ved filtrering av skummet kjernemelk.

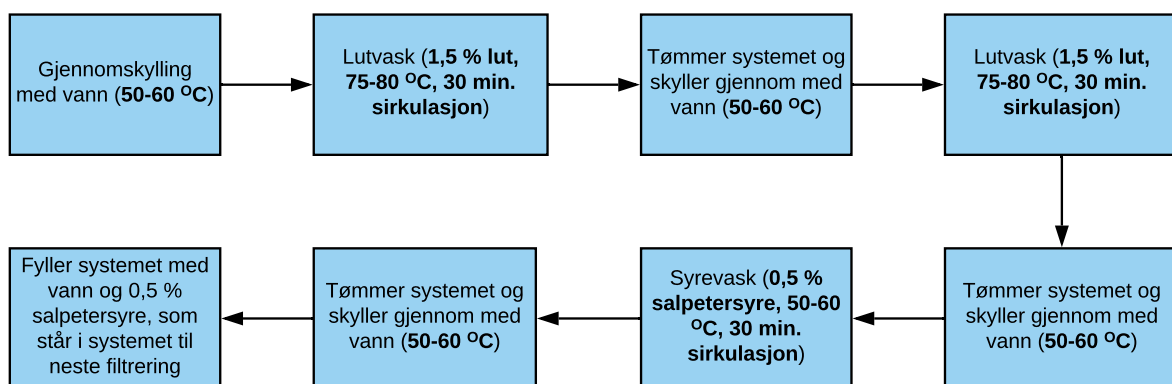
### **3.2.3 Vasking av mikrofiltreringsanlegget**

Etter endt filtrering av skummet melk og kjernemelk ble MF-anlegget vasket. Vaskingen ble gjennomført ved å alternere mellom to ulike vaskeprosedyrer. Der den ene var den originale vaskeprosedyren, som filtreringsanlegget til vanlig ble vasket med. Den andre var en alternativ vaskeprosedyre som ble utarbeidet på bakgrunn av industriell vask av MF-membraner. Beskrivelse av vaskeprosedyrene er beskrevet i kapittel 3.2.3.1 og 3.2.3.2. Forskjellene mellom disse vaskeprosedyrene er beskrevet i nevnte kapitler.

### 3.2.3.1 Original vaskeprosedyre

Rengjøring av MF-anlegget med den originale prosedyren ble gjennomført med lut-lut-syre som rekkefølge på vask. Figur 3.2.2 gir en oversikt over trinnene i den originale vaskeprosedyren.

Ved avslutning av filtrering ble retentatflowen økt, slik at mer retentat strømte ut. Etter avslutning ble systemet skylt godt med vann til det ikke strømte restprodukt ut fra permeat- og retentatstrømmen. Permeat- og retentat slangene ble satt tilbake til balansetanken. Balansetanken ble fylt med vann, og 1,5 % av et alkaliske vaskemiddel (Ultrasil 25, Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Tyskland) ble tilsatt. Retentatslangen ble tatt ut av balansetanken til det begynte å skumme, før den ble satt tilbake. Lutvasken ble sirkulert i 30 minutter, ved en temperatur på 75-80 °C. Etter det første trinnet med lutvask, ble filtreringssystemet tømt for vaskevann. Filtreringssystemet ble videre skylt godt med vann (50-60 °C). Balansetanken ble på nytt fylt med vann og tilsatt 1,5 % av et alkalisk vaskemiddel (Ultrasil 25, Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Tyskland). Lutvasken ble sirkulert i 30 minutter, ved en temperatur på 75-80 °C. Etter det siste trinnet med lutvask, ble filtreringssystemet tømt for vaskevann og skylt ekstra godt med vann (50-60 °C) før syrevask. Deretter ble balansetanken fylt med vann og 0,5 % salpetersyre (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrike) ble tilsatt. Syrevasken ble sirkulert i 30 minutter ved en temperatur på 50-60 °C. Etter trinnet med syrevask, ble filtreringssystemet tømt og skylt godt med vann (50-60 °C). Deretter ble balansetanken fylt med vann, og tilsatt 0,5 % salpetersyre (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrike), som sto i systemet til neste filtrering.

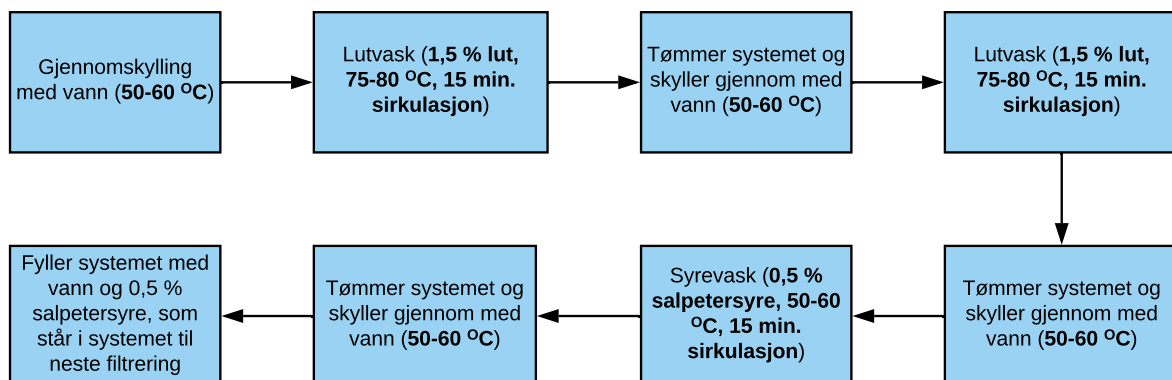


Figur 3.2.2: Flytskjema for den originale vaskeprosedyren.

### 3.2.3.2 *Alternativ vaskeprosedyre*

Rengjøring av MF-anlegget ved denne prosedyren ble gjennomført med samme rekkefølge som den originale vasken (lut-lut-syre). Forskjellen fra den originale prosedyren var at sirkuleringstiden ble redusert for syrevasken og begge trinnene med lutvask. En oversikt over den alternative vaskeprosedyre er skissert i figur 3.2.3. Denne prosedyren ble basert etter hvordan keramiske MF-membraner vaskes industrielt.

Ved avslutning av filtrering ble retentatflowen økt, slik at mer retentat strømte ut. Etter avslutning ble systemet skylt godt med vann til det ikke strømte restprodukt ut fra permeat- og retentatstrømmen. Permeat- og retentat slangene ble satt tilbake til balansetanken. Balansetanken ble fylt med vann, og 1,5 % av et alkalisk vaskemiddel (Ultrasil 25, Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Tyskland) ble tilsatt. Retentatslangen ble tatt ut av balansetanken til det begynte å skumme, før den ble satt tilbake. Lutvasken ble sirkulert i 15 minutter ved en temperatur på 75-80 °C. Etter det første trinnet med lutvasken, ble systemet tømt for vaskevann. Vann (50-60 °C) ble videre skylt gjennom systemet. Balansetanken ble på nytt fylt med vann, og tilsatt 1,5 % av et alkalisk vaskemiddel (Ultrasil 25, Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Tyskland). Lutvasken ble sirkulert i 15 minutter ved en temperatur på 75-80 °C. Etter det siste trinnet med lutvask, ble systemet tømt for vaskevann og skylt ekstra godt med vann (50-60 °C) før syrevasken. Deretter ble balansetanken fylt med vann og 0,5 % salpetersyre (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrike) ble tilsatt. Syrevasken ble sirkulert i 15 minutter ved en temperatur på 50-60 °C. Etter trinnet med syrevask ble systemet tømt, og skylt godt med vann (50-60 °C). Deretter ble balansetanken fylt opp med vann, og tilsatt 0,5 % salpetersyre (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrike), som sto i systemet til neste filtrering.



**Figur 3.2.3:** Flytskjema for den alternative vaskeprosedyren.

### 3.3 Prøveuttak

Prøvene som senere ble analysert mikrobiologisk og kjemisk, ble tatt ut aseptisk ved hjelp av sterile bulkotester. Prøveuttaket av råstoffene ble gjort i forkant av filtreringen. Prøvene av retentatet og permeatet ble tatt ut fra separate tanker, som retentatet og permeatet ble samlet opp i under filtreringene. Uttaket av skyllevannsprøver ble gjort etter at skyllevann ble samlet opp i separate beholdere. Hvor den ene beholderen inneholdt skyllevann fra retentatstrømmen, mens den andre beholderen inneholdt skyllevann fra permeatstrømmen. Det ble tatt ut prøver av skyllevannet før den første lutvasken (første skyllevann). Samtidig ble det tatt ut prøver av skyllevannet etter at vasken var ferdig (siste skyllevann). Den første blokken var begge skyllevannsprøvene en blanding fra retentat- og permeatstrømmen. Deretter ble det tatt ut to separate skyllevannsprøver. Hvor et uttak var fra retentatstrømmen og et fra permeatstrømmen. Tabell 3.3.1 viser hvilke prøveuttak som ble gjort hver uke (blokk) med koden til prøvene i parentes.

**Tabell 3.3.2:** Oversikt over prøveuttakene, med prøvekode i parentes.

Blokk 1	Melk (M)	Retentat (RM)	Permeat (PM)	Skyllevann 1 (S1M)		Skyllevann 2 (S2M)	
Blokk 2	Kjernemelk (KM)	Retentat (RKM)	Permeat (PKM)	Skyllevann 1 – retentat strøm (S1KM-R)	Skyllevann 1 – permeat strøm (S1KM-P)	Skyllevann 2 – retentat strøm (S2KM-R)	Skyllevann 2 – permeat strøm (S2KM-P)
Blokk 3	Melk (M)	Retentat (RM)	Permeat (PM)	Skyllevann 1 – retentat strøm (S1M- R)	Skyllevann 1 – retentat strøm (S1M-P)	Skyllevann 2 – retentat strøm (S2M-R)	Skyllevann 2 – permeat strøm (S2M-P)
Blokk 4	Kjernemelk (KM)	Retentat (RKM)	Permeat (PKM)	Skyllevann 1 – retentat strøm (S1KM-R)	Skyllevann 1 – retentat strøm (S1KM-R)	Skyllevann 2 – retentat strøm (S2KM-R)	Skyllevann 2 – permeat strøm (S2KM-P)



### 3.4 Mikrobiologiske analyser

Prøvene (tabell 3.3.1) til mikrobiologiske analyser ble lagret kjølig etter uttak. Den mikrobielle kvaliteten til prøvene ble undersøkt for en rekke indikatorer. Prøvene ble analysert for innholdet av bakteriofag, psykrotrofe mikroorganismer, mesofile mikroorganismer og endosporedannende mikroorganismer (aerobe og anaerobe).

#### 3.4.1 Bakteriofag

Tilstedeværelsen til bakteriofag ble undersøkt ved hjelp av en plakk-test. Denne analysen ble gjennomført på grunn av problemene *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager kan forårsake ved framstillingen av fermenterte meieriprodukter, dersom de infiserer et meieri. Bakteriofag infeksjon kan enten hemme eller stanse fermenteringer. Denne indikatoren ble også undersøkt på grunn av hypotesen som påsto at bakteriofag elimineres av lut.

##### 3.4.1.1 Bakteriestamme

Til analysene for bakteriofag ble en indikatorbakterie (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 1403) utdelt. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* er en gruppe av melkesyrebakterier som er mest utsatt for angrep av fag (Marcó et al., 2012). Slike arter er også vanlig å finne i mesofile syrekulturer som for eksempel i en DL-kultur eller en O-kultur (Walstra et al., 2006). Indikatorstammen som ble utlevert var en laboratoriestamme av *L.lactis* (Bolotin et al., 2001).

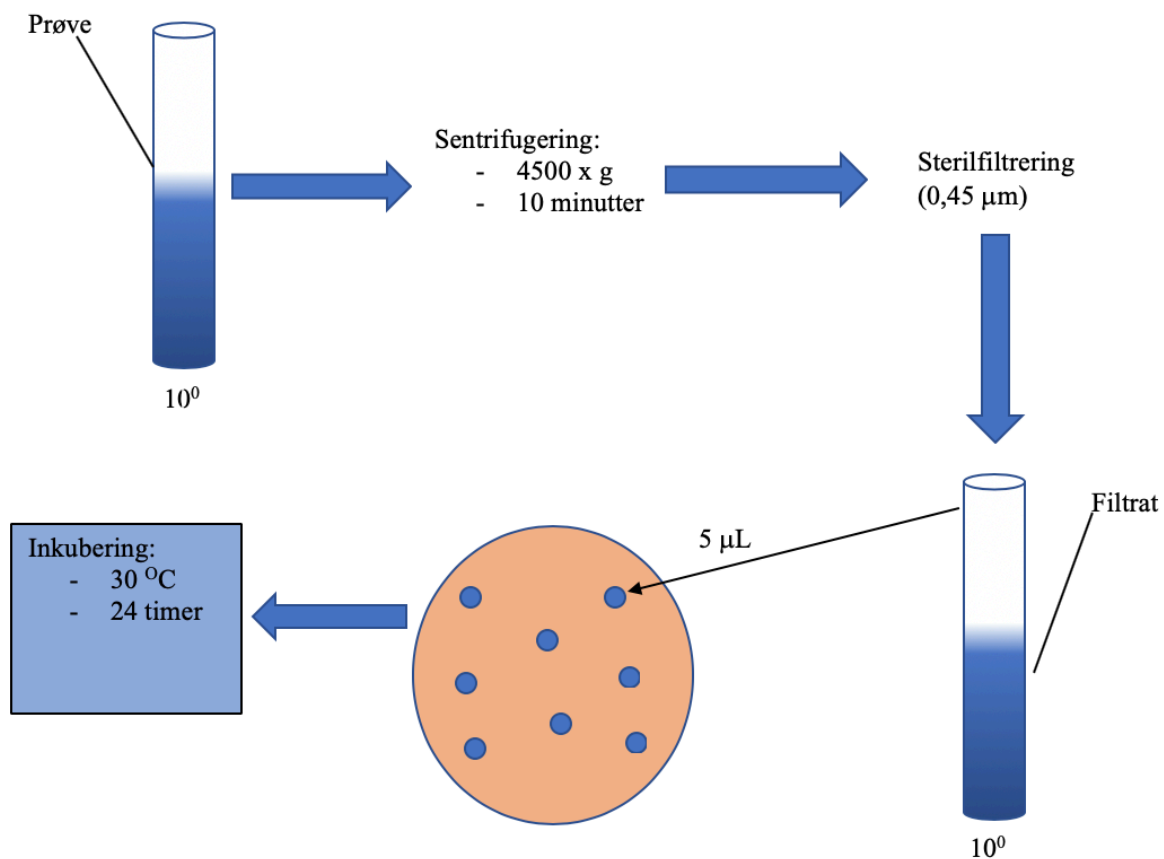
Bakterien ble valgt på grunn av sensitiviteten den hadde til bakteriofager. Samt på grunn av *L.lactis* arter er vanlig å finne i syrekulturer til produksjon av løpefelt ost. Gjennom hele perioden ble indikatorstammen podet om daglig i en GM17 buljong.

##### 3.4.1.2 Forarbeid

I forkant av analysen ble GM17 agar smeltet og fordelt på petriskåler. Soft agaren ble smeltet i et vannbad (100 °C) og deretter plassert i et nytt vannbad (48,4 °C) for temperering. Videre ble en toppagar laget ved å blande 25 µL CaCl<sub>2</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), 300 µL *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 1403 og 3 mL soft agar. Denne blandingen ble tilsatt et rør og mikset ved hjelp av en whirlmikser. Deretter ble toppagaren støpt på en GM17 skål.

### 3.4.1.3 Plakk-testen

Prøvene (8 mL) ble sentrifugert (Eppendorf centrifuge 5804, Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) ved 4500 x g i 10 minutter. Supernatanten for hver prøve ble sterilfiltrert (0,45 µm). Deretter ble 5 µL av ufortynnet filtrat pipettert på en GM17 støpt petriskål med toppagar. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 1 døgn. Dagen etter ble skålene undersøkt for plakk, og plakkdannende enheter ble beregnet. Figur 3.4.1 viser fremgangsmåten for plakk-test av prøvene som ble tatt ut.



*Figur 3.4.1: Flytskjema for plakk-test. Prøven sentrifugeres, sterilfiltreres, før filtratet pipetteres på skål. Avslutningsvis inkuberes prøven.*

### 3.4.2 Stresstesting av bakteriofager

Denne testen ble gjennomført for å dokumentere toleransen bakteriofag hadde til lut. I forkant av testen ble bakteriofag dyrket opp for å få nok fag partikler, slik at testen kunne gjennomføres. I tillegg ble det bestemt å se på faktorene tid og konsentrasjonen til et alkalisk vaskemiddel. Valgte tider og konsentrasjoner er presentert i tabell 3.4.1. Tidene ble valgt på bakgrunn av sirkuleringstiden for det alkaliske vaskemiddelet i de ulike vaskeprosedyrene (15 og 30 minutter). I tillegg ble 45 og 60 minutter valgt. Konsentrasjonene (0,5, 1,0, 1,5 og 2,0

%) av det alkaliske vaskemiddelet ble valgt på bakgrunn av anbefalte konsentrasjoner fra leverandør, hvor den anbefalt dosering var 0-2 %. Før denne testen ble pH på de ulike vaskemiddelkonsentrasjonene målt til henholdsvis pH 12,2, 12,38, 12,5 og 12,6.

Temperaturen var en faktor som kunne blitt tatt med i vurderingen. Men i dette forsøket ble det valgt en temperatur ut ifra vaskeprosedyrene. Begge vaskeprosedyrene opererte med sirkulering ved 75-80 °C. På bakgrunn av dette ble det bestemt til å varmebehandle lut-løsningene i et vannbad ved 80 °C.

**Tabell 3.4.1:** Oversikt over tider og konsentrasjoner av et alkalisk vaskemiddel som ble benyttet i stresstesting av bakteriofag.

Tid [minutter]	15	30	45	60
Konsentrasjon [%]	0,5	1,0	1,5	2,0

#### 3.4.2.1 Oppdyrking av bakteriofag

For å gjennomføre denne analysen ble ulike bakteriofag prøver plakk-testet for å undersøke om de var aktive. Prøvene som ble testet var;  $\phi$ -Voss 15.00,  $\phi$ -Brukssyre 19/7 Nærbø,  $\phi$ -Voss 06.30,  $\phi$ -Voss 7/8 og  $\phi$ -Nærbø 2/1-14.

Ufortynnede fag prøver ble deretter plakk-testet, slik som det beskrevet i kapittel 3.4.1.3. Etter plakk-testen ble det bestemt å bruke  $\phi$ -Voss 15.00 videre. To rør med GM17 buljong ble tilsatt 25  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) og 50  $\mu$ L *Lactococcus lactis* IL 1403 (indikatorbakterie). Det ene røret ble tilsatt 10  $\mu$ L  $\phi$ -Voss 15.00. Det andre røret var en kontroll uten fag. Rørene ble inkubert ved 30 °C til de hadde en OD (optisk tetthet) på 0,2-0,4. Deretter ble røret tilsatt fag sentrifugert (4500 x g, 10 minutter). Supernatanten ble videre sterilfiltrert (0,45  $\mu$ m), og filtratet ble fortynnet til 10<sup>-7</sup>. Deretter ble 5  $\mu$ L av det ufortynnede filtratet samt alle fortynninger pipetert på en GM17 skål med toppagar. Skålen ble inkubert ved 30 °C i 24 timer.

Grunnet lav PFU/mL etter plakk testen ble det bestemt til at prøven måtte dyrkes ytterligere, for å øke mengden fagpartikler. Voss 15.00 filtratet ble dermed brukt til videre oppdyrking av fag partikler. To rør med GM17 buljong ble tilsatt 25  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> og 50  $\mu$ L *Lactococcus lactis* IL 1403. Det ene røret ble tilsatt 1 mL Voss 15.00 filtrat, og det andre røret var en kontroll uten fag. Rørene ble inkubert i 6 timer før røret med fag ble sentrifugert (4500 x g, 10 minutter), og deretter ble supernatanten sterilfiltrert (0,45  $\mu$ m). Filtratet ble videre fortynnet til

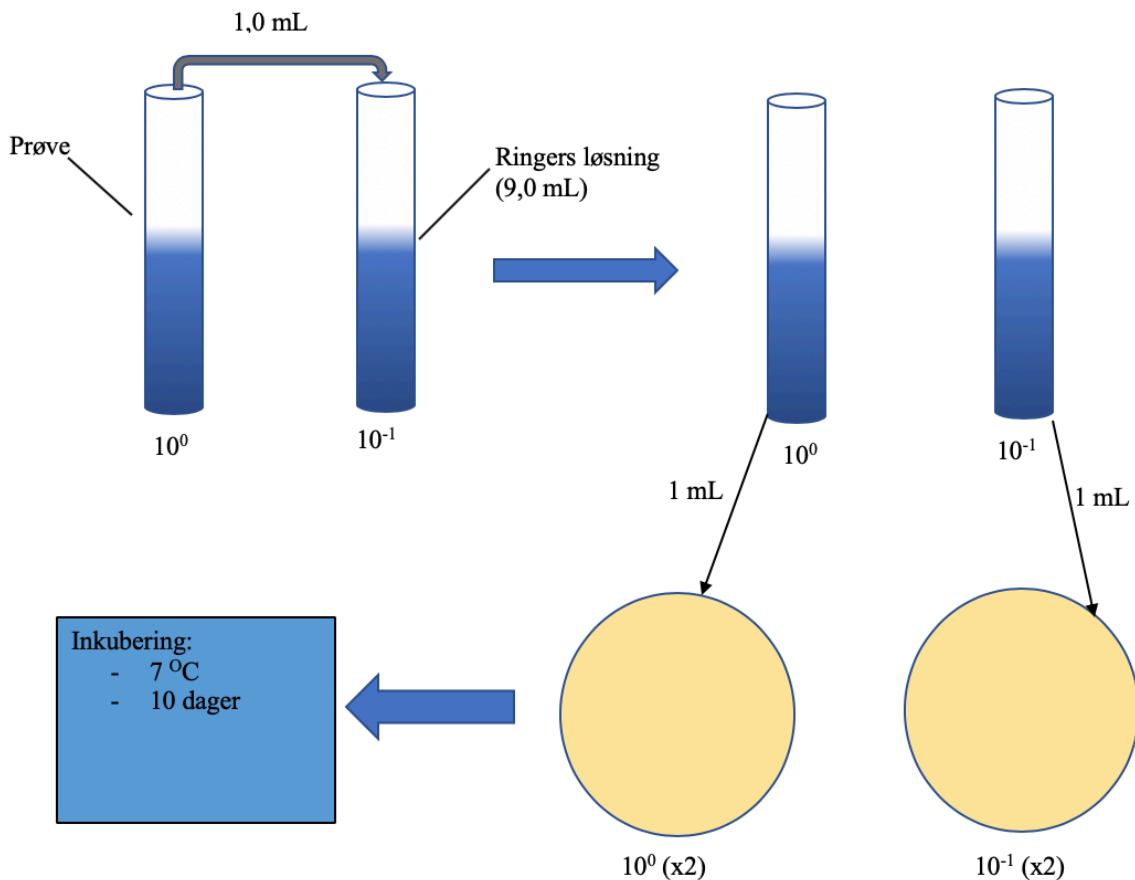
$10^{-7}$ . Ufortynnet filtrat samt alle fortynningene ble plakk-testet. Skålen ble deretter inkubert ved  $30^{\circ}\text{C}$  i 24 timer, og PFU/mL ble beregnet. Plakk-testen viste til en mengde fag-partikler ( $6,0 \times 10^9$  PFU/mL) som var høy nok til å gå videre med stresstesten.

#### **3.4.2.2 Stresstest**

De ulike lutløsningene ble laget ved hjelp av et alkalisk vaskemiddel (Ultrasil 25, Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Tyskland) og destillert vann. Hver løsning ble tilsatt  $100\ \mu\text{L}$  Voss 15.00 filtrat. Løsningene med fag ble deretter plassert i et vannbad ( $80^{\circ}\text{C}$ ). Ved de ulike tidene ble  $400\ \mu\text{L}$  pipetert over i et rør. Hver tid/konsentrasjon kombinasjon ble videre fortynnet til  $10^{-7}$  og plakk-testet. Plakk-testen ble gjennomført slik som beskrevet i kapittel 3.4.1.2 og 3.4.1.3. Deretter ble både ufortynnet prøve samt fortynningsrekken plakk-testet. Skålene ble deretter inkubert ved  $30^{\circ}\text{C}$  i 24 timer.

