



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Kartlegging av sammensetning og overlevelse av sporedannere langs produksjonslinjen for melkepulver med spesielt fokus på Klostridier

Composition and survival of sporeformers along the milk powder production line with special focus on Clostridia

Hanne Kristiansen

Matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet som en avslutning på min mastergrad i matvitenskap retning matvaretrygghet, kvalitet og hygiene ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Denne våren har bært preg av den pågående pandemien COVID-19 som gjorde at store deler av samfunnet, også universitetet, måtte stenges for en periode da jeg var midt i laboratoriearbeidet. Dette fikk også betydning for fremgangen i min masteroppgave og jeg har måtte utelate noen analyser da det ble praktisk vanskelig å gjennomføre. Til tross for alle utfordringer dette har gitt, står jeg nå her med en masteroppgave i hånden som har gitt meg ny kunnskap om bakterienes verden og hvordan det er å ta del i et større forskningsprosjekt.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder professor Siv Skeie for gode diskusjoner og konstruktive tilbakemeldinger på mitt arbeid. Du har en unik pedagogisk evne, har mye kunnskap om meieriteknologifaget og kommer alltid med gode svar på gode spørsmål. Videre vil jeg takke biveileder Davide Porcellato for god veiledning på det praktiske laboratoriearbeidet og hjelp til de bioinformatiske analysene. Du har alltid vært tilgjengelig på telefon om det er noe jeg har lurt på, og du har vært opptatt av at jeg skal forstå. Jeg vil også takke avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani på laboratoriet. Selv om du ikke har vært veilederen min har du alltid vært tilstede og klar for å hjelpe med labtekniske utfordringer jeg har møtt på underveis. Jeg vil takke Ola Tjøland i pilotanlegget for hjelp med prosessering av melka. En takk til alle de andre på laboratoriet som har gjort det mulig å gjennomføre studien.

Jeg vil sende noen tanker hjem til Stryn i Nordfjord, og takke mine kjære foreldre for oppmuntringen jeg har fått over telefon. Dere har alltid vært mine trofaste støttespillere og har hele tiden hatt troen på at jeg skal komme i mål med oppgaven. Til slutt vil jeg rette en STOR TAKK til Serina Søyland Bru og Synne Nornes Bryntesen, mine herlige venninner som jeg bor i kollektiv sammen med her i Oslo. Takk for dere har holdt ut mine frustrasjoner, tørket mine tårer og gitt varme klemmer, men også gledet dere over mine fremskritt i oppgaven. Dere har motivert meg på veien mot toppen, og nå kan jeg endelig se meg tilbake og tenke: «jeg greide det!».

Hanne Kristiansen, Oslo, juni 2020

Sammendrag

Sporer av genus *Clostridium* (Klostridier) og genus *Bacillus* (Basillus) lever i jord og vann, og under innhøsting av gresset kan sporer som lever nederst på stengelen bli med over i silofôret. Slik kan sporer entre melkeproduksjonslinjen når kuene mates på silofôr rik på sporer. Kjente Klostridiearter i melk- og melkeprodukter er *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. botulinum* og *Cl. perfringens*.

Målsetningen med denne masteroppgaven var å kartlegge sammensetning og overlevelse av sporedannere langs produksjonslinjen for melkepulver med spesielt fokus på Klostridier. Studien var en del av et større forskningsprosjekt ved navn «CLOBIO». Dette er et prosjekt i samarbeid mellom Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) og meieriindustrien. Prosjektet skal undersøke hvordan Klostridiesporer overlever og påvirkes av ulike prosesseringer langs produksjonslinjen for ost og melkepulver, og hvilken betydning deres tilstedeværelse vil ha for produktkvaliteten og matvaretryggheten.

Det ble samlet inn prøver fra Ås gård i uke 7, 9 og 11, og melka ble prosessert i pilotanlegget tilknyttet NMBU. Prøver fra rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte, pasteurisert skummet melk, permeat, retentat, skummetmelkpulver og kaseinpulver ble dyrket opp på rør tilsatt RCM-buljong og inkubert ved 37°C og 22°C. Fra prøver det ble observert vekst i form av gassproduksjon eller blakket buljong, ble bakteriene i prøvene DNA-sekvensert.

Resultatet viste at det ble detektert lite Klostridiesporer i fløte. I pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver ble det detektert *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. pabulybutyricum* og *Cl. dioloi/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum*. Dette kan tyde på at disse artene er tilstede i det ferdige melkeproduktet og kan ha betydning for produktets kvalitet og holdbarhet. *Cl. dioloi/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* var den eneste Klostridiearten som vokste i prøver inkubert ved 22°C. Denne temperaturen er nærmere modningstemperaturen for ost, og dens tilstedeværelse i ost bør undersøkes videre.

B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp. utgjorde størst prosentandel av alle detekterte arter, noe som kan gi mistanke om at det ikke bare er Klostridiesporer som utgjør et kvalitetsproblem i ost og melkepulver. Basillussporenes gassproduserende evne i ost bør undersøkes videre.

Abstract

Sporeformers of the genus *Clostridium* (Clostridia) and genus *Bacillus* (Bacillus) live in soil and water, and during harvest, spores on the grass stalk may join the silo feed. In this way spores can enter the milk production line when the cows are fed on grass silage rich in spores. The most known *Clostridium* species in milk and milk products are *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. botulinum* and *Cl. perfringens*.

The aim of this thesis was to analyze the composition and survival of sporeformers along the milk powder production line with special focus on Clostridia. The study was a part of the research project «CLOBIO», a collaboration between Norwegian University of Life Sciences (NMBU) and the dairy industry. The project will investigate how Clostridia spores survive and are affected by various processes along the production line for cheese and milk powder, and what significance their presence will have on product quality and food safety.

Samples were collected from Ås farm in week 7, 9 and 11, and the milk was processed in the pilot plant at NMBU. Samples from raw milk, raw cream, pasteurized cream, pasteurized skimmed milk, permeate, retentate, skimmed milk powder and casein powder were grown on tubes containing RCM broth and incubated at 37°C and 22°C. From tests where growth in gas production or cloudy broth were observed, the bacteria in the samples were DNA-sequenced.

The result showed that minor amounts of Clostridia spores were detected in cream. In pasteurized skimmed milk, skimmed milk powder, retentate and casein powder detected bacteria were *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. pabulybutyricum* and *Cl. dioloi/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum*. This may indicate that these species are present in the finished milk product and may affect the quality and safety of the product. *Cl. dioloi/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* was the only bacteria grown in samples incubated at 22°C. This temperature is closer to the ripening temperature for cheese, and its presence in cheese should be further investigated. *B. cereus thuringiensis/wiedmanni/spp.* made up the largest percentage of all detected species, which may indicate that it is not only Clostridia spores that pose a quality problem in cheese and milk powder. The Bacillus spores ability to produce gas in cheese should be further investigated.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
1. INNLEDNING	1
1.1 BAKGRUNN	2
1.2 MÅLSETNING	2
2. TEORETISK FORANKRING	4
2.1 MELK	4
2.1.1 Hva melk er	4
2.1.2 Bakterier i rå melk.....	5
2.2 SPORER I MELK.....	6
2.2.1 Sporulering og germinering	6
2.2.2 Genus Clostridium (Klostridier).....	9
2.3 HVORDAN SPORER BLIR PÅVIRKET AV ULIKE PROSESSERINGER	15
2.3.1 Pasteurisering og sterilisering	15
2.3.2 Separering	15
2.3.3 Tørring	17
2.3.4 Membranfiltrering.....	19
2.4 METODISK TEORI	22
2.4.1 Kvantifisering av vegetative celler og sporer	22
2.4.2 Identifikasjon av Klostridier og andre sporedannere.....	23
3. MATERIALER OG METODER	28
3.1 FORBEREDELSE	28
3.2 PRØVEINNSAMLING.....	29
3.3 PRØVEPREPARERING	31
3.3.1 Dyrkning på RCM-rør	31
3.3.2 Dyrkningsuavhengig prøvepreparering	35
3.4 PLATETELLING	35
3.5 KVANTIFISERING AV ANTALL SPORER	35
3.6 DNA-EKSTRAKSJON	39
3.6.1 DNA-ekstraksjon for dyrkningsavhengig metode etter Mag midi kit.....	39
3.7 16S rRNA AMPLICON SEKVENSERING	40
3.8 DATABEHANDLING	42
4. RESULTATER	43
4.1 VEKST ELLER IKKE VEKST	43
4.2 TOTALANTALL BAKTERIER	44
4.3 MPN	46
4.4 SEKVENSERINGEN VISTE HØYT INNHOLD AV SPORER	49
4.5 SPORESAMMENSETNING FRA PRØVER INKUBERT VED 37°C.....	51
4.5.1 Uttak 1	52
4.5.2 Uttak 2	55
4.5.3 Uttak 3	58
4.5.4 Sporesammensetningen oppsummert.....	61
4.6 SPORESAMMENSETNING FRA PRØVER INKUBERT VED 22°C FOR UTTAK 1, 2 OG 3.....	62
4.7 SAMMENHENG MELLOM GASSPRODUKSJON OG PRØVENS INNHOLD AV KLOSTRIDIER	66
5. DISKUSJON	69
5.1 ENDRING AV TOTALANTALL BAKTERIER OG SPOREANTALL (MPN) GJENNOM PRODUKSJONSLINJEN	69

5.1.1 Totalantall bakterier.....	69
5.1.2 MPN	71
5.2 FUNN AV KLOSTRIDIEARTER.....	71
5.3 BETYDNINGEN AV BASILLUSSPORER I OST OG MELKEPULVER	73
5.4 SPORENES SAMMENSETNING OG OVERLEVELSE GJENNOM PRODUKSJONSLINJEN.....	74
5.4.1 Separering og pasteurisering	75
5.4.2 Tøking og filtrering.....	76
5.5 EFFEKTEN AV TEMPERATUR PÅ VEKST	78
5.6 SAMMENHENGEN MELLOM GASSPRODUKSJON OG KJENTE GASSPRODUSERENDE KLOSTRIDIER	79
5.7 RØRMETODENS SVAKHETER.....	80
5.7.1 Positive versus negative rør	80
5.7.2 Gassproduksjon og inkubasjonstid.....	81
6. OPPSUMMERING	82
7. VEIEN VIDERE	83
8. REFERANSER	85
VEDLEGG.....	90
VEDLEGG 1	90
VEDLEGG 2	92
VEDLEGG 3	93
VEDLEGG 4.....	94
VEDLEGG 5	95
VEDLEGG 6.....	96
VEDLEGG 7	97
VEDLEGG 8.....	98

1. Innledning

I litteraturen omtales genus *Clostridium* (Klostridier) som anaerobe sporer og genus *Bacillus* (Basillus) som aerobe sporer. Sporer er en overlevelsesform disse bakteriene har utviklet for å beskytte seg selv i et miljø med begrenset tilgang på næring, ugunstige temperaturforhold eller høyt osmotisk trykk. I denne sporeformen vil bakterien være svært motstandsdyktig mot kjemikalier, endring i pH, varme, tørke, osmotisk stress og ultrafiolett stråling (UV-stråling)(Doyle et al., 2014).

Sporer i seg selv er ufarlig, men det er først når sporen germinerer til en vegetativ celle med potensiale til å produsere toksiske stoffer og andre metabolske produkter at de kan skape problemer. Hos mange patogene sporer er germinering et viktig trinn i patogenesen (Paredes-Sabja et al., 2011). Sporer i melk kan være et problem i produkter som har blitt varmebehandlet i form av termisering eller pasteurisering, fordi dette er prosesser som vil påvirke sporene til å begynne og germinere. UHT-behandling (Ultra high temperature) dreper 99,99% av alle sporer, men en slik kraftig varmebehandling er forbundet med endret smak på produktet og er derfor ikke å anbefale (Doyle et al., 2014). UHT-behandlet melk vil også være uegnet til osteproduksjon, fordi myseproteiner denaturerer slik at koaguleringssegenskapene blir dårligere (Walstra et al., 2006). Sporenes evne til å overleve høye temperaturer gjør sporedannere til en utfordring for meieriindustrien (Doyle et al., 2014). Anaerobe sporer er spesielt forbundet med kvalitetsødeleggelse av ost når den modnes. Det dannes gass og osten blåses opp, og det dannes vond smak som gjør at osten må kastes. Sporer har også vist seg å være en trussel i melkepulver som brukes til produksjon av ulike matvarer, da sporene kan overleve i det tørre miljøet og begynne å germinere når forholdene igjen ligger til rette for det.

Konsumenten har en forventning om at melkeprodukter er trygge og har god kvalitet. Mannen i gata vil ikke spise en ost som smaker vondt, og en mor vil ikke gi sitt nyfødte barn morsmelkerstatning som kan gjøre barnet sykt. Samtidig i en verden med økt fokus på å unngå matsvinn, forventer samfunnet at både meieriindustrien og andre næringsmiddelvirksomheter gjør alt de kan for å produsere trygge produkter med god kvalitet, slik at råvaren utnyttes til det fulle og minst mulig går til spille.

«Det er bedre og billigere å forebygge enn å reparere når skaden allerede har skjedd» (Smolan & Vaksvik, 2014). Smolan og Vaksvik sin påstand kan også overføres til meieriindustrien: Å forske på hvilke spesifikke sporer som er et problem når osten modnes og hvordan de overlever gjennom produksjonslinjen for ost, vil kunne forebygge at ost kastes. Å forske på hvilke spesifikke sporer som kan overleve gjennom hele produksjonslinjen frem til melkepulver, vil kunne forebygge at folk blir syke av ulike produkter laget av melkepulver. Det er dyrt å kaste ost, det er dyrt å behandle folk som er syke og det er en rett at alle skal ha tilgang på nok og trygg mat!

1.1 Bakgrunn

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) startet i januar 2020 opp et prosjekt ved navn «Klostridier og annen mikrobiota i rå melk og melkeprodukter: betydning for produktkvalitet og mattrygghet» (CLOBIO). Dette er et prosjekt i samarbeid med meieriindustrien. Prosjektet skal undersøke hvordan Klostridiesporer overlever og påvirkes av ulike prosesseringer langs produksjonslinjen for ost og melkepulver, og hvilken betydning deres tilstedeværelse vil ha for produktkvaliteten og matvaretryggheten. Å finne ut av dette vil være av stor interesse for meieriindustrien, fordi tilstedeværelse av Klostridiesporer kan føre til store økonomiske tap på grunn av kvalitetsfeil og matsvinn, økt behov for omfattende rengjørings- og desinfeksjonsprosedyrer og økte ressursbehov for å sikre matvaretryggheten. Prosjektet skal gå over flere år for å kunne fange opp de ulike sesongvariasjonene.

1.2 Målsetning

Formålet med denne masteroppgaven var å kartlegge sammensetning og overlevelse av sporedannere langs produksjonlinjen for melkepulver med spesielt fokus på Klostridier.

For å finne svar på dette skulle det undersøkes hvordan sporer ble påvirket av ulike prosesseringer som pasteurisering, separering, tørking og filtrering ved å kartlegge sammensetningen av Klostridiearter og andre sporedannere i rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte, pasteurisert skummet melk, skummetmelkepulver (melkepulver fra pasteurisert skummet melk), retentat, permeat og kaseinpulver (melkepulver fra retentat). Hvordan prosessering påvirket sporene kunne også ses ved å estimere totalantall bakterier i prøvene (log kde/ml melk eller 0,1 g melkepulver) og beregne sannsynlig antall sporer per 100 mL melk/10 g melkepulver (Most

probably number, MPN). Det skulle videre undersøkes om inkuberingstemperatur ville påvirke sporesammensetningen og sporenes overlevelse.

Deteksjon av Klostridiearter skulle gi et inntrykk av hvilke spesifikke arter som kan være et problem i ost og melkepulver, og litteratursøk ville gi svar på om noen av disse har egenskaper som er forbundet med kvalitetsødeleggelse eller sykdom. Å detektere andre sporedannere enn Klostridier ville videre gi informasjon om også disse kunne utgjøre et problem i det ferdige melkeproduktet med hensyn til deres evne til å produsere gass.

2. Teoretisk forankring

2.1 Melk

2.1.1 Hva melk er

Melk utskilles fra brystkjertlene hos hunnpattedyr for å gi næring til avkommet. Dette betyr at melk må være svært næringsrikt slik at avkommet kan vokse og utvikle seg. I tillegg til å gi mat til kalven gir melk fra ku også god næring til mennesker, enten ved at den kan konsumeres som den er eller i form av ulike melkeprodukter som ost, yoghurt, smør, kefir, rømme osv (Walstra et al., 2006). Fra melk kan det også lages melkepulver med ulike bruksområder som tørrstoffanrikning i yoghurt og iskem, morsmelkerstatning og ingrediens i ulike typer baby mat, melkesjokolade, tørrvarer og ferdigvarer (Bylund, 1995). Melk fra ku er det vanligste i Norge, men i andre land er også melk fra geit, sau og bøffel viktige næringsgrunnlag (Walstra et al., 2006).

Kumelk (som i helmelk) inneholder 4,0% fett, 3,3% protein, 4,6% laktose, 0,7% mineraler og 87,1% vann. Ca. 80% av proteinene består av fire kaseinfraksjoner (α_{S1} -, α_{S2} -, β - og κ -kasein) ordnet i store kaseinmiceller. De resterende 20% av proteinene er de mindre myseproteinene, der hovedandelen består av β -laktoglobulin og α -laktalbumin (Walstra et al., 2006). Det meste av fett er mettet fett og domineres av palmitinsyre (16:0), stearinsyre (18:0) og myristinsyre (14:0). Av umettede fettsyrer er det først og fremst oljesyre (18:1) som finnes i større mengder, og denne blir også betraktet som en essensiell fettsyre (Fox et al., 2015). Nasjonalt råd for ernæring (2011) anbefaler i sin rapport at magre melkeprodukter inngår som en del av et daglig kosthold. De peker på at melk er en viktig kilde til fett, protein, vitamin A, riboflavin, vitamin B₁₂, kalsium og jod. Det har lenge vært en oppfatning av at magre melkeprodukter har bedre helseeffekter enn helfete, men senere tids forskning spekulerer imidlertid i om helfete melkeprodukter kanskje ikke er så usunne som man først har antydnet. Lordan et al. (2018) sin studie trekker frem at flere av de mettede fettsyrene i melk (C14:0, C15:0, C17:0) faktisk er assosiert med lavere risiko for utvikling av hjerte- og karsykdommer. I tillegg har helfete melkeprodukter en rikere sammensetninger av næringsstoffer, deriblant vitamin D og vitamin K, som også har positive helseeffekter.

I tillegg til å gi god næring til mennesker og dyr, er melk også et godt vekstmedium for mange bakterier. Melk har nøytral pH på 6,7 og høy vannaktivitet, noe som gjør forholdene for bakteriell vekst enda bedre, på godt og vondt (Quigley et al., 2012; Walstra et al., 2006).

2.1.2 Bakterier i rå melk

I følge Walstra et al. (2006) er melka i juret hos friske kyr tilnærmet steril, og kontamineres først i spenekanalene. Senere tids forskning, deriblant forskningsprosjektet «Jurfrisk» ved NMBU, har derimot vist at melka i juret ikke er så steril som litteraturen først har antydnet. Mye kan tyde på at melka har en egen mikrobiota (Hagenes, 2019). Utover dette er det kjent at melka koloniseres av bakterier fra det ytre miljø, da spesielt med bakterier som finnes på overflaten av spenene (Quigley et al., 2012). Andre kilder til bakteriell kontaminasjon er melkingsutstyr som ikke er rengjort skikkelig, vann av dårlig bakteriologisk kvalitet som brukes til rengjøring og dårlig håndhygiene hos bonden som skal melke. Fôr er også en viktig kilde til forurensning, da en del bakterier kan overleve tarmpassasjen og til slutt kontaminere melka via avføring (Quigley et al., 2012; Walstra et al., 2006).

Rå melk er melk som ikke er prosessert enda. Melkesyrebakterier er en gruppe bakterier som kan fermentere laktose til melkesyre og utgjør en stor andel av rå melk. Blant melkesyrebakteriene i rå melk er genus *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* og *Enterococcus* de vanligste (Quigley et al., 2012). Videre viser Quigley (2012) til en studie der det ble funnet at rå melk inneholdt 256 bakteriearter, der *Streptococcus thermophilus* (43,7%) og *Lactococcus lactis* (19%) utgjorde mesteparten. Også psykrotrofe bakterier av genus *Pseudomonas*, *Acinetobacter* og *Aeromonas* var hyppig forekommende (1,3-3,7%). I tillegg vil rå melk være en kilde til humanpatogene bakterier som *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* og *Clostridium perfringens*, for å nevne noen (Walstra et al., 2006).

Melkas mikrobielle sammensetning spiller en viktig rolle i produksjon av ulike melkeprodukter. Melkesyrebakteriene bidrar til smak, tekstur og senker pH for å ivareta matvaretryggheten i fermenterte produkter. De humanpatogene bakteriene på sin side gjør produkter av upasteurisert melk (rå melk) utrygge da de kan føre til alvorlig sykdom. Psykrotrofe bakterier er uønsket i melk først og fremst fordi de kan produsere ekstracellulære proteaser og lipaser under kjølelagring av rå melk som kan overleve pasteurisering. Lipaser påvirker til dårlig smak, mens proteaser påvirker til redusert osteutbytte (Quigley et al., 2012; Walstra et al., 2006). *Bacillus*

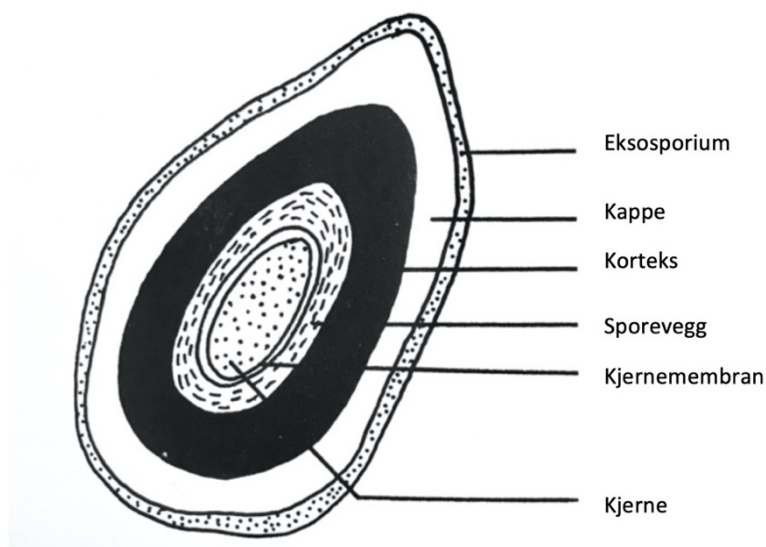
cereus er en aerob sporedanner som er forbundet med søtkoagulering av melk, mens *Cl. tyrobutyricum* er en anaerob sporedanner som er kjent for å produsere store mengder gass som ødelegger osten når den modnes (Walstra et al., 2006).