### 3.4.3 Psykrotrofe mikroorganismer

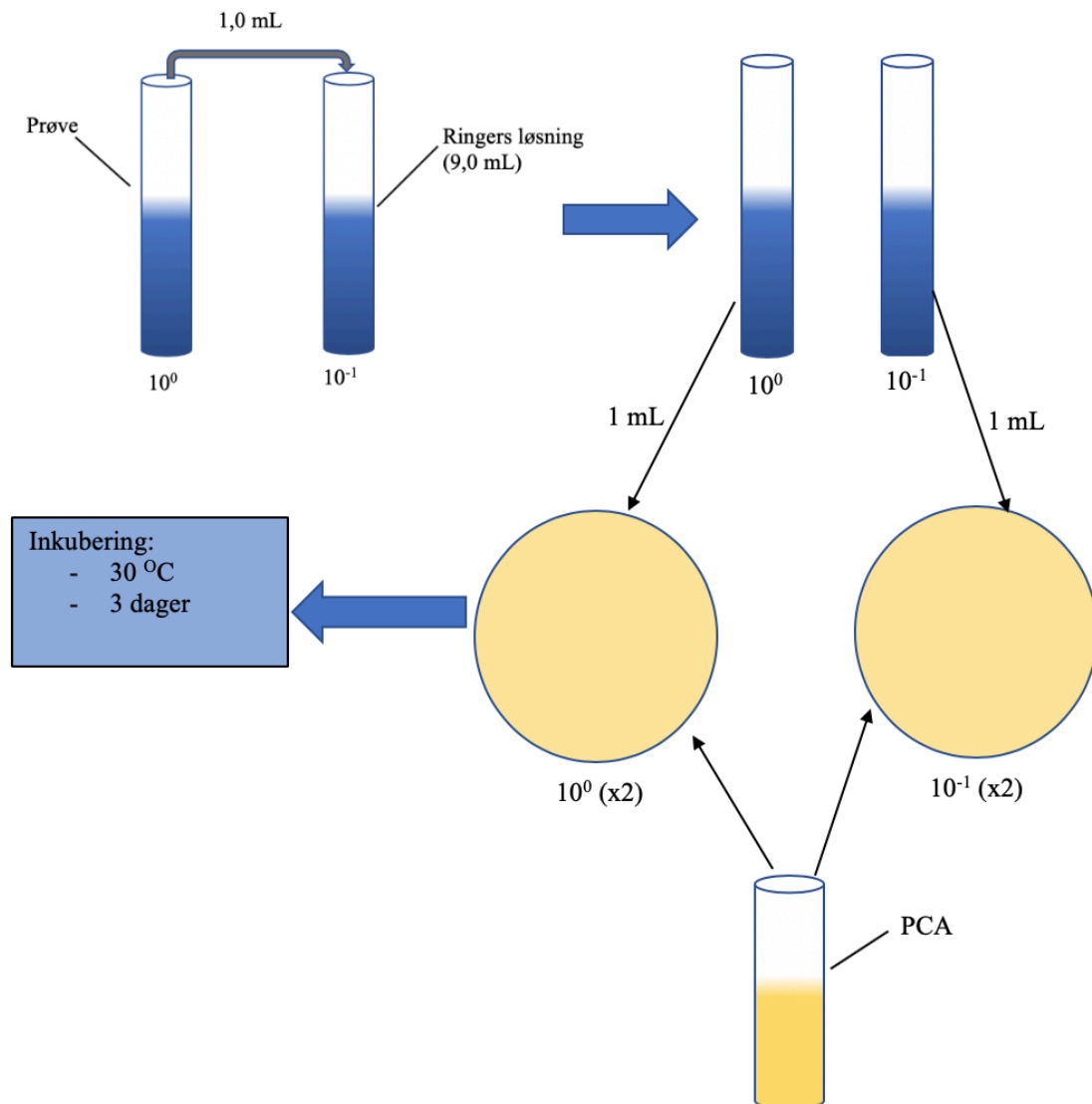
I forkant av denne analysen ble petriskåler støpt med PCA (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland). Prøvene ble fortynnet til  $10^{-1}$ . Til denne analysen ble ufortynnet ( $10^0$ ) prøve og  $10^{-1}$  fortynning analysert ved hjelp av overflatespredning på PCA. Det ble brukt 2 paralleller av ufortynnet prøve samt  $10^{-1}$  fortynningen. Ufortynnet prøve og  $10^{-1}$  fortynning ble pipettert (1 mL) på PCA støpt petriskål. Prøvene ble overflatespredt ved hjelp av en glass-stav. Glass-staven ble sterilisert vha. etanol (96 %) mellom hver overflatespredning og brent av. Skålene ble deretter inkubert ved  $10^{\circ}\text{C}$  i 10 dager. Etter 10 dager ble antall kolonier telt og kimtallet ble beregnet. Figur 3.4.2 skisserer fremgangsmåten for denne analysen.



**Figur 3.4.2:** Flytskjema for analysen av psykrotrofe mikroorganismer. Prøven fortynnes til  $10^{-1}$ , og overflatespres på PCA (Plate Count Agar), før skålene avslutningsvis blir inkubert.

### 3.4.4 Mesofile mikroorganismer

Prøvene ble i forkant av analysen fortynnet til  $10^{-1}$ . PCA (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) ble smeltet i et vannbad ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) og temperert i et annet vannbad ( $48,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Til denne analysen ble 2 paralleller av ufortynnet prøve samt  $10^{-1}$  fortynningen analysert. Prøvene ble pipetert (1 mL) over til petriskåler. PCA ble helt over i petriskålene, før prøve og agar ble blandet forsiktig. Skålene ble deretter inkubert ved  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 3 dager, og kimtallet ble beregnet. Figur 3.4.3 illustrerer trinnene i denne analysen.

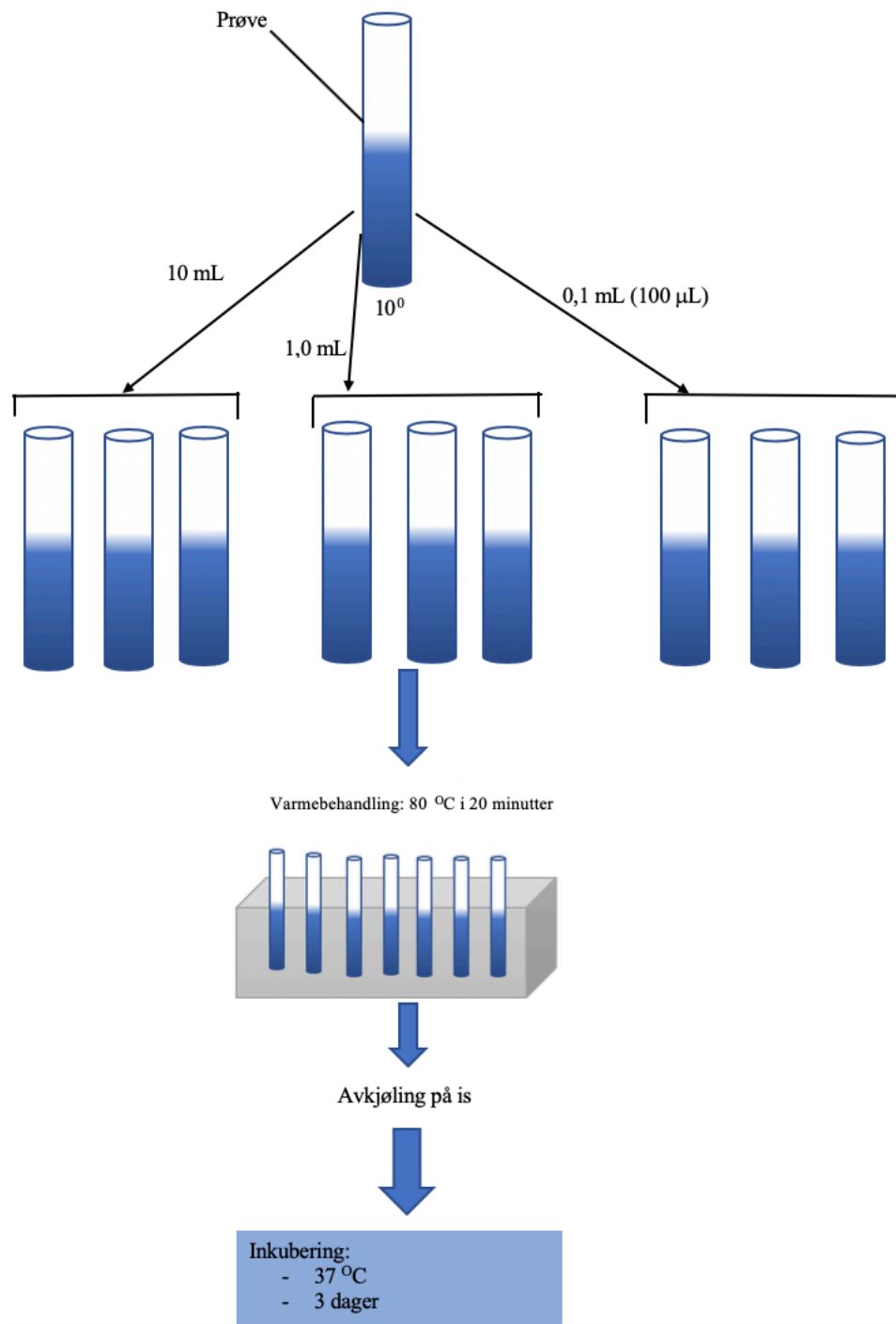


**Figur 3.4.3:** Flytskjema for analysen av mesofile mikroorganismer. Prøven fortynnes til  $10^{-1}$ , og støpes inn av PCA (Plate Count Agar), før skålene inkuberes.

### 3.4.5 Anaerobe sporedannere

Ved undersøkelse av anaerobe sporedannere ble det brukt en MPN (most probable number) metode. Dette er en metode som benyttes i tilfeller hvor en forventer et lavt antall (< 10 MPN/ml). Det ble på forhånd lagd et vekstmedium kalt RCM (Oxoid, Basingstoke, England), samt en voksblending av vaselin (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrike) og parafin (Sigma-aldrich)

Weinzirl's rør med RCM og voks (vaselin/parafin blanding) ble lagd på forhånd. For hver prøve var det behov for 9 rør. Hvor 10 ml prøve ble pipettert over i 3 rør, 1,0 ml i 3 rør og 0,1 ml (100 µl) i 3 rør. Hvert rør ble merket med prøvenavn og prøvevolum. Prøvene ble pipettert slik at de befant seg over voks (vaselin/parafin)-laget. Stativet med alle rørene ble satt i et vannbad (80 °C). Prøvene ble varmebehandlet ved denne temperaturen i 20 minutter, og deretter avkjølt på is. Under varmebehandlingen smeltet voks-laget og prøvene diffundererte gjennom dette laget. Etter avkjøling ble rørene inkubert ved 37 °C i 3 dager. Figur 3.4.4 viser et flytskjema for denne analysen. Etter 3 dager ble rørene undersøkt for gassdannelse, hvor antall rør med gassdannelse ble notert. Dette ga en kombinasjon på antall rør med gassdannelse for hver fortykning. «Mest sannsynlig antall» *Clostridium* ble beregnet ved hjelp av MPN tabellen (vedlegg 2).

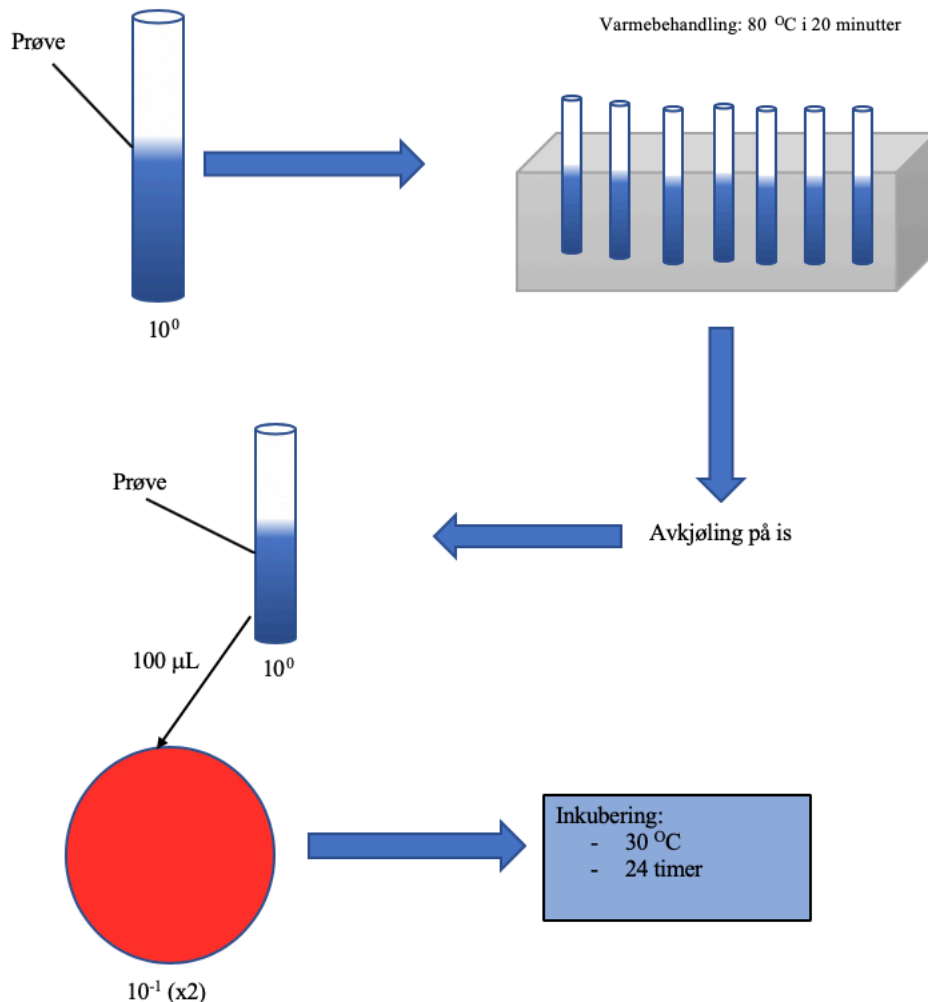


**Figur 3.4.4:** Flytskjema for MPN (Most Probable Number) metoden for analysen av anaerobe sporedannere. Prøven pipetteres (10 mL, 1,0 mL og 0,1 mL) over i tre rør. Rørene varmebehandles ved 80 °C i 20 minutter, før de avkjøles og inkuberes.



### 3.4.6 Aerobe sporedannere

I forkant av analysen ble petriskåler med BHI (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrike) agar støpt. To paralleller av  $10^{-1}$  fortynning ble analysert ved hjelp av overflatespredning. Ufortynnede prøver ble varmebehandlet i et vannbad ( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i 20 minutter. Deretter ble stativet plassert på is for nedkjøling. For å få  $10^{-1}$  fortynning på skål ble  $100\text{ }\mu\text{l}$  av ufortynnet prøve pipettert på BHI støpte petriskålene. Videre ble pipettert prøve overflatespredt ved hjelp av en glass-stav. Glass-staven ble sterilisert vha. etanol (96 %) mellom hver overflatespredning og brent av. Skålene ble deretter inkubert ved  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 24 timer. Etter inkubering ble kolonitall telt, og kintallet ble beregnet. Figur 3.4.5 viser et flytskjema for denne analysen.



**Figur 3.4.5:** Flytskjema for analysen for aerobe sporedannere. Prøven varmebehandles ved  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 20 minutter, før den avkjøles, og overflatespres på BHI-agar. Deretter inkuberes prøven.

### **3.5 Kjemiske analyser**

Den kjemiske sammensetningen til prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet melk og kjernemelk, ble undersøkt ved å gjennomføre flere kjemiske analyser. Prøvene ble analysert for innholdet av tørrstoff, brix (løselig tørrstoff), protein, mineraler, samt at pH ble målt. De fleste prøvene som skulle analyseres kjemisk, ble fryst ned etter hvert filtreringsforsøk. Analysene for % Brix og pH ble gjennomført samme dag som filtrering og vasking i pilot-anlegget. Prøvene som skulle analyseres for tørrstoff og protein ble tint i forkant av gjennomføring av analyser. Mineralprøvene ble fryst ned, og på et senere tidspunkt analysert ved et annet laboratorium. Underveis i filtreringen ble retentatet analysert ved hjelp av milkoscan (FTIR) for å kontrollere konsentrasjonen av proteinet. På denne måten var det mulig å kontrollere når målkonsentrasjonen av protein ble oppnådd.

#### **3.5.1 Proteininnhold (Kjeldahl)**

Bestemmelsen av det totale nitrogen innholdet i prøvene og beregning av proteininnhold ble gjort i henhold til IDF-standard 20A (IDF, 1986). Innholdet av totalt nitrogen ble analysert ved hjelp av mikroKjeldahl (Kjeltec™ 8400 Analyzer Unit, Foss Analytics). Videre ble det totale proteininnholdet beregnet ved å multiplisere totalt nitrogen innhold med en faktor på 6,38.

Prøvene ble veid til ca. 0,5 gram. For hver prøve ble det veid opp til 3 paralleller. Hvert rør ble tilsatt 1 Kjeldahl tablett (Kjeltabs Auto-AA11, Thompson and Capper Ltd.) og 3 mL konsentrert H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Svovelsyre). Rørene ble videre satt i en varmeblokk (Tecator™ Digestor auto, Foss analytics) for oppslutning. Der ble prøvene kokt ved 420 °C i 1 time før rørene ble avkjølt. Deretter ble rørene satt i mikroKjeldahl (Kjeltec™ 8400 Analyzer Unit, Foss Analytics) for destillering. Etter destillering ble prøvesvaret lest av, og % totalt nitrogeninnhold samt totalt proteininnhold ble beregnet.

#### **3.5.2 Tørrstoff (TS)**

Analysen av tørrstoff (TS) i prøvene ble gjennomført i henhold til IDF standard 21B, «Tørrstoff i melk og skummet melk» (IDF, 1987).

Tomme aluminiumsskåler ble veid. Før innveiging ble prøvene rørt godt om, slik at prøvene skulle være så homogene som mulig. Videre ble ca. 2 gram prøve veid opp i en tom aluminiumsskål med kjent vekt. Det ble veid inn to paralleller med så lik vekt som mulig.

Etter innveiling av prøver ble de satt inn i et varmeskap (VENTI-Line, VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankrike). Tørking av prøvene skjedde i varmeskapet over 4 timer ved 102 °C. Etter 4 timer ble de tørkede prøvene satt i eksikator for avkjøling. Deretter ble skålene med tørket prøve veid og % TS ble beregnet.

### **3.5.3 Brix**

Måling av % Brix (løselig tørrstoff) ble gjennomført ved hjelp av et refraktometer (PR-201, Palette, Atago, USA). Refraktometeret ble nullstilt ved hjelp av destillert vann før første måling og mellom hver måling. Destillert vann skulle gi et resultat på 0 % Brix. Ved målingen ble en dråpe av prøven avsatt ved hjelp av en pasteur-pipette og % Brix ble lest av.

### **3.5.4 Mineraler**

Mineralinnholdet i prøvene ble analysert ved fakultetet for miljøvitenskap og naturforvaltning ved NMBU. Analysen ble gjennomført under ledelse av senioringeniør Solfrid Lohne.

Konsentrasjonen (g/kg) ble beregnet etter innveid prøvemengde. Prøvene (ca. 1,00 g) ble dekomponert i 5 mL Ultrapure konsentrert HNO<sub>3</sub> ved 260 °C. Dette ble gjort i en UltraClave (Milestone), og ble videre fortynnet til 50,0 mL med deionisert vann. Prøvene ble kvantifisert med 5110 ICP-OES (Agilent Technologies). Til denne analysen ble sertifisert referansemateriale av melkepulver (ERM-BD150) dekomponert og målt samtidig.

### **3.5.5 pH**

pH-meteret (Orion Star A211, Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ble kalibrert mot buffere (pH 4 (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) og 7 (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland)) før bruk. Målingene av pH ble gjort samme dag som filtreringsforsøkene.

### **3.5.6 Milkoscan (FTIR)**

I forkant av mikrofiltrering ble råstoffet som skulle filtreres analysert ved hjelp av MilkoScan™ FT2 (Foss Analytics). Dette ble gjort for å vite proteininnholdet før filtrering. Ut ifra dette resultatet ble en konsentrasjonsfaktor (CF) for mikrofiltreringen satt. Slik var det mulig å finne ut hvor mye proteininnholdet skulle konsentreres. Underveis i filtreringen ble det gjort det hyppige målinger for å kontrollere konsentreringen av protein.

### 3.6 Statistiske analyser

Statistiske analyser ble gjennomført for å undersøke om det var en effekt av variasjon av råstoff og vaskeprosedyre på analyseresultater. Det ble gjennomført en variansanalyse i form av en enveis-ANOVA analyse, ved hjelp av programmet R Commander (versjon 3.5.1). For å undersøke om effekten av forsøksfaktorene var signifikant eller ikke, ble signifikansnivået  $\alpha$  satt til 0,05.

To forsøksfaktorer ga følgende modell:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  er responsen som ble undersøkt med tanke på forsøksfaktorene råstoff og vaskeprosedyre, samt interaksjonseffekten mellom disse faktorene.  $\mu$  er gjennomsnittet,  $\alpha_i$  er faktoren råstoff,  $\beta_j$  er faktoren vaskeprosedyre,  $\alpha\beta_{ij}$  er interaksjonen mellom råstoff og vaskeprosedyre, mens  $\varepsilon_{ijk}$  er variasjonen som ikke blir forklart av modellen.

Videre ble følgende hypoteser satt:

$H_0$ : Faktorene råstoff og vaskeprosedyre hadde ingen effekt

$H_1$ : Faktorene hadde en effekt

Nullhypotesen ( $H_0$ ) kunne forkastes dersom p-verdien var lavere enn 0,05 ( $p < \alpha$ ). Dersom p-verdien var høyere enn 0,05 var nullhypotesen gjeldende.

## 4 Resultater

### 4.1 Mikrofiltrering

Det ble totalt gjennomført åtte filtreringsforsøk. Skummet melk og kjernemelk ble filtrert fire ganger. Ved hvert filtreringsforsøk, ble parameterne trykk, flow og temperatur registrert.

Trykkregistreringene var trykket inn til anlegget, samt trykk inn og ut på permeat og retentat siden av membranen. Basert på registreringene ble transmembrantrykket (TMP) og permeat fluxen beregnet. Beregningen av permeat flux ble basert på permeatflowen og membranarealet (2,12 m<sup>2</sup>). Mens beregningen av TMP ble basert på trykk registreringene.

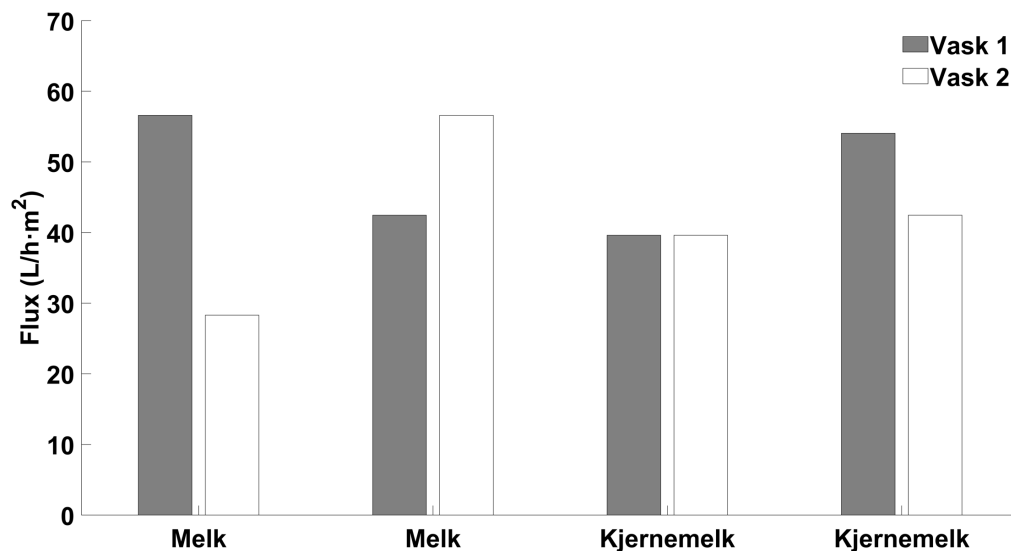
#### 4.1.1 Vannflux

I forkant av hver filtrering ble vannfluxen (permeat flux til rent vann) registrert.

Registreringene av vannfluxen ga en indikasjon på renheten til anlegget, og var i tillegg et mål på effekten av rengjøringen av anlegget, etter den foregående filtreringsprosessen. Figur 4.1.1 viser hvordan vannfluxen var etter filtrering av skummet melk og kjernemelk. Figuren viser også hvilken vaskeprosedyre anlegget ble vasket med. Vannfluxen etter en vask ble målt ved oppstart av neste filtrering. Etter endt vask ble en 0,5 % salpetersyreløsning tilsatt balansetanken. Denne løsningen sto i filtreringssystemet fra endt vask til neste filtreringsforsøk. Tabell 4.1.1 viser effekten variasjonen av råstoff og vaskeprosedyre hadde på vannfluxen, i tillegg til interaksjonseffekten.

**Tabell 4.1.3:** Effekten variasjonen ulike råstoffer og vaskeprosedyrer hadde på vannflux. I tillegg er interaksjonseffekten presentert. Resultatene er oppgitt som p-verdi.