2.2 Sporer i melk

2.2.1 Sporulering og germinering

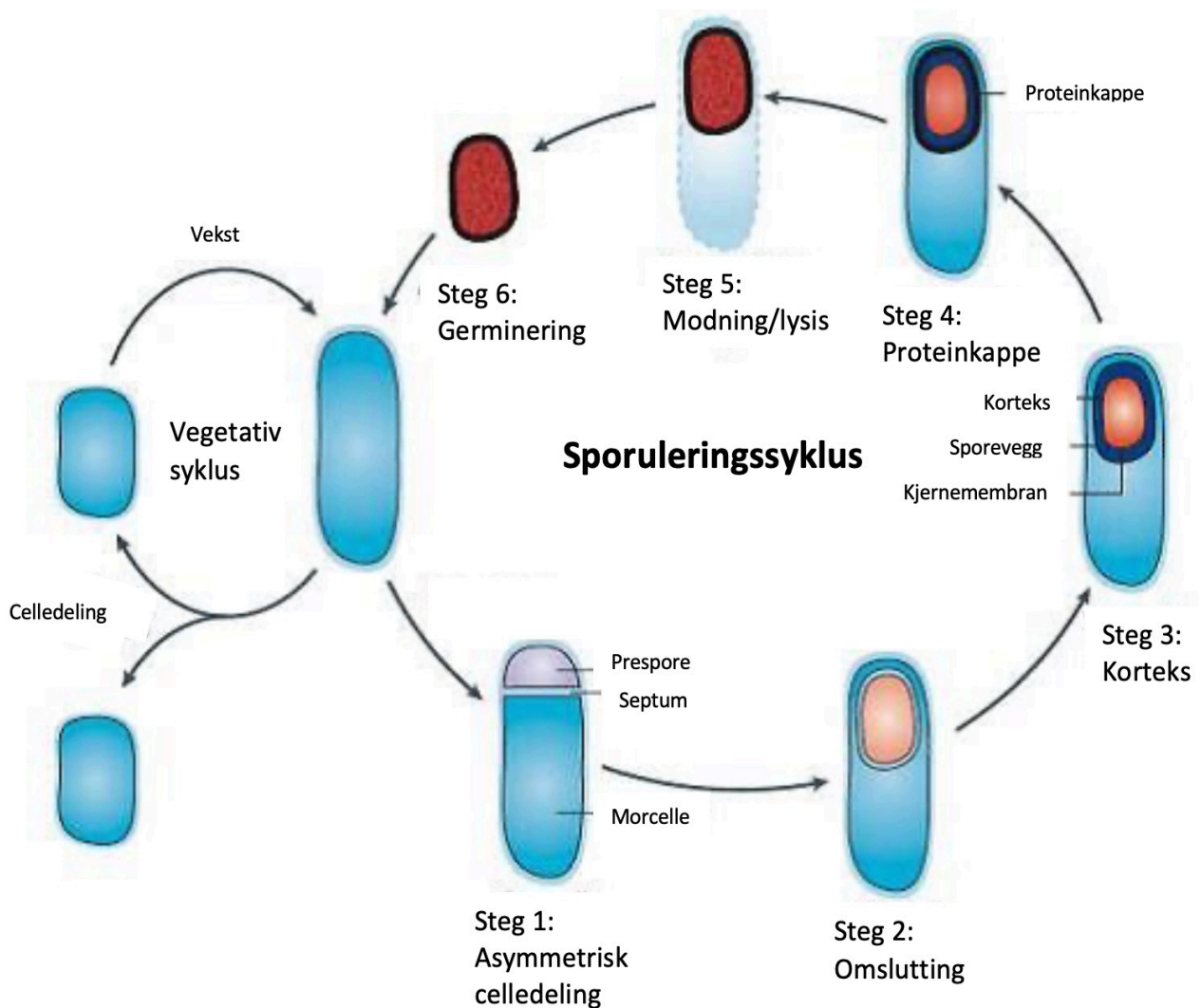
Sporer er grampositive bakterier som tilhører fylum *Firmicutes*, som videre kan deles inn i de fem klassene *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes* og *Thermolichobacteria*. Blant disse er *Bacilli* og *Clostridia* de viktigste innenfor meieriindustrien (Gopal et al., 2015).

Figur 2.1 viser tverrsnitt av hvordan sporen er bygget opp i flere lag og gir en forståelse av hvorfor sporer er så motstandsdyktig. Kjernen i midten inneholder et vannfattig cytoplasma med DNA, ribosomer, enzymer, Ca^{2+} -ioner, små syreløselige proteiner (Small acid solution proteins, SASP) og store mengder dipicolinsyre (Bahl & Durre, 2001; Schøyen, 2011). SASP bindes til DNA og spiller en sentral rolle i sporens UV-resistens (resistens mot ultrafiolett stråling), og en dehydrert kjerne gjør sporen varmeresistent (Bahl & Durre, 2001; Johansen et al., 2013). Kjernen er omsluttet av en indre sporemembran, kjernemembranen. Kjernemembranen har lav permeabilitet, til og med vann slippes ikke gjennom, og dette gjør at DNA beskyttes mot skadelige kjemikalier (Paredes-Sabja et al., 2011). Utenfor kjernemembranen ligger sporeveggen bestående av et tynt lag peptidoglykan, lik celleveggen slik den er hos vegetative celler. Sporeveggen er videre omsluttet av et enda tykkere lag peptidoglykan kalt korteks, som bidrar til at kjernen dehydreres. Proteinkappen ytterst beskytter sporen mot kjemikalier. I tillegg beskytter den korteks mot lysozymer som kan hydrolysere peptidoglykan. Noen arter har også et lag eksosporium utenpå proteinkappen. Eksosporium består av et basallag av proteiner med et nettverk av kollagenliknende proteiner som stikker ut som «hår» på toppen. Eksosporium bidrar til sporens hydrofobisitet slik at den lettere bindes til substrater og ulike typer overflater (Henriques & Moran, 2007; Paredes-Sabja et al., 2011).



Figur 2.1 Tverrsnitt av sporens oppbygging. Kjernen innerst er omsluttet av en kjernemembran, sporevegg, korteks og proteinkappe ytterst. Noen sporer har også et lag eksosporium utenpå proteinkappen. Figuren er hentet fra Schøyen (2011).

Sporuleringsprosessen er grundig undersøkt i *B. subtilis*, men det antas at prosessen vil være lik også hos andre sporedannere (Henriques & Moran, 2007). Sporuleringen initieres ved fosforylering av transkripsjonsfaktor Spo0A som bindes til «0A-boxes» på DNA og påvirker uttrykk av over 500 gener, der minst 100 av dem er involvert i sporuleringsprosessen (Bahl & Durre, 2001)(McHugh et al., 2017). Sporuleringsprosessen tar flere timer og kan deles inn i steg 1-6 som skissert i figur 2.2 (Juodeikiene et al., 2012). I steg 1 deles den vegetative bakteriecellen asymmetrisk i en mindre prespore og en større morcelle avskilt av septum, før morcellen i steg 2 omslutter presporen. Presporen utvikles inne i morcellen og kalles derfor en endospore (Bahl & Durre, 2001; Henriques & Moran, 2007). I steg 3 pakkes presporen med DNA inn i sporevegg, korteks og morcellens plasmamembran som blir til kjernemembranen. I steg 4 omsluttet presporen av proteinkappen og i noen tilfeller eksosporium ytterst. I steg 5 modnes presporen videre, før morcellen lyses og presporen frigjøres som en fri endospore (Juodeikiene et al., 2012). Når forholdene igjen blir gunstige for vekst, vil endosporen i steg 6 begynne å germinere (Doyle et al., 2014). Germinering initieres av germinanter i form av aminosyrer, sukker og purinderivater som bindes til GerA-reseptorer i kjernemembranen, slik at dipicolinsyre og ioner frigis fra kjernen. Dette trigger hydrolyse av korteks, noe som muliggjør vannopptak i kjernen til et nivå lik det som er vanlig hos vegetative celler. En rehydrert kjerne betyr økt enzymaktivitet og metabolismen kommer i gang, og med ett er sporen igjen blitt en vegetativ celle (Paredes-Sabja et al., 2011).



Figur 2.2. Sporuleringscyklus for *B. subtilis*. I steg 1 deles den vegetative bakteriecellen asymmetrisk i en mindre prespore og en større morcelle avskilt av septum, før morcellen i steg 2 omslutter presporen. I steg 3 pakkes presporen med DNA inn i sporevegg, korteks og morcellens plasmamembran som blir til kjernemembranen. I steg 4 omslutes presporen av proteinkappen og i noen tilfeller eksosporium ytterst. I steg 5 modnes presporen videre, før morcellen lyseres og presporen frigjøres som en fri endospore. I steg 6 germinerer den frie presporen til en vegetativ celle. Figuren er hentet og modifisert fra Juodeikiene et al. (2012).

2.2.2 Genus *Clostridium* (Klostridier)

2.2.2.1 Historisk perspektiv

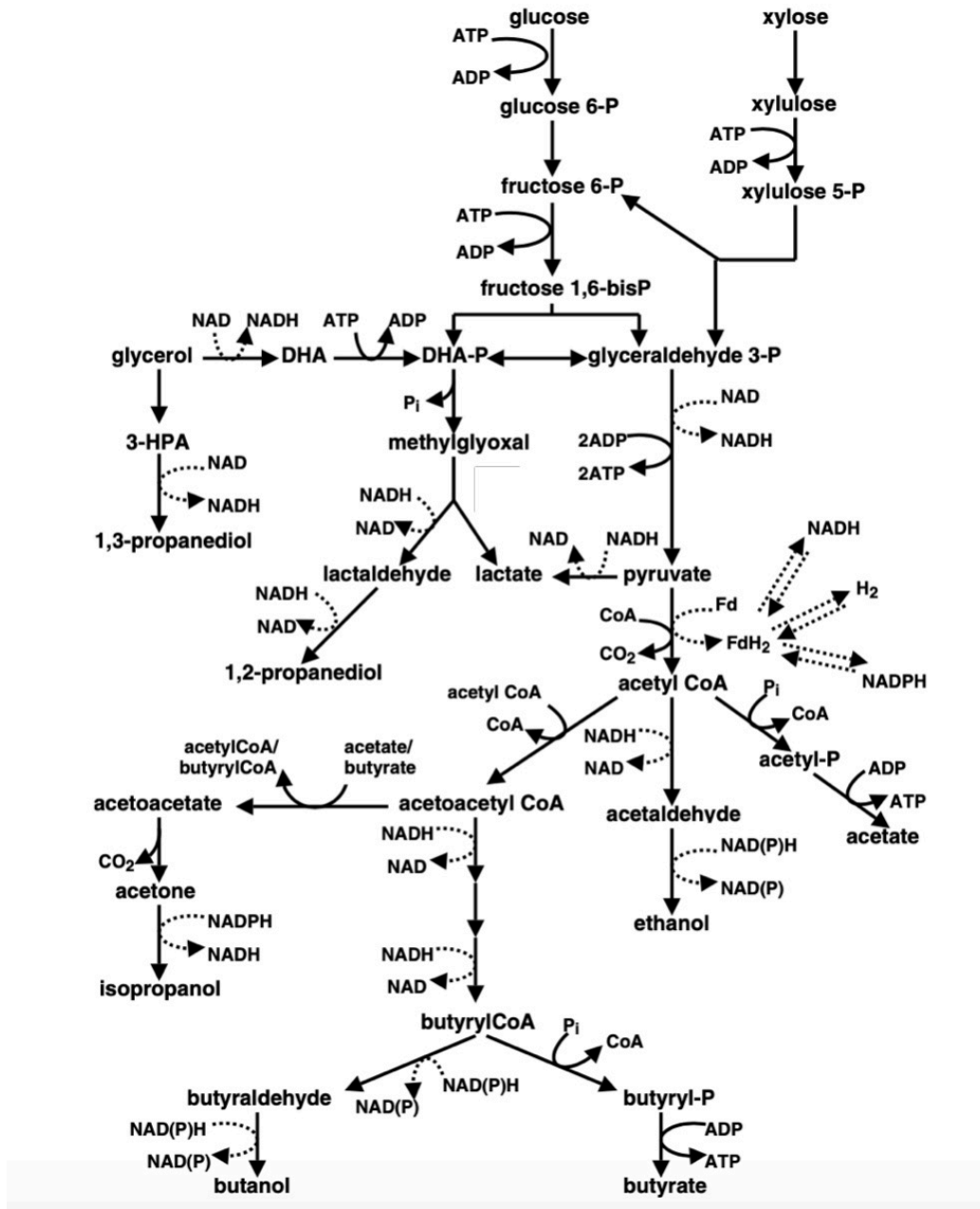
Klostridier ble trolig allerede beskrevet rundt år 460-370 før Kristus av den greske fysikeren Hippocrates. I hans bok, *Epidemics III*, skildret han en betennelsestilstand med store likheter til det som i dag er kjent som gassgangren (Bahl & Durre, 2001). Ifølge Norsk Helseinformatikk er gassgangren, også kalt myonekrose, en sårinfeksjon forårsaket av ulike Klostridiebakterier, først og fremst *Cl. perfringens* (Norsk Helseinformatikk, 2019). Likevel var det ikke før på 1800-talet at genus *Clostridium* ble nærmere forsket på. I 1861 beskrev den franske biologen, mikrobiologen og kjemikeren Louis Pasteur (1822-1895) en mikroorganisme som hadde evne til å vokse uten tilgang på oksygen, og han konstruerte navnet «anaerob» som betyr «uten oksygen». Pasteur gav denne mikroorganismen navnet *Vibrion butyrique* på grunn av dens evne til å danne butyrate (smørsyre) som fermenteringsprodukt. Senere ble Pasteurs *Vibrion butyrique* omdøpt til *Cl. butyricum* av den polske vitenskapsmannen Adam Prazmowski (1821-1885) (Bahl & Durre, 2001). Doyle et al. (2014) viser til kilder som påstår at Klostridier for første gang ble detektert i melk og melkeprodukter på starten av 1900-tallet. I 2001 var det beskrevet mer enn 150 arter av genus *Clostridium* (Bahl & Durre, 2001).

2.2.2.2 Morfologi, metabolisme og fysiologi

Den vegetative bakteriecellen er 0,5-2,0 µm i diameter, kan bli opp til 30 µm i lengde og er utstyrt med flageller som gjør den bevegelig. Endosporene kan ha en sentral, subterminal eller terminal lokalisering avhengig av arten. Genus *Clostridium* er en av de største i prokaryotriket, og de mange artene har sin unike metabolisme og fysiologi. De aller fleste artene er obligat anaerobe, selv om det er vist at noen kan vokse med tilgang på oksygen. Majoriteten av Klostridiene er mesofile med optimal veksttemperatur i området 30-40°C, men noen er også termofile (optimal veksttemperatur i området 60-70°C) eller psykrotrofe (optimal veksttemperatur i området 22-25°C). Videre vokser de fleste best i pH-område 6,5-7,0 (Bahl & Durre, 2001).

Klostridiene deles inn i to grupper: sakkarolytiske og proteolytiske. Sakkarolytiske Klostridier fermenterer først og fremst sukker og organiske syrer, mens de proteolytiske fermenterer aminosyrer. I tillegg vil noen være spesialisert til å fermenterer andre organiske forbindelser som aromatiske forbindelser, aminer og puriner (Bahl & Durre, 2001; Johansen et al., 2013). Deres fermenteringsprodukter er store mengder gass (CO₂, H₂, CH₄), organiske syrer

(melkesyre, eddiksyre (acetate), smørsyre, fumarsyre) og løsemidler (butanol, propanol, acetone, etanol) (Samul et al., 2013). Figur 2.3 illustrerer reaksjonsveien med hensyn til karbohydratmetabolismen.



Figur 2.3. Karbohydratmetabolisme hos Klostridier. Figuren er hentet fra Bahl & Durre (2001).

2.2.2.3 Klostridier i melk og melkeprodukter

Klostridier med betydning for meieriindustrien er de som er patogener eller kan ødelegge melkeproduktene (kvalitetsforringere). I følge Samul et al. (2013) er det bare 35 av dem i slekten som er patogener, og Walstra et al. (2006) peker på at det først og fremst er *Cl. botulinum* og *Cl. perfringens* som er forekommende i melk og melkeprodukter, selv om det er sjelden de forårsaker matforgiftning her. *Cl. botulinum* produserer åtte typer botulinum nevrotoksin, A-H, som forårsaker sykdommen botulisme. Alle toksinene er av proteinnatur og virker ved å blokkere overføring av nerveimpulser. Botulisme er en livstruende sykdom og toksinet blir betraktet som verdens giftigste stoff (Doyle et al., 2014; Granum, 2015). *Cl. perfringens* har også evne til toksinproduksjon og assosieres med gastroentritt (Granum, 2015).

Cl. tyrobutyricum, *Cl. butyricum*, *Cl. beijerinckii* og *Cl. sporogenes* er kvalitetsforringere som er kjent for å ødelegge osten når den modnes (Le Bourhis et al., 2006).

2.2.2.3.1 Klostridier i ost

Cl. tyrobutyricum, *Cl. butyricum* og *Cl. beijerinckii* er alle sakkarolytiske Klostridier, mens *Cl. sporogenes* er proteolytisk. *Cl. tyrobutyricum* har i tillegg en unik evne til å fermentere melkesyre. De produserer eddiksyre, smørsyre, hydrogengass (H₂) og karbondioksid (CO₂). På grunn av deres evne til å produsere smørsyre omtales alle bortsett fra *Cl. sporogenes* som smørsyresporer (Doyle et al., 2014; Pahlow et al., 2003). Gassen gjør at osten blåser seg opp og det dannes sprekker, mens smørsyre gir vond smak på osten. I ost er det anaerobe forhold og under modning av ost vil melkesyrebakterier omdanne laktose til melkesyre (Walstra et al., 2006). Le Bourhis et al. (2006) viser i sin studie at dette gjør ost til et ypperlig vekstmedium, spesielt for *Cl. tyrobutyricum* som kan vokse ved en pH helt ned mot 5,8. De andre artene vokser bedre tidlig i modningsforløpet da pH enda er relativt høy (Pahlow et al., 2003). Det er spesielt semi-harde oster av typen Gouda og Emmentaler som er utsatt for å bli ødelagt som følge av slik smørsyregjæring, noe som fører til store økonomiske tap for meieriindustrien (Le Bourhis et al., 2006; Walstra et al., 2006).

I 1973 var det et utbrudd av botulisme i Frankrike og Sveits etter konsum av ost. Årsaken kunne tilskrives at osten hadde modnet på strå kontaminert av avføring. Det har også blitt rapportert om et utbrudd av botulisme i Italia som kan spores tilbake til ost. Der ble det konkludert med at osten hadde modnet ved for høy pH og at prosesseringen ikke hadde vært nøye nok (Doyle et al., 2014).

2.2.2.3.2 Klostridier i melkepulver

Det tørre miljøet i melkepulver gjør det mulig for Klostridiene å overleve i deres sporeform. Når skummetmelkepulver rekombineres tilsettes det vann og deretter melkefett for å oppnå ønsket fettprosent (Walstra et al., 2006). I rekombinert melkepulver vil sporer som finnes der kunne begynne å germinere om forholdene ligger til rette for det (Scott et al., 2007). *Cl. halophilum*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi/haemolyticum*, *Cl. sporogenes* og *Cl. botulinum* er arter som er blitt funnet i melkepulver (McHugh et al., 2017). Spesielt tilstedeværelse av *Cl. botulinum* sporer i morsmelkestatning er en bekymring i forhold til utvikling av spedbarnbotulisme. Sporen kan begynne å germinere i tarmen hos nyfødte barn som enda ikke har et velutviklet immunforsvar. Likevel er det så langt ikke blitt rapportert om tilfeller der spedbarnsbotulisme kan spores tilbake til melkepulver (Doyle et al., 2014).

2.2.2.3.3 Klostridier i yoghurt

I 1989 var det et utbrudd av botulisme i England som kunne spores tilbake til yoghurt som følge av at hasselnøtt som aromakomponent ikke hadde vært varmebehandlet tilstrekkelig (Doyle et al., 2014). *Cl. botulinum* kan vokse ved en pH helt ned mot 4,6 (Granum, 2015), og det er derfor ikke usannsynlig at den kan vokse i det syrlige miljøet i yoghurt.