Effekt av råstoff [p-verdi]	Effekt av vaskeprosedyre [p-verdi]	Interaksjonseffekt (p-verdi)
0,826	0,501	0,945

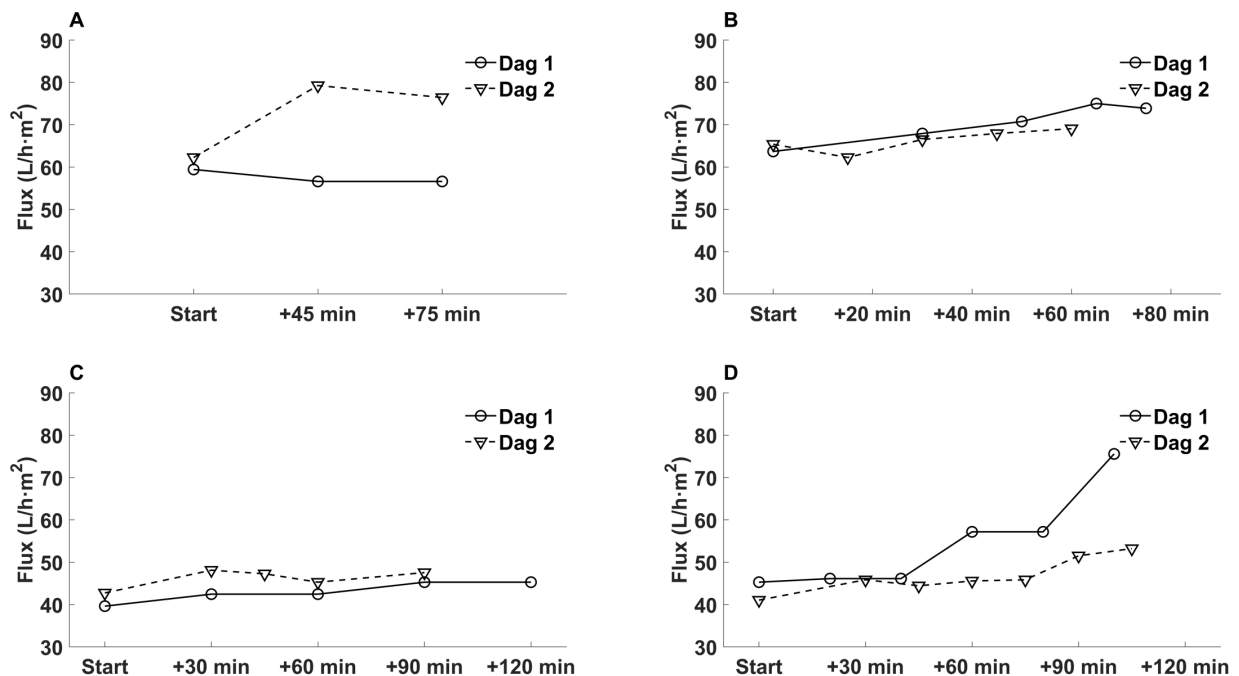


**Figur 4.1.4:** Vannflux ( $L/hm^2$ ) etter mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk, og etter vask med ulike prosedyrer. Vask 1: original vaskeprosedyre. Vask 2: alternativ vaskeprosedyre. Vannflux resultater etter filtrering av melk vises for hhv. blokk 1 og 3. Resultatet for vannflux etter filtrering av kjernemelk vises for hhv. blokk 2 og 4. Grå søyle: dag 1, hvit søyle: dag 2.

Figuren viser at vannfluxen som ble beregnet etter filtrering av skummet melk var høyere ved blokk 1, etter at filtreringssystemet ble vasket med den originale vaskeprosedyren. Da skummet melk ble filtrert ved blokk 3, var vannfluxen derimot høyere etter at filtreringssystemet ble vasket med den alternative vaskeprosedyren. Ved filtrering av skummet kjernemelk ved blokk 2, var vannfluxen lik etter begge filtreringsforsøkene. Da kjernemelk ved blokk 4, var vannfluxen høyest etter at filtreringssystemet ble vasket med den originale vaskeprosedyren. Vannfluxen varierte både i forhold til ulikt råstoff og ulik vaskeprosedyre. Denne observasjonen ble bekreftet gjennom variansanalysen som viste til at effekten av faktorene råstoff og vaskeprosedyre ikke var signifikant på vannfluxen.

#### 4.1.2 Endringen av permeat flux

I løpet av hver filtreringsprosess ble permeat fluxen beregnet gjennom registreringer av permeatflowen. Endringen av permeat flux over en filtreringsprosess gjorde det mulig å vurdere filtreringen. Permeat flux blir definert som volumet av en væske som strømmer gjennom membranen per tid over et gitt membranareal. Figur 4.1.2 skisserer hvordan permeat fluxen endret seg over tid da skummet melk og kjernemelk ble mikrofiltrert.

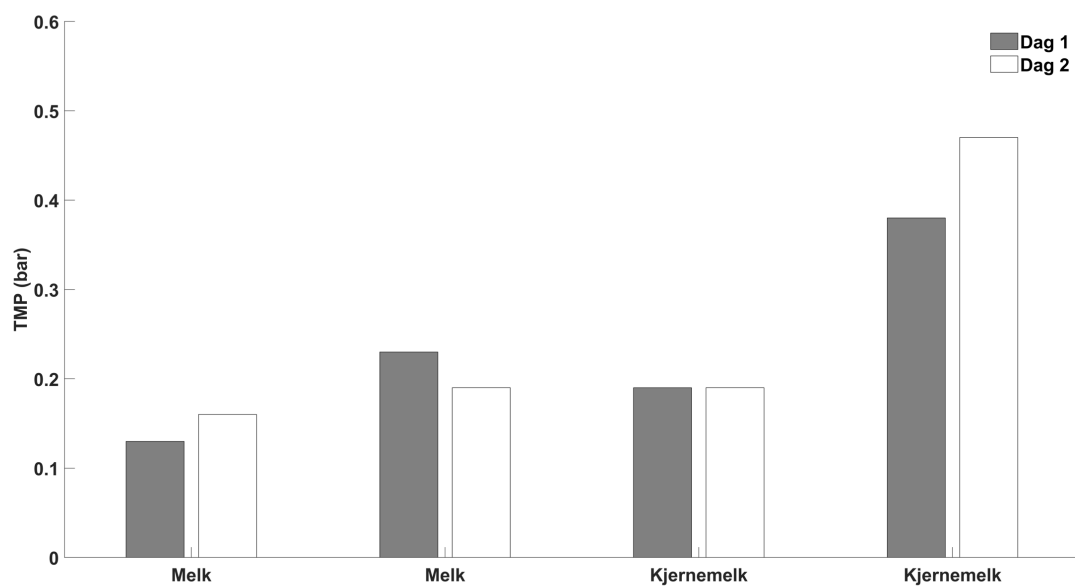


**Figur 4.1.5:** Endring av permeat flux ( $L/h\cdot m^2$ ) under mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Endringen av permeat flux ved mikrofiltrering av melk er presentert i figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3). Mens endringen av permeat flux under filtreringen av kjernemelk er presentert i figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4).

Figuren viser at permeat fluxen økte mest ved filtrering av skummet melk ved blokk 1 (dag 2) og skummet kjernemelk ved blokk 4 (dag 1), sammenlignet med de øvrige filtreringsforsøkene. Permeat fluxen var noe jevn underveis i filtreringsforløpet ved blokk 1 (dag 1). I motsetning økte permeat fluxen tidlig ved dag 2, og var jevn mot slutten. Da skummet melk ble filtrert ved blokk 3 var permeat fluxen jevn mellom begge dagene, men økte mest ved dag 1. Ved filtrering av skummet kjernemelk ved blokk 2 var permeat fluxen jevn. Figuren viser også at permeat fluxen var lite stabil ved filtrering av skummet kjernemelk ved blokk 4.

#### 4.1.3 Transmembrantrykk (TMP)

I forbindelse med hvert filtreringsforsøk, ble TMP beregnet som en gjennomsnittlig verdi for hele filtreringsprosessen. Figur 4.1.3 skisserer forskjellene i TMP for hver blokk med filtrering av skummet melk og kjernemelk. Effekten ulike råstoff hadde på transmembrantrykket ble undersøkt ved hjelp av en variansanalyse, og ga en p-verdi på 0,127.



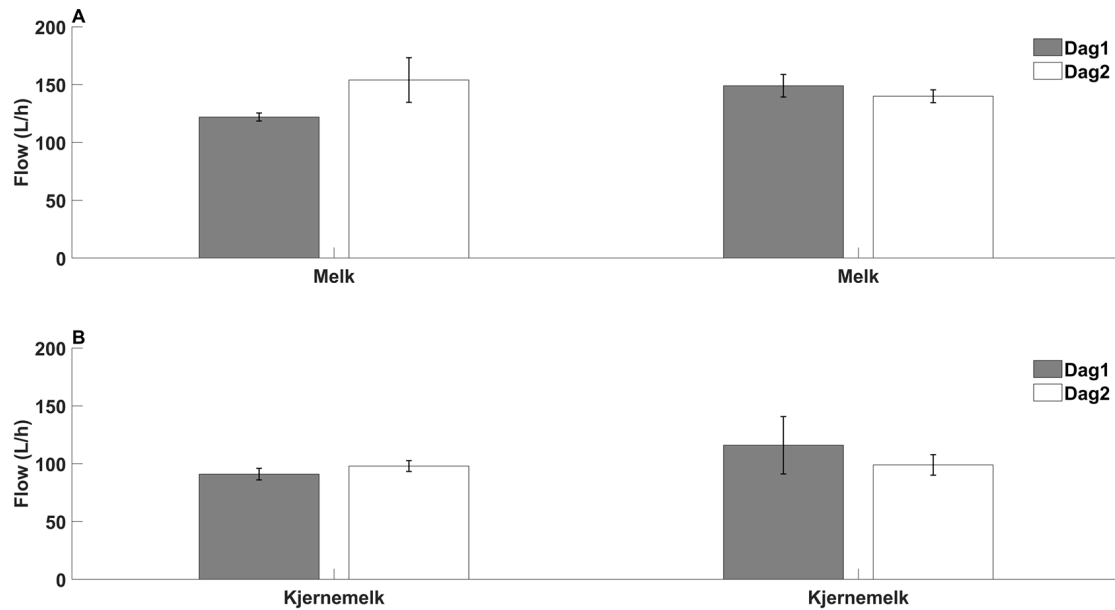
**Figur 4.1.6:** Transmembrantrykket (TMP) [Bar] under mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. TMP ved filtrering av melk er presentert for hhv. blokk 1 og 3. TMP ved filtrering av kjernemelk er presentert for hhv. blokk 2 og 4.

Figuren viser at transmembrantrykket var ustabil da skummet melk ble filtrert. Da skummet kjernemelk ble filtrert ved blokk 2 var TMP lik. Filtrering av skummet kjernemelk ved blokk 4 ga høyere transmembrantrykk sammenlignet med de øvrige filtreringsforsøkene. Figuren viser ingen tydelige forskjeller i TMP mellom filtreringene av skummet melk og kjernemelk. Forskjellene i TMP ved filtrering av de ulike råstoffene var samtidig ikke signifikant.



#### 4.1.4 Permeatflow

Permeatflowen (volumstrømmen) ble registrert under filtrering, og resultatene er presentert i figur 4.1.4. Figuren viser den gjennomsnittlige permeatflowen ved filtrering av skummet melk og kjernemelk. Permeatflowen ble registrert slik at permeat fluxen under filtreringsforløpene kunne vurderes. Blant annet på grunn av at permeatflow er en faktor som permeat fluxen påvirkes av. Effekten ulike råstoffer hadde på permeatflowen ble undersøkt ved hjelp av en variansanalyse, og p-verdien ble beregnet til å være 0,0038.



**Figur 4.1.7:** Permeatflow (L/h) ( $\pm$  standardavvik) ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk.. Figur A (hhv. Blokk 1 og blokk 3): permeatflow ved filtrering av melk. Figur B (hhv. Blokk 2 og 4): permeatflow ved filtrering av kjernemelk.

Permeatflowen var jevn for alle filtreringsforsøkene. Men den var høyere da skummet melk ble filtrert sammenlignet med filtreringene av skummet kjernemelk. Forskjellene i permeatflow mellom skummet melk og kjernemelk, som figuren viser var samtidig signifikant.

## 4.2 Mikrobiologiske analyser

Det ble foretatt flere mikrobiologiske analyser for å få en oversikt over den mikrobielle kvaliteten, i prøvene som tabell 3.3.1 viser. Den mikrobielle kvaliteten ble vurdert ved å analysere for innholdet av mesofile mikroorganismer, psykrotrofe mikroorganismer, bakteriofager og endosporedannende mikroorganismer (aerobe og anaerobe). Den første uken (blokk 1) var skyllevannsprøvene en blanding av retentat- og permeat-strømmen. Men fra og med blokk 2 ble det tatt ut skyllevann fra både retentat- og permeat-strømmen. Vanligvis bør kolonitallet på petriskål være mellom 25 og 250 for at resultatet skal være representativt.

### 4.2.1 Mesofile mikroorganismer

For å få et bilde på den mikrobiologiske kvaliteten, ble prøvene undersøkt for mesofile mikroorganismer. Innholdet av mesofile mikroorganismer ble undersøkt i skummet melk og kjernemelk, retentat, permeat og skyllevann før og etter vask.

#### 4.2.1.1 Skummet melk

Resultatene for analysene i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk, er presentert i tabell 4.2.1.

**Tabell 4.2.1:** Mesofile mikroorganismer (kde/mL) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk. Strek (-) betyr at prøvene ikke ble analysert for mesofile mikroorganismer. S1: skyllevann 1, S2: skyllevann 2, S1<sub>M-R</sub>: skyllevann 1 – retentat strøm, S1<sub>M-P</sub>: skyllevann 1-permeat strøm, S2<sub>M-R</sub>: skyllevann 2-retentat strøm, S2<sub>M-P</sub>: skyllevann 2-permeat strøm.

Prøve	Blokk 1		Blokk 3	
	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2
Skummet melk	Overgrodd	7,0x10 <sup>1</sup>	2,8x10 <sup>2</sup>	1,6x10 <sup>2</sup>
Retentat	2,3x10 <sup>1</sup>	8,4x10 <sup>1</sup>	Overgrodd	1,7x10 <sup>2</sup>
Permeat	4,5x10 <sup>-1</sup>	9,1x10 <sup>-1</sup>	0	0
S1	8,6x10 <sup>0</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	-	-
S1 <sub>M-R</sub>	-	-	8,3x10 <sup>-1</sup>	9,2x10 <sup>0</sup>
S1 <sub>M-P</sub>	-	-	1,5x10 <sup>1</sup>	0
S2	0	5,0x10 <sup>0</sup>	-	-
S2 <sub>M-R</sub>	-	-	2,3x10 <sup>0</sup>	0
S2 <sub>M-P</sub>	-	-	4,5x10 <sup>-1</sup>	0

Tabellen viser at innholdet av mesofile mikroorganismer i skummet melk var lavest ved dag 2, ved blokk 1 og 3. De fleste filtreringsforsøkene viste til at innholdet av mesofile mikroorganismer økte i retentatet, sammenlignet med skummet melk. Samtidig som at konsentrasjonen var lavere i alle prøvene av permeatet. Tabellen viser også at innholdet av mesofile mikroorganismer var lavt i skyllevannsprøvene.

#### 4.2.1.2 Skummet kjernemelk

Innholdet av mesofile mikroorganismer i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet kjernemelk, er presentert i tabell 4.2.2.

**Tabell 4.2.2:** Mesofile mikroorganismer (kde/mL) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet kjernemelk.  $S1_{M-R}$ : skyllevann 1 – retentat strøm,  $S1_{M-P}$ : skyllevann 1-permeat strøm,  $S2_{M-R}$ : skyllevann 2-retentat strøm,  $S2_{M-P}$ : skyllevann 2-permeat strøm.

Prøve	Blokk 2		Blokk 4	
	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2
Skummet kjernemelk	$1,6 \times 10^2$	$6,2 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	Overgrodd
Retentat	$2,9 \times 10^2$	$6,5 \times 10^1$	Overgrodd	$6,8 \times 10^1$
Permeat	$3,6 \times 10^0$	$4,5 \times 10^{-1}$	$8,3 \times 10^{-1}$	$8,2 \times 10^0$
$S1_{KM-R}$	$1,4 \times 10^0$	$3,2 \times 10^0$	$2,8 \times 10^1$	$9,2 \times 10^1$
$S1_{KM-P}$	$3,7 \times 10^1$	$4,5 \times 10^{-1}$	0	$4,5 \times 10^{-1}$
$S2_{KM-R}$	$4,5 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^0$	0	$4,5 \times 10^0$
$S2_{KM-P}$	$1,8 \times 10^0$	$9,1 \times 10^{-1}$	0	$4,5 \times 10^{-1}$

Tabellen viser at innholdet av mesofile mikroorganismer var lavere i skummet kjernemelk ved dag 2, da skummet kjernemelk ble mikrofiltrert ved blokk 2. Samtidig økte konsentrasjonen i skummet kjernemelk fra dag 1 til dag 2, ved blokk 4. Filtreringsforsøkene med skummet kjernemelk viste ikke til tydelige trender med tanke på økt konsentrasjon i retentatet. Samtidig viste alle filtreringsforsøkene til at innholdet av mesofile mikroorganismer ble redusert i permeatet. Tabellen viser også at innholdet av mesofile mikroorganismer var lavt i skyllevannsprøvene.

#### **4.2.2 Psykrotrofe mikroorganismer**

En annen indikator på den mikrobielle kvaliteten til prøvene som ble tatt ut var psykrotrofe mikroorganismer. Ingen av prøvene som ble tatt ut i forbindelse med filtrering av skummet melk ga vekst av psykrotrofe mikroorganismer. Da skummet kjernemelk ble filtrert ved blokk 2, var ikke psykrotrofe mikroorganismer tilstede i noen av prøvene som ble tatt ut. Men da kjernemelk ble filtrert ved blokk 4 (dag 2), var det vekst i prøven av skummet kjernemelk ( $1,2 \times 10^1$  kde/mL). Samtidig var det også vekst i skyllevannet før vask i retentatet strømmen ( $5,0 \times 10^0$  kde/mL) og i skyllevannet etter vask fra retentat strømmen ( $4,5 \times 10^{-1}$  kde/mL).

#### **4.2.3 Bakteriofag**

På bakgrunn av påstanden om at bakteriofag kan elimineres av lut, var bakteriofag en viktig indikator for den mikrobielle kvaliteten. Tilstedeværelsen av bakteriofager ble undersøkt ved hjelp av en plakk-test, som kapittel 3.4.1.3 viser. Ingen av prøvene som ble tatt ut i forbindelse med mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk viste til plakkdannelse. Og dermed at bakteriofager ikke var tilstede i prøvene.

Toleransen *Lactococcus lactis* spesifikke fager har ovenfor lut, ble videre undersøkt gjennom en stresstest. Stresstesten ble gjennomført ved å utsette bakteriofag for ulike kombinasjoner av tid og konsentrasjoner av et alkalisk vaskemiddel. Tidene og konsentrasjonene som ble valgt er beskrevet i kapittel 3.4.2. Vaskemiddel løsningene ble varmebehandlet ( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) og prøver ble tatt ut etter gitte tider. De ulike kombinasjonene ble fortynnet ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ) og plakk-testet. Ingen av tid/konsentrasjon kombinasjonene ga dannelse av plakk. Noe som tyder på at bakteriofag ikke var tilstede i skålene. En kontroll uten lut ble også fortynnet og plakk-testet. Denne kontrollen ga plakkdannelse, og mengden plakkdannenede enheter (PFU/mL) ble beregnet til å være  $6,0 \times 10^9$  PFU/mL.

#### 4.2.4 Aerobe sporedannere

Sporedannende mikroorganismer blir ofte forbundet med upasteurisert melk, og kan forringe kvaliteten til produktet. Tilstedeværelsen av aerobe sporedannere vil ikke bare gi en indikasjon på den mikrobielle kvaliteten, men kunne også gi en indikasjon på den sensoriske kvaliteten.

##### 4.2.4.1 Skummet melk

Tabell 4.2.3 viser resultatene innholdet av aerobe sporedannere i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk.

**Tabell 4.2.3:** Aerobe sporedannere (kde/mL) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk. Strek (-) betyr at prøvene ikke ble analysert for aerobe sporedannere. S1: skyllevann 1, S2: skyllevann 2, S1<sub>M-R</sub>: skyllevann 1 – retentat strøm, S1<sub>M-P</sub>: skyllevann 1-permeat strøm, S2<sub>M-R</sub>: skyllevann 2-retentat strøm, S2<sub>M-P</sub>: skyllevann 2-permeat strøm.

Prøve	Blokk 1		Blokk 3	
	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2
Skummet melk	0	Overgrodd	$3,0 \times 10^2$	$7,1 \times 10^3$
Retentat	0	$1,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
Permeat	0	0	0	0
S1	0	0	-	-
S1 <sub>M-R</sub>	-	-	0	0
S1 <sub>M-P</sub>	-	-	0	0
S2	0	0	-	-
S2 <sub>M-R</sub>	-	-	0	0
S2 <sub>M-P</sub>	-	-	0	$5,0 \times 10^1$

Tabellen viser at innholdet av aerobe sporedannere i den skummede melken økte fra dag 1 til dag 2 ved begge blokkene. Ingen av filtreringsforsøkene viste til økning i innholdet av aerobe sporedannere i retentatet. Samtidig var det ikke vekst i noen av prøvene av permeatet. Med et unntak var det ikke vekst av aerobe sporedannere i skyllevannsprøvene. Unntaket var prøven av skyllevannet fra permeat strømmen etter vask ved blokk 3 (dag 2).

#### 4.2.4.2 Skummet kjernemelk

Innholdet av aerobe sporedannere i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk er presentert i tabell 4.2.4.

**Tabell 4.2.4:** Aerobe sporedannere (kde/mL) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet kjernemelk.  $S1_{M-R}$ : skyllevann 1 – retentat strøm,  $S1_{M-P}$ : skyllevann 1-permeat strøm,  $S2_{M-R}$ : skyllevann 2-retentat strøm,  $S2_{M-P}$ : skyllevann 2-permeat strøm.

Prøve	Blokk 2		Blokk 4	
	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2
Skummet kjernemelk	$5,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	0
Retentat	$1,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	0
Permeat	$6,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	0	0
$S1_{KM-R}$	0	0	0	0
$S1_{KM-P}$	0	0	0	0
$S2_{KM-R}$	0	0	0	0
$S2_{KM-P}$	0	$2,0 \times 10^2$	0	0

Tabellen viser at innholdet av aerobe sporedannere økte fra dag 1 til dag 2, da skummet kjernemelk ble filtrert ved blokk 2. Denne trenden var motsatt ved blokk 4, da innholdet var lavest ved dag 2. Økningen av aerobe sporedannere i retentatet var ikke tilfellet for alle filtreringsforsøkene. Samtidig viste de fleste filtreringsforsøkene at innholdet av aerobe sporedannere ble redusert i permeatet. Med et unntak var skyllevannsprøvene frie for aerobe sporedannere. Unntaket var skyllevannet fra permeat strømmen etter vask ved blokk 2 (dag 2).

#### 4.2.5 Anaerobe sporedannere

Anaerobe sporedannere som *Clostridium* arter kan potensielt forringe produkter, gjennom toksinproduksjon og endring av den sensoriske kvaliteten. *Clostridium* arter er derfor en viktig parameter på den mikrobielle kvaliteten til råstoffet. Det sannsynlige antallet anaerobe sporedannere (*Clostridium*) ble bestemt ut fra kombinasjonen med antall rør med gassdannelse fra ulike fortyninger, og ved hjelp av å lese av en MPN-tabell (vedlegg 2). MPN-tabellen viste hva det sannsynlige antallet *Clostridium* for en kombinasjon av rør med gassdannelse. Dersom ingen rør hadde gassdannelse, var det mest sannsynlige antallet *Clostridium*  $<3,0 \times 10^{-2}$  MPN/mL.

##### 4.2.5.1 Skummet melk

Resultatene fra analysene for anaerobe sporedannere etter mikrofiltrering av skummet melk er presentert i tabell 4.2.5. Skyllévannsprøvene som ble tatt ut etter mikrofiltrering av skummet melk ved blokk 1, var en blanding av retentat- og permeat strømmen.

**Tabell 4.2.5:** Anaerobe sporedannere (MPN/mL) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk. Strek (-) betyr at prøvene ikke ble analysert for anaerobe sporedannere. S1: skyllévann 1, S2: skyllévann 2, S1<sub>M-R</sub>: skyllévann 1 – retentat strøm, S1<sub>M-P</sub>: skyllévann 1-permeat strøm, S2<sub>M-R</sub>: skyllévann 2-retentat strøm, S2<sub>M-P</sub>: skyllévann 2-permeat strøm.

Prøve	Blokk 1		Blokk 3	
	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2
Skummet melk	$3,6 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-2}$	$9,3 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^{-1}$
Retentat	$9,2 \times 10^{-2}$	$9,2 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^0$	$4,3 \times 10^{-1}$
Permeat	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$
S1	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	-	-
S1 <sub>M-R</sub>	-	-	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$
S1 <sub>M-P</sub>	-	-	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$
S2	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	-	-
S2 <sub>M-R</sub>	-	-	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$
S2 <sub>M-P</sub>	-	-	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$

Tabellen viser at det mest sannsynlige innholdet av *Clostridium* ved blokk 1, var likt i skummet melken for begge dagene. Da skummet melk ble mikrofiltrert ved blokk 3, var innholdet av *Clostridium* lavest ved dag 2. Alle filtreringsforsøkene viste at innholdet av anaerobe sporedannere økte i retentatet. Permeat prøvene viste samtidig at anaerobe

sporedannere var fraværende. Samtlige skyllevannsprøver viste til ingen vekst av anaerobe sporedannere.

#### 4.2.5.2 Skummet kjernemelk

Innholdet av anaerobe sporedannere i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk er presentert i tabell 4.2.6.

**Tabell 4.2.6:** Anaerobe sporedannere (MPN/mL) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet kjernemelk.  $S1_{M-R}$ : skyllevann 1 – retentat strøm,  $S1_{M-P}$ : skyllevann 1-permeat strøm,  $S2_{M-R}$ : skyllevann 2-retentat strøm,  $S2_{M-P}$ : skyllevann 2-permeat strøm.

Prøve	Blokk 2		Blokk 4	
	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2
Skummet kjernemelk	$9,2 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-1}$	$3,6 \times 10^{-1}$
Retentat	$4,3 \times 10^{-1}$	$9,2 \times 10^{-2}$	$>1,1 \times 10^1$	$4,6 \times 10^0$
Permeat	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$
$S1_{KM-R}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$>1,1 \times 10^1$	$1,5 \times 10^0$
$S1_{KM-P}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$
$S2_{KM-R}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$
$S2_{KM-P}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$	$<3,0 \times 10^{-2}$

Resultatene for blokk 2 viser en reduksjon av anaerobe sporedannere i den skummede kjernemelken fra dag 1 til dag 2. Når det gjelder blokk 4, så økte innholdet av anaerobe sporedannere fra dag 1 til dag 2. Alle filtreringsforsøkene viste til økning av det mest sannsynlige antallet *Clostridium* i retentatet. Permeat prøvene som ble tatt ut ved blokk 2 og 4 viste også til reduksjon av anaerobe sporedannere. Med noen unntak var ikke anaerobe sporedannere tilstede i skyllevannsprøvene. Unntakene var skyllevannsprøvene før vask fra permeat strømmen ved blokk 4, som skilte seg ut ved at det var et høyt innhold av anaerobe sporedannere.



### 4.3 Kjemiske analyser

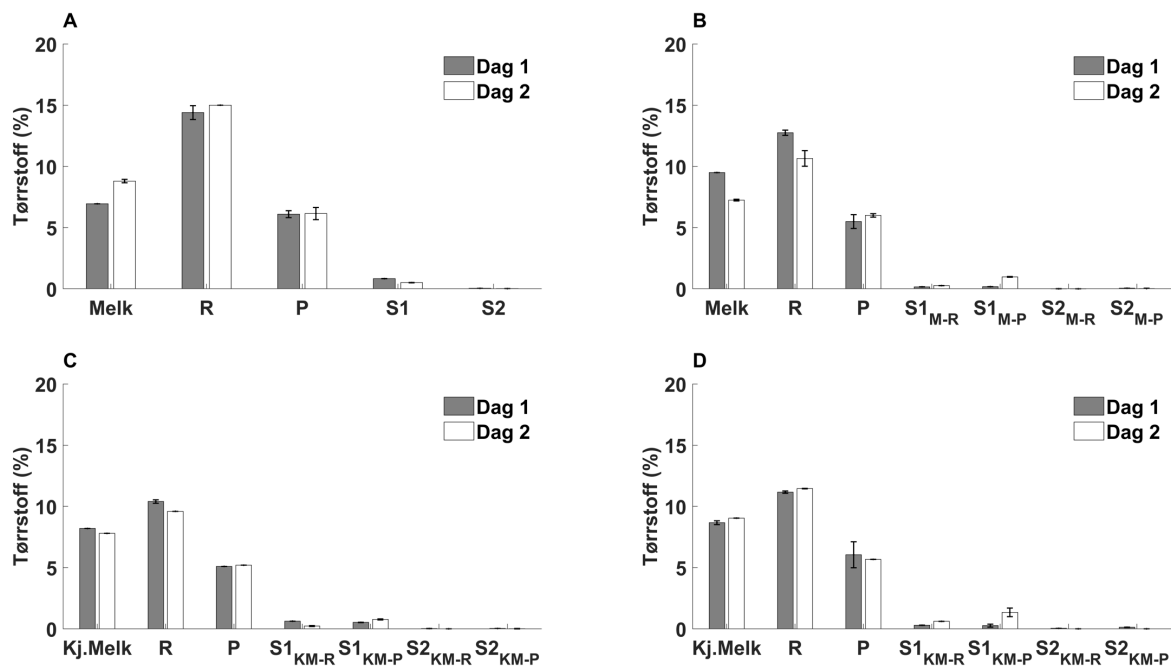
Prøvene som ble tatt ut til kjemiske analyser var skummet melk og kjernemelk, permeat, retentat, samt skyllevann før og etter vask. Etter filtrering og vasking ble prøvene analysert for % Brix (vedlegg 1), og pH. Resterende prøver til kjemiske analyser ble fryst ned fram til analysene ble gjennomført. I tillegg til Brix og pH, ble prøvene også analysert for mineraler, proteininnhold og tørrstoff (TS). Den første uken var skyllevannsprøvene en blanding av retentat- og permeat-strømmen. Deretter ble skyllevannsprøvene tatt ut fra både retentat- og permeat strømmen.

#### 4.3.1 Tørrstoff (TS)

Tørrstoff-analyser ble gjennomført for å vurdere separeringsprosessen. Resultatene for tørrstoffinnholdet kunne vise hvordan tørrstoffinnholdet endret seg i retentatet og permeatet. Resultatene fra tørrstoff analysene er presentert i figur 4.3.1. Tørrstoffinnholdet ble analysert for prøver av skummet melk og kjernemelk, retentat, permeat, samt skyllevann før (skyllevann 1) og etter (skyllevann 2) vask. Det ble også gjennomført en variansanalyse for å undersøke effekten ulike råstoffer hadde på tørrstoffinnholdet, samt effekten av ulike råstoffer og vaskeprosedyrer på tørrstoffinnhold i skyllevannet etter vask. Resultatene er presentert i tabell 4.3.1.

**Tabell 4.3.1:** Effekten ulike råstoffer hadde på tørrstoffinnholdet for skummet melk og kjernemelk. I tillegg viser tabellen effekten av variasjon av råstoff og vaskeprosedyre hadde på tørrstoffinnholdet i det siste skyllevannet. Samt interaksjonseffekten mellom de to parameterne. Resultatene er oppgitt som p-verdi. Strek (-) vil si at effekten ikke ble testet.

Prøve	Effekt av råstoff (p-verdi)	Effekt av vaskeprosedyre (p-verdi)	Interaksjonseffekt (p-verdi)
Skummet melk/kjernemelk	0,669	-	-
Skyllvann 2	0,532	0,3357	0,355



**Figur 4.3.1:** Tørrstoffinnhold (%) ( $\pm$  standardavvik) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjerneemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): tørrstoffinnhold i prøver tatt ut ved filtrering av skummet melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): tørrstoffinnhold i prøver tatt ut ved filtrering av skummet kjerneemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjerneemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

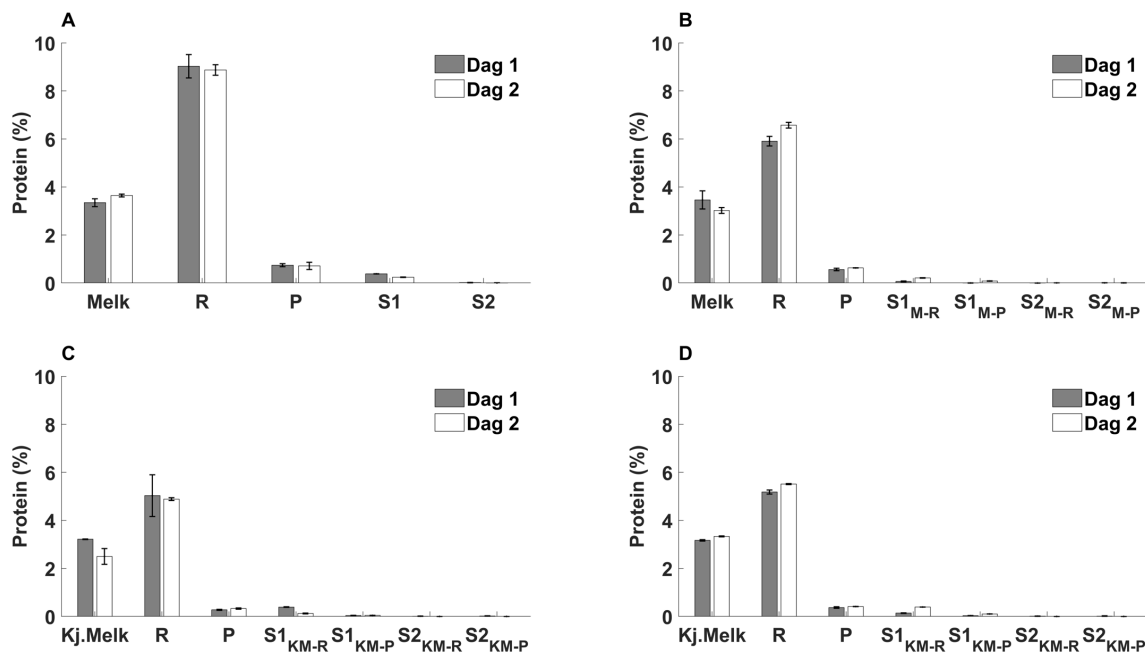
Figuren viser at det var forskjeller i tørrstoffinnhold mellom dag 1 og dag 2, da skummet melk ble filtrert. Alle filtreringene av skummet melk viste at tørrstoffinnholdet økte i retentatet, og samtidig ble redusert i permeatet. Tørrstoffinnholdet i skummet kjerneemelk var ulikt mellom dag 1 og dag 2, for begge blokkene. Endringen av tørrstoff i retentat og permeat viste til samme trend som da skummet melk ble filtrert, hvor tørrstoffinnholdet økte i retentatet og ble redusert i permeatet. Figuren viser til små forskjeller i tørrstoffinnhold mellom skummet melk og kjerneemelk. Forskjellen i tørrstoff i skummet melk og kjerneemelk var samtidig ikke signifikant. Tørrstoffinnholdet i samtlige skyllevannsprøver var lavt. I tillegg hadde hverken råstoff eller vaskeprosedyre en signifikant effekt på tørrstoffinnholdet i skyllevannet etter vask.

### 4.3.2 Proteininnhold

Målet ved filtreringsforsøkene var å konsentrere skummet melk til 8 % protein, og skummet kjernemelk til 6 % protein, i retentatet. Prøvene ble analysert for proteininnhold for å kunne vurdere filtreringsprosessen, med tanke på hvordan proteininnholdet endret seg i retentatet og permeatet. Proteininnholdet ble analysert for skummet melk og kjernemelk, retentat, permeat, samt skyllevann før (skyllevann 1) og etter (skyllevann 2) vask. Proteininnholdet i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk er presentert i figur 4.3.2. Det ble gjennomført en variansanalyse for å undersøke effekten variasjonen i råstoff hadde på proteininnholdet i skummet melk og kjernemelk. Samtidig ble også effekten ulike råstoff og vaskeprosedyrer hadde på proteininnholdet i skyllevannet etter vask undersøkt. Disse effektene er presentert i tabell 4.3.2.

**Tabell 4.3.2:** Effekten ulike råstoffer hadde på proteininnholdet i skummet melk og kjernemelk. I tillegg viser tabellen effekten variasjonen av råstoff og vaskeprosedyre hadde på proteininnholdet i det siste skyllevannet. Samt interaksjonseffekten mellom de to parameterne. Resultatene er oppgitt som p-verdi. Strek (-) vil si at effekten ikke ble testet.

Prøve	Effekt av råstoff (p-verdi)	Effekt av vaskeprosedyre (p-verdi)	Interaksjonseffekt (p-verdi)
Skummet melk/kjernemelk	0,235	-	-
Skyllevann 2	0,448	0,252	0,278

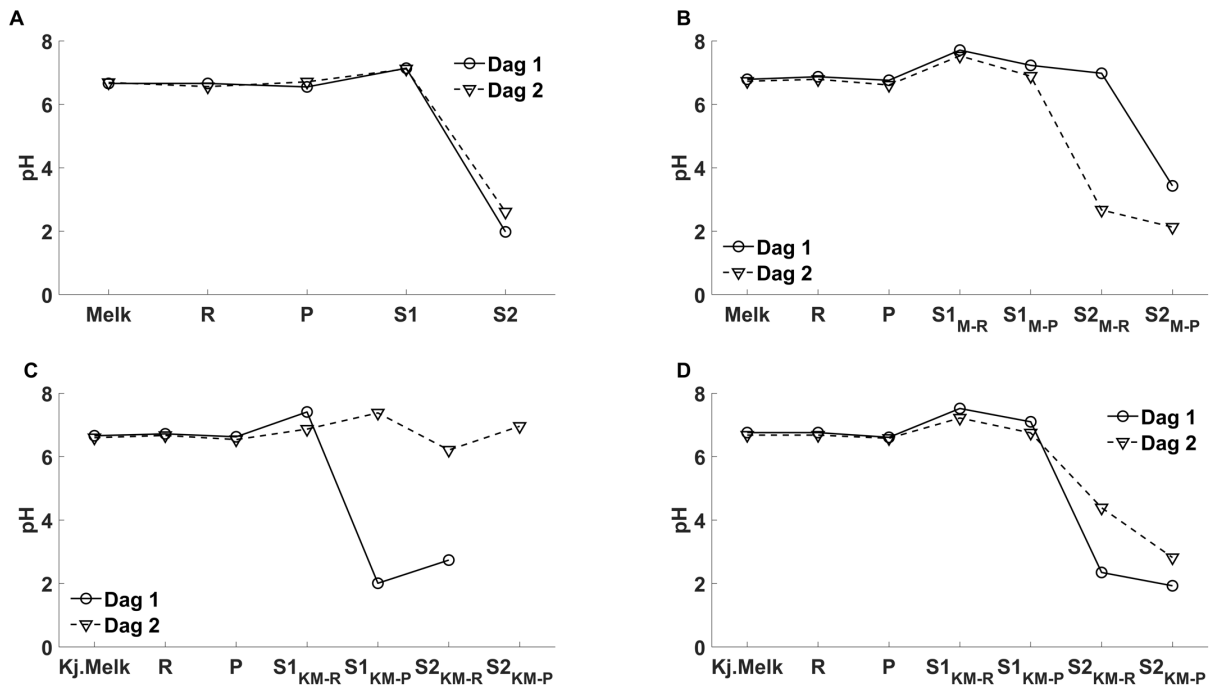


**Figur 4.3.2:** Proteininnhold (%) ( $\pm$  standardavvik) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): proteininnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): proteininnholdet i prøver ved filtrering av skummet kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2).  $S1_{M-R}$  (Skyllevann 1-retentat strøm),  $S1_{M-P}$  (Skyllevann 1-permeat strøm),  $S2_{M-R}$  (Skyllevann 2-retentat strøm),  $S2_{M-P}$  (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk),  $S1_{KM-R}$  (Skyllevann 1-retentat strøm),  $S1_{KM-P}$  (Skyllevann 1-permeat strøm),  $S2_{KM-R}$  (Skyllevann 2-retentat strøm),  $S2_{KM-P}$  (Skyllevann 2-permeat strøm).

Figuren viser at det var små forskjeller i proteininnhold mellom prøvene av skummet melk fra dag 1 til dag 2, for både blokk 1 og 3. Det samme ble observert for proteininnholdet i den skummede kjernemelken ved blokk 2 og 4. Figuren viser at forskjellene i tørrstoffinnhold mellom skummet melk og kjernemelk var små. Disse forskjellene var samtidig ikke signifikant. Alle filtreringsforsøkene viste til at proteinkonsentrasjonen økte i retentatet, sammenlignet med skummet melk og kjernemelk, samtidig som at konsentrasjonen ble redusert i permeatet. Når det gjelder proteininnholdet i retentatet ved filtrering av skummet melk var den høyere enn 8 % ved blokk 1, og lavere enn 8 % ved blokk 3. Retentat prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk viste til et proteininnhold som var lavere enn 6 %. Alle skyllevannsprøvene viste til et lavt proteininnhold. Samtidig var ikke variasjonen av råstoff og vaskeprosedyre signifikant på proteininnholdet i det siste skyllevannet.

### 4.3.3 pH

For å undersøke hvordan pH endret seg i retentatet og permeatet, sammenlignet med skummet melk og kjernemelk, ble pH målt i prøvene som ble tatt ut. Samtidig ble også pH målt i skyllevannsprøvene, for å få en indikasjon på sammensetningen til skyllevannet. pH i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk er presentert i figur 4.3.3.



**Figur 4.3.3:** pH i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): pH i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): pH i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

Figuren viser at pH ved blokk 1 ble redusert i retentatet og økte i permeatet for dag 1. Denne trenden var ikke tilfellet for dag 2. pH ved dag 2 var lik i retentatet og ble redusert i permeatet. pH økte i det første skyllevannet for begge dagene. Samtidig var pH i det siste skyllevannet lavere enn det første skyllevannet. Til tross for forskjeller i pH i prøvene av skummet melk, retentat og permeat ved blokk 1, så var de små. pH i prøvene fra blokk 3 viste at pH økte i retentatet og ble redusert i permeatet. Denne trenden ble observert for begge dagene. pH i skyllevannsprøvene varierte noe, der pH i skyllevann fra begge dagene var høyere i retentat strømmen sammenlignet med permeat strømmen.

Figuren viste at pH i prøver fra dag 1 og 2 for blokk 2 hadde samme trend hvor pH reduseres i permeatet. pH i skyllevannsprøvene varierte noe. pH resultatene fra blokk 4 viste økning i retentatet og reduksjon i permeatet. pH varierte i skyllevannsprøvene. Det var mulig å observere en trend for skyllevannsprøvene, hvor pH var høyere i skyllevannsprøver fra permeat strømmen.

#### 4.3.4 Mineralinnhold

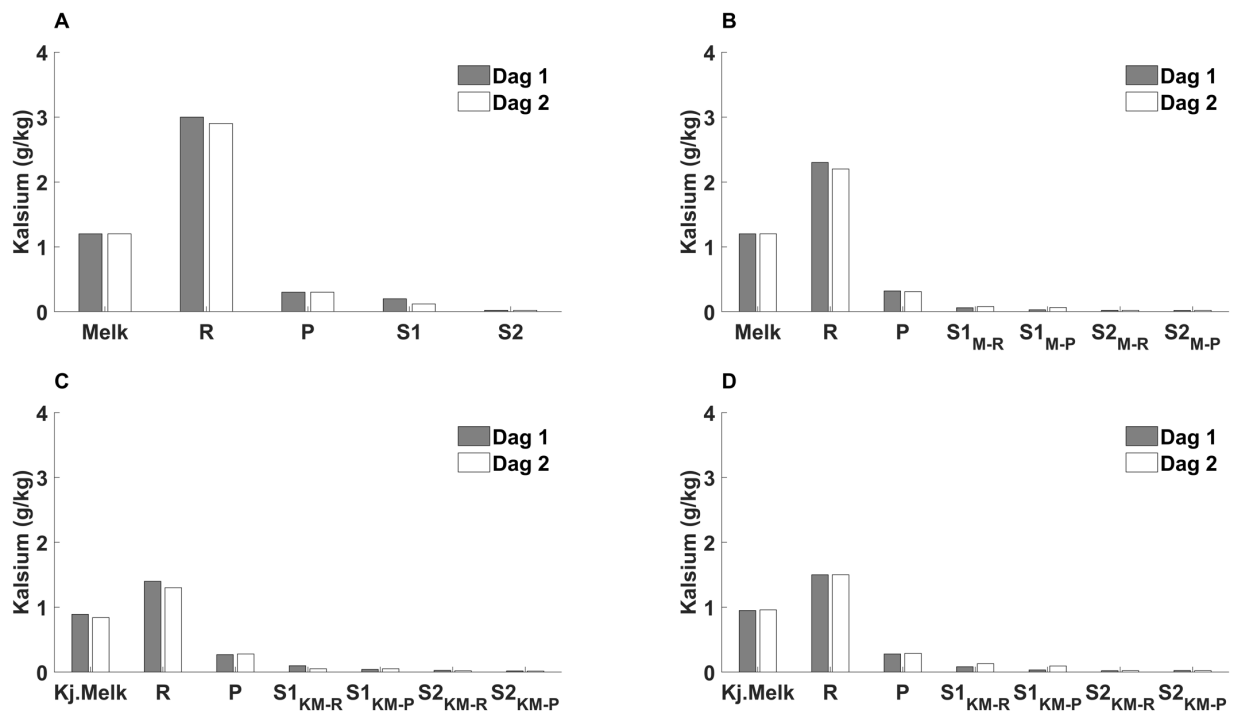
Mineralinnholdet i prøvene ble analysert for å undersøke i hvilken fraksjon mineralene ender opp i ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Prøvene ble analysert for innhold av kalsium (Ca), kalium (K), magnesium (Mg), natrium (Na) og fosfor (P).

##### 4.3.4.1 Kalsium

Kalsiuminnholdet (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk er presentert i figur 4.3.4. Det ble gjennomført en variansanalyse for å undersøke effekten ulike råstoffer hadde på kalsiuminnholdet i skummet melk og kjernemelk. Samtidig ble effekten ulike råstoffer og vaskeprosedyrer hadde på kalsiuminnholdet i skyllevannet etter vask undersøkt. Disse resultatene er presentert i tabell 4.3.3.

**Tabell 4.3.3:** Effekten ulike råstoffer hadde på kalsiuminnholdet i skummet melk og kjernemelk. I tillegg viser tabellen effekten variasjonen av råstoff og vaskeprosedyre hadde på kalsiuminnholdet i det siste skyllevannet. Samt interaksjonseffekten mellom de to parameterne. Resultatene er oppgitt som p-verdi. Strek (-) vil si at effekten ikke ble testet.

Prøve	Effekt av råstoff (p-verdi)	Effekt av vaskeprosedyre (p-verdi)	Interaksjonseffekt (p-verdi)
Skummet melk/kjernemelk	0,00005	-	-
Skyllevann 2	0,738	0,440	0,579



**Figur 4.3.4:** Kalsiuminnhold (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): kalsiuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): kalsiuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

Figuren viser at innholdet av kalsium var likt mellom dagene for alle blokkene, da skummet melk og kjernemelk ble filtrert. Det kan være mulig å observere at kalsiuminnholdet var høyere i skummet melk, sammenlignet med skummet kjernemelk. Disse forskjellene var samtidig signifikant. Alle filtreringsforsøkene viste at kalsiuminnholdet økte i retentatet, samt at det ble redusert i permeatet. Skyllevannsprøvene som ble tatt ut etter filtrering av skummet melk og kjernemelk viste et lavt innhold av kalsium. Effekten av ulikt råstoff og vaskeprosedyre var samtidig ikke signifikant på kalsiuminnholdet i skyllevannet etter vask.

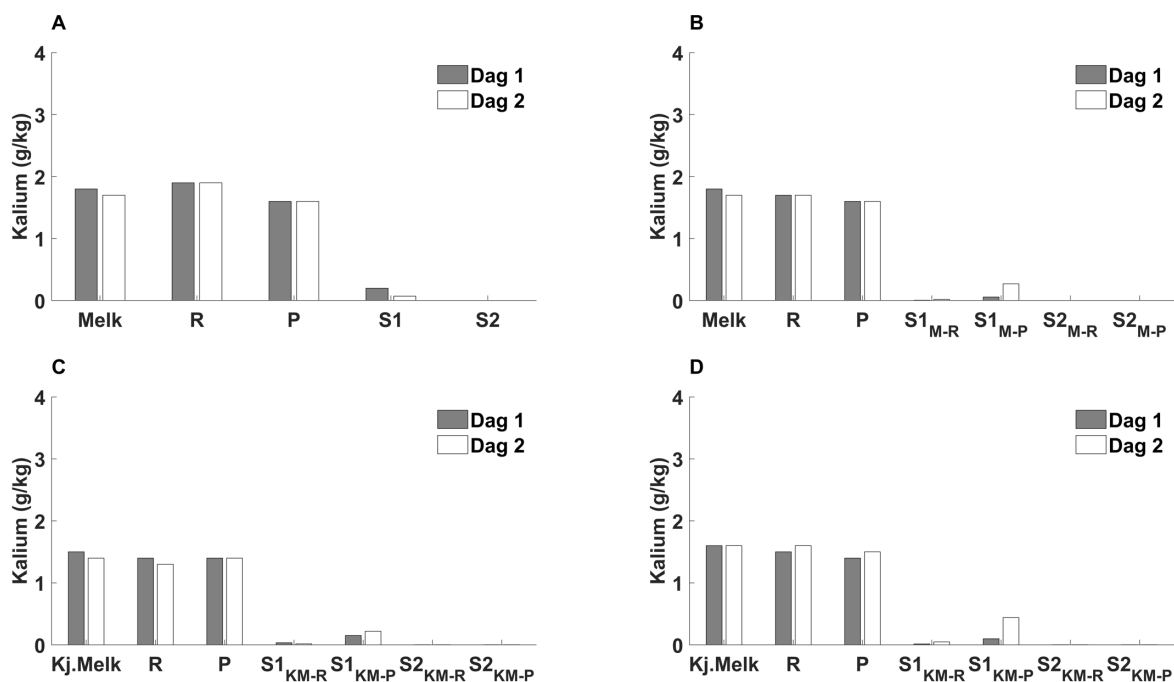
#### 4.3.4.2 Kalium

Innholdet av Kalium (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk er vist i figur 4.3.5. Effekten variasjonen av ulike råstoff hadde på kaliuminnholdet i skummet melk og kjernemelk, ble undersøkt ved hjelp av en variansanalyse. Samtidig ble også effekten ulike råstoffer og vaskeprosedyrer hadde på kaliuminnholdet i skyllevannet etter vask undersøkt. Disse resultatene er presentert i tabell 4.3.4.