2.2.2.3.4 Kontroll av Klostridier i melk- og melkeprodukter

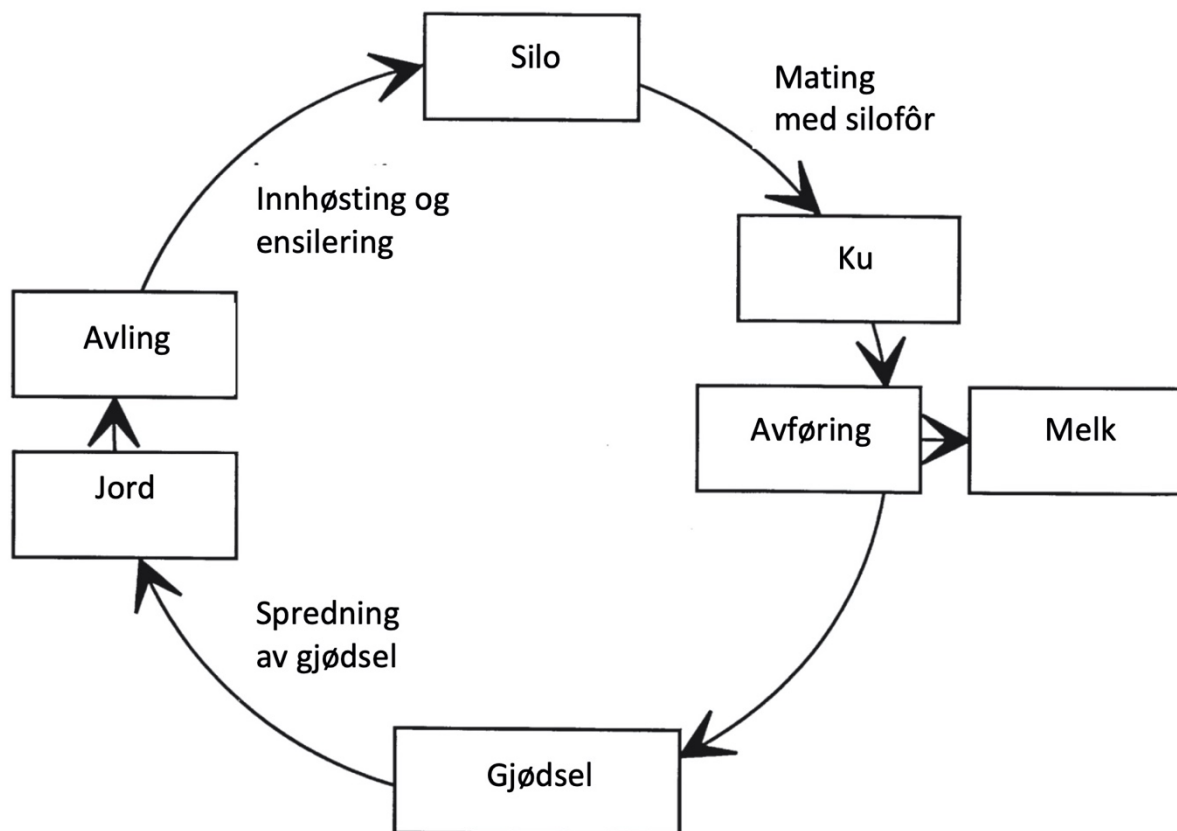
I Norge blir all rå melk som ankommer meieriet testet for anaerobe sporer i en 3-rørsmetode som grunnlag for kvalitetsbetaling. Da dyrkes melka opp på 3 rør i et medium som Klostridier kan vokse på, og rørene inkuberes under anaerobe forhold. Etter 3 dager observeres det fra hvor mange rør det er blitt produsert gass og kvaliteten på melka blir rangert etter høy vekst (3 positive rør), middels vekst (2 positive rør), lav vekst (1 positivt rør) eller ingen vekst (0 positivt rør) (Johansen et al., 2013; Tine Råvare, 2015). I tillegg betales bonden for hvordan melka lukter og smaker, en sensorisk analyse som blant annet kan avdekke smørsyreproduksjon. Videre beskriver Johansen (2013) i sin rapport en 9-rørsmetode som norsk meieriindustri vanligvis bruker for kvantifisering av anaerobe sporer i ystemelk. Denne metoden belyses nærmere i kapittel 2.4.1.2.

Norsk meieriindustri tester ikke rutinemessig på spesifikke Klostridiesporer i melkepulver, men melkepulveret testes fenotypisk på selektive agarer for å sjekke om det dannes svarte kolonier (Jakobsen, 2020). Dette skjer som følge av at noen Klostridier har evne til å redusere sulfitt til

sulfid. Disse omtales som sulfittreduserende Klostridier (Engelsk: Sulphite reducing Clostridia, SRC), og disse er ofte kvalitetsforringere. I næringsmiddelindustrien brukes dette som en indikator på fekal forurensning av Klostridiesporer (Doyle et al., 2014). Ute i Europa blir imidlertid melkepulver til morsmelkerstatning rutinemessig screenet for *Cl. perfringens* (Gopal et al., 2015). Doyle (2014) viser til en publisering av Codex Alimentarius Commission som konkluderer med at *Cl. botulinum* ikke utgjør en stor fare i melkepulver, og International Commission on Microbiological Specification of Foods mener det er tilstrekkelig å kun teste for SRC i melkepulver.

2.2.2.4 Klostridiesporenes vei inn i melka

Klostridiesporenes vei inn i melka er skissert i figur 2.4: Klostridier lever vanligvis som sporer i jord, vann og i tarmen hos mennesker og dyr (Walstra et al., 2006). Når gresset vokser på jordene vil sporene befinne seg helt nederst på stengelen, og når bonden slår gresset i sommerhalvåret vil sporene kunne komme over i silofôret til kua. I siloen er det anaerobe forhold og rik tilgang på karbohydrater og proteiner, og om pH ikke blir for lav vil Klostridiesporene begynne å germinere og vokse bra her. Så kommer vinteren og kuene mates med silofôr rik på sporer (Pahlow et al., 2003). Sporene overlever tarplassasjen og akkumulerer i avføringen. Derfra er det kort vei opp til spenene og videre kontaminasjon av melka når kua skal melkes (Pahlow et al., 2003; Vissers et al., 2006). Det er også kort vei til spenene direkte fra fôret når kua spiser. Studier har vist at hele 76% av bakteriene på spenenes overflate tilhører fylum *Firmicutes*, som genus *Clostridium* tilhører (Quigley et al., 2012). Det er heller ikke uvanlig å gjødsle jorda med avføring fra kua, og slik vil sporene potensielt kunne føres med inn i siloen igjen ved neste innhøsting (Pahlow et al., 2003). Meieriindustrien omtaler Klostridiesporer som «vintersporer», fordi de først og fremst er et problem i silofôr som gis til kuene i vinterhalvåret når de ikke har mulighet til å beite fritt ute. Dette reflekterer et høyere innhold av Klostridiesporer i melk i vintermånedene (Sølverød et al., u.å.).



Figur 2.4. Klostridiesporenes vei fra jord til melk. Sporene lever i jord og nederst på stengelen til gresset, og vil kunne komme over i silofôret under innhøsting. Kuene mates med silofôr rik på sporer, og sporene kan komme over i melka fra kuas avføring. Avføringen blir også brukt til å gjødsle jorda og slik tilbakeføres sporene til gresset. Figuren er hentet og modifisert fra Pahlow et al. (2003).

For meieriindustrien er det avgjørende at rå melka som leveres til meieriet har best mulig kvalitet (Johansen et al., 2013; Pahlow et al., 2003). Det sies at «en kjede er aldri sterkere enn det svakeste ledd», og derfor er fokus på fôr kvalitet allerede i primærleddet essensielt for å unngå problemer senere i produksjonslinjen. Man vet allerede nå at silofôr er den viktigste innfallsporten for Klostridiesporene (Pahlow et al., 2003). I det forebyggende arbeid vil det derfor være naturlig å rette et blikk mot bondens produksjonspraksis med tanke på innhøsting og ensilering. Pahlow et al.(2003) nevner flere forhold som vil ha noe å si for kvaliteten på silofôret: høy stubbing av gresset vil redusere faren for at sporer nederst på stengelen følger med. Også værforholdene spiller en viktig rolle. I våte perioder har jord lettere for å klistre seg til gresset, og om mulig bør derfor innhøstingen skje når jord og gress er tørt. Å øke tørrstoffinnholdet i gresset, samt ha kontroll på pH i siloen vil redusere livsbetingelsene for Klostridie. Utover dette er det til slutt viktig at bonden tenker på å vaske spenene godt før melking.

Selv om bonden kan gjøre mye for å unngå at sporer skal komme over i melka, er det likevel ikke til å unngå at det skjer. På veien gjennom produksjonslinjen er melka i kontakt med ulike overflater hvor sporene, med sin hydrofobe overflate, kan slå seg ned og danne biofilm. Biofilm er en samling bakterier som er festet til hverandre og til en næringsrik overflate, hvor de vokser og deler seg. Bakteriene produserer polysakkarider og andre organiske forbindelser, også kalt ekstracellulær polymerisk substans (EPS), som beskytter dem mot omgivelsene. Dette gjør biofilm vanskelig å fjerne med vanlig renhold (Faille et al., 2014). Det er spesielt Basillusporer som er kjent for å danne biofilm i meierianleggene og har vært årsak til kontaminasjon av melkepulver (McHugh et al., 2007). Det er ikke utenkelig at også Klostridiesporer har evne til å danne biofilm i meierianleggene.

2.3 Hvordan sporer blir påvirket av ulike prosesseringer

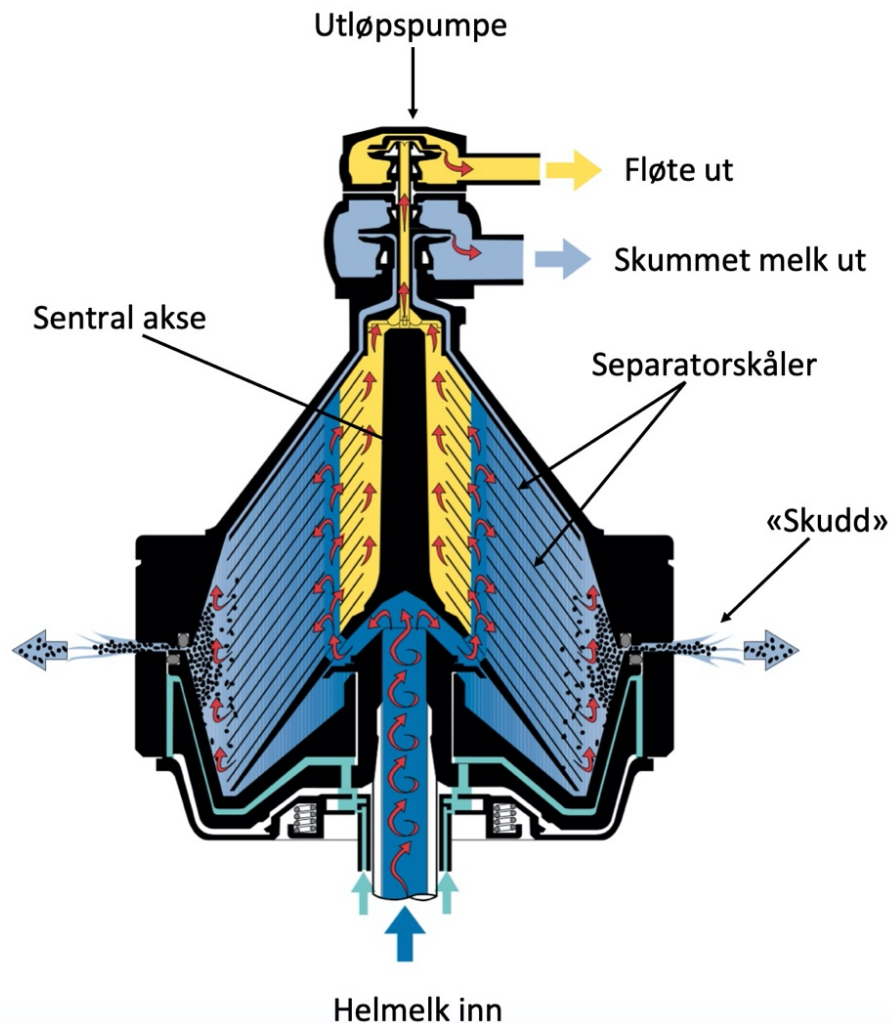
2.3.1 Pasteurisering og sterilisering

Rå melka som forlater gården vil ha en rik mikrobiota. I det rå melka ankommer meieriet vil den pasteuriseres for å drepe de bakteriene i melka som kan utgjøre en trussel mot matvaretryggheten og produktkvaliteten. Dette betyr at rå melka varmebehandles ved 72°C i 15 sekunder eller ved 63°C i 30 minutter. Fløte pasteuriseres ved 75°C i 15 sekunder. Denne temperatur og tid er satt i forhold til overlevelsen av *Mycobacterium tuberculosis*, som anses å være den mest varmeresistente blant de humanpatogene bakteriene. Samtidig vil melkas egenskaper med hensyn til smak og næringsinnhold ivaretas og myseproteiner denatureres ikke ved denne temperatur og tid. Etter pasteurisering kan man anta at alle patogene vegetative bakterier, mugg og gjær er drept. Termotolerante vegetative bakterier og sporer har derimot evne til å overleve pasteurisering, men disse kan drepes ved sterilisering i form av UHT. Da varmebehandles melka ved 145°C i bare noen sekunder (Walstra et al., 2006).

2.3.2 Separering

Separering er en prosess som separerer to faser fra hverandre. Helmelk (rå melk) kan separeres i skummet melk og fløte. I meieriindustrien brukes separering som ledd i å standardisere melk og melkeprodukter til ønsket fettinnhold, ved at deler av fløten kan føres tilbake i skummet melka. Separeringen skjer i en separator som består av en separatorkule og en utløpspumpe slik figur 2.5 illustrerer. Separatorkula er satt sammen av separatorskåler og det er her selve separeringen skjer ved temperatur 50-55°C. Helmelka blir ført inn i separatorkula gjennom rør fra bunnen langs en sentral akse, og på separatorskålene vil sentrifugalkrafta skille helmelka i

fløte og skummet melk. Fettkulene som har minst tetthet vil vandre inn mot aksen og skummet melka som har større tetthet vil vandre ut mot periferien. Fløte og skummet melk blir så ført opp i hver sine rør til en utløpspumpe på toppen, der fløte og skummet melk går ut fra hver sin ventil. Det som er til overs og har så stor tetthet at det ikke føres ut av separatorens, som sporer og bakterier, vil en gang i blant «skytes ut» (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).



Figur 2.5. Separering av helmelk i skummet melk og fløte. Helmelka føres inn i bunnen av separatorkula og opp langs en sentral akse. På separatorskålene vil sentrifugalkrafta skille helmelka i skummet melk og fløte. Fløte har lavest tetthet og vil vandre inn mot sentral aksen, mens skummet melka med høy tetthet vil vandre ut mot periferien. Skummet melk og fløte føres opp til en utløpspumpe på toppen. Av og til «skytes» separatorens for å kvitte seg med sporer og bakterier. Figuren er hentet fra Bylund (1995).

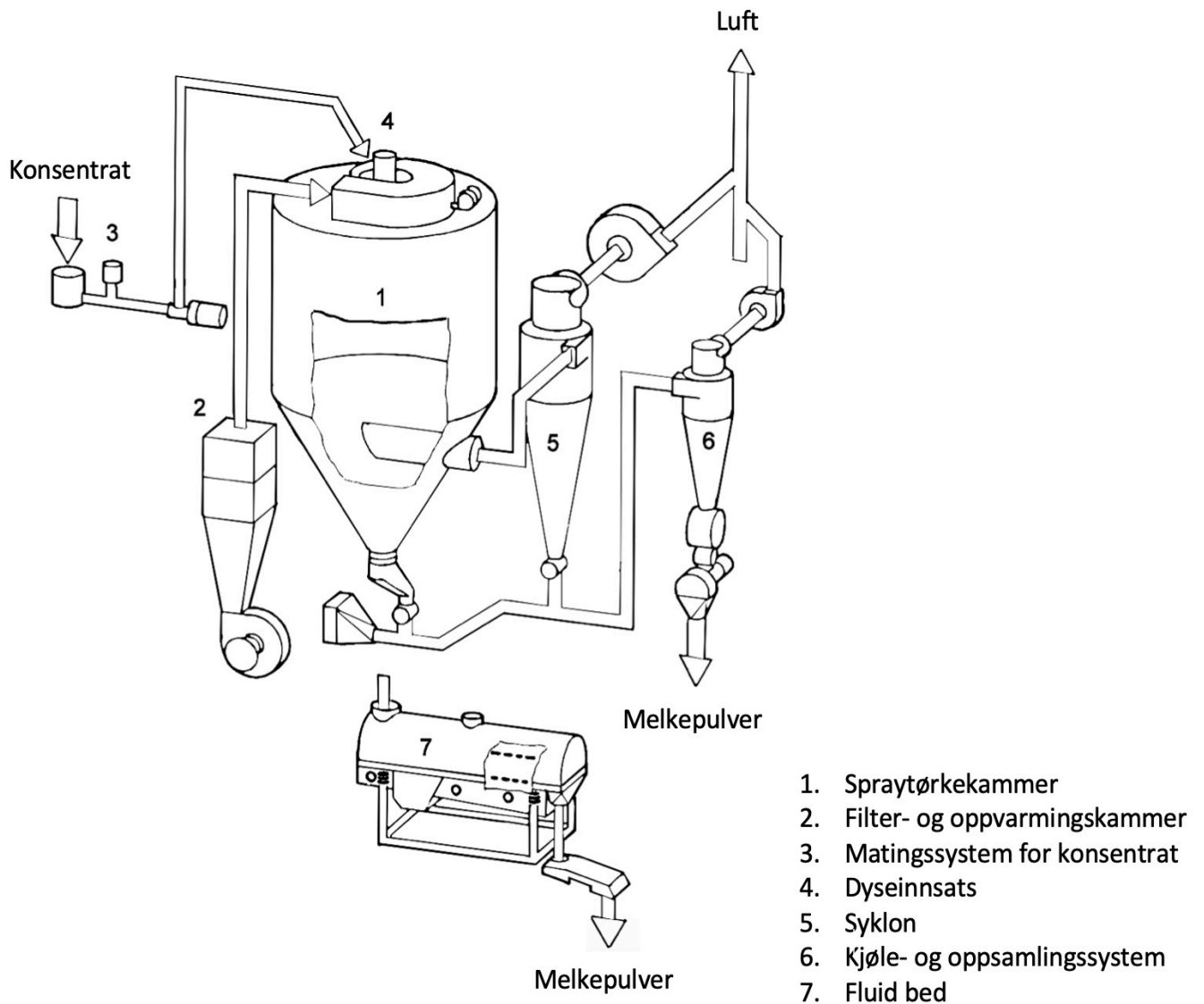
2.3.3 Tørking

Melkepulver kan blant annet lages fra helmelk (helmelkspulver), skummet melk (skummetmelkpulver), myse (Engelsk: Whey protein concentrate, WPC) og kaseinat (kaseinpulver) (McHugh et al., 2007). Melkepulver er melk hvor det meste av vannet er fjernet (Westergaard, 2010). I følge Bylund (1995) har melkepulver et vanninnhold på 2,5 – 5 %, og ingen bakterier vil kunne vokse når vanninnholdet blir så lavt. Sporer vil derimot kunne overleve. Samtidig vil melk miste vekt og volum når det tørkes, og på den måten vil transportkostnadene gå ned. Slik kan melkepulver lagres over flere år uten at produktet taper kvalitet og melkepulver kan transporteres billig over lengre avstander (Bylund, 1995).

Spraytørking er en mye brukt metode for å tørke melk. Før selve tørkeprosessen fordampes melka ved en temperatur på 50-70°C slik at den konsentreres. Konsentratet kjøles ned i 2-3 timer, før det igjen varmes opp til en temperatur på 90-100°C i noen få sekunder (Becker et al., 1994). Så spraytørkes konsentratet ved å omdanne det til mange små dråper, der vannet i dråpene fordampes av varm luft slik at man sitter igjen med pulverpartikler. Westergaard (2010) beskriver spraytørking for ett-, to- og trestegs tørking, med sentrifugal- eller dyseforstøving og med og uten agglomerering. Agglomerering betyr at det dannes klustere sammensatt av enkeltpartikler som oppstår ved at tørre og våte partikler kolliderer, også kalt «instant powder». Agglomerering er hensiktsmessig for at melkepulveret skal kunne løses lett i vann igjen. Ordinært melkepulver som ikke er agglomerert vil ha en tendens til å klumpe seg når det tilføres vann (Westergaard, 2010).

Figur 2.6 skisserer spraytørkeprosessen ved bruk av dyseforstøving i to steg uten agglomerering: Melka (konsentrat) blir pumpet gjennom et matingsystem (3) opp til en dyseinnsats (4) som sitter på toppen av spraytørkekammeret (1). I dyseinnsatsen forstøves melkekonsentratet til finfordelte dråper som sprayes inn i tørkekammeret. I tørkekammeret skjer første tørkesteg ved at dråpene møter filtrert varm luft oppvarmet fra et oppvarmingskammer (2) som fordamper dråpene til pulverpartikler. Den varme lufta i tørkekammeret vil normalt ha en temperatur på 150-250°C (Becker et al., 1994). Store partikler vil falle til bunn, før pulveret kjøles ned og samles opp (6). Partikler som er for små for å falle til bunn, «fines», vil samles opp i syklonen (5), der de separeres fra lufta, faller til bunn, samles opp og kjøles ned sammen med de store partiklene (6). I de tilfellene hvor man har tørking i to steg vil de store partiklene gjennomgå en ettertørking i «fluid bed» (7). Funksjonen til «fluid bed» er å fjerne resten av fuktigheten i pulveret som ikke ble fjernet allerede i tørkekammeret,

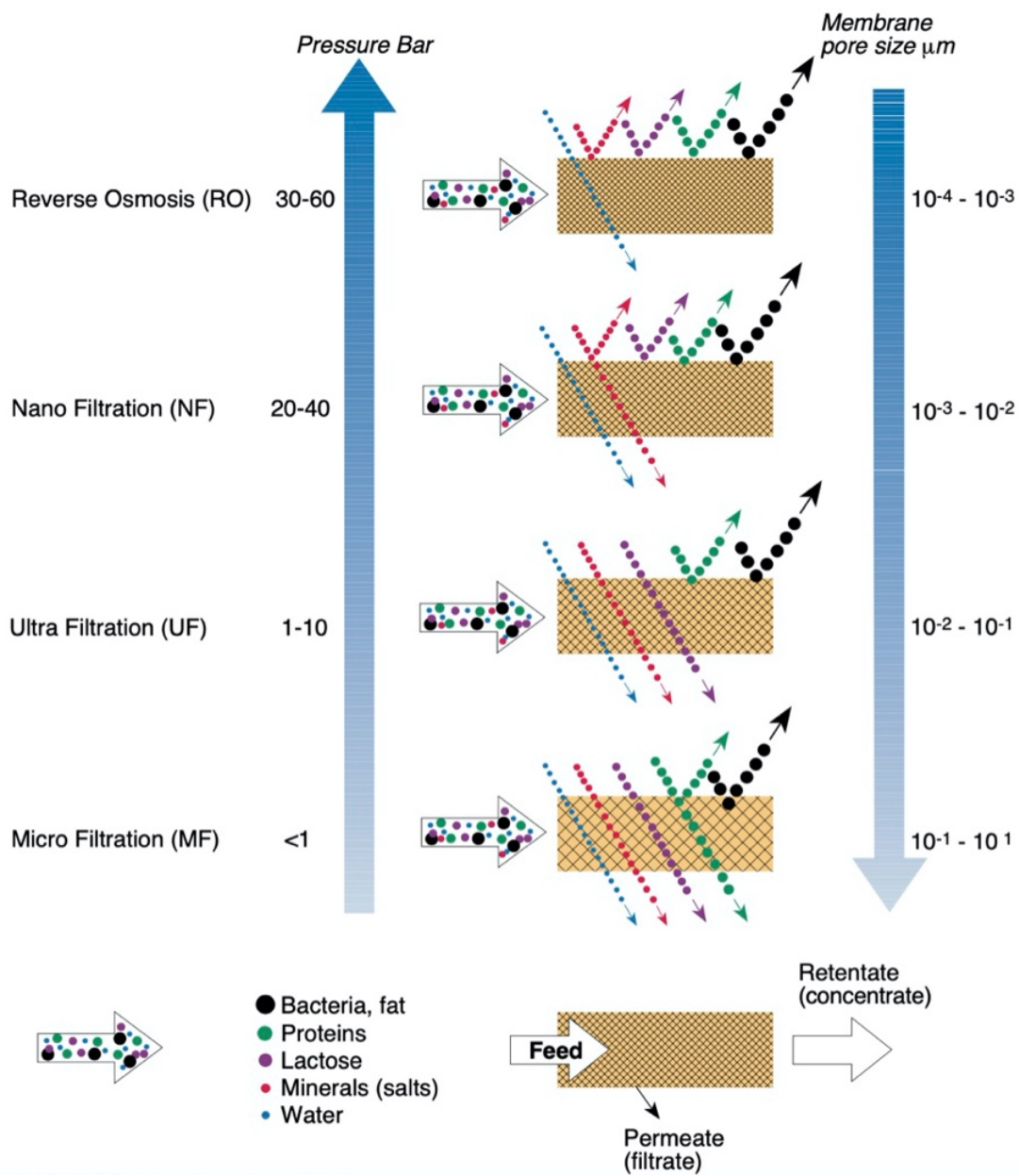
samtidig som den kjøler ned pulveret. I de tilfellene hvor man ønsker agglomerert pulver føres «fines» fra syklonen tilbake til dyseenheten via «fines return». Her vil de feste seg til sprayen som kommer inn, danne agglomerater, bli store nok og falle ned til bunn (Westergaard, 2010).