**Tabell 4.3.4:** Effekten ulike råstoffer hadde på kaliuminnholdet i skummet melk og kjernemelk. I tillegg viser tabellen effekten variasjonen av råstoff og vaskeprosedyre hadde på kaliuminnholdet i det siste skyllevannet. Samt interaksjonseffekten mellom de to parameterne. Resultatene er oppgitt som p-verdi. Strek (-) vil si at effekten ikke ble testet.

Prøve	Effekt av råstoff (p-verdi)	Effekt av vaskeprosedyre (p-verdi)	Interaksjonseffekt (p-verdi)
Skummet melk/kjernemelk	0,0069	-	-
Skyllvann 2	0,183	1,0	1,0





**Figur 4.3.5:** Kaliuminnholdet (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): kaliuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): kaliuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

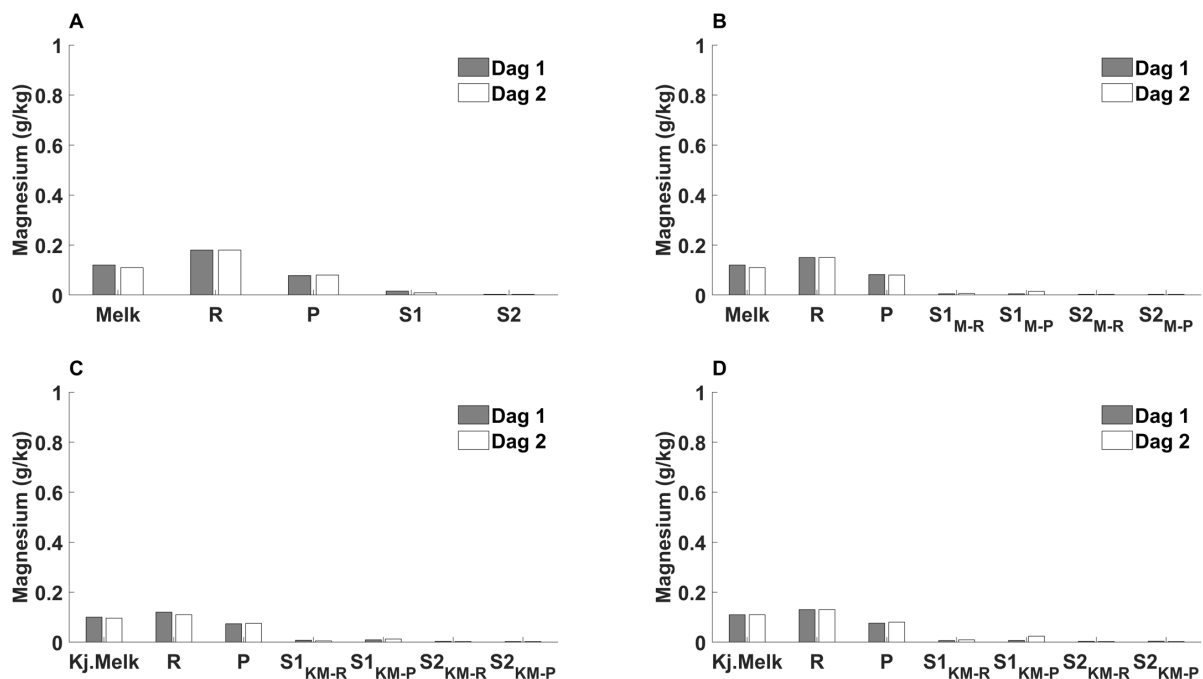
Figuren viste at kaliuminnholdet mellom dagene var likt for alle blokkene, da skummet melk og kjernemelk ble mikrofiltrert. Kaliuminnholdet i prøvene som ble tatt ut etter mikrofiltrering av melk, viste at innholdet var høyest i melken fra dag 1. Samtidig var det små forskjeller i kaliuminnhold i retentatet og permeatet for begge dager ved blokk 1 og 3. Figuren viser også at det var små forskjeller i kaliuminnhold mellom skummet kjernemelk, retentat og permeat for begge dagene ved blokk 2 og 4. Figuren viser at det er en forskjell i kaliuminnhold mellom skummet melk og kjernemelk, hvor innholdet er høyest i skummet melk. Forskjellen i kaliuminnhold mellom skummet melk og kjernemelk var i tillegg signifikant. Med noen unntak var det lavt kaliuminnhold i skyllevannsprøvene. Unntakene var prøvene av det første skyllevannet fra permeat strømmen ved blokk 2, 3 og 4. Innholdet var høyest ved dag 2 for disse prøvene. Effekten ulike vaskeprosedyrer og råstoff hadde på kaliuminnholdet var samtidig ikke signifikant på kaliuminnholdet.

#### 4.3.4.3 Magnesium

Magnesiuminnholdet (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk er presentert i figur 4.3.6. Effekten av å variere med råstoffet på magnesiuminnholdet i prøvene, ble undersøkt ved hjelp av en variansanalyse. Samtidig ble effekten ulike råstoffer og vaskeprosedyrer hadde på magnesiuminnholdet i prøvene undersøkt. Resultatene er presentert i tabell 4.3.5.

**Tabell 4.3.5:** Effekten ulike råstoffer hadde på magnesiuminnholdet i skummet melk og kjernemelk. I tillegg viser tabellen effekten variasjonen av råstoff og vaskeprosedyre hadde på magnesiuminnholdet i det siste skyllevannet. Samt interaksjonseffekten mellom de to parameterne. Resultatene er oppgitt som p-verdi. Strek (-) vil si at effekten ikke ble testet.

Prøve	Effekt av råstoff (p-verdi)	Effekt av vaskeprosedyre (p-verdi)	Interaksjonseffekt (p-verdi)
Skummet melk/kjernemelk	0,097	-	-
Skyllevann 2	0,7499	0,9491	0,8481



**Figur 4.3.6:** Magnesiuminnholdet (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): magnesiuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): magnesiuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

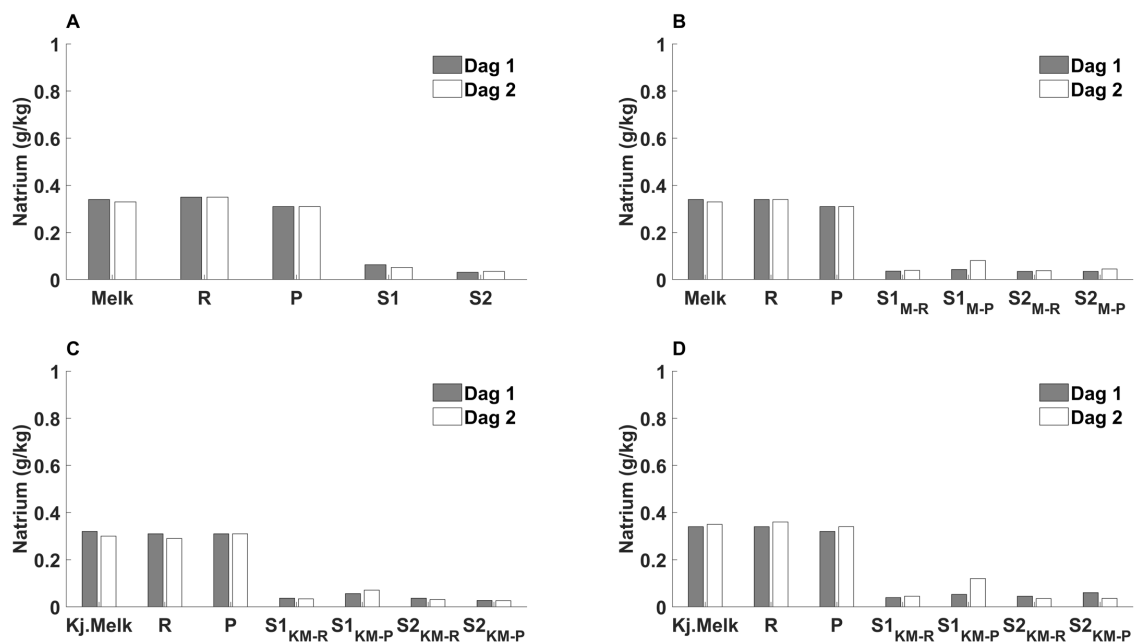
Figuren viser at magnesiuminnholdet i prøvene av skummet melk og kjernemelk var lik mellom dagene for alle blokkene. Det kan observeres at magnesiuminnholdet økte i retentatet og ble redusert i permeatet for både blokk 1 og 3. Den samme trenden kan også observeres da skummet kjernemelk ble filtrert ved blokk 2 og 4. Men forskjellene i magnesiuminnhold var små mellom skummet kjernemelk, retentat og permeat. Figuren viser at forskjellene i magnesiuminnhold mellom skummet melk og kjernemelk, var små. Disse forskjellene var samtidig ikke signifikant. Alle skyllevannsprøvene som ble tatt ut viste seg å ha et lavt magnesiuminnhold. Samtidig var ikke effekten av ulike råstoffer og vaskeprosedyrer signifikant på magnesiuminnholdet i skyllevannet etter vask.

#### 4.3.4.4 Natrium

Innholdet av Natrium (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk er presentert i figur 4.3.7. Det ble gjennomført variansanalyser for å undersøke effekten ulike råstoffer hadde på natriuminnholdet i skummet melk og kjernemelk. I tillegg ble effekten ulike råstoffer og vaskeprosedyrer hadde på natriuminnholdet i skyllevannet etter vask undersøkt. Disse resultatene er presentert i tabell 4.3.6.

**Tabell 4.3.6:** Effekten ulike råstoffer hadde på natriuminnholdet i skummet melk og kjernemelk. I tillegg viser tabellen effekten variasjonen av råstoff og vaskeprosedyrer hadde på natriuminnholdet i det siste skyllevannet. Samt interaksjonseffekten mellom de to parameterne. Resultatene er oppgitt som p-verdi. Strek (-) vil si at effekten ikke ble testet.

Prøve	Effekt av råstoff (p-verdi)	Effekt av vaskeprosedyrer (p-verdi)	Interaksjonseffekt (p-verdi)
Skummet melk/kjernemelk	0,537	-	-
Skyllevann 2	0,775	0,570	0,341

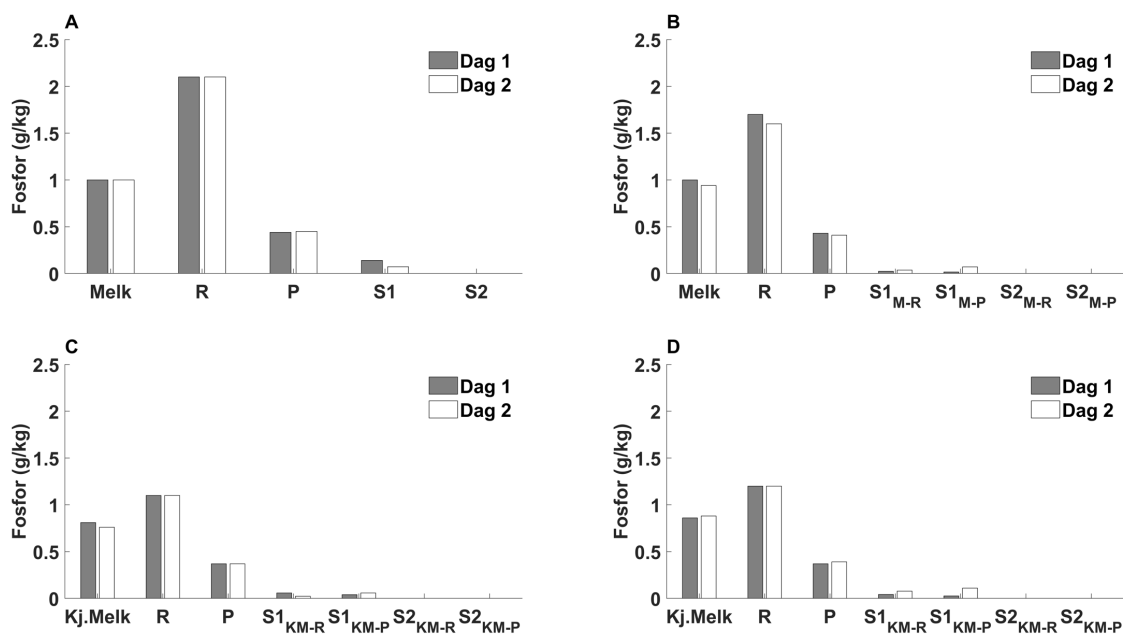


**Figur 4.3.7:** Natriuminnholdet (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): natriuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): natriuminnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

Natriuminnholdet var like mellom dagene i alle blokkene, da skummet melk og kjernemelk ble filtrert. Figuren viser at forskjellen i natriuminnhold mellom skummet melk, retentat og permeat var minimale da skummet melk ble filtrert ved blokk 1 og 3. Resultatene for natriuminnholdet i prøvene som ble tatt ut da kjernemelk ble filtrert viste til den samme trenden. Forskjellene i natriuminnhold var små mellom skummet melk og kjernemelk. Samtidig var ikke effekten av ulike råstoffer signifikante på natriuminnholdet. Samtlige skyllevannsprøver viste til lavt natriuminnhold. Effekten av ulike råstoffer og vaskeprosedyrer var samtidig signifikant på natriuminnholdet i skyllevannet etter vask.

#### 4.3.4.5 Fosfor

Fosforinnholdet (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk er presentert i figur 4.3.8. Effekten ulike råstoffer hadde på fosforinnholdet i skummet melk og kjernemelk ble analysert ved hjelp av en variansanalyse. Resultatet viste til en p-verdi på 0,002.



**Figur 4.3.8:** Fosforinnholdet (g/kg) i prøvene som ble tatt ut ved mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): fosforinnholdet i prøvene som ble tatt ut etter filtrering av skummet melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): fosforinnholdet i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

Figuren viser at forskjellen i fosforinnhold i prøvene av skummet melk og kjernemelk, var små mellom dagene for hver blokk. Filtreringsforsøkene med skummet melk ga økt fosforkonsentrasjon i retentatet, samt at konsentrasjonen ble redusert i permeatet. Den samme trenden ble observert da skummet kjernemelk ble filtrert ved blokk 2 og 4. Figuren viser også at fosforinnholdet er høyere i skummet melk sammenlignet med skummet kjernemelk. Samtlige skyllevannsprøver viste til lavt fosforinnhold. Effekten ulike råstoffer hadde på fosforinnholdet i den skummede melken og kjernemelken var samtidig signifikant.

## 5 Diskusjon

### 5.1 Mikrofiltrering og vask av MF-anlegg

Permeat fluxen til rent vann (her kalt vannflux) ble registrert i forkant av hvert filtreringsforsøk som et mål på rengjøringen etter forrige filtreringsforsøk. Vannflux er en parameter som ikke kan brukes når rengjøringen skal vurderes. Dette skyldes at partikler kan ha foulet membraner ved avsetning inne i porene, samtidig som at vannfluxen ikke gir noen indikasjoner på egenskapene til overflaten til membranen (Blanpain-Avet et al., 2004). Selv om vannfluxen kunne gitt indikasjoner på rengjøringen, så var det ikke en faktor som kunne avgjort om rengjøringen var god eller ikke. På grunn av at vannfluxen ble registrert i forkant av hver filtrering, varierte tiden mellom endt vask fra forrige filtrering og registrering av vannflux. Antall dager fra vask til registrering av vannflux er en annen faktor som kunne ha påvirket resultatene.

Etter hver vaskerunde ble salpetersyreløsning, tilsvarende som ble brukt under vask tilført balansetanken. Salpetersyreløsningen sto i filtreringssystemet til neste forsøk. Effekten av antallet dager med 0,5 % salpetersyre i filtreringssystemet fra endt vask til registrering av vannflux kunne gitt utslag på resultatene. En skulle forvente at vannfluxen ville vært høyere med økende antall dager med syre i filtreringssystemet. Da skummet melk ble filtrert viste antallet dager mellom vask og måling av vannflux, at vannfluxen var høyest i tilfellene med færrest dager mellom vask og måling. Noe som ikke stemte med hva som var mulig å forvente.

Da salpetersyren sto i filtreringssystemet etter vask, ble ikke syreløsningen sirkulert, noe som kunne påvirket resultatene. Sirkulasjon kunne påvirket fjerning av eventuelle forbindelser i eller på membranen, slik at det kunne gitt bedre vannflux. I tilfelle med skummet kjernemelk, var vannfluxen lik etter begge filtreringsdager ved blokk 2. I motsetning til blokk 4 hvor vannfluxen var høyere der antallet dager mellom vask og måling av vannflux var lengst. Dette samsvarte med hva som var mulig å forvente, og var motsatt av tilfelle med skummet melk. På grunn av den eventuelle effekten av tidspunktet for måling av vannflux, kunne det vært en idé å registrere vannflux rett etter vask. Dette ville gitt færre usikkerheter. Samtidig ville det vært lettere å knytte verdien for vannflux opp mot vaskeprosedyren. Vaskingen ble gjennomført ved å alternere mellom to vaskeprosedyrer. Den ene var den originale vaskeprosedyren, som vanligvis ble brukt til vask av MF-anlegget. Mens den andre var en

alternativ vaskeprosedyre hvor sirkuleringstiden var halvert ved alle trinn sammenlignet med den originale prosedyren. Vannfluxen som ble registrert etter filtrering av både skummet melk og kjernemelk viste at hverken vaskeprosedyre eller råstoff hadde en signifikant effekt på vannfluxen.

En feilkilde i forsøksoppsettet til denne oppgaven kan ha vært at det ikke ble brukt nye membraner. Dette kan ha påvirket resultatene gjennom at membranen trolig har blitt foulet irreversibelt tidligere. Ikke all fouling kan reverseres ved hjelp av vask. Det er en mulighet at nye membraner kunne gitt mer optimale resultater. Men samtidig ville det også vært en mulighet for at slike membraner ville trengt litt gjennomkjøring før forsøkene. På den andre siden blir dette MF-anlegget mindre brukt sammenlignet med industrielle membraner. Bruken av MF-anlegget ved piloten ved NMBU, ville trolig ikke resultert i mer alvorlig fouling sammenlignet med fouling av industrielle membraner.

Permeat fluxen ble beregnet under hvert filtreringsforsøk, og endringen av permeat flux over tid er presentert i figur 4.1.2. Under en slik separeringsprosess vil konsentrasjonspolarisering og fouling forekomme over tid, og en naturlig konsekvens av dette er fluxreduksjon (D'Souza & Mawson, 2005). Men ingen av filtreringsforsøkene viste en tilsvarende reduksjon av permeat flux. Ved å «stresse» filtreringssystemet i større grad kunne det vært mulig å observere fluxreduksjon. Men på grunn av at retentatet fra noen av filtreringsforsøkene skulle brukes videre, ville det blitt vanskelig å gjennomføre. De fleste filtreringsforsøkene viste derimot til en jevn permeat flux under filtreringsforløpet. Permeat fluxen avhenger blant annet av permeatflow (Water Environment Federation, 2005). Hvordan permeat fluxen ble påvirket av permeatflowen, forklarte til en viss grad forklare endringen av permeat flux under filtreringsforsøkene. Dersom permeatflowen økte, ville også fluxen øke. Det samme ville vært tilfellet ved reduksjon i permeatflow. Dette forventede forholdet mellom permeatflow og permeat flux var tilfelle for alle filtreringsforsøkene. Forholdet mellom permeatflow og flux forklarte derimot ikke årsaken til at permeat fluxen ikke gikk ned som var forventet. En mulig forklaring på dette er teorien som omhandler kritisk flux. Teorien forklarer kritisk flux gjennom tre faser, hvor permeat fluxen i den første fasen øker lineært med Transmembrantrykket (TMP). Gjennom de to siste fasene blir permeat fluxen mer uavhengig av TMP, samt at TMP blir høyere enn det kritiske trykket. I tillegg vil fluxen vil gå ned ved den siste fasen. (Brans et al., 2004). Dersom filtreringsforsøkene ble gjennomført på en såpass kontrollert måte uten at den kritiske fluxen ble nådd, kunne det forklare utfallet. Men permeat



fluxen økte ikke jevnlig, noe som gjør denne teorien mindre aktuell. Men dersom filtreringsforsøkene ble gjennomført under mer kontrollerte betingelser som beskrevet ved kritisk flux, for å unngå fouling var det mulig å anta at anlegget ble utsatt for mindre stress.

Permeat fluxen avhenger av membranarealet samt permeatflowen (Water Environment Federation, 2005). Dersom permeatflowen økte, vil også permeat fluxen øke. Korresponderende med økning/reduksjon i permeatflow, økes eller reduseres permeat fluxen. Resultatene samsvarte med disse forventningene. Til tross for at permeat fluxen ikke gikk ned som forventet, så bekreftet resultatene forholdet mellom permeat flux og permeatflow. Den andre faktoren membranareal er en konstant og vil ikke påvirke permeat flux slik permeatflowen gjør. Arealet har først betydning dersom en reduserer/øker antall membranstaver. Som følge av forholdet mellom permeatflow og flux, ble noe av endringen av permeat flux forklart gjennom ujevn permeatflow. På grunn av at permeatflowen svingte i løpet av filtreringsprosessen, påvirket det på samme tid registreringen av permeatflowen. Noe som ga usikkerheter til registrert permeatflow og beregnet permeat flux. Men om dette hadde stor påvirkning på permeat fluxen og kurven for endring av flux var usikkert.

Generelt sett var permeat fluxen lavere da skummet kjernemelk ble filtrert, sammenlignet med filtrering av skummet melk. Dette ble forklart gjennom permeatflowen som var lavere. Årsaken til dette kan ha vært at filtreringen av skummet kjernemelk ble gjennomført med en mer kontrollert tilnærming. Dette på grunn av lite erfaring knyttet til filtrering av kjernemelk. I tillegg er det knyttet noen utfordringer til mikrofiltrering av kjernemelk, som følge av at komponenter fra fettkulemembranen kan ha lik størrelse som kaseinmicellene (Corredig et al., 2003). På grunn av forskjellene i størrelse kan membraner foules letter og gi problemer ved mikrofiltrering av skummet kjernemelk.

Et annet moment var forholdet mellom transmembrantrykket (TMP) og permeat flux. I henhold til teorien rundt kritisk flux, så skal permeat fluxen øke lineært med TMP i starten av filtreringen (Brans et al., 2004). På grunn av at TMP ble beregnet som en gjennomsnittlig verdi for hele filtreringsprosessen, og ikke jevnlig slik de andre parameterne, ble forholdet mellom permeat flux og TMP vanskelig å vurdere. Men ved å se på forholdet mellom TMP og permeat flux mellom begge dagene for en blokk, var det mulig å se en sammenheng. Filtreringsforsøkene med skummet melk viste at dersom fluxen var høyere en dag var også TMP høyere. Dette var for eksempel tilfellet ved blokk 1 hvor fluxen var høyere ved dag 2,

hvor også TMP var høyest. Dette var også til en viss grad tilfellet da kjernemelk ble filtrert. Et unntak var blokk 2 hvor TMP var lik ved begge dager.

## 5.2 Mikrobiologisk sammensetning

### 5.2.1 Mikrobiologisk kvalitet i skummet melk før og etter mikrofiltrering, samt etter vask

Upasteurisert melk skal i henhold til Animaliehygieneforskriften (2009) ha et bakterieinnhold som er lavere enn  $3,0 \times 10^5$  kde/mL. Mer spesifikt når det gjelder totaltall aerobe mesofile mikroorganismer, så skal det tallet være lavere enn  $3,0 \times 10^4$  kde/mL (Samarzija et al., 2012). Den mikrobielle kvaliteten til den skummede melken var god, siden ingen av prøvene inneholdt mer enn  $3,0 \times 10^4$  kde/mL. Til tross for at analysen av det totale innholdet av aerobe mesofile mikroorganismer også inkluderer døde celler (Frøyen, 2016). Ga den fortsatt en god indikasjon på den mikrobielle kvaliteten. Den mikrobiologiske kvaliteten ble også målt gjennom innholdet av aerobe og anaerobe sporedannere, psykrotrofe mikroorganismer og bakteriofager. Generelt sett for de mikrobiologiske analysene, ga de fleste resultatene ingen kolonier, samt at noen skåler ikke hadde et tellbart antall kolonier. Dette ga et dårlig grunnlag for statistiske beregninger med tanke på signifikans. På grunn av dette, ble det ikke gjennomført variansanalyser for å undersøke signifikansen til de mikrobiologiske resultatene.

Arter av den aerobe sporedanneren *Bacillus cereus* kan være et problem på flere måter. Psykrotrofe *B. cereus* er et problem på grunn av overlevelse ved kjøleskaptemperatur (Granum, 2015). I tillegg til termoduriske *B. cereus* som kan overleve pasteurisering (Doyle et al., 2015). Det som gjør dette til en organisme som kan true mattryggheten, er produksjonen av toksiner. Evnen denne organismen har til produksjon av termostabile hydrolytiske enzymer, gjør at de også kan forringe produktkvaliteten (Samarzija et al., 2012). Slike enzymer kan forringe produkter blant annet gjennom proteolyse forårsaket av proteaser. Dette var trolig årsaken til bismaker i et produkt som ble laget av retentatet etter at skummet melk ble filtrert ved blokk 1 (dag 2). Trolig var bismaken forårsaket av proteaser produsert av *B. cereus*. En annen mulig årsak kunne vært proteaser produsert av *Pseudomonas spp.* eller andre psykrotrofe arter (Doyle & Buchanan, 2013). Men det er lite trolig årsaken til bismaken, ettersom det ikke ble registrert vekst av psykrotrofe mikroorganismer i prøvene av skummet melk som ble tatt ut. Det ble knyttet noe usikkerhet til disse resultatene, ved at de fleste prøvene ble tatt ut i fødetanken hvor melken ble temperert til  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Til tross for at psykrotrofe arter kan ha blitt inaktivert ved denne temperaturen. Så var det mulig at

*Pseudomonas spp.* kunne produsert slike enzymer ved kjølelagring (Samarzija et al., 2012). Den varmestabile egenskapen til slike enzymer kunne fortsatt medført forringelse av melken. På grunn av dette, var det en mulighet for at melken ble forringet av proteaser produsert av psykrotrofe mikroorganismer. Det var derimot ikke vekst av psykrotrofe mikroorganismer i prøvene som ble tatt ut ved filtrering av skummet melk.

Det er uklart hvilke krav som stilles til upasteurisert melk angående sporedannere. Derfor var det vanskelig å påstå at den mikrobielle kvaliteten var god med tanke på aerobe og anaerobe sporedannere. Anaerobe sporedannere og da spesielt *Clostridium* arter kan også utgjøre en stor trussel. Enkelte *Clostridium* arter er toksinprodusenter som gjør at de kan true mattryggheten (Granum, 2015). Men i meierisammenhengen er *Clostridium tyrobutyricum* en bakterie som utgjør et stort problem gjennom forringelse av kvaliteten til oster som for eksempel Jarlsberg (Doyle et al., 2015). Det var forventet at det var sporedannere i upasteurisert melk. Innholdet av anaerobe sporedannere var generelt sett lavt i prøvene av skummet melk. I tillegg var innholdet likt for alle prøvene av upasteurisert melk. På grunn av ukjente grenseverdier ble det til en viss grad vurdert til at resultatene på grunn av det lave innholdet var gode. Men det ble derimot observert at innholdet av anaerobe sporedannere var høyere ved blokk 3 sammenlignet med blokk 1. Årsaken til forskjellen i innholdet av anaerobe sporedannere mellom disse blokkene var usikkert. Men kontaminasjoner før melken kom til piloten var en mulig årsak. En usikkerhet ved analysen var vurderingen av gassdannelse, spesielt med tanke på hva som ble vurdert til å være gassdannelse. Hvordan eventuell gassdannelse ble observert og vurdert for hvert rør kan ha påvirket resultatene. En feilkilde til analysen for anaerobe sporedannere ved blokk 1 ble knyttet til vekstmediet RCM (Reinforced Clostridial Medium). Vekstmediet ble ikke laget rett, slik at pulveret ikke ble fullstendig løst opp. Dette medførte i at noe bunnutfelling ble observert etter autoklaving av mediet. Konsentrasjonen til dette mediet kunne vært forskjellig i røret, dette kan ha gitt ulike vekstforhold og videre påvirket resultatene.

En faktor som kunne påvirket resultatene med tanke på den mikrobielle kvaliteten var forskjellen i alder fra dag 1 til dag 2. Innholdet av mesofile mikroorganismer var et unntak når det gjelder alderen til melken som ble filtrert, da var innholdet lavest ved dag 2. Tempereringen av melk til 50 °C i forkant av filtreringen påvirket trolig innholdet av psykrotrofe mikroorganismer, på grunn av at de fleste prøvene ble tatt ut ved denne temperaturen. Dette kan også ha påvirket resultatene for mesofile mikroorganismer. Generelt

sett var det også mulig at tidspunktet for uttak av prøver spilte inn, med tanke på hvor lenge mikroorganismene ble utsatt for denne temperaturen. Andre feilkilder som kunne gitt grunn til usikkerhet, var at prøvene ikke ble ristet før gjennomføring av analyser, noe som ga lite homogene prøver. Dette kan videre ha vært en årsak til variasjoner mellom paralleller med tanke på antall kolonier.

Mikroorganismer og sporer er vanligvis større enn porene til MF-membraner. På grunn av dette vil de holdes igjen av membranen og konsentreres i retentatet (Doyle & Buchanan, 2013; Saboya & Maubois, 2000). Innholdet av mikroorganismer var forventet å øke i retentatet og reduseres i permeatet, sammenlignet med skummet melk og kjernemelk. Resultatene fra analysene av mesofile mikroorganismer stemte godt overens med teorien. Men forventede endringer i bakterieinnhold i retentat og permeat var derimot ikke tydelig for de fleste analysene for aerobe sporedannere. Ingen av filtreringsforsøkene med skummet melk viste til økning av aerobe sporedannere i retentatet. På den andre siden var derimot permeatet prøvene for melk frie for aerobe sporedannere. Noe som indikerte i at separeringsprosessen var god. Effekten av filtreringen når det gjelder anaerobe sporedannere var god. Ved alle filtreringsforsøkene økte innholdet anaerobe sporedannere i retentatet, uten at det ble funnet noe i permeatet. Dette samsvarte med hva som var mulig å forvente av en slik separeringsprosess (Da Silva Birion et al., 2018).

Det var på forhånd forventet at den mikrobielle kvaliteten til skyllevannsprøvene skulle være god. Skyllevannet etter ferdig vasket filtreringssystem skulle også vise til en bedre mikrobiell kvalitet sammenlignet med skyllevannet før vask. Uten kjente grenseverdier for hva som kunne indikert en god kvalitet, ble kvaliteten på skyllevannsprøvene vurdert ut fra kimtallet. En faktor som i stor grad kan ha påvirket de mikrobiologiske resultatene, var tidspunktet for uttak av prøver. Et tidligere uttak av skyllevann kunne indikert dårligere kvalitet sammenlignet med et senere uttak. Men lengden på gjennomskyllingen av filtreringssystemet etter filtrering varierte etter hvor skittent anlegget var. Samtidig ble skyllevannet fra retentat- og permeatstrømmen vurdert subjektivt med tanke på når det var lite restprodukt som strømte ut. Selv om det ville vært vanskelig å standardisere tidspunktet for uttaket, kunne det vært fordelaktig. Med like betingelser for uttak av prøver, ville det være lettere å sammenligne resultatene. Den samme subjektive vurderingen var tilfellet ved uttaket av skyllevannsprøvene etter vask. Der ble det gjort subjektive vurderinger av skyllevannet med tanke på når det ikke var syre i skyllevannet. Generelt sett var den mikrobielle renheten god i prøvene av det første

skyllevannet, som forventet var også den mikrobielle kvaliteten bedre for det siste skyllevannet. Innholdet av mesofile mikroorganismer var som forventet lavt i skyllevannsprøvene og viste til at vannet holdt god mikrobiell kvalitet. Men resultatet fra dag 1 ved blokk 3 skilte seg ut med vekst i permeat strømmen. Veksten i dette skyllevannet kan ha vært forårsaket av kontaminasjoner. Skyllevannsprøvene viste i stor grad til ingen vekst av sporedannere. Kontaminasjoner kunne vært en årsak til avvik med tanke på vekst av aerobe sporedannere i skyllevann. Men det totale bildet på den mikrobielle kvaliteten til skyllevannsprøvene tatt ut etter filtrering av melk var gode. Når det gjelder effekten av å alternere mellom to vaskeprosedyrer, viste alle filtreringsforsøkene med skummet melk et innhold av mesofile mikroorganismer som var lavest etter vasking med den originale vaskeprosedyren. Men innholdet etter at filtreringssystemet ble vasket med den alternative metoden viste til lave verdier, som ikke var så forskjellige fra da filtreringssystemet ble vasket med den originale prosedyren. Dette tydet på at det kunne vært mulig å redusere sirkuleringstiden for både lut- og syrevask, og samtidig gi god mikrobiologisk renhet.

### **5.2.2 Mikrobiologisk kvalitet i skummet kjernemelk før og etter mikrofiltrering, samt etter vask**

Kjernemelken som ble filtrert var omtrent en uke gammel ved ankomst til NBMU. Den ble kjølelagret (4 °C) fra tapping til den ankom TINE Meieriet Kalbakken. Før den ble transportert til NMBU. Alderen på kjernemelken i kombinasjon av at dette i Norge er et biprodukt, gjør at det kunne vært mulig å forvente forskjeller i mikrobiologisk kvalitet sammenlignet med melken. Alderen på kjernemelken var en faktor som kunne hatt innvirkning på den mikrobielle kvaliteten. Men denne effekten var ikke tilfellet. Den mikrobielle kvaliteten ble vurdert gjennom innholdet av mesofile mikroorganismer, psykrotrofe mikroorganismer, bakteriofager og sporedannere (aerobe og anaerobe), som vist i tabell.

Det var ikke mulig å identifisere kritiske verdier eller grenseverdier for totaltallet aerobe mesofile mikroorganismer i kjernemelk. Noe som resulterte i at den mikrobielle kvaliteten ble vurdert ut fra kimtallet. Men ingen av resultatene ga høyere verdier enn nevnte grenseverdier for melk. Kjernemelk er et biprodukt fra produksjonen av smør. Utgangspunktet for denne produksjonen var fløte etter at upasteurisert melk hadde blitt separert. Fløten fra denne melken har vært gjennom varmebehandlingsprosesser som eliminerte mesofile mikroorganismer. I tillegg ble fløten pasteurisert før kjerning. Totalt sett var dette faktorer

som trolige ville gitt dårlige vekstforhold for de fleste mikroorganismer. Disse faktorene kunne også ha spilt inn på den mikrobielle kvaliteten til kjernemelken.

Det var mulig å forvente at upasteurisert melk inneholdt sporedannere. Når det gjelder innholdet av aerobe sporedannere var det også uklart hva som kunne vært forventet. Men basert på resultatene var det mulig å anta at innholdet var lavt. Innholdet av aerobe sporedannere var samtidig lavere i skummet kjernemelk sammenlignet med skummet melk. Temperaturbehandlingen av fløten ved framstillingen av smør kunne også hatt en innvirkning på innholdet av aerobe sporedannere. Hvordan fløteråstoffet ble behandlet ved produksjonen av smør som ga kjernemelk til filtreringsforsøkene, var ikke kjent. På grunn av dette var det ikke mulig å vurdere denne faktoren ytterligere. Resultatene for skummet kjernemelk avvikte mellom dagene, ved blokkene kjernemelk ble filtrert. Disse variasjonene var vanskelig å forklare. Veksten av aerobe sporedannere i kjernemelken var generelt sett lav, alderen tatt i betraktning. Dette kan ha vært forårsaket av aseptisk tapping og god kontroll på kjølelagringen fra tapping og transport fra TINE Meieriet Jæren til NMBU. Kjernemelkens innhold av anaerobe sporedannere var også lavt, men det eksisterte noen forskjeller mellom dagene for hver blokk. Årsaken til disse forskjellene i innhold av anaerobe sporedannere var uklare. Samtidig var også innholdet av anaerobe sporedannere lavere ved blokk 4 sammenlignet med blokk 2. Men årsaken til denne forskjellen var også usikker. Behandlingen av fløteråstoffet før framstilling av smør, hadde trolig innvirkning på innholdet anaerobe sporedannere. Psykrotrofe mikroorganismer var fraværende i de fleste prøvene. Filtringen av skummet kjernemelk ved blokk 4 (dag 2) var et unntak, hvor det var vekst av psykrotrofe mikroorganismer i skummet kjernemelk. Dette avvikte med resultatene fra forrige dag, hvor psykrotrofe mikroorganismer var fraværende. En mulig feilkilde kan ha vært uttaket av prøver av kjernemelken før filtrering. Prøvene av skummet kjernemelk ble tatt ut fra fødetanken, hvor kjernemelken ble temperert til 50 °C. Som tidligere nevnt kan denne temperaturen ha påvirket den mikrobielle sammensetningen til råstoffet, spesielt med tanke på psykrotrofe mikroorganismer. Tempereringen kunne også påvirket innholdet av mesofile mikroorganismer. Prøvene ble ikke ristet før analysene for psykrotrofe mikroorganismer ble gjennomført. Noe som trolig var årsaken til eventuelle forskjeller mellom parallellene for en prøve og dermed resultatet.

Det var forventet at bakterieinnholdet i henhold til teori skulle øke i retentatet, samt reduseres i permeatet (Da Silva Birion et al., 2018). Innholdet av mesofile mikroorganismer i

kjernemelk retentatet og permeatet stemte bra med forventningene. Forskjellen mellom skummet kjernemelk, permeat og retentat var vanskelig å vurdere i tilfellene hvor prøvene var overgrodde. Men i disse tilfellene var det samtidig mulig å observere at innholdet var høyere i retentatet sammenlignet med skummet kjernemelk. Dette stemte bra med hva som var forventet av en slik separeringsprosess. Den skummede melken ble konsentrert til et høyere proteininnhold sammenlignet med kjernemelken. På bakgrunn av dette var det mulig å anta at innholdet av mesofile mikroorganismer kunne vært høyere i retentatet, etter filtrering av skummet melk. Men konsentreringsgraden virket ikke å ha en innvirkning på resultatene. Innholdet av aerobe sporedannere viste derimot i de fleste tilfellene til å ikke øke i retentatet. Samtidig som at det ikke var en trend som viste til reduksjon i permeatet. Effekten av filtreringen med tanke på innholdet av anaerobe sporedannere var derimot god. Alle filtreringsforsøkene viste til at innholdet av anaerobe sporedannere økte i retentatet, og en reduksjon ble observert for permeatet. Dette samsvarte med hva som var mulig å forvente av en slik separeringsprosess.

Det var på forhånd forventet at den mikrobielle kvaliteten til skyllevannet både før og etter rengjøring var god. Samtidig som at skyllevannet etter endt vask skulle hatt bedre mikrobiell kvalitet enn skyllevannet tatt ut før vask. En faktor som i stor grad kunne påvirket de mikrobiologiske resultatene var tidspunktet for uttak av prøvene. Innholdet av mesofile mikroorganismer i skyllevannet etter filtrering av kjernemelk var lavt, og indikerte en god mikrobiell renhet. Skyllevannsprøvene viste med noe unntak til en god mikrobiell kvalitet med tanke på innholdet av sporedannere. Innholdet av aerobe sporedannere i skyllevannet etter vask ved blokk 2 (dag 2) avvikte i forhold til skyllevannet før vasking, fra permeat strømmen. Årsaken til at det var vekst i skyllevannet etter vask, men ikke før vask var uklart. Men en mulig årsak til dette kunne vært forklart gjennom eventuelle kontaminasjoner ved oppsamling av skyllevann eller ved gjennomføring av analysen.

Tidspunktet for uttaket av prøvene kan ha påvirket de fleste resultatene. Et tidligere uttak av prøver av det første skyllevannet var trolig årsaken til vekst av aerobe sporedannere i prøvene som ble tatt ut ved blokk 4. Underveis i filtreringsforsøkene ved blokk 4 ble det mistenkt at fett kunne ha foulet membranen. På bakgrunn av dette burde de første skyllevannsprøvene blitt tatt ut på et senere tidspunkt. Skyllevannsprøvene var med noen unntak frie for psykrotrofe mikroorganismer. Da skummet kjernemelk ble filtrert ved blokk 4 var det vekst i prøvene av det første skyllevannet fra retentat strømmen. Uten vekst i retentatet var det

vanskelig å forklare tilstedeværelsen i skyllevannet fra retentat strømmen før vask. En mulig årsak kan ha vært vekst av psykrotrofe mikroorganismer over natten ved kjølelagring. Kontaminasjoner ved oppsamling av skyllevann eller ved gjennomføring av analysen kunne også vært en årsak til veksten. Prøvene var også med et par unntak frie for anaerobe sporedannere. Det var vekst av anaerobe sporedannere i prøvene av det første skyllevannet fra retentat strømmen begge dager ved blokk 4. Årsaken til denne veksten kan trolig ha vært et tidlig uttak av skyllevannsprøvene. Prøvene av skyllevannet etter vask var det eneste målepunktet, da effekten av ulike vaskeprosedyrer ble vurdert. Dette ble sett på som en svakhet ved forsøksoppsettet. Generelt sett ble det ikke observert til at alterneringen mellom to vaskeprosedyrer, ga store forskjeller med tanke på den mikrobielle renheten. Men det ble vurdert til at flere målepunkter kunne vært en fordel, med tanke på vurderingen av vaskeprosedyrene. Effekten av ulike vaskeprosedyrer ga bedre resultater med tanke på mesofile mikroorganismer ved filtrering av skummet melk, sammenlignet med skummet kjernemelk. Men forskjellene var ikke store. På bakgrunn av dette var det mulig å anta det var mulig å oppnå god mikrobiell renhet, til tross for redusert sirkuleringstid for vaskemidlene.

### **5.2.3 Bakteriofag som indikator for mikrobiell kvalitet før og etter mikrofiltrering, og etter vask**

En viktig del av oppgaven var å undersøke toleransen *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager har til alkaliske vaskemidler. På grunn av påstanden om at fag kan elimineres av lut, var bakteriofag en viktig mikrobiell indikator for denne oppgaven. Analyser for å undersøke tilstedeværelsen av fag, ble vurdert til å være viktig på grunn av problemene fag infeksjoner kan forårsake. Spesielt ved framstillingen av fermenterte meieriprodukter. Bakteriofager som er spesifikke for melkesyrebakterier, slik som *L.lactis* arter, kan enten hemme eller stanse fermenteringer (Marcó et al., 2012). Det var ikke forventet at bakteriofag skulle være tilstede i prøvene i prøvene som ble tatt ut ved hvert filtreringsforsøk. Til tross for at det ikke var vekst av fag, så var det likevel en viktig analyse å gjennomføre på grunn av konsekvensene som kan oppstå dersom fag var tilstede. Det kan ha vært flere årsaker til at fag ikke var tilstede i prøvene. Det kunne vært faktorer ved filtreringsprosessen eller vaskeprosedyrene. Men uten tilstedeværelse i skummet melk/kjernemelk var det lite trolig årsaken. Selv om det kan ha vært fag i filtreringssystemet som kunne kontaminert råstoffet ved filtrering. Fraværet av fag kunne også vært forårsaket av feilkilder knyttet til analysen. Et moment kunne vært sensitiviteten indikatorstammen *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403 hadde til eventuelle fag. Dersom sensitiviteten var lav kunne det forklart årsaken til disse



resultatene. Det kan også ha vært tilfelle at konsentrasjonen av  $\text{CaCl}_2$  som ble tilsatt var for lav.  $\text{CaCl}_2$  ble tilsatt for å hjelpe fag til å binde seg til indikatorbakterien.

Det ble i tillegg gjennomført en stresstest av bakteriofag for å undersøke toleransen til lut. Denne testen ble gjennomført ved å utsette fag for ulike kombinasjoner av konsentrasjoner av et alkalisk vaskemiddel og tid. På grunn av at det ikke var fag tilstede i noen av prøvene tatt ut i forbindelse med filtreringsforsøkene, kunne denne testen gi en indikasjon på toleransen bakteriofag har til alkaliske vaskemidler. Konsentrasjonene ble valgt etter anbefalt dosering basert på produktdatabladet til det alkaliske vaskemiddelet Ultrasil 25 (Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Tyskland). Mens tidene ble valgt med utgangspunkt i vaskeprosedyrene som anlegget ble vasket med. Toleransen fag har til lut ble antatt å være lite undersøkt, på grunn av få publikasjoner. På grunn av at slik testing var lite utbredt, var det ikke mulig å finne en optimal metode for stresstesting av bakteriofag. Med få publikasjoner som kunne gi grunnlag for en metode, ble metoden istedet basert på betingelser (temperatur, konsentrasjon, tid) ved lutvask av keramiske MF-membraner. Kombinasjonen av konsentrasjon til det alkaliske vaskemiddelet og tid ble plakk-testet, slik kapittel 3.4.1.3 viser. I forkant av denne testen ble aktiviteten til utlevert fag-prøve undersøkt ved hjelp av en plakk-test. Plakk-testen ga få plakk, som indikerte at fagen var lite aktiv. På bakgrunn av dette ble andre prøver av fag plakk-testet. Basert på denne analysen ble det bestemt til å bruke  $\phi$ -Voss 15.00 i dette forsøket. Før gjennomføring av testen var det også viktig å dyrke opp fag, for å få et tilstrekkelig antall fag partikler før testing. I likhet med plakk-testingen av prøvene som ble tatt ut ved filtreringsforsøkene, ga ikke denne plakk-testen noe utslag i form av plakk. Basert på dette var det mulig å konkludere med at lut dreper fag. Dette samsvarer med hva Murphy et al. (2014) kunne konkludere med. De undersøkte effekten av lut ( $\text{NaOH}$ ) på bakteriofag og viste at det ikke ble dannet plakk. Slik at luten eliminerte fag partiklene. I tillegg til prøver med fag, ble også fag med kjent konsentrasjon plakk-testet som en kontrollprøve. Denne ga plakkdannelse, tilsvarende som da prøven ble dyrket til et høyt antall fag partikler. Dette tydet på at luten eliminerte fag i prøver. På grunn av at temperatur var en faktor ved dette forsøket, var det vanskelig å isolere effekten av konsentrasjon. Dette på grunn av at både tid og temperatur er faktorer som kunne påvirke overlevelsen til fag.

Selv om denne metoden ikke hadde blitt gjennomført ved å bruke vannbad med temperatur lik betingelser for lutvask, ville temperaturen uansett hatt en påvirkning. En annen faktor var at effekten ble undersøkt ved å lage fire løsninger med ulik konsentrasjon av et alkalisk

vaskemiddel som ble brukt ved vask av membraner. Dette vaskemiddelet bestod ikke av kun NaOH, men også av natriumhypokloritt. Dette var et moment som gjorde det vanskelig å konkludere med toleransen for NaOH. Samtidig skal effekten av å bruke et vaskemiddel som består av flere komponenter være mer effektivt sammenlignet med midler med en komponent (Hayes et al., 2017). Optimalt burde det blitt brukt en ren NaOH løsning for å undersøke om lut kunne eliminert fag. Men samtidig viste denne testen effekten av kombinasjonen av vaskemiddelkonsentrasjon, tid og temperatur på overlevelsen til bakteriofager. På den andre siden ble det brukt betingelser som tilsvarer betingelser som ble brukt ved lutvask. Slik at metoden til en viss grad simulerte en vaskeprosedyre. Samtidig var det viktig å påpeke at analysen ble gjennomført på lab benken. Selv om denne analysen viste til eliminering av bakteriofag, så var det ikke mulig å påstå at en lik tilnærming vil fungert dersom dette ble oppskalert til en CIP-vask av membraner.

Indikatorbakterien som ble brukt til dette forsøket var *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL 1403. Gjennom en tidligere masteroppgave hadde denne bakterien vist seg å være sensitiv til fagprøven  $\phi$ -Voss 15.00, som ble brukt til testen. Dermed kunne ikke eventuelle feilkilder vært knyttet til indikatorstammen. Et annet usikkerhetsmoment kunne vært pH toleransen til indikatoren. pH til samtlige lutløsninger var høyere enn 12. Det var mulig at høye pH verdier kunne eliminert indikatorbakterien. Det ble foreslått å nøytralisere lutløsningene med svak syre før fortykning av prøven og plakk-testing. Ved å gjøre dette kunne det vært mulig å utelukke at pH var for høy. Men det var samtidig vanskelig å vite hvordan tilsatsen av svak syre ville påvirket resultatet. Effekten av tilsats av svak syre burde derfor blitt undersøkt på forhånd. Dette momentet var en av årsakene til at metoden for denne testen burde blitt modifisert i større grad. Som tidligere nevnt kunne også temperaturen vært et usikkerhetsmoment ved denne analysen. Det kunne vært mulig temperaturen i seg selv var utslagsgivende for inaktivering av fag. Bakteriofager har ulik toleranse til temperatur, og enkelte har vist evne til å overleve temperaturbehandling lik lav pasteurisering (Campagna et al., 2014; Mahoney et al., 2012). Murphy et al. (2014) undersøkte toleransen til fag innenfor gruppen 936, som er en gruppe bakteriofager som har vist høy spesifisitet til *Lactococcus lactis*. De undersøkte overlevelsen til fag ved 85 °C. Overlevelsen av fag varierte, hvor noen overlevde, mens andre ikke tålte denne temperaturen. Ulike isolater vil dermed ha ulik toleranse. På grunn av få publikasjoner på toleransen MSB-spesifikke bakteriofager til lut, ble det vurdert til å være et område med potensial til videre forskning.