Figur 2.6. Spraytøking i 2 steg uten agglomerering. Spraytørkeren består av et spraytørkekammer (1), filter- og oppvarmingskammer (2), matingssystem for konsentrat (3), dyseinnsats (4), syklon (5), kjøle- og oppsamlingssystem (6) og fluid-bed (7). Figuren er hentet og modifisert fra Westergaard (2010).

2.3.4 Membranfiltrering

Membranfiltrering er en prosess som innenfor meieriindustrien brukes for å separere ulike komponenter i melka fra hverandre. Dette skjer ved å filtrere melka gjennom en halvgjennomtrengelig membran ved at det påføres et ytre trykk. Membranens porestørrelse (porediameter) bestemmer hvilke komponenter som holdes igjen (retentat) og hvilke komponenter som slippes igjennom (permeat) (Walstra et al., 2006). I følge Bylund (1995) kan membranfiltrering deles inn i fire ulike ut ifra membranens porediameter som skissert i figur 2.7: Revers osmose (RO) er den fineste membranfiltreringen der porene i membranen har en diameter på $10^{-4} - 10^{-3}$ μm , så små at kun vannmolekyler slipper gjennom til permeatet. Nanofiltrering (NF), der membranen har en noe større porediameter på $10^{-3} - 10^{-2}$ μm , slipper også salter gjennom. Laktose, proteiner, bakterier og fett holdes tilbake i retentatet. Ultrafiltrering (UF), der membranen har en porediameter på $10^{-2} - 10^{-1}$ μm , lar også laktosen slippe gjennom. Mikrofiltrering (MF), der membranen har en porediameter på $10^{-1} - 10^1$ μm , vil bare kunne holde tilbake de største proteinmolekylene (kaseiner), fett og bakterier. Figuren viser også hvilket trykk som må påføres systemet for å filtrere komponentene ved de ulike filtreringsprosessene.



Figur 2.7. Prinsipp for membranfiltrering. Membranfiltreringsprosessene kan deles inn i revers osmose (RO), nanofiltrering (NF), ultrafiltrering (UF) og mikrofiltrering (MF). De ulike prosessene filtrerer ulike komponenter (vann, salter, laktose, proteiner, fett og bakterier) avhengig av membranens porediameter ved at det påføres et ytre trykk. Komponentene som filtreres kalles permeat (også kalt filtrat), mens komponentene som holdes tilbake av membranen kalles retentat (også kalt konsentrat). Figuren er hentet fra Bylund (1995).

Mikrofiltrering, der membranen har en porediameter på 0,8-1,8 μm , er sammen med baktofugering en mye brukt metode for å fjerne sporer i ystemelk (Bermúdez et al., 2016). Man velger denne porediameteren fordi den er liten nok til å holde de fleste sporer tilbake i retentatet, samtidig som den er stor nok til at for eksempel myseproteiner og mindre komponenter slippes gjennom til permeatet (0,1 til 1% av sporene vil også slippes gjennom). Slik unngås avleiringer på membranens overflate og filtreringsevnen blir bedre, og fra et økonomisk perspektiv vil dette være fordelaktig. Dessuten gjør mikrofiltreringen det mulig å hente ut sporer og UHT-behandle disse, samtidig som man bevarer de andre komponentene i permeatet som blir pasteurisert. Dette gjør ystemelka tilnærmet fri for sporer, uten at det går på bekostning av ystingsegenskapene (Walstra et al., 2006).

Melkepulver laget fra mikrofiltrert skummet melk refereres ofte som «micellært kaseinpulver» eller bare kaseinpulver. Da mikrofiltreres melka gjennom en membran med porediameter på 0,05-0,2 μm , slik at alle kaseiner holdes igjen i retentatet som så tørkes til pulver (Jørgensen et al., 2018). Kaseinpulver vil være fri for myseproteiner, da myseproteiner i følge Walstra et al. (2006) har mindre molekylvekt og trolig vil kunne være små nok til å passere en membran med en slik porediameter. Kaseinpulveret vil imidlertid ha et høyt innhold av sporer. Kaseinpulver kan brukes for å øke proteininnholdet i yoghurt og fra permeatet kan man lage myseproteinpulver. Myseproteinpulver fra permeat kan også brukes i yoghurt for å få de geleringsegenskapene man ønsker yoghurt skal ha. Myseproteinpulver fra permeat er bedre egnet til dette formål sammenlignet med myseproteinpulver laget fra ostemyse (Jørgensen et al., 2018).

2.4 Metodisk teori

2.4.1 Kvantifisering av vegetative celler og sporer

2.4.1.1 Plattetelling for å estimere totalantall bakterier

Når man dyrker bakterier in vitro legger man forholdene til rette for at bakteriecellene kan dele seg og øke i antall. For å få til dette velges det næringsholdige medier som bakterier kan leve på under gitte dyrkningsbetingelser. Dyrkning på medier som er gjort faste ved å tilsette agar er en mye brukt metode til kvantifisering av antall bakterier i en prøve. Når bakteriene blir mange nok danner de kolonier (Schøyen, 2011). Så telles antall kolonidannede enheter (kde) som ganges med fortynningsfaktoren, og svaret brukes som estimat på totalantall bakterier i en prøve per milliliter. Ifølge Adam og Moss (2008) er det akseptabelt å telle mellom 30 og 300 kolonier for å kunne stole på at estimatet er nøyaktig nok. Det er derfor ofte hensiktsmessig å fortynne prøven i en 10-gangersfortynningsserie for å få en tellbar plate.

Blodagar og Brain heart infusion agar (BHI-agar) er generelle medier som brukes for å få et bilde på totalantall bakterier i en prøve. Blodagar er også fin å bruke for å vurdere forskjellige typer hemolyse hos bakteriene, da hemolyse ofte er en indikasjon på at de er patogene. Selv om de aller fleste bakteriearter vokser på blodagar er det ikke alltid slik, og i de tilfellene kan det derfor være hensiktsmessig å heller bruke BHI-agar. Når den totale sammensetningen av bakterier i en prøve skal undersøkes kan det være en idé å bruke begge disse mediene, slik at man kan fange opp så mange bakteriearter som mulig, også de som ikke vokser på blodagar (Aspholm, 2020).

2.4.1.2 Most probably number (MPN)

Most probably number (MPN) er en kvantitativ metode for å estimere sannsynlig antall sporer/bakterier i en prøve. Metoden utføres ofte i 3 eller 5 reagensrør per fortynning tilsatt et flytende vekstmedium. Etter inkubering observeres rørene for vekst/ikke vekst, og basert på antall rør med vekst kan sannsynlig antall bakterier eller sporer estimeres ut ifra en MPN-tabell. Metoden er spesielt følsom på mindre bakteriepopulasjoner, da man kan bruke større prøvevolum på flytende medier (Oblinger & Koburger, 1975). I forhold til å kvantifisere sporer i melk som vanligvis er mindre enn 400 sporer/L, er derfor MPN-metoden å foretrekke fremfor utsåing på plate (Johansen et al., 2013). Metoden forutsetter imidlertid at bakteriene fordeles tilfeldig gjennom hele prøven, noe som betyr at man må prøve å oppnå en homogen blanding under prøvepreparering (Oblinger & Koburger, 1975).

Meieriindustriens 9-rørsmetode for kvantifisering av anaerobe sporer i ystemelk går ut på at man dyrker prøver i totalt 9 rør i 3 ulike fortynninger (10 mL, 1 mL og 0,1 mL) à 3 replikater. Rørene er tilsatt RCM (Reinforced Clostridial medium) og med en parafin/vaselin propp på toppen som sørger for anaerobe dyrkningsbetingelser. Antall rør med vekst med hensyn til gassproduksjon leses av som positiv (Johansen et al., 2013).

Slik det er i dag er ystemelka allerede blitt produsert til ost når MPN-tallene er klare etter at RCM-rørene har inkubert i 3 dager. Det er derfor ikke mye meieriet kan gjøre om det viser seg at ystemelka hadde et høyt sporeantall, annet enn å vente å se om osten blåses opp eller utvikler smørsyre under modning. Å kvantifisere anaerobe sporer i ystemelk brukes derfor først og fremst som en kontroll på ystemelkas kvalitet (Eide, 2020).

Meieriindustrien bruker vanligvis 9-rørsmetoden når MPN skal beregnes-- for anaerobe sporer i ystemelk, men i denne studien ble metoden brukt på alle prøver langs produksjonslinjen for melkepulver. Dette for å få et bilde på hvordan sporeantallet endret seg og for å kunne si hvordan sporene ble påvirket av prosessering.

2.4.2 Identifikasjon av Klostridier og andre sporedannere

2.4.2.1 Dyrkningsavhengig og dyrkningsuavhengig metoder

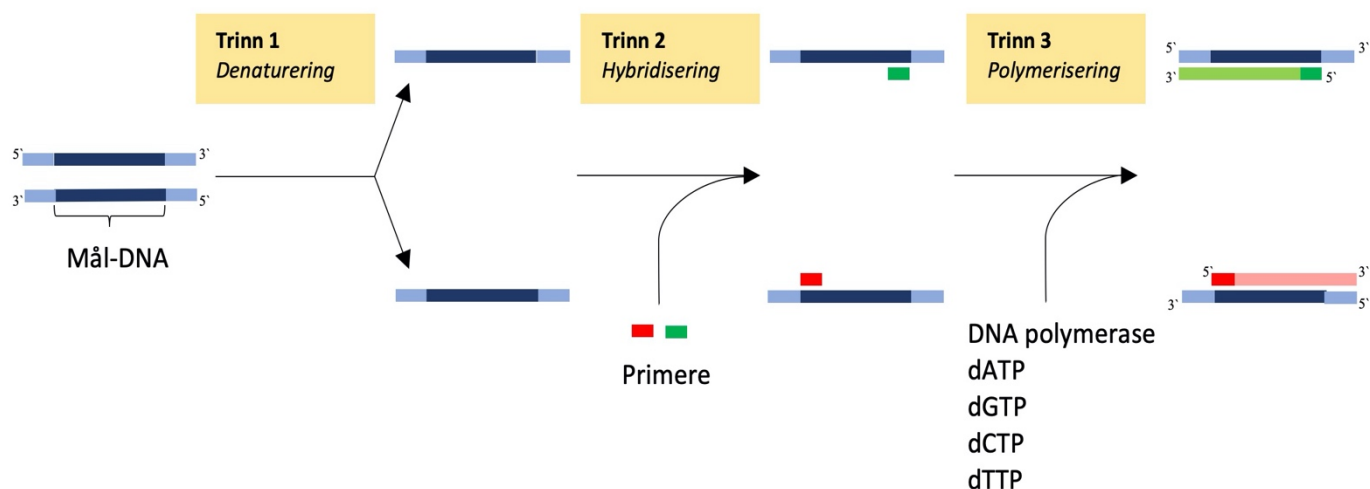
Molekylærbiologiske metoder for identifikasjon av Klostridier kan ha en dyrkningsavhengig (culture dependent) eller dyrkningsuavhengig (culture independent) tilnærming. Ved dyrkningsavhengig metoder ekstraheres DNA fra bakterier som vokser for eksempel på RCM, mens ved dyrkningsuavhengig metoder ekstraheres DNA direkte fra en prøve. Fordelen med dyrkningsavhengig metoder er at man kan identifisere akkurat de bakterietypene man er ute etter. Ulemper ved denne metoden er at det tar tid å dyrke opp bakterier, man kan risikere at bakterier utkonkurrerer hverandre slik at man ikke får fanget opp de bakteriene man hadde ønsket og noen bakterier har vanskelig for å vokse in vitro. Dyrkningsuavhengig metoder på sin side gjør det mulig å studere den totale diversiteten av bakterier i en prøve uten å måtte dyrke opp prøvene først. Dette gjør metoden rask og enkel, og man kan få et bilde av dynamikken av bakterier i prøven slik den er i virkeligheten (Jany & Barbier, 2008).

2.4.2.2 DNA-ekstraksjon

DNA-ekstraksjon er en molekylærbiologisk metode for å hente ut DNA (deoksyribonukleinsyre) fra en bakteriecelle for så å rense det etterpå. I følge Sjøberg (2013) finnes det flere ulike måter å ekstrahere DNA på, men her omtales de trinnene som normalt inngår. Først må DNA gjøres tilgjengelig ved at bakteriecellen knuses og lyses. Bakteriecellen kan lyses ved å ta i bruk ulike typer enzymer som lyzosym og proetinase K, samt ulike typer detergenter. Slik vil proteiner fragmenteres, mens DNA er uforandret og løselig i vann. Deretter inngår et sentrifugeringssteg for å sedimentere store celleorganeller, mens oppløst DNA og proteinmolekyler forblir i supernatanten. Etanol har den egenskapen å gjøre DNA uløselig og brukes for å felle ut DNA (Sjøberg, 2013). DNA kan så binde seg til ulike partikler, for eksempel magnetpartikler (LGC) eller silikapartikler i en kolonne (Qiagen). Ulike typer vaskebufferer brukes for å vaske vekk rester av proteiner og løsemidler. Til slutt elueres DNA slik at det slippes fra partiklene det er bundet til og blir fritt tilgjengelig i et eluat for videre PCR (Polymerase chain reaction).

2.4.2.3 Kvantitativ Polymerase kjedereaksjon (qPCR)

Polymerase kjedereaksjon (Engelsk: Polymerase chain reaction, PCR) er en metode som brukes for å amplifisere (kopiere) DNA in vitro (Alberts et al., 2014). Metoden gjør det mulig å fremskaffe store mengder DNA fra en liten mengde, slik at spesifikke DNA-sekvenser kan påvises ved sekvensering (Sjøberg, 2013). Til reaksjonen trenger man en blanding bestående av DNA, to primere (reverse og forward), DNA-polymerase og de fire nukleotider i form av dATP (deoksyadenosintrifosfat), dGTP (deoksyguanintrifosfat), dCTP (deoksyctosintrifosfat) og dTTP (deoksytymintrifosfat). Reaksjonen skjer i tre trinn som skissert i figur 2.8: Denaturering, hybridisering og polymerisering. I trinn 1 varmes reaksjonsblandingen opp slik at dobbelttrådet DNA (Engelsk: double-stranded DNA, dsDNA) denatureres til to separate DNA-tråder (Engelsk: single-stranded DNA, ssDNA). I trinn 2 senkes temperaturen slik at spesifikke primere hybridiseres til komplementære nukleotidbaser i 3'-ende av hver sin DNA-tråd. Primeren er designet til å feste seg til den DNA-regionen som man ønsker å amplifisere (mål-DNA). I trinn 3 økes temperaturen igjen slik at DNA-polymerase kan syntetisere (polymerisere) en ny DNA-tråd (amplicon) komplementær til mål-DNA ved å binde frie nukleotider til 3'-enden av primerne og syntetisere i 5'-3'-retning. Trinnene gjentas i flere sykluser, og etter hver syklus dobles mengden amplicon (Alberts et al., 2014).



Figur 2.8. PCR i en syklus. I trinn 1 denatureres dobbeltrådet DNA til to enkelttrådet DNA. I trinn 2 hybridiserer primere til 3-ende av hver sin DNA-tråd. I trinn 3 syntetiserer DNA-polymerase en ny DNA-tråd komplementær til mål-DNA ved å binde frie nukleotider til 3'-ende av primerne (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Figuren er hentet og modifisert fra Alberts et al. (2014).

Kvantitativ PCR (Engelsk: quantitative polymerase chain reaction, qPCR) er en videreutvikling av konvensjonell PCR der PCR-produktet kvantifiseres etter hver syklus ved at det avgis fluorescens som kan detekteres. Ponchel et al. (2003) viser til to grunnleggende metoder for å detektere PCR-produkter. Den mest vanlige metoden er å bruke prober som bindes spesifikt til en DNA-sekvens. TaqMan er en mye brukt probe til dette formål. Det er også mulig å bruke fargestoffer, for eksempel SYBR-Green, som bindes uspesifikt til minor groove i dsDNA (Sjøberg, 2013). Felles for begge metodene er at proben eller fargestoffet avgir fluorescens etterhvert som DNA amplifiseres ved en syklus. Det må riktignok avgis fluorescens av en viss intensitet før det kan detekteres, noe som ofte oppnås etter et visst antall sykluser angitt som «cycle threshold» (Ct) (Ponchel et al., 2003; Sjøberg, 2013).

I ettertid av PCR er det vanlig å rense PCR-produktet. Prinsippet bak rensingen er at PCR-produkter med 100 bp eller mer bindes til magnetkuler mens primer-dimere, salter, nukleotider og enzymer vaskes bort med etanol. Dette er komponenter som kan tenkes å forstyrre DNA-sekvenseringen (Beckman Coulter, 2016).

2.4.2.4 Illumina MiSeq sekvensering

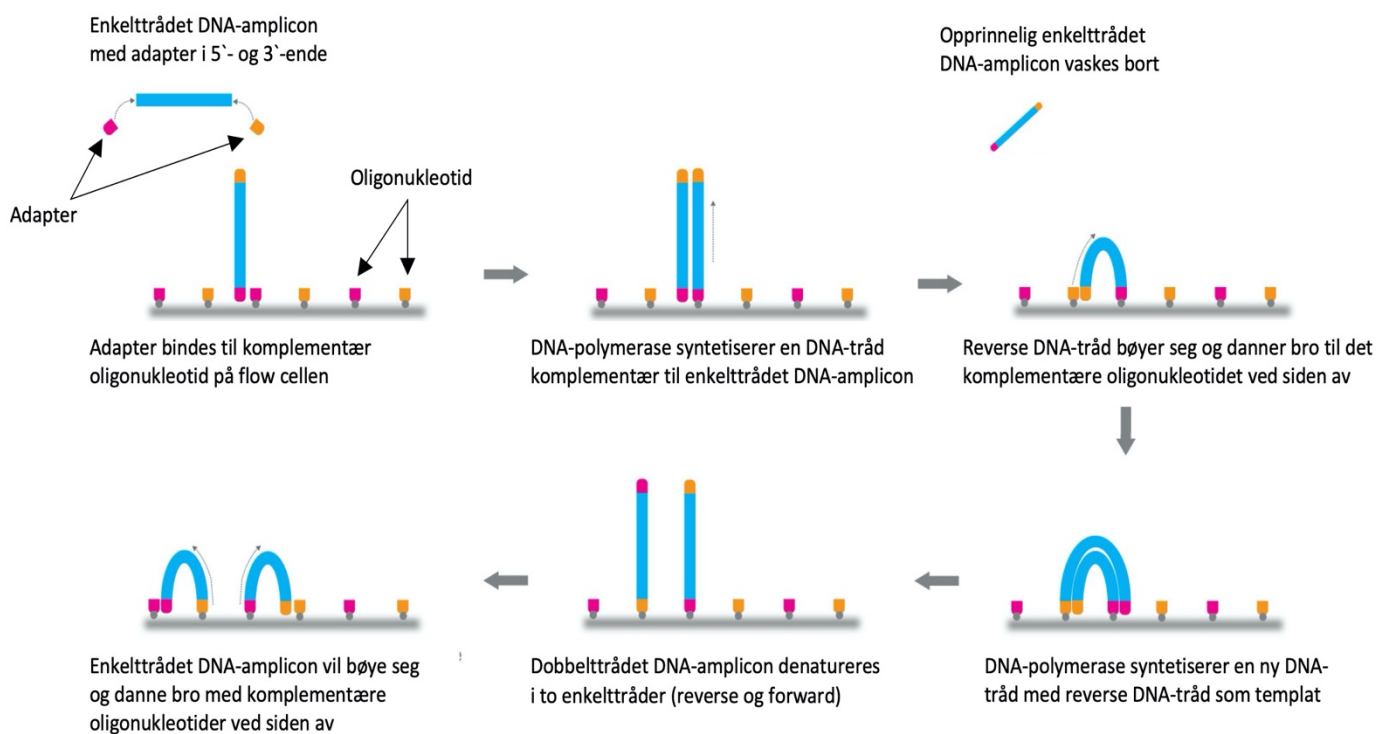
Prokaryote organismer, derav bakterier, har ribosomer bestående av en stor subenhet på 50S og en liten subenhet på 30S. S-verdien står for Svedberg og den angir størrelsen på cellekomponenten ut ifra hvor raskt den sedimenterer ved ultrasentrifugering. Den store og den lille subenheten er videre satt sammen av rRNA-molekyler og ribosomale proteiner. 30S-subenheten er satt sammen av 16S rRNA og 21 proteiner. Funksjonen til 16S rRNA er å posisjonere mRNA på ribosomet slik at translasjonen kan starte (Watson et al., 2014). Bakterielt 16S rRNA-genet med sine 1540 basepar består av ni hypervariable regioner, V1-V9 (Fadrosh et al., 2014; Watson et al., 2014). Dette er områder på genet der DNA-sekvensen vil variere mellom ulike bakterietyper (Gray et al., 1984). De hypervariable områdene er flankert av universelle sekvenser som universelle primere kan feste seg til når mål-DNA i hypervariable områder skal amplifiseres. Slik brukes hypervariable områder av 16S rRNA-genet som biomarkør for å detektere bakterier av ulike arter i en prøve (Janda & Abbott, 2007; Jany & Barbier, 2008).

DNA-sekvensering betyr å bestemme baserekkefølgen i et gen. Illumina MiSeq er neste generasjons sekvenseringsteknologi som kan produsere flere tusen sekvenser samtidig uten å måtte øke kostnadene (Illumina, 2017; Tesin, 2019). I studier utført av Fadrosh et al. (2014) og Porcellato og Skeie (2016) er det først og fremst V3 og V4 (mål-DNA) som har vært av interesse når 16S rRNA-genet skal sekvenseres ved Illumina MiSeq. Selve sekvenseringen skjer på en flow celle med overflatebundne oligonukleotider. Men først består metoden i å preparere et bibliotek der amplifisert mål-DNA fra PCR1, DNA-amplicon, modifiseres av adaptere i 5'- og 3'-ende i det som omtales som PCR2 (Ved helgenomsekvensering består prepareringen også i å fragmentere DNA i størrelsesorden 200-500 bp). Adapteren er satt sammen av en sekvens ytterst som kan binde komplementære oligonukleotider på flow cellen, indeks-primer i midten (index 1 og index 2) og en primer innerst som skal binde DNA-polymerase. Indeksene har en unik sekvens på mellom 8-12 bp som er ligert til alle DNA-amplicon i et bibliotek og gjør det mulig sekvensere flere biblioteker samtidig på den samme flow cellen. Dette kalles multipleksing (Illumina, 2016; Illumina, 2017).

I neste trinn overføres DNA-amplicon til flow cellen. Oligonukleotidene er komplementær til sekvensen i den ytterste regionen av adapteren, og det er dette som gjør at DNA kan feste seg. På flow cellen blir nå DNA-amplicon amplifisert gjennom såkalt «broamplifisering» slik det er

skissert i figur 2.9. Prosessen gjentas til det har blitt amplifisert millioner av kopier av DNA-ampliconet. Dette kalles et kluster (Illumina, 2016; Illumina, 2017).

Deretter skjer sekvenseringen ved at det lages en ny tråd med DNA-ampliconet som templat, som i litteraturen omtales som «sequencing by synthesis» (SBS). Hver kluster produserer sin unike DNA-sekvens. Det tilsettes primere, DNA polymerase og dATP, dGTP, dCTP og dTTP. De ulike nukleotidene er merket med hver sin fluorescerende farge. Nukleotidene er terminerende med en blokkert 3'-ende, som betyr at DNA-polymerase blir hindret i å syntetisere mer enn én nukleotid om gangen. I det denne nukleotiden blir inkorporert avgis det et lyssignal som detekteres som første base i sekvensen. Ikke-inkorporerte nukleotider vaskes bort, før alle fire nukleotider igjen blir tilsatt med ny mulighet for å bli inkorporert som andre base i sekvensen. Etter Illumina MiSeq har man fremstilt flere millioner sekvenser av DNA-amplicon som databehandles ved bruk av bioinformatiske verktøy for å identifisere hvilken bakterieart DNA-sekvensene har likhet med. I de tilfellene det gjøres en helgenomsekvensering, sammenstilles enkeltsekvenser fra alle DNA-fragmentene slik at man får en sammenhengende DNA-sekvens (Illumina, 2017; Sjøberg, 2013).



Figur 2.9. Broamplifisering med Illumina MiSeq. Figuren er hentet og modifisert fra Martin (u.å).

3. Materialer og metoder

3.1 Forberedelser

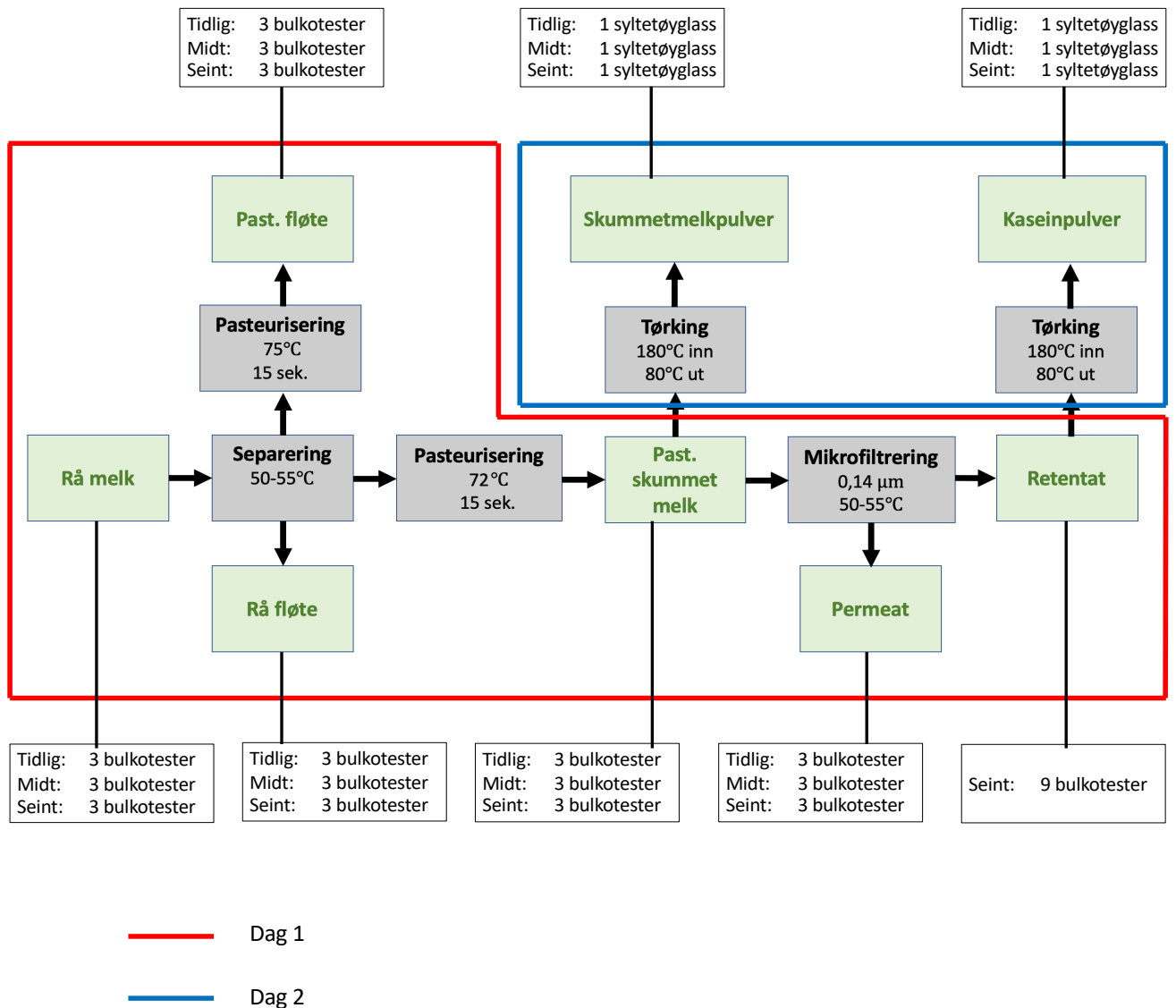
I forkant av selve studien ble det laget faste og flytende medier som bakterier og sporer skulle dyrkes på. Av faste medier ble det laget skåler med RCM-agar og BHI-agar, og av flytende medier ble det preparert RCM-buljong på rør. Sammen med blodagar skulle BHI-agar brukes til kvantifisering av totalantall bakterier i prøvene. Blodagar ble bestilt inn fra en ekstern leverandør. RCM-agar skulle brukes til rendyrking av bakteriekolonier, som senere skal identifiseres på Maldi-Tof når denne oppgaven er levert. Rørene med RCM-buljong skulle brukes til å dyrke opp Klostridier og sekvensere disse, samt brukes i MPN-analysen.

Når det ble laget medier var det viktig å jobbe sterilt for å unngå uønsket bakterievekst på mediene. BHI-agar ble laget fra Brain heart infusion (Oxoid, UK) og agar-pulver (VWR Chemicals) i blandingsforholdet 37 g BHI og 15 g agar-pulver i 1 liter destillert vann. RCM-agar ble laget fra Reinforced Clostridial Medium (Oxoid, UK) og agar-pulver (VWR Chemicals) i blandingsforholdet 38 g RCM og 15 g agar-pulver i 1 liter destillert vann. Blandingene ble posisjonert på flasker og autoklavert, før det ble helt over på petriskåler.

RCM-rørene ble laget etter Tine sin prosedyre «Reinforced Clostridial Medium (RCM-rør), medium til anaerobe sporedannere. Tillaging» (Ødegård, 2015).

3.2 Prøveinnsamling

Rå melk ble vinteren 2020 hentet fra Ås gård i uke 7 (uttak 1), 9 (uttak 2) og 11 (uttak 3), og avlevert til pilotanlegget ved NMBU. Figur 3.1 viser hvordan melka ble behandlet i ulike prosesser og hvordan prøver ble samlet inn langs produksjonslinjen. De grå boksene illustrerer prosessen og de grønne boksene illustrerer hvilke prøver som ble analysert. På dag 1 ble rå melka separert i fløte og skummet melk, før fløten ble pasteurisert ved 75°C grader i 15 sekunder og skummet melka ble pasteurisert ved 72°C i 15 sekunder. Pasteurisert skummet melk ble så mikrofiltrert ved en porediameter på 0,14 µm og separert i retentat og permeat. Denne dagen ble det samlet inn prøver i 3 bulkotester à 100 mL av rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte (med unntak av uttak 1), pasteurisert skummet melk, permeat og retentat. Det ble samlet inn prøver tidlig, midt og seint prosessen, med unntak av for retentat hvor det ble samlet inn prøver kun seint i prosessen. 1-2 bulkotester ble brukt videre til prøvepreparering, mens 1-2 bulkotester ble fryst ned ved -40°C som back up. På dag 2 ble pasteurisert skummet melk og retentat tørket til henholdsvis skummetmelkpulver og kaseinpulver med 2-steps spraytørke med agglomerering. Temperaturen i tørkekammeret var ca. 180°C, og etter tørking ble pulveret kjølt ned til ca. 80°C. Denne dagen ble det samlet inn 1 glass melkepulver tidlig, midt og seint i prosessen. Dette var syltetøyglass med kork som på forhånd var blitt autoklavert. Prøvene fra dag 1 ble preparert videre samme dag, mens melkepulverprøvene fra dag 2 ble oppbevart kjøling for videre preparering en annen dag.



Figur 3.1. Flytskjema over prosess og prøveinnsamling. De grå boksene illustrerer prosessen og de grønne boksene illustrerer prøvene som ble analysert. På dag 1 ble det samlet inn rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte, pasteurisert skummet melk, permeat og retentat. På dag 2 ble det samlet inn skummetmelkpulver og kaseinpulver. Rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte, pasteurisert skummet melk og permeat ble samlet inn tidlig, midt og seint i prosessen à 3 bulkotester. Retentat ble samlet inn seint i prosessen à 9 bulkotester. Skummetmelkpulver og kaseinpulver ble samlet inn tidlig, midt og seint i prosessen à 1 syltetøyglass.

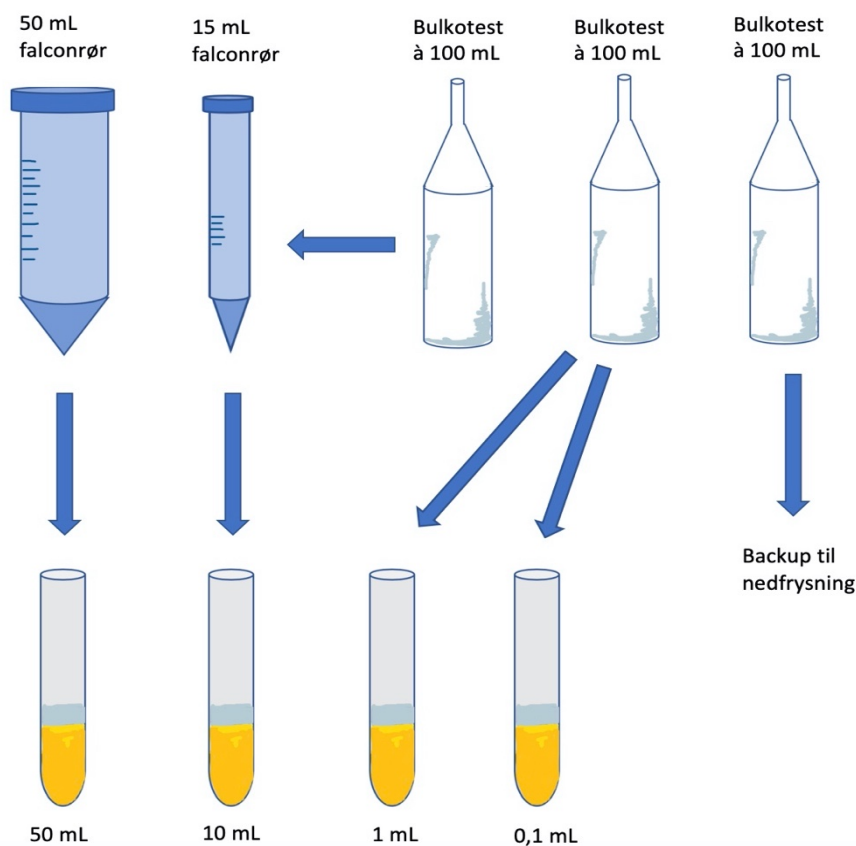
Fra permeatet tidlig, midt og seint i prosessen ble det også tatt prøve til analyse av proteiner som en kontroll på membranens filtreringsevne. Permeatet ble kjørt på kapillærelektroforese slik at proteiner med ulik størrelse kunne separeres fra hverandre og detekteres. Om det ikke ble detektert kaseinproteiner i permeatet var dette en indikasjon på at kaseinene ble holdt tilbake av membranens, og membranens hadde slik god filtreringsevne. Analysen ble utført av avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani.

3.3 Prøvepreparering

3.3.1 Dyrkning på RCM-rør

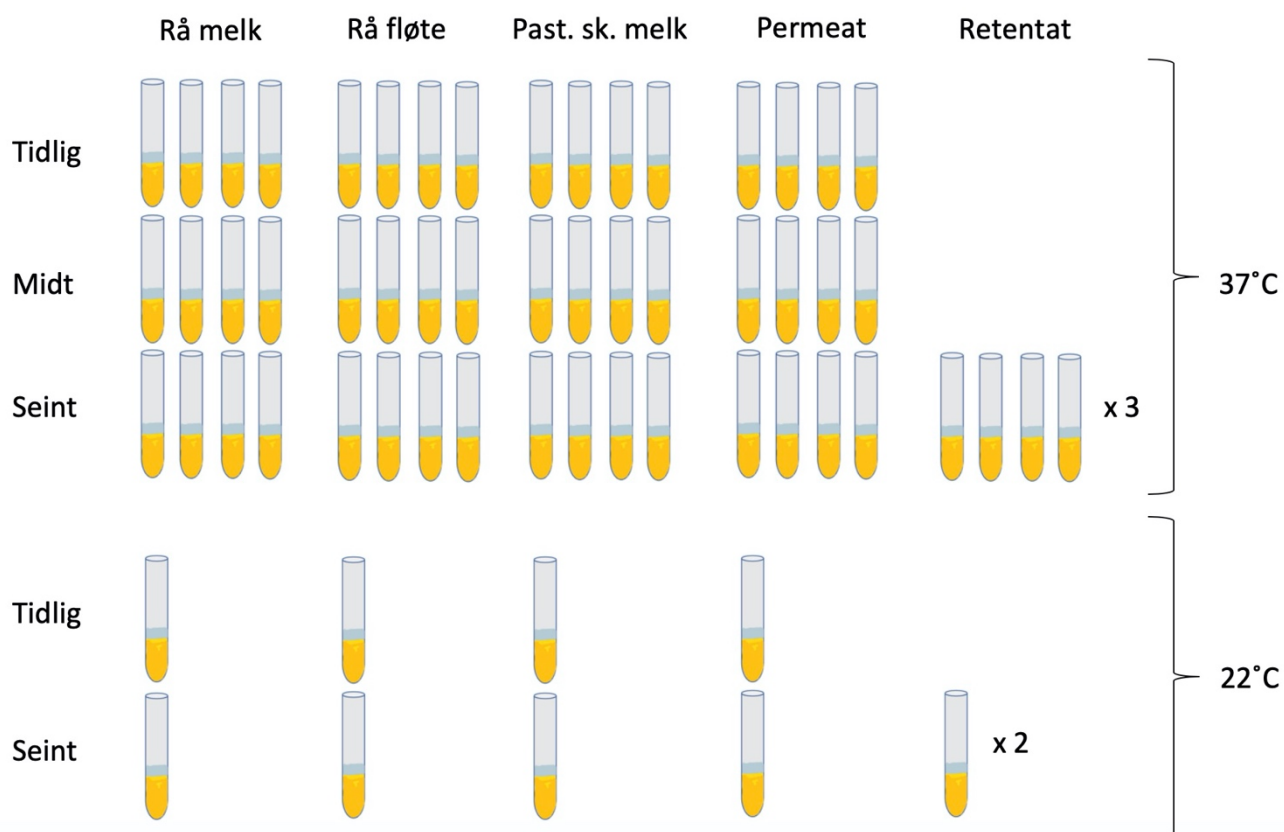
Prøvene fra dag 1 ble preparert videre slik de var. Melkepulverprøvene fra dag 2 måtte løses i sitratvann før videre preparering til en 10^{-1} -fortynning ved å løse 27,7 g melkepulver i 250 mL sitratvann. Prøvene ble preparert for dyrkning på glassrør med kork tilsatt RCM-buljong og parafin/vaselin etter TINE sin prosedyre «Anaerobe sporedannere (clostridier) i råmelk og ystemelk, 9-rørs-prøve med RCM» (Ødegård, 2016). I tillegg ble det i denne studien ved uttak 1 preparert rør fra 50 mL prøvemateriale: 50 mL og 10 mL prøve ble oppkonsentrert i henholdsvis 50 mL og 15 mL falconrør ved sentrifugering på 4500 rpm med swing-out rotor i 15 minutter (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R). Supernatanten ble helt av, pelleten ble resuspendert i 1 mL Ringers løsning og overført til glassrør med RCM-buljong.

Figur 3.2 illustrerer oppsettet for en prøve (rå melk), for eksempel tidlig i prosessen ved uttak 1. I alt ble det samlet inn 3 bulkotester à 100 mL for denne ene prøve. Fra bulkotestene ble det tatt ut 50 mL og 10 mL for videre oppkonsentrering på henholdsvis 50 mL og 15 mL falconrør, mens 1 mL og 0,1 mL ble overført direkte til RCM-rørene. 1-2 bulkotester ble fryst ned ved ca. -40°C som backup. RCM-rørene med prøvemateriale ble så varmebehandlet ved 80°C i 13 minutter i vannbad. Til slutt ble totalt 4 glassrør med prøvemateriale (0,1 mL, 1 mL, 10 mL og 50 mL) inkubert ved 37°C i 3 dager.



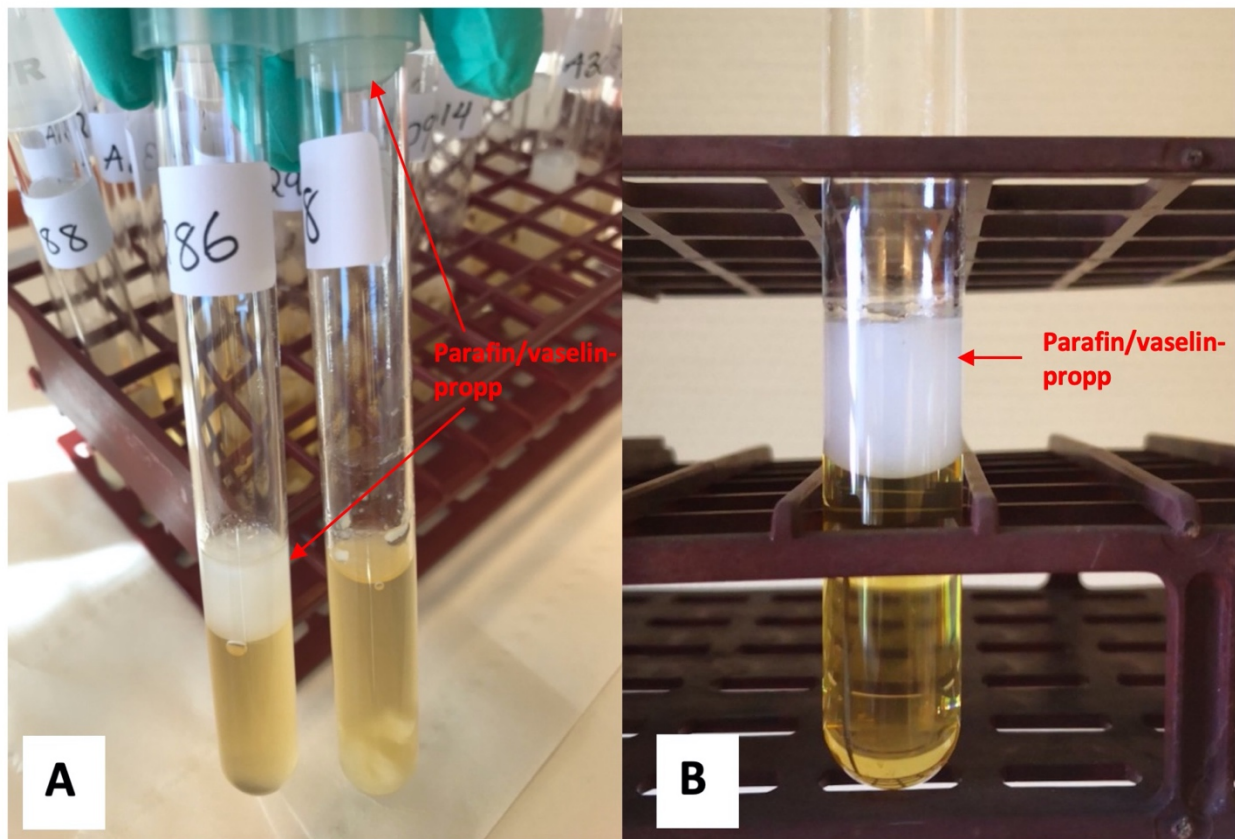
Figur 3.2. Forsøksoppsettet for rå melk fra tidlig i prosessen fra uttak 1. 50- og 10 mL prøvene ble oppkonsentrert på henholdsvis 50 mL og 15 mL falconrør for så å bli overført til RCM-rørene. 1 mL og 0,1 mL prøvene ble overført direkte til RCM-rørene fra bulktesten.

I tillegg til å inkubere prøver på 37°C, ble det også preparert ett sett til inkubering på 22°C i 4 dager. Figur 3.3 viser hele forsøksoppsettet for 37°C og 22°C på dag 1 fra uttak 1. For hver prøve inkubert ved 37°C ble det preparert prøver på 50 mL, 10 mL, 1 mL og 0,1 mL (4 rør) fra tidlig, midt og seint i prosessen. For hver prøve inkubert ved 22°C ble det kun preparert prøver på 50 mL fra tidlig og seint i prosessen (midt i prosessen ble utelatt på grunn av mangel på RCM-rør). Fra uttak 2 og uttak 3 dag 1 ble det i tillegg preparert prøver fra pasteurisert fløte, og 50 mL prøvene ble utelatt i forsøksoppsettet da det fra uttak 1 hadde blitt observert god vekst både på 50 mL og 10 mL. 10 mL prøvene fra uttak 2 og 3 ble fremdeles oppkonsentrert på 15 mL falconrør. For alle melkepulverprøvene inkubert ved 37°C fra alle uttakene på dag 2 ble det imidlertid preparert prøver på 50 mL, 10 mL, 1 mL og 0,1 mL fra tidlig midt og seint i prosessen på samme måte som figur 3.3 viser. For melkepulverprøvene inkubert ved 22°C fra alle uttakene ble det preparert prøver på 50 mL fra tidlig, midt og seint i prosessen.



Figur 3.3. Forsøksoppsett dag 1 uttak 1. Det ble preparert 50-, 10-, 1- og 0,1 mL prøver (4 rør) fra rå melk, rå fløte, pasteurisert skummet melk og permeat tidlig, midt og seint i prosessen til inkubering på 37°C. Fra retentat ble det preparert 50-, 10-, 1- og 0,1 mL prøver kun seint i prosessen. For prøver inkubering ved 22°C ble det kun preparert 50 mL prøve fra rå melk, rå fløte, pasteurisert skummet melk og permeat tidlig og seint i prosessen. Fra retentat ble det preparert 50 mL prøver fra kun seint i prosessen.

Etter inkubering ble det notert hvilke prøver som var positive på vekst ved å observere hvilke prøver som hadde gassproduksjon (og var blakket) og hvilke prøver som kun hadde blakket buljong. Prøver som var negative på vekst ble det ikke observert gassproduksjon fra og buljongen var helt klar. Figur 3.4 viser et eksempel på hvordan prøvene ble avlest. I figur 3.4A observeres to positive prøver: En prøve med gassproduksjon og blakking (til høyre) og en prøve uten gassproduksjon men buljongen var blakket (til venstre). Gassproduksjon kunne ses ved at parafin/vaselinproppen hadde forsvunnet oppover i glasset og dannet en luftbarriere mellom blakket buljong og parafin/vaselin. Av og til hadde parafin/vaselinproppen også forsvunnet helt opp i korken. I figur 3.4B observeres en prøve uten gassproduksjon og buljongen var heller ikke blakket (helt klar). Denne prøven ble oppfattet som negativ og ble ikke analysert videre.



Figur 3.4. Avlesning av rør. (A) Prøve med gassproduksjon (til høyre) og prøve uten gassproduksjon men buljongen var blakket (til venstre). Gassproduksjon kunne tydelig ses fordi parafin/vaselin-proppen hadde forsvunnet opp i korken etter 3 dagers inkubering. I den andre prøven uten gassproduksjon hadde ikke parafin/vaselin-proppen beveget seg, men buljongen var likevel blakket. Meieriindustrien ville oppfattet prøven til høyre som positiv og prøven til venstre som negativ, men i denne studien ble begge prøvene oppfattet som positiv. (B) En prøve ble oppfattet negativ når det ikke ble observert gassproduksjon og buljongen var helt klar.

Prøver med vekst ble preparert videre for DNA-ekstraksjon ved å overføre 1 mL prøve til 1,5 mL eppendorfrør. For å få tilgang til prøvematerialet i bunn av glassrørene måtte parafin/vaselin-proppen fjernes ved hjelp av sterile vattpinner (VWR® Critical Swab® Swab, Small Foam-Over Cotton Head, USA). Eppendorfrørene ble så sentrifugert ved 16000 x g i 3 minutter i sentrifuge for eppendorfrør (Centrifuge 5424, USA). Supernatanten ble helt av og pelleten ble resuspendert i 1 mL sitratvann for videre vask gjentatt 1-2 ganger. Til slutt ble vasket pellet fryst ned ved -20°C.

Før RCM-rørene ble kastet ble det tatt ut prøver fra rørene for rendyrking på RCM-agar. For rør som i forkant hadde inkubert ved 37°C, ble agarene inkubert videre i anaerobe kar i inkubatorskap på temperatur 37°C i 3 dager. For rør som i forkant hadde inkubert ved 22°C, ble agarene inkubert videre i anaerobe kar i inkubatorskap på temperatur 22°C i 4 dager. Isolater

fra agarene ble overført til eppendorf tilsatt 600 µL RCM-buljong og 600 µL 30% glyserol, for så å bli fryst ned ved -20°C.

3.3.2 Dyrkningsuavhengig prøvepreparering

50 mL av prøvene ble overført til falconrør for videre dyrkningsuavhengig DNA-sekvensering. Prøvene ble sentrifugert ved 4500 rpm på swing-out rotor i 15 minutter, supernatanten ble helt av og pelleten resuspendert i 1 mL Ringers løsning. Deretter ble løsningen overført til 1,5 mL eppendorfrør og sentrifugert ved 16000 x g i 3 minutter i sentrifuge for eppendorfrør (Centrifuge 5415 D, USA). Supernatanten ble helt av og pelleten resuspendert i 1 mL sitratvann for vask gjentatt 2 ganger. Til slutt ble vasket pellet fryst ned for videre DNA-ekstraksjon.

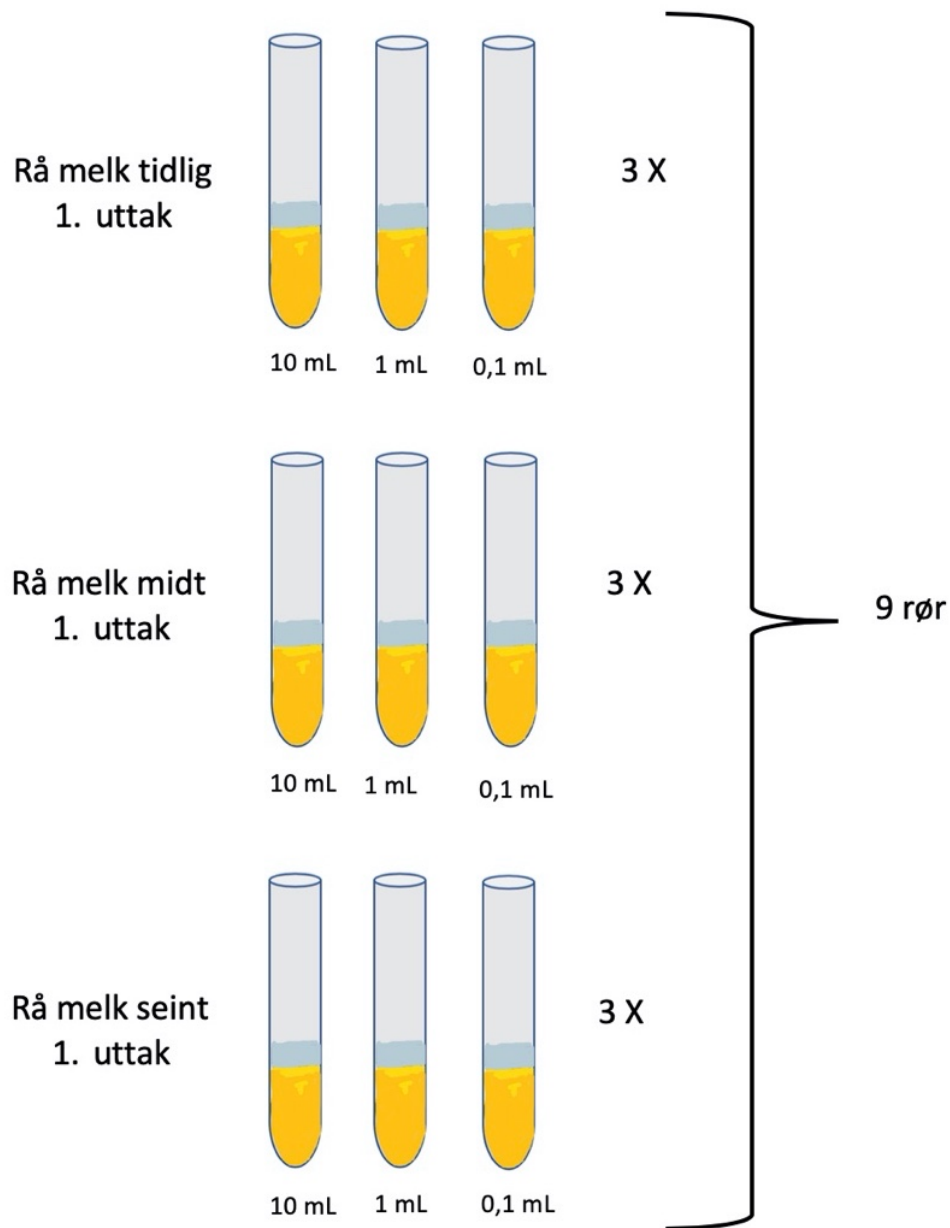
Resultatene fra dyrkningsuavhengig metode var mangelfulle og er derfor utelatt i resultatkapittelet. Det er ikke usannsynlig at årsaken til mangelfulle resultater er labtekniske feil ved DNA-ekstraksjon eller feil validering av PCR-resultater. I en normalsituasjon ville prøvene blitt analysert på nytt, men omstendighetene denne våren gjorde dette praktisk vanskelig å gjennomføre. Forsøk med dyrkningsuavhengig metode bør gjennomføres på et senere tidspunkt.

3.4 Platetelling

Like etter ankomst pilotanlegget ble det fra prøvene midt i prosessen laget en 10-gangersfortynningsserie for overflatespredning på BHI- og blodagar. Fra hver fortynning ble det ved bruk av en engangsbøyle av plast sådd ut i to paralleller. Agarene ble så inkubert ved 37°C i 2 døgn. Plater med kolonier mellom 30 og 300 ble talt, og ut ifra fortynningsfaktoren ble antall kolonidannede enheter per milliliter (kde/mL) i original prøven estimert. Svaret ble rapportert i log kde/mL melk eller 0,1 g melkepulver.

3.5 Kvantifisering av antall sporer

For kvantifisering av antall sporer i prøvene og for å se hvordan sporeantallet endret seg gjennom produksjonslinjen ble MPN utregnet fra 10-, 1- og 0,1 mL prøvene fra alle uttakene etter samme 9-rørsmetoden som meieriindustrien bruker for kvantifisering av anaerobesporer i ystemelk (Ødegård, 2016). Tidlig, midt og sent i prosessen ble betraktet som 3 replikater slik eksempelet i figur 3.5 illustrerer. Ødegård (2016) sin MPN-tabell ble brukt i beregningene.

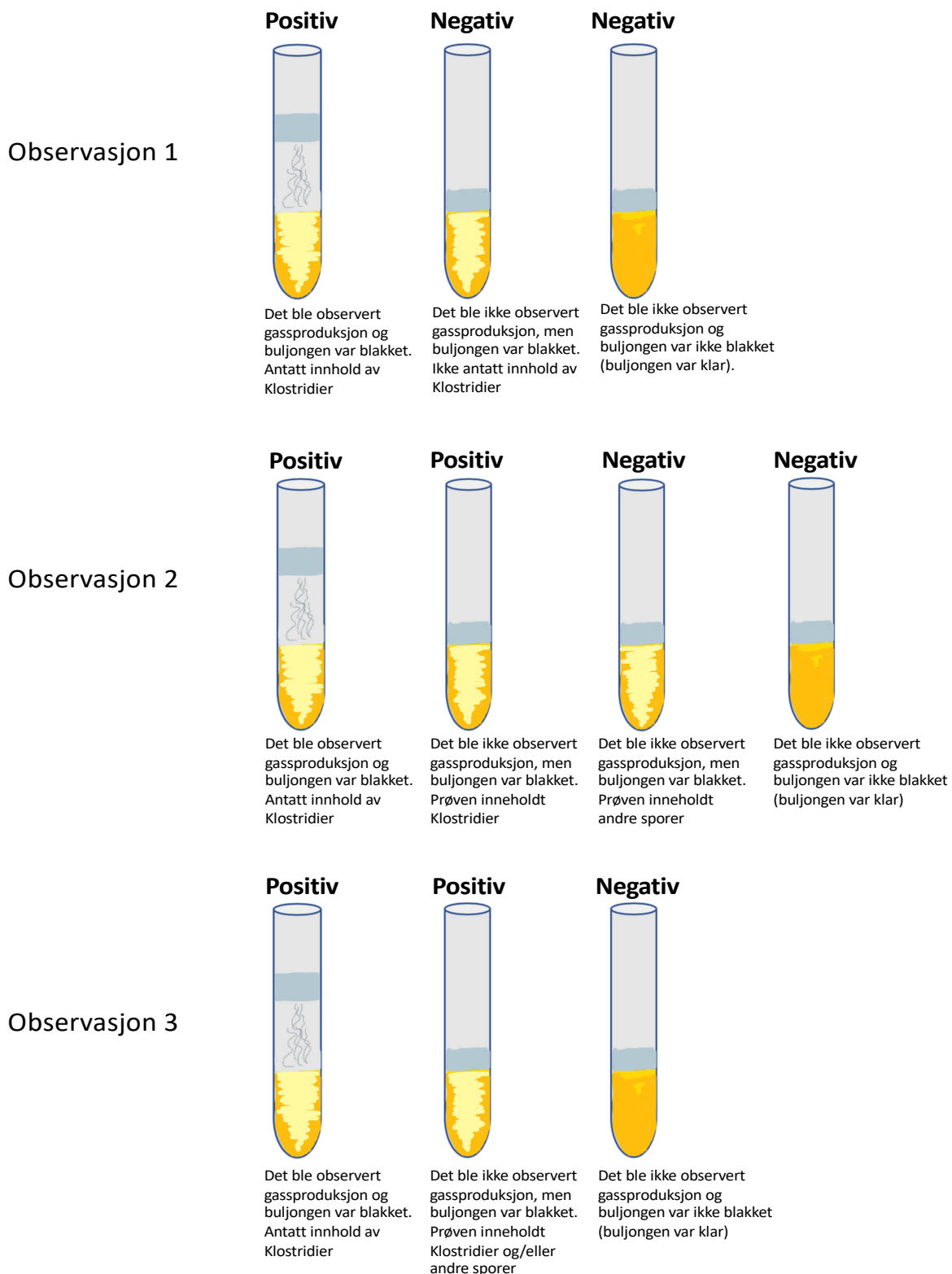


Figur 3.5. Oppsett for 9-rørsmetoden med eksempel for rå melk fra uttak 1. Tidlig, midt og seint i prosessen ble betraktet som 3 replikater.

Meieriindustrien definerer et rør som positivt dersom det observeres gassproduksjon der det antas at røret vil inneholde Klostridier (et positivt rør med hensyn til gassproduksjon vil også alltid være blakket på grunn av bakterievekst). I denne studien ble det også gjort et hypotetisk forsøk på hvordan MPN-tallet ville sett ut dersom også rør med blakket buljong (uten gassproduksjon) ble oppfattet som positive. Rør som verken hadde gassproduksjon eller der buljongen var helt klar ble oppfattet som negativ.

MPN ble beregnet med hensyn til at kun blakkede prøver inneholdt Klostridier (detektert fra sekvenseringsforsøket), og en studie der den blakkede prøven inneholdt Klostridier /eller andre sporer. Totalt ble det beregnet MPN-tall fra 3 observasjoner slik figur 3.6 illustrerer:

1. «Røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (med blakking)»
2. «Røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (buljongen var også blakket), eller dersom det ble observert blakket buljong (uten gassproduksjon) gitt at prøven inneholdt Klostridier».
3. «Røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (med blakking), eller dersom det ble observert blakket buljong (uten gassproduksjon) der prøven inneholdt Klostridier og/eller andre sporer».



Figur 3.6. Rør ble oppfattet som positive i henhold til 3 ulike observasjoner. Observasjon 1: «Røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (med blakking)». Observasjon 2: «Røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (buljongen var også blakket), eller dersom det ble observert blakket buljong (uten gassproduksjon) gitt at prøven inneholdt Klostridier». Observasjon 3: «Røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (med blakking), eller dersom det ble observert blakket buljong (uten gassproduksjon) der prøven inneholdt Klostridier og/eller andre sporer».

3.6 DNA-ekstraksjon

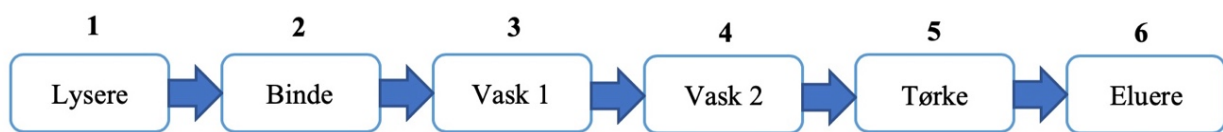
DNA-ekstraksjon ble utført ved å ta i bruk to ulike metoder. For dyrkningsavhengig metode ble det benyttet Mag midi kit (Katalognummer: 40402)(LGC). Ekstraksjonen ble utført slik det står beskrevet i protokollen med noen justeringer med hensyn til volum reagenser. Fremgangsmåten slik den ble utført er beskrevet under. DNA-ekstraksjon med hensyn til dyrkningsuavhengig metode ble utført slik det står beskrevet i protokollen til DNeasy[®] PowerFood[®] Microbial Kit (Katalognummer: 21000-100-MON)(Qiagen).

3.6.1 DNA-ekstraksjon for dyrkningsavhengig metode etter Mag midi kit

I forkant av ekstraksjonen ble nedfrost pellet løst i 200 µL lysisbuffer med innhold av 50 mM Tris (pH 8,0) og 50 mM EDTA (pH 8,0), for så å bli overført til rør à 2 mL tilsatt 0,5 g glasspon (Sigma, USA). DNA ble gjort tilgjengelig ved at bakteriepelleten ble mekanisk lysert i FastPrep96TM-maskin (USA) i 3x50 sekunder ved 1800 rpm. Deretter ble rørene sentrifugert i eppendorfsentrifuge (Centrifuge 5424, Germany) ved 16000 x g i 3 minutter. Slik sedimenterte glasspon og større celleorganeller, mens DNA og rester fra bakteriecellen la seg i supernatanten. 50 µL av supernatanten ble overført til riktig brønn i en 96-brønnsplate klar for videre DNA-ekstraksjon.

Det ble brukt en 8-kanalsmultipipette da reagenser skulle overføres til 96-brønnsplaten. Figur 3.7 skisserer trinnene 1-6 som inngikk i DNA-ekstraksjonen slik det er beskrevet i Mag midi kitet: Ved lyseringssteget (1) ble 50 µL lysisbuffer (Lysis buffer BLm) og 5 µL protease tilsatt 96-brønnsplaten, før platen ble inkubert ved 55°C i 10 minutter på varmeblokk. 96-brønnsplaten ble forseglet med plastfilm for å unngå fordamping av prøvene. Etter inkubering ble det tilsatt 50 µL etanol og 16 µL magnetpartikkelløsning (mag particle suspension BLm) til hver brønn som DNA kunne binde seg til (2). Prøvene ble mikset forsiktig ved å pipettere opp og ned totalt fem ganger, for så å inkubere i 2 minutter ved romtemperatur. Deretter ble 96-brønnsplaten plassert på en magnet slik at magnetpartikkelløsningene formet en pellet der hvor magnetplaten var i kontakt med brønnen. Den øvrige supernatanten ble fjernet og kastet ved bruk av en 8-kanalsmultipipette. Så ble 96-brønnsplaten ført bort fra magneten, og pelleten ble resuspendert i 100 µL vaskebuffer 1 (Wash buffer BLm 1)(3). Platen ble inkubert i 10 minutter ved romtemperatur, før 96-brønnsplaten igjen ble ført i kontakt med magneten slik at magnetpartikkelløsningen formet en pellet og supernatanten ble fjernet og kastet. Denne gangen ble pelleten resuspendert i 100 µL vaskebuffer 2 (Wash buffer BLm 2)(4). Prosedyren ble

gjentatt en gang til med vaskebuffer 2. Etter siste vask ble pelleten tørket ved 55°C i 6 minutter på varmeblokken, uten at 96-brønnsplaten ble forseglet med plastfilm for at mest mulig av vaskebufferen skulle fordampe (5). Tørket pelleten ble resuspendert i 50 µL elueringsbuffer (Elution buffer BLM), og inkubert med plastfilm over brønnene ved 55°C i 10 minutter (6). Nå var det nødvendig med plastfilm for å unngå at eluat med DNA skulle fordampe bort. 96-brønnsplaten ble så ført i kontakt med magneten for siste gang og etter ca. 3 minutter hadde magnetpartiklene formet en pellet. Til slutt ble så mye som mulig av eluatet fjernet og overført til en ny 96-brønnsplate for videre PCR.



Figur 3.7. DNA-ekstraksjon for dyrkningsuavhengig metode. Figuren er hentet og modifisert fra Mag midi kit (LGC).

3.7 16S rRNA amplicon sekvensering

For PCR1 ble de universelle primerne Uni430F (5'- CCTACGGGRBGCASCAG - 3') og Bac806R (5'- GGACTACYVGGGTATCTAAT - 3') brukt for å amplifisere V3 og V4 av 16S rRNA-genet hos bakteriene i prøven (Porcellato et al., 2017). DNA ble amplifisert i henhold til qPCR og Eva Green ble brukt som fluorescerende fargestoff. PCR-mastermiksen ble preparert etter tabell 3.1 og applisert til en 96-brønnsplate for amplifisering på LightCycler 480 II (Roche, Sveits) etter følgende PCR-program: Initiell denaturering ved 98°C i 30 sekunder, etterfulgt av 35 sykluser med denaturering ved 98°C i 10 sekunder, hybridisering ved 53°C i 15 sekunder og syntetisering i 72°C i 10 sekunder.

Tabell 3.1. Konsentrasjon av reagens i lagerløsning og per prøve, samt volum (μL) reagenser per prøve for kjøring på PCR1.

Reagens	Konsentrasjon i lagerløsning	Konsentrasjon per prøve	Volum (μL) per prøve
Q5 Buffer master-mix	2 x	1 x	10
16SF	5 μM	0,5 μM	2
16SR	5 μM	0,5 μM	2
Eva Green	20 x	1 x	1
Vann			2
DNA			3

Rensing av PCR-produkt, PCR2, normalisering, kvantifisering, Illumina MiSeq sekvensering og bioinformatikk ble utført av postdoc Davide Porcellato ved NMBU. Produkt ble renset med 0,8 x Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc, USA) slik det står beskrevet i Beckman Coulter (2016) sin prosedyre, men med noen endringer i forhold til volum reagenser: det ble brukt 150 μL etanol og 20 μL elueringsbuffer (50 μL siste gang). 2 μL av renset PCR-produkt ble brukt som templat for PCR2 med unike indeks-primere 1 og 2. PCR-mastermiksen ble preparert etter tabell 3.2 og applisert til en 96-brønnsplate for amplifisering på LightCycler 480 II (Roche, Sveits) etter følgende PCR-program: Initiell denaturering ved 98°C i 30 sekunder, etterfulgt av 12 sykluser med denaturering ved 98°C i 10 sekunder, hybridisering ved 57°C i 15 sekunder og syntetisering i 72°C i 10 sekunder. PCR-produktet ble så renset og normalisert ved bruk av SequelPrep Normalization Plate (96) Kit (Thermo Fisher Scientific, Norge) slik det står beskrevet i manualen til Invitrogen (Invitrogen Corporation, 2008). Renset og normalisert bibliotek ble så kvantifisert med Kapa library quantification Kit (Roche, USA) på LightCycler 480 II (Roche, Sveits) og sekvensert på Illumina MiSeq (Illumina, USA).

Tabell 3.2. Konsentrasjon av reagens i lagerløsning og per prøve, samt volum (μL) reagenser per prøve for kjøring på PCR2.

Reagens	Konsentrasjon i lagerløsning	Konsentrasjon per prøve	Volum (μL) per prøve
Q5 Buffer master-mix	2 x	0,9 x	10
16SF	5 μM	0,05 μM	0,2
16SR	5 μM	0,05 μM	0,2
Index N7XX	5 μM	0,5 μM	2
Index S5XX	5 μM	0,5 μM	2
Eva Green	20 x	0,9 x	1
Vann			3
DNA			2

3.8 Databehandling

Kvalitetssikring og normalisering av sekvensdata ble utført av postdoc Davide Porcellato slik det står beskrevet i Skeie et al. (2019). Total ble det analysert 360 ulike sekvensvarianter (SV) av 16S rRNA fra prøvene. De sekvensvariantene som hadde mindre enn 375 basepar i sekvensen og som det ikke ble detektert mer enn 10 sekvenser av, ble utelatt fra den videre kartleggingsanalysen. Total ble 254 kvalitetssikrede sekvensvarianter analysert videre, og de som utgjorde 0,5% av disse ble videre identifisert ved å gjøre et Nucleotidic Basic Local Alignment Search Tool (nBLAST) på National Center for Biotechnology Information (NCBI) sin nettside (National Center for Biotechnology Information, u.å). BLAST-søket ble utført i databasen «reference RNA sequences (refseq_rna). Sekvensvarianten (query) ble identifisert til den bakteriearten i databasen som den hadde høyest prosentidentitet med. Identifiserte sekvensvarianter ble organisert i et fylogenetisk tre på nettsiden til Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences, MAFFT version 7 (MAFFT, u.å).

4. Resultater

I dette kapitlet presenteres resultatene fra denne studien. I kapittel 4.1 gis det en oversikt over resultatene fra dyrkningsforsøket, som presenteres nærmere i kapittel 4.4-4.6. Dette kapitlet tar for seg resultatene fra dyrkningsavhengig metode med hensyn til hvilke arter som ble detektert og hvordan deres overlevelse var gjennom produksjonslinjen. I kapittel 4.2 presenteres totalantall bakterier i prøvene og hvordan dette endret seg gjennom produksjonslinjen. Kapittel 4.3 tar for seg sannsynlig antall sporer i de ulike prøvene beregnet fra MPN-tabellen og hvordan sporeantallet endret seg gjennom produksjonslinjen med hensyn til observasjon 1, 2 og 3. I kapittel 4.7 presenteres sammenhengen mellom gassproduksjon og prøvens innhold av Klostridier. Resultatet fra dyrkningsuavhengig metode presenteres kun i vedlegg 8.

4.1 Vekst eller ikke vekst

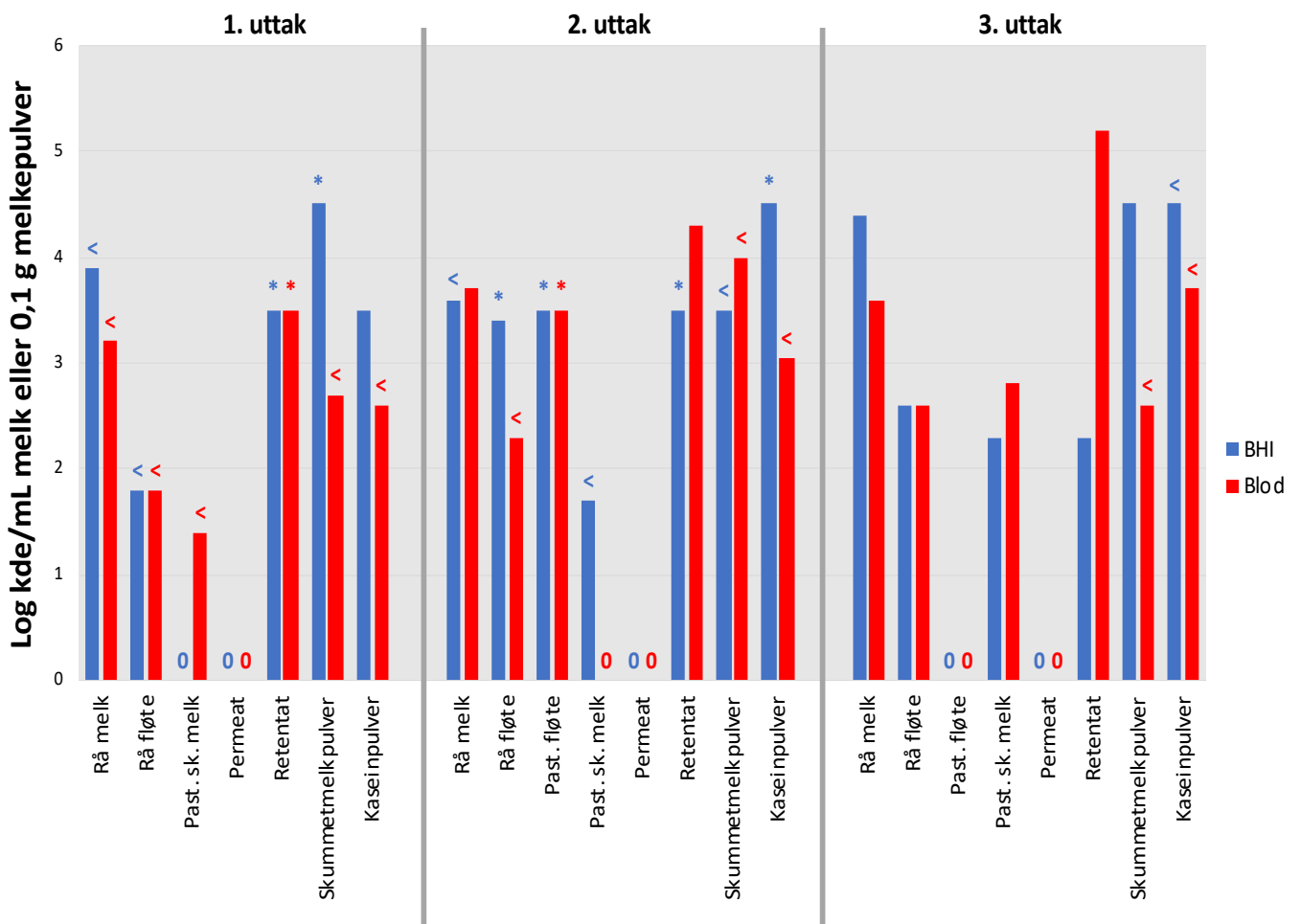
For dyrkningsavhengig metode ble alle prøver inkubert anaerobt på RCM-buljong ved 37°C og 22°C i henholdsvis 3 og 4 dager. Det vises til vedlegg 1 for en fullstendig oversikt over alle prøver som inngikk i dyrkningsforsøket, fra hvilke prøver det ble observert gass, fra hvilke prøver det kun ble observert blakket buljong og hvilke prøver som ikke hadde noe vekst. Fra alle prøver der det ble observert vekst i form av gassproduksjon (og blakking) eller kun blakking (uten gassproduksjon), ble DNA-ekstrahert og amplifisert. Det var imidlertid ikke alltid det ble dannet PCR-produkter fra amplifikasjonen, og disse ble derfor ikke videre DNA-sekvensert. Etter sekvensering og normalisering hadde noen prøver mindre enn 1000 sekvenser, og disse ble heller ikke tatt med i den videre kartleggingsanalysen. Hvilke prøver dette gjelder er merket i vedlegg 1.

Fra hvert uttak ble det tatt prøve fra permeat tidlig, midt og seint i prosessen til analyse av protein på kapillærelektroforese. Vedlegg 2, 3 og 4 viser elektroferogrammene for henholdsvis uttak 1, 2 og 3. Alle uttakene viser at det ble detektert proteiner etter 20-25 minutter, og disse proteinene viste seg å være myseproteinene α -laktalbumin og β -laktoglobulin. Det ble ikke detektert kaseinproteiner i permeatet fra noen av uttakene.

4.2 Totalantall bakterier

Under prøvepreparering ble 27,7 g melkepulver løst i 250 mL sitratvann, som tilsvarer omtrent 0,1 g melkepulver/mL sitratvann. For melkepulverprøvene oppgis derfor totalantall bakterier i log kde/0,1 g melkepulver, mens for rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte, pasteurisert skummet melk, retentat og permeat oppgis totalantall bakterier i log kde/mL melk. Totalantall bakterier ble estimert ved overflatespredning på BHI- og blodagar inkubert aerobt ved 37°C i 2 dager. Ved å bruke BHI- og blodagar får man et bilde på den totale sammensetningen av bakteriearter i prøven.

Figur 4.1 viser totalantall bakterier i rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte (med unntak av uttak 1), pasteurisert skummet melk, permeat og retentat, skummetmelkpulver og kaseinpulver fra uttak 1, 2 og 3. For hver prøve ble det sådd ut på BHI-agar (blå søyle) og blodagar (rød søyle). Noen av estimatene er innbefattet med en viss usikkerhet da det i en del tilfeller ble telt mindre enn 30 kolonier på platen (<) eller platen var overgrodd som gjorde det vanskelig å telle kolonier (*). Figuren gir et bilde på hvordan totalantall bakterier endret seg gjennom produksjonslinjen.



Figur 4.1 Totalantall bakterier (log kde/mL melk eller 0,1 g melkepulver) i rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte (med unntak av uttak 1), pasteurisert skummet melk, permeat, retentat, skummetmelkpulver og kaseinpulver fra uttak 1, 2 og 3. Bakteriantallet i en prøve ble estimert ved å telle kolonier på agar av BHI (blå søyle) og blod (rød søyle). Fra de platene det ble telt mindre enn 30 kolonier er sløylen markert «<», mens når skålen var overgrodd er søylen markert «*». Fra de platene det ikke ble telt noen kolonier er markert «0».

Figur 4.1 viser at fra de fleste prøvene der det ble telt kolonier fra begge agarene var totalantall bakterier noe varierende mellom BHI- og blodagar, med unntak av rå fløte og retentat fra uttak 1, pasteurisert fløte fra uttak 2 og rå fløte fra uttak 3. Her var totalantall bakterier likt mellom agarene. Det ble ikke detektert vekst i permeat fra noen uttak. Det ble heller ikke detektert vekst i pasteurisert skummet melk på BHI-agar fra uttak 1, i pasteurisert skummet melk på blodagar fra uttak 2 og fra uttak 3 ble det ikke detektert vekst i pasteurisert fløte på noen av agarene.

Fra alle uttakene ble totalantall bakterier beregnet til å være høyere i rå melk enn i rå fløte, pasteurisert fløte og pasteurisert skummet melk. Totalantall bakterier i pasteurisert fløte fra uttak 2 ble beregnet til å være høyere på begge agarene sammenlignet med pasteurisert

skummet melk. Ellers var totalantall bakterier fra alle uttakene på BHI- og blodagar økende fra pasteurisert skummet melk til skummetmelkpulver og fra pasteurisert skummet melk til retentat. Fra uttak 2 og 3 var totalantall bakterier på BHI-agar for kaseinpulver beregnet til å være høyere sammenlignet med skummetmelkpulver, noe som også ble observert for blodagar fra uttak 3. For uttak 1 og 2 ble derimot totalantall bakterier i kaseinpulver på blodagar beregnet til å være lavere sammenlignet med skummetmelkpulver.

4.3 MPN

MPN ble beregnet i henhold til 3 observasjoner: «Røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (med blakking)» (observasjon 1), «røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (buljongen var også blakket), eller dersom det ble observert blakket buljong (uten gassproduksjon) gitt at prøven inneholdt Klostridier» (observasjon 2) og «røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon (med blakking), eller dersom det ble observert blakket buljong (uten gassproduksjon) der prøven inneholdt Klostridier og/eller andre sporer» (observasjon 3). Under prøvepreparering ble 27,7 g melkepulver løst i 250 mL sitratvann, som tilsvarer omtrent 10 g melkepulver per 100 mL sitratvann. Tabell 4.1 viser beregnet MPN per 100 mL melk/10 g melkepulver for disse 3 observasjonene for alle prøver ved uttak 1, 2 og 3. Tabellen gir et bilde på hvordan sporeantallet med hensyn til disse 3 observasjonene endret seg gjennom produksjonslinjen. Tabellen er laget med utgangspunkt i beregninger i vedlegg 5, 6 og 7. For observasjon 2 hendte det at noen rør med observert vekst ikke ble sekvensert fordi det ikke hadde blitt dannet PCR-produkter. Man kunne derfor ikke være sikre på om prøven inneholdt Klostridier. MPN-tallet for observasjon 2 var derfor innbefattet med en viss usikkerhet. Hvilke prøver dette gjelder er merket i tabellen i vedlegg 6.

Tabell 4.1. MPN per 100 mL melk/10 g melkepulver utregnet i henhold til observasjon 1, 2 og 3 for rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte (med unntak av uttak 1), pasteurisert skummet melk, permeat, retentat, skummetmelkpulver og kaseinpulver fra uttak 1, 2 og 3.

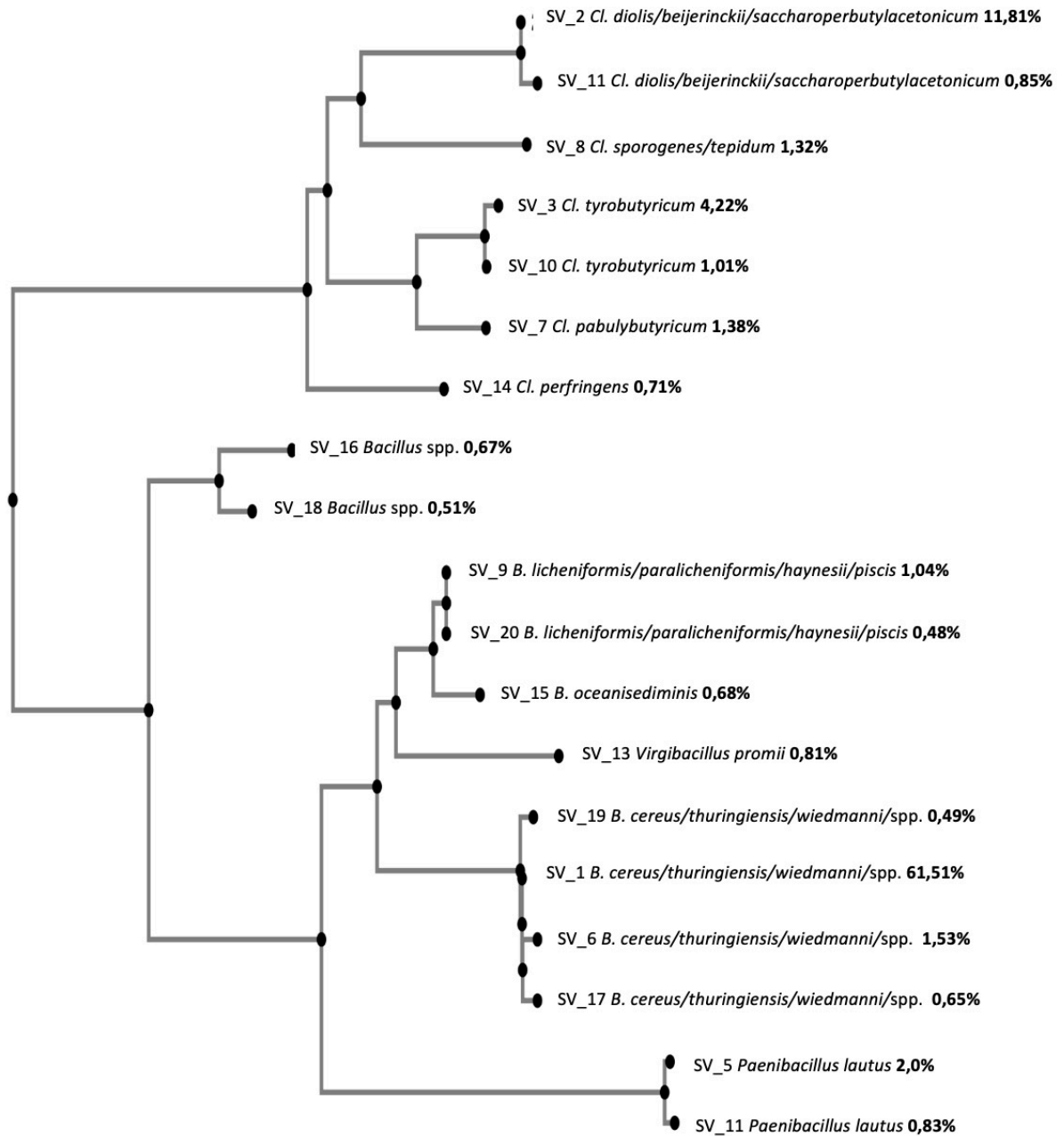
Prøve	Uttak	MPN per 100 mL melk/10 g melkepulver		
		Observasjon 1	Observasjon 2	Observasjon 3
Rå melk	1	6	16	>1100
Rå fløte	1	4	15	450
Past. sk. melk	1	45	95	450
Permeat	1	0	0	7
Retentat	1	45	45	>1100
Skummetmelkpulver	1	200	200	>1100
Kaseinpulver	1	25	25	1100
Rå melk	2	3	3	>1100
Rå fløte	2	0	3	>1100
Past. fløte	2	0	0	>1100
Past. sk. melk	2	3	15	450
Permeat	2	0	0	0
Retentat	2	95	250	>1100
Skummetmelkpulver	2	7	7	450
Kaseinpulver	2	95	250	1100
Rå melk	3	0	4	>1100
Rå fløte	3	0	4	>1100
Past. fløte	3	0	3	>1100
Past. sk. melk	3	4	4	>1100
Permeat	3	0	0	0
Retentat	3	25	25	>1100
Skummetmelkpulver	3	9	9	>1100
Kaseinpulver	3	4	9	1100

Med hensyn til observasjon 1 for alle uttakene viser tabell 4.1 at MPN økte i det pasteurisert skummet melk ble tørket skummetmelkpulver. Fra uttak 2 og 3 økte også sporeantallet i det pasteurisert skummet melk ble filtrert til retentat, mens fra uttak 1 ble ikke sporeantallet påvirket av mikrofiltreringssteget. Videre var sporeantallet lavere i kaseinpulver sammenlignet med retentat og skummetmelkpulver fra uttak 1 og 3, mens fra uttak 2 var sporeantallet uforandret. Fra alle uttakene var også sporeantallet høyere i pasteurisert skummet melk sammenlignet med rå fløte og rå melk. Fra uttak 2 og uttak 3 ble det ikke detektert noen sporer i verken rå fløte eller pasteurisert fløte. Fra uttak 1 var sporeantallet i de fleste prøver prøvene langs produksjonslinjen høyere sammenlignet med de andre uttakene, der sporeantallet var lavest ved uttak 3. Dette med unntak av pasteurisert skummet melk som hadde høyere sporeantall ved uttak 3 sammenlignet med uttak 2, og retentat og kaseinpulver som hadde høyere sporeantall ved uttak 2 sammenlignet med uttak 1.

Med hensyn til observasjon 2 for alle uttakene endret sporeantallet mellom prøvene seg stort sett etter samme mønster som for observasjon 1, men sporeantallet var jevnt over høyere eller lik som i observasjon 1. Med hensyn til observasjon 3 fra alle uttakene var sporeantallet over 1100 sporer per 100 mL melk/10 g melkepulver i de fleste prøver, og det var vanskelig å se samme mønster som for observasjon 1 og 2. Verken for observasjon 1 eller 2 var det sporer i permeatet fra noen av uttakene. Observasjon 3 hadde 7 sporer/100 mL permeat fra uttak 1, ellers var permeat fra uttak 2 og 3 sporefritt.

4.4 Sekvenseringen viste høyt innhold av sporer

Figur 4.2 viser fylogenetisk tre av de 19 bakterieartene som utgjorde 0,5 % av 254 analyserte sekvensvarianter. SV_4 er utelatt fra kartleggingsanalysen da denne i all hovedsak ble funnet i prøver fra dyrkningsuavhengig metode. 61,51% av sekvensvariantene utgjorde *B. cereus-/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1), etterfulgt av 11,81% *Cl. diolis/bejierinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2) og 4,22% *Cl. tyrobutyricum* (SV_3). Ellers var også en rekke andre arter av genus *Bacillus* og *Clostridium* representert, i tillegg til genus *Paenibacillus*. Det ble bare identifisert sporedannere i prøvene. Sporesammensetningen og deres overlevelse langs produksjonslinjen for melkepulver ble videre kartlagt med hensyn til disse artene.

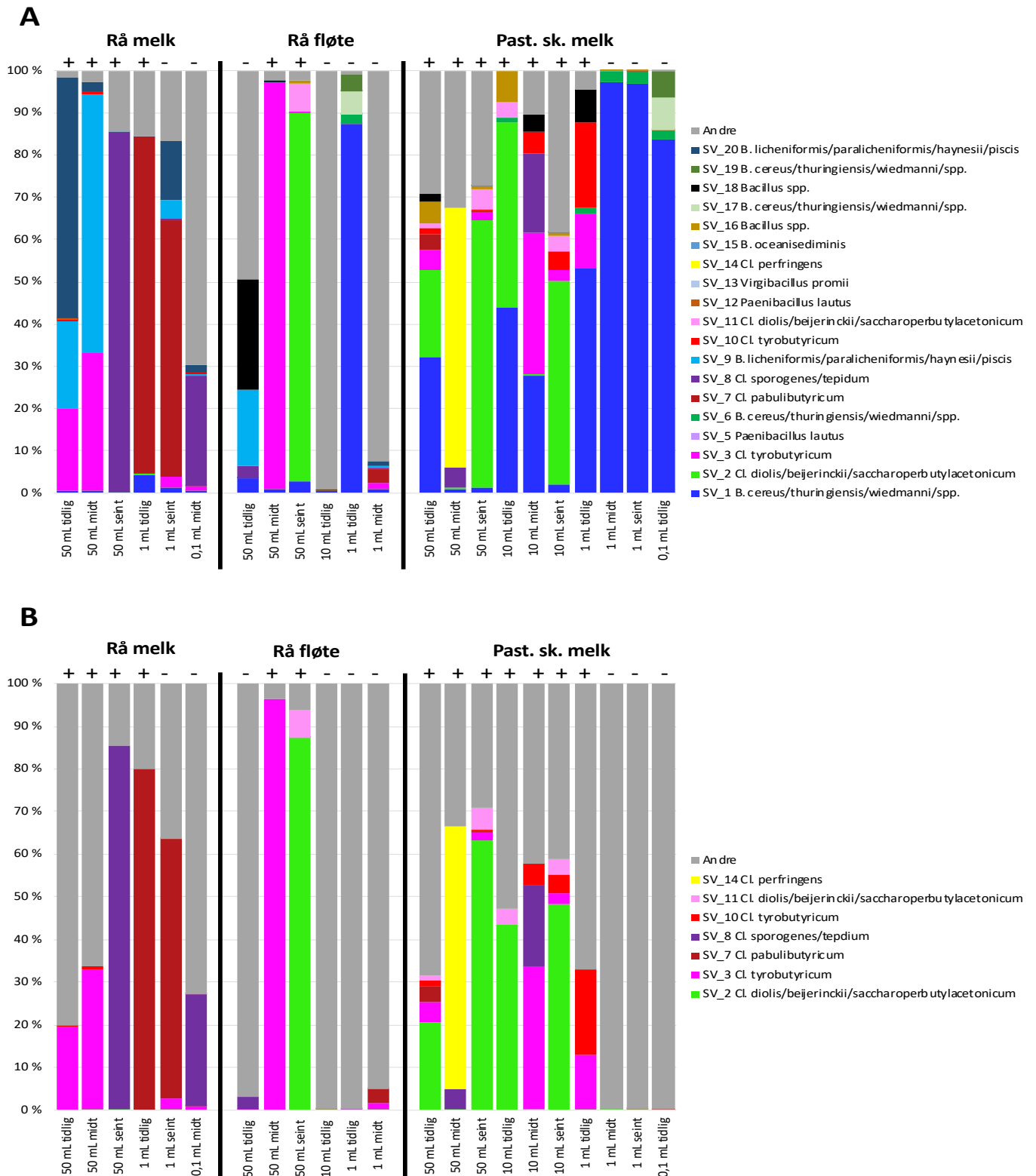


Figur 4.2. Fylogenetisk tre med oversikt over de bakterieartene som utgjorde ca. 0,5% eller mer av 254 sekvensvarianter. Det ble funnet bakterier av genus *Clostridium*, *Bacillus* og *Paenibacillus*.

4.5 Sporesammensetning fra prøver inkubert ved 37°C

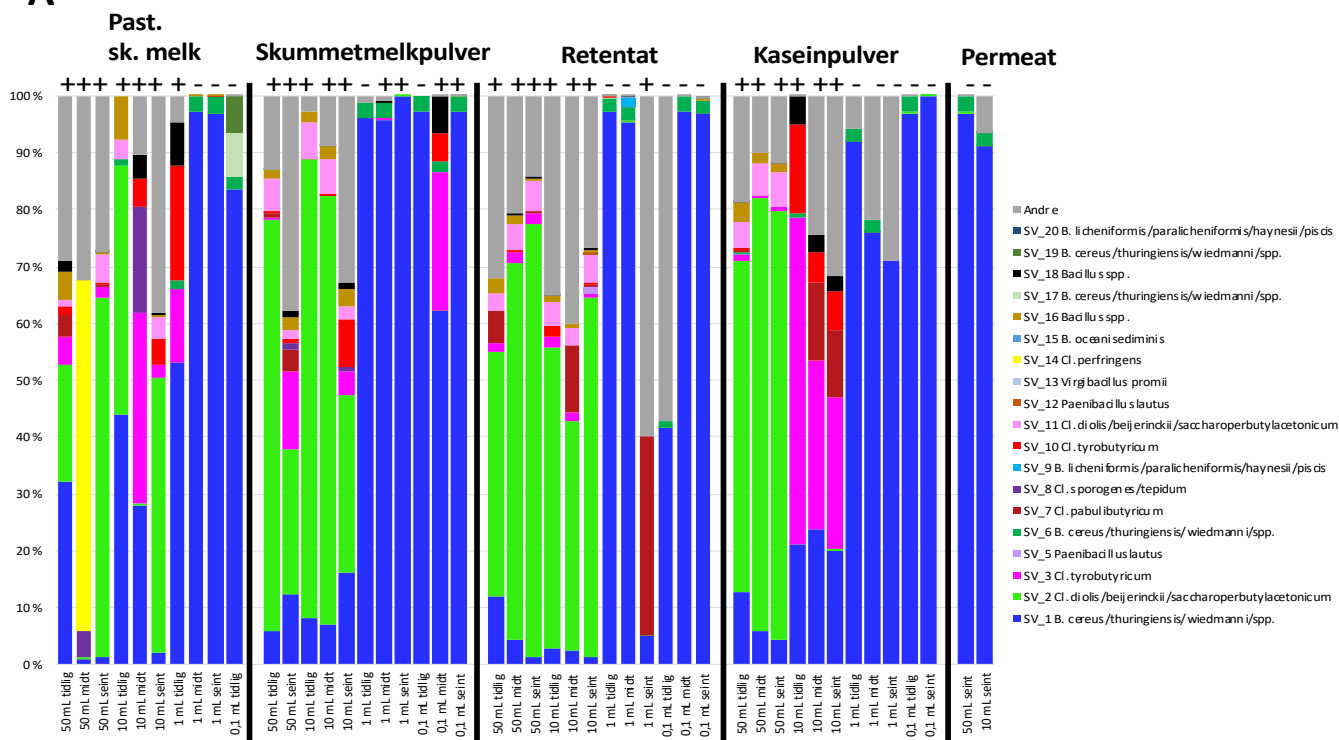
Plottene under viser hvordan sporesammensetningen i prosent (%) med hensyn til sporene presentert i figur 4.2 endret seg gjennom produksjonslinjen ved uttak 1, 2 og 3 i prøver inkubert ved 37°C. For hvert uttak presenteres en figur (figur 4.3 for uttak 1, figur 4.5 for uttak 2 og figur 4.7 for uttak 3) som illustrerer hvordan prosessene separering og pasteurisering påvirket sammensetningen ved å se på rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte (med unntak av uttak 1) og pasteurisert skummet melk. Den andre figuren (figur 4.4 for uttak 1, figur 4.6 for uttak 2 og figur 4.8 for uttak 3) illustrerer hvordan prosessene tørking og filtrering påvirket sammensetningen ved å se på pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat, kaseinpulver og permeat (kun uttak 1). Hver figur illustrerer hvordan sporesammensetningen endret seg med hensyn til genus *Clostridium*, *Bacillus* og *Paenibacillus* (A), og hvordan sporesammensetningen endret seg kun med hensyn til genus *Clostridium* (B). Hver søyle i plottene representerer en prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gassproduksjon (+) eller om buljongen kun var blakket (-). Alle prøvene som det var sekvensdata fra er representert i plottene, dvs. at prøver der det ikke ble observert vekst fra, prøver uten PCR-produkter eller prøver med mindre enn 1000 sekvenser er utelatt.

4.5.1 Uttak 1

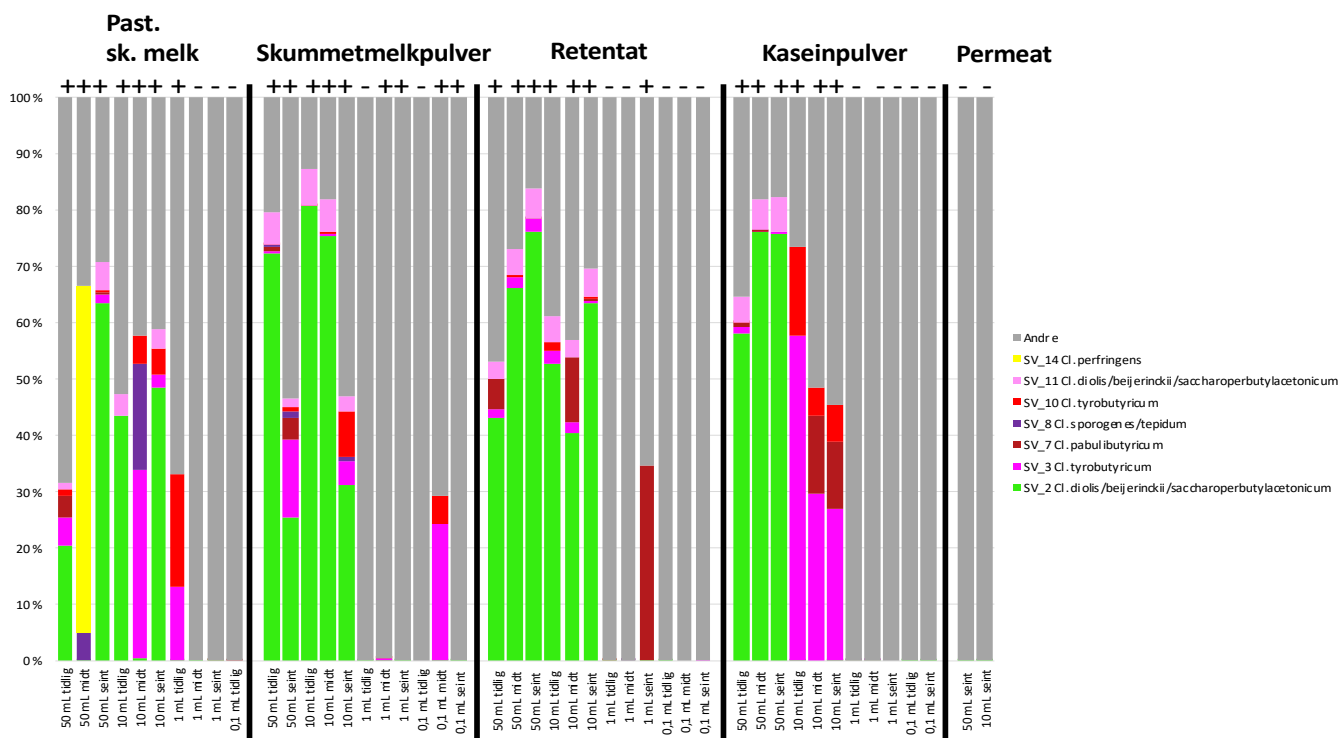


Figur 4.3. Sporesammensetning (%) i rå melk, rå fløte og pasteurisert skummet melk fra uttak 1 med prøver inkubert ved 37°C. Hver søyle i plottene representerer en prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.

A



B



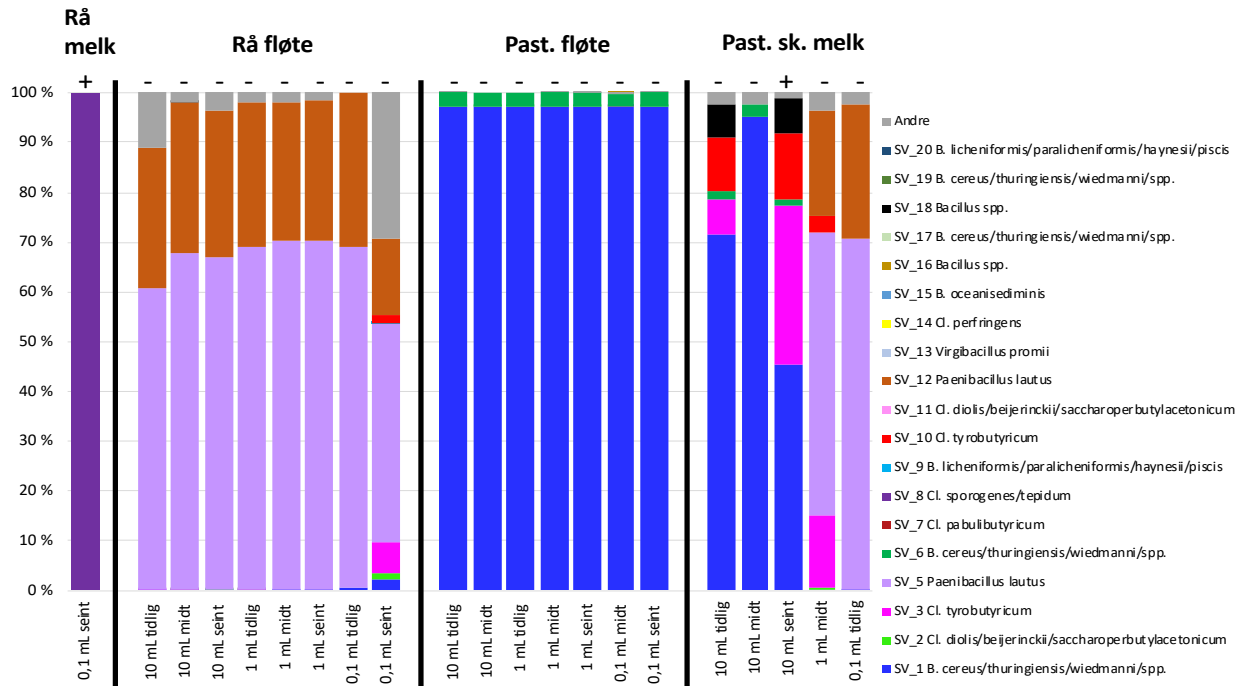
Figur 4.4. Sporesammensetning (%) i pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat, kaseinpulver og permeat fra uttak 1 med prøver inkubert ved 37°C. Hver søyle i plottene representerer én prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.

Fra uttak 1 viser figur 4.3A at sporesammensetningen ble påvirket av separering, da den endret seg noe fra rå melk, til rå fløte og pasteurisert skummet melk. Av Klostridier i rå melk var det først og fremst *Cl. tyrobutyricum* (SV_3), *Cl. sporogenes/tepidum* (SV_8) og *Cl. pabulibycticum* (SV_7) som vokste, og av Basillus vokste *B.licheniformis/paralicheniformis/haynesii/piscis* (SV_9/SV_20). I rå fløte gjorde *Cl. tyrobutyricum* (SV_3) og *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2) seg gjeldene i 50 mL prøvevolum, sistnevnte ble ikke observert i rå melk. Av Basillus vokste også her *B.licheniformis/paralicheniformis/haynesii/piscis* (SV_20) i 50 mL prøvevolum, mens i 1 mL vokste *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1). Pasteurisert skummet melk hadde noe av det samme mønsteret som rå fløte. Pasteurisert skummet melk var overrepresentert av *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1) i små prøvevolum, mens i større volum så det ut til at *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2) tok overhånd. Også *Cl. tyrobutyricum* (SV_10/SV_3) vokste bra. I tillegg vokste *Cl. perfringens* (SV_14). Figur 4.3B viser at stort sett fra alle rør som inneholdt Klostridier ble det observert gass, men for rå melk i prøvene «1 mL seint», «0,1 mL midt» og rå fløte i prøvene «50 mL tidlig» og «1 mL midt» ble det ikke observert gassproduksjon til tross for at prøvene inneholdt Klostridier.

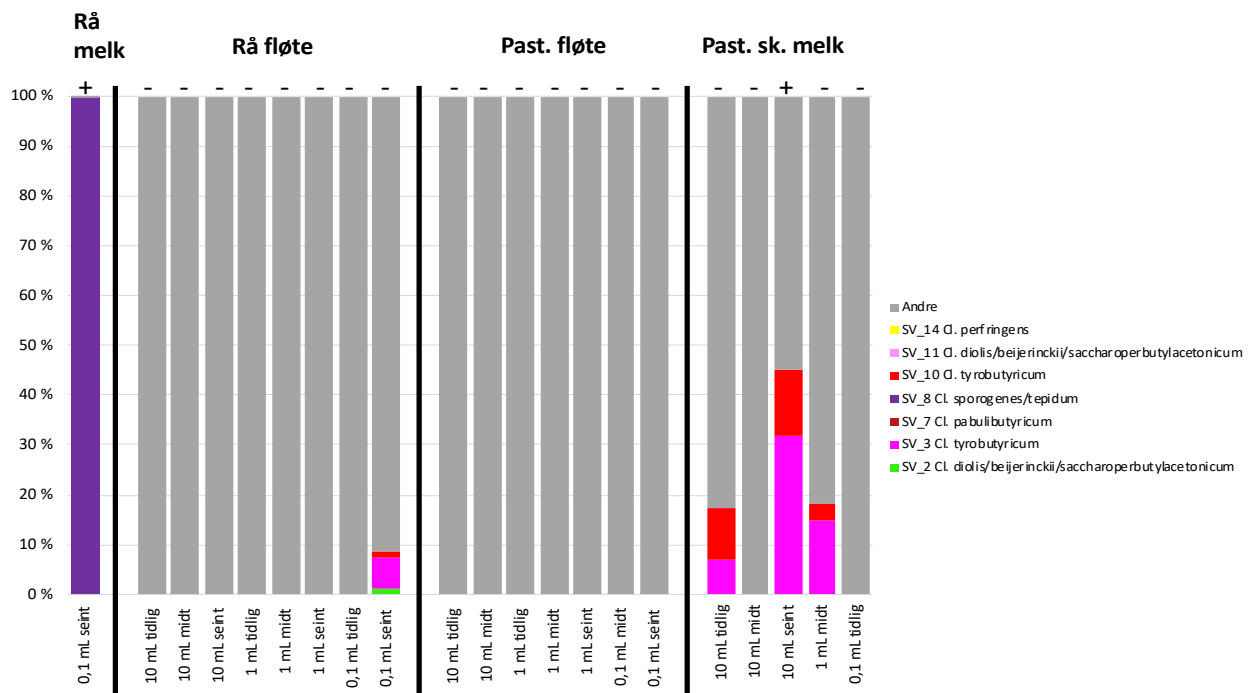
Figur 4.4 viser, på lik linje med figur 4.3 for rå fløte og pasteurisert skummet melk, at i små prøvevolum fra alle prøvene var *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1) overrepresentert, mens i større prøvevolum tok Klostridiene overhånd. Sammensetningen i skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver var forholdsvis lik sammensetningen i pasteurisert skummet melk. Kaseinpulver var noe mer dominert av *Cl. tyrobutyricum* (SV_3), mens *Cl. perfringens* (SV_14) i pasteurisert skummet melk så ikke ut til å bli med videre utover i produksjonslinjen, heller ikke *Cl. sporogenes/tepidum* (SV_8) i særlig stor grad. Figur 4.4B viser at permeatet, som under dyrkning hadde vist tegn til vekst gjennom en blakket buljong, viste seg å inneholde i hovedsak *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1). Stort sett alle rør med gassproduksjon inneholdt Klostridier, med unntak av skummetmelkpulver i prøven «1 mL midt» og «0,1 mL seint».

4.5.2 Uttak 2

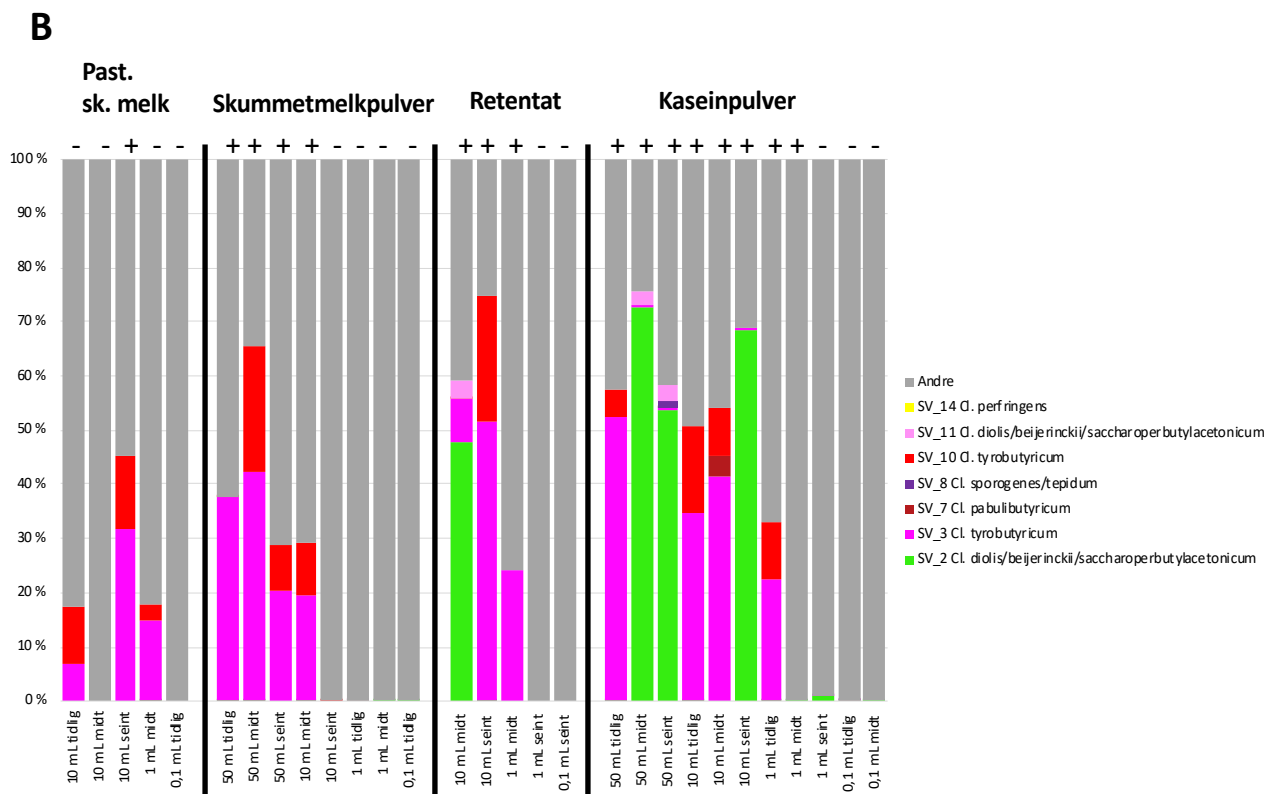