## 5.3 Kjemisk sammensetning

### 5.3.1 Melkens kjemiske sammensetning før og etter mikrofiltrering, samt etter vask

Den kjemiske sammensetningen til skummet melk ble bestemt gjennom å analysere prøvene for tørrstoff, proteininnhold, pH og innholdet av utvalgte mineraler (kalsium, kalium, magnesium, natrium og fosfor). Vurderingen av den kjemiske sammensetningen til den skummede melken ble basert på forventede verdier i melk. Sammensetningen til melk vil variere med faktorer som genetikk og helsen til kua (Hurt & Barbano, 2010).

Tørrstoffinnholdet i melk vil variere, men Fox et al. (2015) beskrev denne verdien til å være 12,7 %. Prøvene som ble tatt ut av den skummede melken viste ikke til dette. Resultatene viste uventede forskjeller i tørrstoffinnhold mellom dagene hver blokk skummet melk ble filtrert. De store forskjellene kan ha vært forårsaket av feil ved gjennomføring av analysen. Som at prøveskålene ikke ble dekket til under innveining av prøvene. Dette kan ha gitt utslag på resultatet ved at noe prøvevolum kan ha begynt å fordampe.

Proteiner og mineraler utgjør en del av melkens tørrstoff. Melk har vanligvis et forventet proteininnhold på 3,3 % (Walstra et al., 2006). Prøvene av skummet melk viste til et proteininnhold nær denne konsentrasjonen. Forskjellene mellom begge dagene for blokkene med filtrering av melk var små. I tillegg til disse analysene ble pH målt. Melk har vanligvis en pH rundt 6,7 (Walstra et al., 2006). Dette stemte bra med melken som ble filtrert ved blokk 1. Det var uventet med høyere pH i prøvene av skummet melk som ble tatt ut ved blokk 3, og årsaken til dette var usikkert. En mulig feilkilde som kunne ha påvirket resultatene, var temperaturen på prøvene ved måling. pH-meteret ble kalibrert ved buffere ved romtemperatur. Dersom temperaturen var noe høyere enn romtemperatur ved måling kunne det gitt utslag. Samtidig var det også usikkert om pH – resultatene for blokk 3 var veldig høye eller hvorvidt verdiene var akseptable.

Melken inneholder en del mineraler, hvor noen av de vanligste mineralene er kalsium, kalium, magnesium, fosfor og natrium. I melken er mineralene fordelt ulikt, hvor enkelte befinner seg i serumet, mens andre i micellene. Kalsium, fosfor og magnesium er mineraler som befinner seg i kaseinmicellene (Li & Corredig, 2014; Walstra et al., 2006). Kalsiuminnholdet i melken ligger vanligvis på 1,17 g/kg (Walstra et al., 2006). Prøvene som ble tatt ut av skummet melk viste at innholdet av kalsium stemte bra med forventet verdi. Når det gjelder melkens innhold av kalium, så ligger det vanligvis på 1,43 g/kg (Walstra et al., 2006). Dette er en verdi som

var lavere enn innholdet i prøvene av skummet melk. Men forskjellen fra forventet nivå var ikke stor. Med tanke på at den forventede verdien er en gjennomsnittlig verdi, og at innholdet varierer i melk. Var det mulig å anta at konsentrasjonen av kalium i prøvene av melk likevel kan ha vært i et område for hva som kan forventes. Magnesiuminnholdet i melk er lavere sammenlignet med både kalium og kalsium. Vanligvis er magnesium konsentrasjonen på 0,11 g/kg i melk (Walstra et al., 2006). Prøvene av skummet melk viste verdier tilsvarende forventet magnesiuminnhold i melk. Melkens innhold av natrium er forventet å være 0,48 g/kg (Walstra et al., 2006). Det forventede innholdet var høyere enn natriuminnholdet i samtlige prøver av skummet melk. Innholdet av fosfor er forventet å være 0,63-1,02 g/kg (Zamberlin et al., 2012). Prøvene som ble tatt ut av melken før filtreringen viste til et fosforinnhold i samsvar med hva som var forventet.

På grunn av at en ved mikrofiltrering tar ut en del vann i permeatet, vil naturligvis tørrstoffinnholdet øke i retentatet. Permeatet vil samtidig få et redusert tørrstoffinnhold, sammenlignet med den skummede melken. Alle resultatene fra filtreringsforsøkene med melk viste til nettopp dette. Brix (løselig tørrstoff) ble målt i prøvene, og resultatene viste til de samme og forventede trendene. Målet ved filtreringen av skummet melk var å konsentrere proteininnholdet til 8 %. Likevel varierte proteininnholdet mellom 9 % (blokk 1) mot 6 % (blokk 3). På grunn av at innholdet i retentat- og permeat tanken ikke ble rørt rundt før uttak, var prøvene lite homogene og representative. Dette var den mest trolige årsaken til usikkerhet rundt tørrstoffinnholdet i retentat- og permeat prøver. Av det totale proteininnholdet i melk utgjør kaseinet majoriteten (Walstra et al., 2006). I tillegg er kaseinmicellene (0,02-0,3  $\mu\text{m}$ ) større enn hva myseproteinene (0,006-1,0  $\mu\text{m}$ ) er (Tomasula et al., 2011). Størrelsesforholdet mellom de to store proteingruppene i melk kunne også forklart forskjellene i proteininnhold i retentat og permeat, kombinert med at majoriteten av proteiner i melk er kasein. Kaseinet utgjør hovedandelen av protein i melk og har samtidig en størrelse som stort sett er større enn porene til MF-membraner. På grunn av dette blir det meste av kasein i melk holdt igjen av membranen, og vil derfor bidra til et høyere proteininnhold i retentatet. Samtidig er myseproteinene mindre enn porestørrelsen, og vil passere membranen. Slik at de vil finne seg i permeatet.

Bufferkapasiteten forteller noe om evnen pH har til å økes eller reduseres. Mineraler og proteiner er komponenter i melk som kan bidra til endringen i bufferkapasitet (Salün et al., 2005). Økningen av kaseinkonsentrasjon i retentatet bidrar også til at bufferkapasiteten øker i

retentatet sammenlignet med skummet melk (Salün et al., 2005). På grunn av den økte bufferkapasiteten i retentatet, kunne det vært mulig å forvente at pH økte. Samtidig som det kunne vært forventet med pH reduksjon i permeatet, blant annet på grunn av en lavere proteinkonsentrasjon. Filtreringen av skummet melk ved blokk 3 viste til resultater som stemte bra med forventningene, hvor pH økte i retentatet og samtidig ble redusert i permeatet. Dette var derimot ikke tilfellet da melk ble filtrert ved blokk 1. Årsaken til disse resultatene var usikre.

Kalsium, magnesium, og fosfor er som tidligere nevnt en del av kaseinmicellen (Mekmene et al., 2009; Walstra et al., 2006). På grunn av dette var det mulig å forvente at de, sammen med kaseinmicellene ble holdt igjen av membranen. Slik at konsentrasjonen av disse mineralene økte i retentatet. Konsentrasjonen av kalsium, magnesium og fosfor i retentat prøvene viste til den forventede økningen i konsentrasjon. Samtidig som at konsentrasjonen ble redusert i permeatet. På grunn av at en del av disse mineralene befinner seg i serumfasen, var det mulig å forvente en lav konsentrasjon i permeatet. Innholdet av kalium og natrium i retentat- og permeat prøvene viste ikke til samme trend som de øvrige mineralene. Innholdet av disse mineralene i permeatet var riktignok lavere enn både skummet melk og retentat. Men forskjellene mellom skummet melk, retentat og permeat var små. Dette kan tyde på at natrium og kalium ikke ble konsentrert i lik grad som de øvrige mineralene i retentatet. En årsak til denne endringen kan ha vært at det meste av kalium og natrium i melk befant seg i serumfasen (Walstra et al., 2006).

Tørrstoffinnholdet burde vært høyere i skyllevannet før vask sammenlignet med skyllevannet etter vask. En mulig feilkilde som kan ha vært aktuell for alle kjemiske analyser av skyllevann, var tidspunktet for uttak av prøver. Et tidlig uttak av det første skyllevannet ville trolig gitt et høyere tørrstoffinnhold. Men generelt sett var tørrstoffinnholdet i skyllevannsprøvene som forventet lave. Nett-vannet som ble brukt til å skylle gjennom anlegget kan ha vært en mulig feilkilde på grunn av eventuelt innhold av salter og mineraler. Men det var lite trolig at dette ville gitt store utslag. Innholdet av tørrstoff var slik som forventet lavest i de siste skyllevannsprøvene. Dette ble forventet ettersom skyllevannet ble tatt ut etter en vaskeprosedyre, som involverte bruk av alkaliske vaskemidler og syre. Forventningene var basert på effekten av vaskemidlene. Hvor alkaliske vaskemidler skal være effektiv i fjerning av organiske forbindelser, mens syrer fjerner uorganiske forbindelser (D'Souza & Mawson, 2005).

I likhet med skyllevannsprøvenes tørrstoffinnhold var innholdet av protein lavt. Hvor også innholdet var lavere i det siste skyllevannet. Dette var resultater som stemte med det som var forventet. Samtidig var proteininnholdet i de fleste av disse prøvene så lavt, at det kunne bidratt med usikkerhet til resultatene. Som tidligere nevnt, kunne tidspunktet ved uttak av påvirket resultatene. pH-målinger av prøvene kunne til en viss grad bekrefte om prøvene ble tatt ut tidlig eller sent. Videre kunne gjennomskyllingen av filtreringssystemet ved vann forklart dette, gjennom vannets nøytrale pH. Et tidlig uttak av det første skyllevannet ville trolig gitt en pH nær produktets pH. Mens et senere tidspunkt derimot ville gitt pH-verdi lik 7. Når det gjelder et tidlig uttak av skyllevannet etter endt vask ville pH trolig vært i området mellom 1 og 2. Dette på grunn av at filtreringssystemet i det siste vasketrinnet ble vasket ved å sirkulere en salpetersyreløsning. Et senere tidspunkt ville derimot trolig gitt pH ved 7. pH i prøvene av det første skyllevannet ved blokk 1 indikerte at det var lite restprodukt som strømte gjennom retentat- og permeatstrømmen, noe som også ble observert for blokk 3. Det tydet også på at det prøvene av skyllevannet etter vask ved blokk 1 ble tatt ut på et noe tidlig tidspunkt.

En generell oppfatning med tanke på mineralinnholdet i skyllevannsprøvene, var at det var veldig lavt. Det ble også forventet at innholdet var lavest i det siste skyllevannet. Dette var forventet på grunn av at syrebaserte vaskemidler i henhold til teori skal ha en effektiv virkning på fjerning av uorganiske forbindelser, som mineraler (D'Souza & Mawson, 2005). Det var også en mulighet for at noe av mineralinnholdet i skyllevannsprøvene kunne kommet fra nett-vannet, og gitt usikkerhet til resultatene. Av denne grunnen burde det blitt tatt ut prøver av nett-vannet for å eventuelt kunne fjernet noe av usikkerheten som ble knyttet til resultatene. Alle skyllevannsprøvene viste som forventet til lavt mineralinnhold, og at innholdet var lavest i skyllevannet etter endt vask. Eventuelt innhold av mineraler i nett-vannet kunne som tidligere nevnt forklart noe av resultatene. Men på grunn av at fosforinnholdet i skyllevannet etter vask var vesentlig lavere enn innholdet for de andre mineralene, var det mulig å anta at nett-vannet ikke inneholdt fosfor. På grunn av den forventede effekten av syrebaserte vaskemidler på uorganiske forbindelser, var det mulig å forvente en effekt av vaskeprosedyre. Denne forventningen ble basert på at en vaskeprosedyre hadde lengre sirkuleringstid med salpetersyre. Men effekten av lengre virketid for syren var ikke signifikant på innholdet av de fleste mineralene i skyllevannet etter vask.

### **5.3.2 Kjernemelkens kjemiske sammensetning før og etter mikrofiltrering, samt etter vask**

Den kjemiske sammensetningen til kjernemelken ble bestemt gjennom de samme analysene (tørrstoff, brix, proteininnhold, pH og mineraler) som ble gjennomført ved filtrering av skummet melk. Det var forventet at kjernemelkens tørrstoff skulle variere mellom 7 og 10 % (Fuquay et al., 2011). Alle prøvene av den skummede kjernemelken hadde et tørrstoffinnhold som stemte med forventningene. Forskjellen i tørrstoffinnhold mellom dagene for begge blokkene skummet kjernemelk ble filtrert, var usikker. Men en årsak ble knyttet til innveilingen av prøvene til analysen, som nevnt i forbindelse med filtrering av skummet melk. I tillegg kunne lite homogene prøver vært en årsak. Samtidig var ikke forskjellene innad i blokkene like store som for skummet melk. Kjernemelk har et proteininnhold som ligger mellom 2,66 og 3,75 % (Fuquay et al., 2011). Dette indikerer at kjernemelk har et proteininnhold som er noe likt melk. Samtidig er også forholdet mellom kasein og myseprotein i kjernemelk, likt forholdet i melk (Svanborg et al., 2015). Proteininnholdet i prøvene var stort sett innenfor det forventede proteininnholdet. Unntaket var den skummede kjernemelken som ble filtrert ved blokk 2 (dag 2). Men resultatet fra denne dagen viste til et høyt standardavvik som ga usikkerheter tilknyttet resultatet. Med unntak av denne dagen var proteininnholdet jevnt mellom begge dagene hver blokk kjernemelk ble filtrert. Lite er publisert når det gjelder kjernemelkens pH. Men De Bassi et al. (2012) rapporterte at pH i kjernemelken er lik pH i melk. Dette stemte også bra med pH i prøvene av skummet kjernemelk. Men et unntak var blokk 4 (dag 1), hvor pH i skummet kjernemelk ble målt til å være 6,76. Det var usikkert hvorvidt denne verdien var for høy eller om den var akseptabel. Temperaturen til prøvene ved måling av pH kunne som tidligere nevnt vært en mulig feilkilde.

Mineralinnholdet til kjernemelk er lite undersøkt. Dette er en komponent i kjernemelken som har fått mindre oppmerksomhet sammenlignet med for eksempel fosfolipidene. Derfor var det i de fleste tilfeller vanskelig å vite hva som kan ha vært forventet av mineraler i kjernemelk. Men O'Connell og Fox (2000) har rapportert om at kalsiuminnhold i kjernemelk var 0,948 g/kg. Dette stemte bra med kalsiuminnholdet i prøvene av skummet kjernemelk. Kalsiuminnholdet var i tillegg signifikant lavere i kjernemelk sammenlignet med melk. Innholdet av kalium i kjernemelk er ikke publisert noe sted. Men resultatene viste til at kaliuminnholdet var lavere i skummet kjernemelk sammenlignet med skummet melk. Dette ble også bekreftet gjennom en variansanalyse, som viste at effekten av råstoff var signifikant.

Det ble ikke funnet noen publikasjoner som viste til magnesiuminnholdet i kjernemelk. Resultatet fra analysene i dette arbeidet viste at innholdet av magnesium i den skummede kjernemelken ikke var signifikant forskjellig fra innholdet av magnesium i skummet melk. Det ble ikke funnet noen publikasjoner på natriuminnhold i skummet kjernemelk. Men resultatene indikerte i at skummet melk og kjernemelk inneholdt omtrent like mye natrium. Effekten av råstoff var samtidig ikke signifikant på natriuminnholdet. Dette bekreftet observasjonene som ble gjort med tanke på natriuminnholdet i melk og kjernemelk. Innholdet av fosfor er ikke publisert noe sted. Men basert på resultatene var det mulig å anta at det var en forskjell mellom melk og kjernemelk med tanke på fosforinnhold. Resultatene kunne bekrefte at innholdet av fosfor var signifikant lavere i kjernemelk, sammenlignet med melk.

Som forventet økte tørrstoffinnholdet i retentatet sammenlignet med skummet kjernemelk, samt en tilsvarende reduksjon i permeatet. Denne trenden ble bekreftet gjennom brix resultatene (vedlegg 1). Sammenlignet med skummet melk, var tørrstoffinnholdet lavere i kjernemelk retentatet. Dette var forårsaket av at melken ble mer konsentrert enn kjernemelken, som ble konsentrert til 6 % protein. I likhet med konsentreringen av skummet melk, nådde ingen av filtreringsforsøkene målkonsentrasjonen. Det ble antatt at uttaket av prøvene var lite representative, og kan ha vært en trolig årsak til resultatene.

Filtreringsforsøkene viste også til at proteininnholdet økte i retentatet og ble redusert i permeatet, sammenlignet med skummet kjernemelk. Dette stemte bra med hva som var forventet. På grunn av at mesteparten av proteiner i kjernemelk er kasein og størrelsen til kasein er det trolig at proteininnhold er høyere i retentatet (Tomasula et al., 2011). I tillegg er myseproteiner mindre i størrelse og mengde, noe som gjør at de passerer membranen og blir en del av permeatet (Tomasula et al., 2011). Forholdet mellom kasein og myseprotein kan ha vært en årsak som kunne forklart forskjellene mellom retentat og permeat med tanke på proteininnholdet. Proteininnholdet var som forventet høyere i retentatet etter filtrering av skummet melk, sammenlignet med filtrering av skummet kjernemelk. Samtidig var konsentrasjonen lavest i permeatet etter filtrering av kjernemelk. En mulig årsak til dette kan forklares gjennom proteinsammensetningen til kjernemelk. Dersom mengden myseproteiner var lavere i kjernemelk, kan det ha vært en årsak til forskjeller i proteininnhold i permeat etter filtrering av skummet melk og kjernemelk. Men størrelsen til proteiner i fettkulemembranen var en årsak som ga usikkerhet til proteininnholdet. Med tanke på hvordan proteiner fra fettkulemembranen ville påvirket proteininnholdet i retentatet og permeatet.



Den høye kaseinkonsentrasjonen i retentatet bidro til økt bufferkapasitet. Ved en økning i bufferkapasitet var det mulig å forvente at pH økte i retentatet og reduseres i permeatet (Salün et al., 2005). Økning i pH i retentatet var kun tilfellet ved blokk 2. Mens den forventede reduksjonen av pH i permeatet var tydelig for alle filtreringsforsøkene. Det var usikkert hvordan mineralene er fordelt i kjernemelken. Men det ble antatt at de er fordelt slik mineralene er i melk. Som vil si at kalsium, magnesium og fosfor er forbundet med kaseinmicellene. Mens mesteparten av natrium og fosfor befinner seg i serumfasen. På bakgrunn av dette var det mulig å forvente at kalsium, magnesium og fosfor ble holdt igjen av membranen med kaseinmicellene, og dermed blitt konsentrert i retentatet. Resultatene for innholdet av disse mineralene i retentatet samsvarte med forventningene. Hvor konsentrasjonen økte i retentatet sammenlignet med skummet kjernemelk. Som tidligere nevnt vil en del av disse mineralene være i serumfasen. Noe som ga en lav konsentrasjon av mineraler i permeatet. Innholdet av natrium og kalium i retentatet og permeatet etter filtrering av skummet kjernemelk viste ikke til samme trend som de øvrige mineralene. Men innholdet av kalium og natrium var ved de fleste tilfellene lavere i permeatet, sammenlignet med skummet kjernemelk og retentatet. Forskjellene mellom skummet kjernemelk, retentat og permeat var derimot små. Effekten av filtreringsprosessen med tanke på innholdet av kalium og natrium var dermed ikke tydelig, slik tilfellet var for de øvrige mineralene. En årsak til forskjeller ble knyttet til fordelingen av mineralene i kjernemelken, hvor det ble antatt at disse mineralene var fordelt slik som i melk, der mesteparten av innholdet av kalium og natrium befant seg i serumfasen.

Det var også ved filtrering av skummet kjernemelk forventet at tørrstoffinnholdet var lavt i skyllevannsprøvene, hvor innholdet var lavest i det siste skyllevannet. Tidspunktet for uttak av prøvene var som tidligere nevnt en mulig feilkilde. Men som forventet var tørrstoffinnholdet lavt i disse prøvene. I tillegg var tørrstoffinnholdet som forventet lavere i det siste skyllevannet sammenlignet med det første. Årsaken til dette var trolig på grunn av at det siste skyllevannet ble tatt ut etter vask.

Det var noen trender som viste til forskjeller i tørrstoffinnhold i det siste skyllevannet mellom de ulike vaskeprosedyrene. Men effekten av ulike vaskeprosedyrer var ikke signifikant på tørrstoffinnhold i det siste skyllevannet. Som da skummet melk ble filtrert var det mulig å anta at det lave tørrstoffinnholdet i skyllevannsprøvene, kan ha vært forårsaket av at nettvannet kunne inneholdt eventuelle mineraler og salter. Som beskrevet for filtrering av

skummet melk var det også mulig å anta at ulike vaskeprosedyrer kunne hatt en innvirkning på tørrstoffinnholdet skyllevannet etter vask. Effekten av å alternere mellom to ulike vaskeprosedyrer var ikke synlige ved å se på resultatene. Denne observasjonen ble bekreftet gjennom en variansanalyse som viste at effekten av vaskeprosedyre ikke var signifikant på tørrstoffinnholdet. På samme måte som da skummet melk ble filtrert var proteininnholdet generelt sett lavt i skyllevannsprøvene. Dette stemte bra med hva som var forventet. Proteininnholdet var som forventet lavest i prøvene av det siste skyllevannet. Det kunne vært mulig å forvente en effekt av vaskeprosedyrer. Men dette var ikke en gjennomgående trend for resultatene for skyllevannet etter vask. Samtidig var ikke effekten av vaskeprosedyre signifikant på proteininnholdet i skyllevannet etter vask. Som beskrevet ved filtrering av skummet melk kunne tidspunktet for uttak av prøver ha påvirket resultatene. Effekten av tidspunktet for uttaket ble til en viss grad bekreftet ved pH målinger av skyllevannet, som forklart for skummet melk. Resultatene av det første skyllevannet ved blokk 2 viste at prøvene ble tatt ut på et senere tidspunkt, noe som også var tilfellet ved blokk 4. Når det gjelder det siste skyllevannet, ble prøvene tatt ut ved ulike tidspunkt ved blokk 2. Med tidlig uttak ved dag 1 og sent uttak ved dag 2. Prøvene av det første skyllevannet ble tatt ut rett før vaskingen ble satt i gang. På grunn av viktigheten av å skylle ut restprodukt før vasken ble satt i gang, var dette skyllevannet en viktig parameter. Dersom det var en del restprodukt i filtreringssystemet kan det ha redusert effektiviteten til vaskeprosedyren og mikroorganismer kan potensielt utvikle resistens ovenfor kjemikalie (Campagna et al., 2014).

Mineralinnholdet i skyllevannsprøvene kan ha blitt påvirket av flere faktorer. Dette kunne blitt forklart gjennom eventuelt innhold av mineraler i nett-vannet som ble brukt til å skylle gjennom anlegget. På bakgrunn av det svært lave fosforinnholdet i skyllevannet etter vask, kunne det tyde på at nett-vannet trolig ikke inneholdt fosfor. Et annet moment var vaskeprosedyren. Syre skal i henhold til teori fjerne uorganiske forbindelser som mineraler (D'Souza & Mawson, 2005). Basert på dette var det mulig å anta at en syrevask med redusert sirkuleringstid ville gitt et høyere innhold av mineraler, sammenlignet med en vask med lengre sirkuleringstid. Men denne effekten var ikke fremtredende og samtidig ikke signifikant for de fleste mineralene. Det var forventet at mineralinnholdet i skyllevannsprøvene var lavt. Samtidig som at innholdet skulle være lavest i prøvene av det siste skyllevannet. Som forventet var innholdet av mineraler lavt i samtlige skyllevannsprøver. Samtidig som at innholdet var lavest i det siste skyllevannet.

## 6 Konklusjon

Utvikling av en vaskeprosedyre krever kunnskap om egenskapene til råstoffet som skal filtreres, med tanke på hvordan det kan foule membraner. Samtidig er det også viktig med kunnskap om hvordan parametere for en vaskeprosess kan endres etter renheten til anlegget etter filtreringsprosessen. For å sikre en god rengjøringsprosess er det viktig at anlegget skylles godt gjennom før vask og mellom hvert trinn med kjemikalier. Dersom det er en del restprodukt i retentat- og permeatstrømmen kan effektiviteten til rengjøringsprosessen reduseres. Videre kan dette gi dårligere kjemisk-, fysisk- og mikrobiell renhet etter vask. Samt en separeringsprosess med redusert effektivitet.

Effekten av de ulike vaskeprosedyrene ble målt gjennom skyllevannet etter endt vask. Det ble konkludert med at effekten av å alternere mellom to vaskeprosedyrer ikke ga signifikante forskjeller med tanke på renhet. Prøvene fra dette skyllevannet viste til god mikrobiell renhet med tanke på alle mikrobielle indikatorene det ble analysert for. Skyllevannsprøvene etter endt vask viste også til god kjemisk renhet gjennom dets lave innhold av tørrstoff, mineraler og proteiner. Den fysiske renheten kunne blant annet blitt målt gjennom separeringsevnen til membranen. Evnen membranen hadde til å holde igjen forbindelser som var større enn porestørrelsen i retentatet var god. Og dermed var det mulig å konkludere i at den fysiske renheten var god. På bakgrunn av disse resultatene ble det med forbehold konkludert med at vaskeprosedyren med redusert sirkuleringstid for kjemikaliene viste til resultater, som var like gode sammenlignet med da systemet ble vasket med lengre sirkulering av vaskemidlene.

Gjennom testing av toleransen *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager hadde til alkaliske vaskemidler, var det mulig å konkludere med at slike bakteriofager ble eliminert av alkaliske vaskemidler. Dette samsvarte med publikasjoner innenfor dette området. Men på grunn av få publikasjoner og usikkerheter knyttet til metoden. Ble det anbefalt med videre forskning på toleransen til *L.lactis* spesifikke fager ovenfor alkaliske vaskemidler. På bakgrunn av dette ble det ikke med sikkerhet konkludert med at fag ble eliminert av alkaliske vaskemidler.

## 7 Forslag til videre arbeid

Utgangspunktet for denne oppgaven var å se på rengjøring av keramiske MF-membraner for optimal renhet og optimale prosessbetingelser for framstilling av kaseinkonsentrat. Fokuset ble etterhvert rettet mot rengjøring. På grunn av lite tid ble det ikke mulig å optimalisere prosessbetingelser for konsentreringen av kasein. Denne delen av oppgaven kan da tas videre i en annen oppgave. Det som kan undersøkes er effekten av å bruke ulike MF-membraner med ulik porestørrelse, samtidig som det også kan være mulig å operere med ulike transmembrantrykk. Et annet forslag kunne vært å «stresse» filtreringssystemet mer ved å for eksempel konsentrere skummet melk og kjernemelk mer enn det ble gjort i denne oppgaven.

Om det var mulig, kunne det vært en idé å se på hvordan en teknikk som «backwash», har en innvirkning på fouling av membraner. Dette er en teknikk hvor retentatet pumpes motsatt vei gjennom membranen, slik at partikler fjernes fra membranen (Hilal et al., 2007). Det kunne vært interessant å undersøke hvordan denne teknikken kunne redusert fouling underveis i en filtreringsprosess. Dette kunne blitt gjort i kombinasjon med å stresse filtreringssystemet slik at membranen ble mer foulet.

Vurdering av fouling kunne også vært et tema å ta tak i. Det kan for eksempel gjøres ved å elektronmikroskopere membranen. Elektronmikroskopering av membraner var et forslag på noe som kunne blitt gjort ved denne oppgaven, men en utfordring var å finne en metode for hvordan membranene skal elektronmikroskoperes. En annen utfordring ved elektronmikroskopering er kostnadene ved å ødelegge membranen

Når det gjelder vasking av membranfiltreringsanlegg kunne effekten av et trinn med enzymvask blitt undersøkt. Ved å bruke enzymer som er spesifikke mot forbindelser som fouler membranen, kunne fouling laget blitt fjernet på en mer effektiv måte. Et enzymatisk vaskemiddel med proteaser kunne virket effektivt mot proteiner som foulet membranen (D'Souza & Mawson, 2005).

Toleransen bakteriofager har til lut er noe som bør undersøkes videre. Dette på grunn av få publikasjoner på dette området. Samtidig bør en metode for undersøkelse toleransen bakteriofag til lut utvikles ytterligere. Dette siden det var noen usikkerheter rundt metoden

som ble benyttet. Innvirkningen av andre faktorer som temperatur og trykk kunne blitt undersøkt med tanke på overlevelsen til fag.

Arbeidet med denne oppgaven avdekket at lite er publisert angående mineraler i kjernemelk. Mineralenes rolle i kjernemelk har kommet i skyggen av fosfolipidene. Så et forslag kunne vært å se mer på innholdet av mineraler i kjernemelken. Og i hvilken fraksjon mineralene befinner seg i etter mikrofiltrering av kjernemelk.

## 8 Referanser

- Adams, M. C., Hurt, E. & Barbano, D. M. (2015). Effect of ceramic membrane channel geometry and uniform transmembrane pressure on limiting flux and serum protein removal during skim milk microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 98 (11): 7527-7543. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9753>.
- Adams, M. R. & Moss, O. (2008). *Food microbiology*. Guildford, UK: RSC Publishing.
- Andersson, A., Rönner, U. & Granum, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International journal of Food Microbiology*, 28 (2): 145-155. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00053-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00053-4).
- Animaliehygieneforskriften. (2009). *FOR-2019-01-18-30 Forskrift om særlige hygieneregler for næringsmidler av animalsk opprinnelse* Tilgjengelig fra: [https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1624/\\*#KAPITTEL\\_6](https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1624/*#KAPITTEL_6) (lest 18.04).
- Blanpain-Avet, P., Migdal, J. F. & Benezech, T. (2004). The effect of multiple fouling and cleaning cycles on a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate - Membrane performance and cleaning efficiency. *Food and Bioproducts Processing*, 82 (C3): 231-243. doi: 10.1205/fbio.82.3.231.44182.
- Blanpain-Avet, P., Migdal, J. F. & Bénézech, T. (2009). Chemical cleaning of a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate suspension - Characterization of hydraulic and chemical cleanliness. *Journal of Membrane Science*, 337 (1-2): 153-174. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.03.033>.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauer, S., Jaillon, O., Malmgren, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. (2001). The Complete Genom Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. IL1403 *Genome Research*, 11: 731-753. doi: doi: 10.1101/gr.169701
- Brans, G., Schroën, C. G. P. H., van der Sman, R. G. M. & Boom, R. M. (2004). Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*, 243 (1-2): 263-272. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.06.029>.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27 (9): 1017-1032. doi: <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>.

- Bylund, G. (2015). *Dairy processing handbook*: Tetra Pak international S.A.
- Campagna, C., Villion, M., Labrie, S. J., Duchaine, C. & Moineau, S. (2014). Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *International journal of Food Microbiology*, 171: 41-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.012>.
- Cogan, N. G. (2006). Effect of persister formation on bacterial response to dosing. *Journal of Theoretical Biology*, 238 (3): 694-703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.06.017>.
- Conway, V., Gauthier, S. F. & Pouliot, Y. (2014). Buttermilk: much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers*, 4 (2).
- Corredig, M., Roesch, R. R. & Dalglish, D. G. (2003). Production of a Novel Ingredient from Buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 86 (9): 2744-2750. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73870-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73870-3).
- D'Souza, N. M. & Mawson, A. J. (2005). Membrane Cleaning in the Dairy Industry: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (2): 125-134. doi: <https://doi.org/10.1080/10408690490911783>.
- Da Silva Birion, D., Dos Santos, V. & Zeni, M. (2018). *Ceramic Membranes Applied in Separation Process*. Cham: Springer.
- Dalglish, D. G. & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *The Annual Review of Food Science and Technology*, 3: 449-467. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101214.
- De Bassi, L. G., Ferreira, G. C. C., Da Silva, A. S., Sivieri, K., Aragon-Alegro, L. C. & Costa, M. D. R. (2012). Evaluation of physiochemical, microbiological and sensorial characteristics of fermented milk beverages with buttermilk addition. *International journal of Dairy Technology*, 65 (2): 282-286. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00764.x>.
- Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International journal of Food Microbiology*, 197: 77-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>.
- Doyle, M. P. & Buchanan, R. L. (2013). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4. utg.: ASM Press.
- Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, 5 (13): 1213-1219. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>.

- Fauquant, J., Beaucher, E., Sinet, C., Benoit, R. & Lopez, C. (2014). Combination of homogenization and cross-flow microfiltration to remove microorganisms from industrial buttermilks with an efficient permeation of proteins and lipids. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21: 131-141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.10.004>.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*: Springer, Cham. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>.
- Frøyen, O. J. (2016). *Kompendium for studieåret 2016/2017 - Matmikrobiologi*: Høgskolen i Sør-Trøndelag, Avdeling for teknologi, Program for MATteknologi.
- Fuquay, J. W., Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (2011). *Encyclopedia of Dairy Sciences*: Academic Press.
- Galanakis, C. (2018). *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*: Academic Press.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning: smitte gjennom mat og vann*. 4. utg.: Cappelen Damm AS.
- Griep, E. R., Cheng, Y. & Moraru, C. I. (2018). Efficient removal of spores from skim milk using cold microfiltration: Spore size and surface property conditions. *Journal of Dairy Science*, 101 (11): 9703-0713. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14888>.
- Guglielmotti, D. M., Mercanti, D. J., Reinheimer, J. A. & Quiberoni, A. (2012). Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi: 10.3389/fmicb.2011.00282.
- Hayes, S., Murphy, J., Mahoney, J., Lugli, G. A., Ventura, M., Noben, J., Franz, C. M. A. P., Neve, H., Nauta, A. & van Sinderen, D. (2017). Biocidal Inactivation of *Lactococcus lactis* Bacteriophages: Efficacy and Targets of Commonly Used Sanitizers. *Frontiers in Microbiology*, 107 (8). doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00107>.
- Hilal, N., Ogunbiyi, O. O., Miles, N. J. & Nigmatullin, R. (2007). Methods Employed for Control of Fouling in MF and UF Membranes: A Comprehensive Review. *Separation science and technology*, 40 (10): 1957-2005. doi: DOI: 10.1081/SS-200068409.
- Hoffmann, T. (2011). *Membrane filtration and membrane filtration assembly*. US Pat. Nr. 13/635,335 (NO Pat. Nr. 330,181).
- Hongyu, L. & Chen, V. (2010). Membrane fouling and Cleaning in Food and Bioprocessing. I: Cui, Z. F. & Muralidhara, H. S. (red.) *Membrane Technology - A Practical Guide to Technology And Applications in Food and Bioprocessing*, s. 213-254: Elsevier.



- Hurt, E. & Barbano, D. M. (2010). Processing factors that influence casein and serum protein separation by microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 93 (10): 4928-4941. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3121>.
- Ibarz, A. & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). *Unit operations in food engineering*: CRC Press.
- IDF. (1986). *International IDF Standard 20A: 1986: Milk. Determination of Nitrogen Content (Kjeldahl Method) and Calculation of Crude Protein Content* (lest 17.03).
- IDF. (1987). *IDF Standard 21B: Tørrstoff i melk og skummet melk* (lest 20.03).
- Janstová, B., Dracková, M. & Vorlová, L. (2006). Effect of *Bacillus cereus* Enzymes on Milk Quality following Ultra High Temperature Processing. 75: 601-609. doi: doi:10.2754/avb200675040601.
- Jukkola, A., Partanen, R., Rojas, O. J. & Heino, A. (2016). Separation of milk fat globules via microfiltration: Effect of diafiltration and opportunities for stream valorization. *Journal of Dairy Science*, 99 (11): 8644-8654. doi: 10.3168/jds.2016-11422.
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E., Johansen, A., Schüller, R. B. & Skeie, S. B. (2016). Optimization of protein fractionation by skim milk microfiltration: Choice of ceramic membrane pore size and filtration temperature. *Journal of Dairy Science*, 99 (8): 6164-6179. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11090>.
- Kanematsu, H. & Barry, D. M. (2015). *Biofilms and Materials Science*: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-14565-5.
- Karunakaran, E. & Biggs, C. A. (2011). Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilms formation: an investigation of the physiochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (4): 1161-1175. doi: 10.1007/s00253-010-2919-2.
- Kleppen, H. P., Bang, T., Nes, I. N. & Holo, H. (2011). Bacteriophages in milk fermentations: Diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *International Dairy Journal*, 21 (9): 592-600. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.02.010>.
- Li, Y. & Corredig, M. (2014). Calcium release from milk concentrated by ultrafiltration and diafiltration. *Journal of Dairy Science*, 97 (9): 5294-5302. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7567>.
- López, D., Vlamakis, H. & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2 (7): a000398. doi: 10.1101/cshperspect.a000398.
- Lönn-Stensrud, J. (2018). *Biofilm*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/biofilm> (lest 04.05).

- Madaeni, S. S. & Mansourpanah, Y. (2004). Chemical cleaning of reverse osmosis membranes fouled by whey. *Desalination*, 161 (1): 13-24. doi: [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(04\)90036-7](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(04)90036-7).
- Madaeni, S. S., Tavakolian, H. R. & Rahimpour, F. (2011). Cleaning Optimization of Microfiltration Membrane Employed for Milk Sterilization. *Separation science and technology*, 46 (4): 571-580. doi: <https://doi.org/10.1080/01496395.2010.534118>.
- Mahoney, J., Murphy, J. & van Sinderen, D. (2012). Lactococcal 936-type phages and dairy fermentation problems: from detection to evolution and prevention. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi: 10.3389/fmicb.2012.00335.
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M. & Gohar, M. (2016). *Bacillus cereus* Biofilms - Same, Only Different. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01054.
- Marcó, M. B., Moineau, S. & Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2(3): 149-158. doi: <https://doi.org/10.4161/bact.21868>.
- Mekmene, O., Le Graët, Y. & Gaucheron, F. (2009). A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chemistry*, 116 (1): 233-239. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.039>.
- Mohammadi, T., Madaeni, S. S. & Moghadam, M. K. (2003). Investigation of membrane fouling. *Desalination*, 153 (1-3): 155-160. doi: [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)01118-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)01118-9).
- Morin, P., Britten, M., Jiménez-Flores, R. & Pouliot, Y. (2007a). Microfiltration of Buttermilk and Washed Cream Buttermilk for Concentration of Milk Fat Globule Membrane Components. *Journal of Dairy Science*, 90 (5): 2132-2140. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2006-832>.
- Morin, P., Jiménez-Flores, R. & Pouliot, Y. (2007b). Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 17 (10): 1179-1187. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.03.010>.
- Mourouzidis-Mourouzis, S. A. & Karabelas, A. J. (2006). Whey protein fouling of microfiltration ceramic membranes - Pressure effects. *Journal of Membrane Science*, 282 (1-2): 124-132. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.05.012>.
- Muro, C., Riera, F. & Diaz, M. d. C. (2012). Membrane Separation Process in Wastewater Treatment of Food Industry. I: Valdez, B. (red.) *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*: IntechOpen. Tilgjengelig fra: <https://cdn.intechopen.com/pdfs/29163.pdf>. doi: DOI: 10.5772/31116.

- Murphy, J., Royer, B., Mahoney, J., Hoyles, L., Heller, K., Neve, H., Bonestroo, M., Nauta, A. & van Sinderen, D. (2013). Biodiversity of lactococcal bacteriophages isolated from 3 Gouda-type cheese-producing plants. *Journal of Dairy Science*, 96 (8): 4945-4957. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6748>.
- Murphy, J., Mahoney, J., Bonestroo, M., Nauta, A. & van Sinderen, D. (2014). Impact of thermal and biocidal treatments on lactococcal 936-type phages. *International Dairy Journal*, 31 (1): 56-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.011>.
- Nil, K. (2010). *Glossary of Biotechnology Terms*: CRC Press.
- O'Connell, J. E. & Fox, P. F. (2000). Heat stability of Buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 83 (8): 1728-1732. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75042-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75042-9).
- Oliveira, J., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Kouwen, T. R. & van Sinderen, D. (2018). Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 101 (1): 96-105. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13403>.
- Popovic, S., Milanovic, S., Ilicic, M., Djuric, M. & Tekic, M. (2009). Flux recovery of tubular ceramic membranes fouled with whey proteins. *Desalination*, 249 (1): 293-300. doi: 0.1016/j.desal.2008.12.060.
- Roesch, R. R., Rincon, A. & Corredig, M. (2004). Emulsifying Properties of Fractions Prepared from Commercial Buttermilk by Microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 87 (12): 4080-4087. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73550-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73550-X).
- Rosenberg, M. (1995). Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science & Technology*, 6 (1): 12-19. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88912-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88912-8).
- S. Y. Ng, K., Haribabu, M., Harvie, D. J. E., Dunstan, D. E. & Martin, G. J. O. (2017). Mechanisms of flux decline in skim milk ultrafiltration: A review. *Journal of Membrane Science*, 523: 144-162. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.09.036>.
- Saboya, L. V. & Maubois, J. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Dairy Science And Technology*, 80 (6): 541-553. doi: DOI: 10.1051/lait:2000144
- Salün, F., Mietton, B. & Gaucheron, F. (2005). Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal*, 15 (2): 95-109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.06.007>.
- Samarzija, D., Zamberlin, S. & Pogacic, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. 62 (2): 77-95.

- Sodini, I., Morin, P., Olabi, A. & Jimenez-Flores, R. (2006). Compositional and Functional Properties of Buttermilk: A Comparison Between Sweet, Sour and Whey Buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 89 (2): 525-536. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72115-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72115-4).
- Song, L. & Elimelech, M. (1995). Theory of concentration polarization in crossflow filtration. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 91 (19): 3389-3398. doi: 10.1039/FT9959103389.
- Song, L. (1998). Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration: mechanisms and modeling of membrane fouling. *Journal of Membrane Science*, 139 (2): 183-200. doi: [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(97\)00263-9](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(97)00263-9).
- Steinhauer, T., Hanely, S., Bogendorfer, K. & Kulozik, U. (2015). Temperature dependent membrane fouling during filtration of whey and whey proteins. *Journal of Membrane Science*, 492: 364-370.
- Stoeckel, M., Lücking, G., Ehling-Schulz, M., Atamer, Z. & Hinrichs, J. (2016). Bacterial spores isolated from ingredients, intermediate and final products obtained from dairies: thermal resistance in milk. *Dairy Science & Technology*, 96 (4): 569-577. doi: DOI 10.1007/s13594-016-0279-0.
- Svanborg, S., Johansen, A., Abrahamsen, R. K. & Skeie, S. B. (2014). Initial pasteurisation effects on the protein fractionation of skimmed milk by microfiltration. *International Dairy Journal*, 37: 26-30.
- Svanborg, S., Johansen, A., Abrahamsen, R. K. & Skeie, S. B. (2015). The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. *Journal of Dairy Science*, 98 (9): 5829-5840. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9039>.
- Tomasula, P. M., Mukhopadhyay, S., Datta, N., Porto-Fett, A., Call, J. E., Luchansky, J. B., Renye, J. & Tunick, M. (2011). Pilot-scale crossflow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk. *Journal of Dairy Science*, 94 (9): 4277-4291. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3879>.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2. utg. Food Science and Technology: CRC Press.
- Water Environment Federation. (2005). *Membrane Systems for Wastewater Treatment*: McGraw Hill Professional.

- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. & Harrison, S. C. (2013). *Molecular biology of the gene*. 7. utg. New York: Pearson.
- Zamberlin, S., Antunac, N., Havranek, J. & Samarzija, D. (2012). Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo*, 62 (2): 111-125.
- Zhang, W., Luo, J., Ding, L. & Jaffrin, M. Y. (2015). A Review on Flux Decline Control Strategies in Pressure-Driven Membrane Processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54 (11): 2843-2861. doi: 10.1021/ie504848m.

## 9 Vedlegg

### Vedleggsfortegnelse

<i>Vedlegg 1</i> .....	<i>101</i>
<i>Vedlegg 2</i> .....	<i>102</i>

Følgende vedlegg befinner seg på minnepenn:

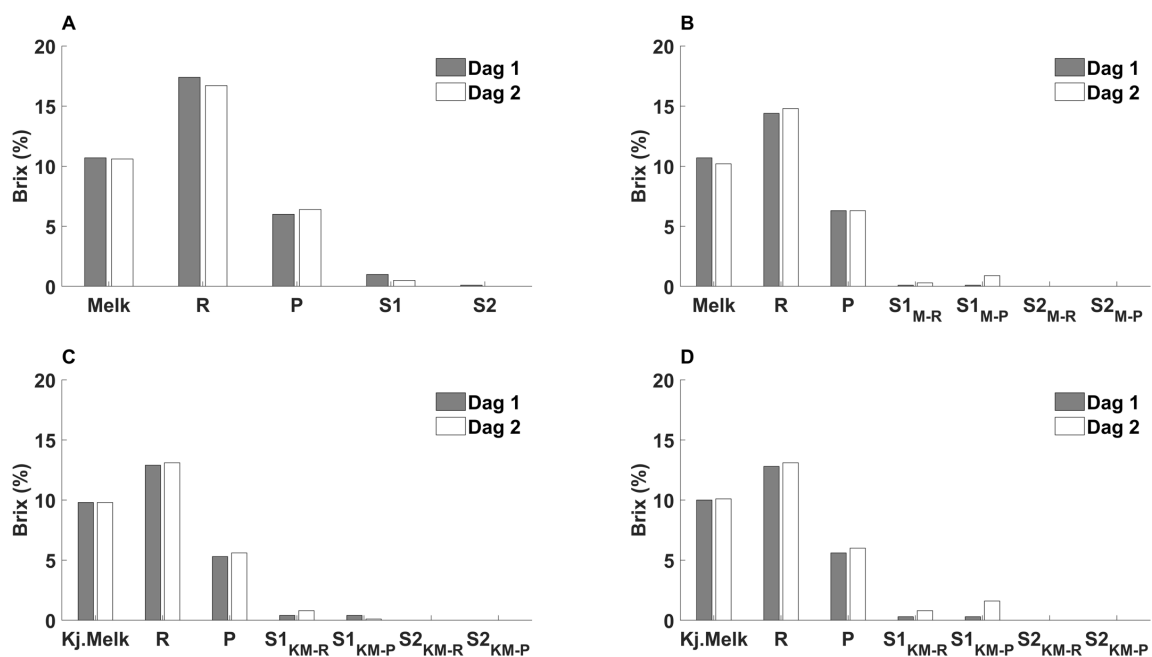
- Vedlegg 3: Tillaging av vekstmedier
- Vedlegg 4: Rådata
- Vedlegg 5: Beregninger

## Vedlegg 1

### Brix resultater

**Tabell 1:** Effekten av variasjon av råstoff på % Brix i skummet melk og kjernemelk. Samt effekten av ulikt råstoff samt vaskeprosedyre på % Brix i det siste skyllevannet. Interaksjonseffekten av råstoff og vaskeprosedyre på % Brix i det siste skyllevannet er også presentert. Resultatet er oppgitt som p-verdi. Strek (-) vil si at effekten ikke ble testet.

Prøve	Effekt av råstoff (p-verdi)	Effekt av vaskeprosedyre (p-verdi)	Interaksjonseffekt (p-verdi)
Melk/kjernemelk	0,0044	-	-
Skyllevann 2	0,337	0,337	0,337



**Figur 1:** % Brix i prøver tatt ut etter mikrofiltrering av skummet melk og kjernemelk. Figur A (Blokk 1) og B (Blokk 3): % Brix i prøver tatt ut ved mikrofiltrering av melk. Figur C (Blokk 2) og D (Blokk 4): % Brix i prøver tatt ut ved filtrering av kjernemelk. R: retentat, P: permeat, S1 (skyllevann 1), S2 (Skyllevann 2). S1<sub>M-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>M-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>M-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>M-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm). Kj.Melk (Kjernemelk), S1<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 1-retentat strøm), S1<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 1-permeat strøm), S2<sub>KM-R</sub> (Skyllevann 2-retentat strøm), S2<sub>KM-P</sub> (Skyllevann 2-permeat strøm).

## Vedlegg 2

### MPN-tabell

MLG appendix 2.0 Table 1.

Table 1. MPN Index and 95% Confidence Limits for Various Combinations of Positive Tubes in a 3 Tube Dilution Series Using Inoculum Quantities of 10, 1 and 0.1 g (ml).

Combination of Positives	MPN Index per g (ml)	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0-0-0	<0.03	---	0.095
0-0-1	0.030	0.0015	0.096
0-1-0	0.030	0.0015	0.11
0-1-1	0.061	0.012	0.18
0-2-0	0.062	0.012	0.18
0-3-0	0.094	0.036	0.38
1-0-0	0.036	0.0017	0.18
1-0-1	0.072	0.013	0.18
1-0-2	0.11	0.036	0.38
1-1-0	0.074	0.013	0.20
1-1-1	0.11	0.036	0.38
1-2-0	0.11	0.036	0.42
1-2-1	0.15	0.045	0.42
1-3-0	0.16	0.045	0.42
2-0-0	0.092	0.014	0.38
2-0-1	0.14	0.036	0.42
2-0-2	0.02	0.045	0.42
2-1-0	0.15	0.037	0.42
2-1-1	0.20	0.045	0.42
2-1-2	0.27	0.087	0.94
2-2-0	0.21	0.045	0.42
2-2-1	0.28	0.087	0.94
2-2-2	0.35	0.087	0.94
2-3-0	0.29	0.087	0.94
2-3-1	0.36	0.087	0.94
3-0-0	0.23	0.046	0.94
3-0-1	0.38	0.087	1.1
3-0-2	0.64	0.17	1.8
3-1-0	0.43	0.09	1.8
3-1-1	0.75	0.17	2.0
3-1-2	1.2	0.37	4.2
3-1-3	1.6	0.40	4.2
3-2-0	0.93	0.18	4.2
3-2-1	1.5	0.37	4.2
3-2-2	2.1	0.40	4.3
3-2-3	2.9	0.90	10.
3-3-0	2.4	0.42	10.
3-3-1	4.6	0.90	20.
3-3-2	11.	1.8	41.
3-3-3	>11.	4.2	---







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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway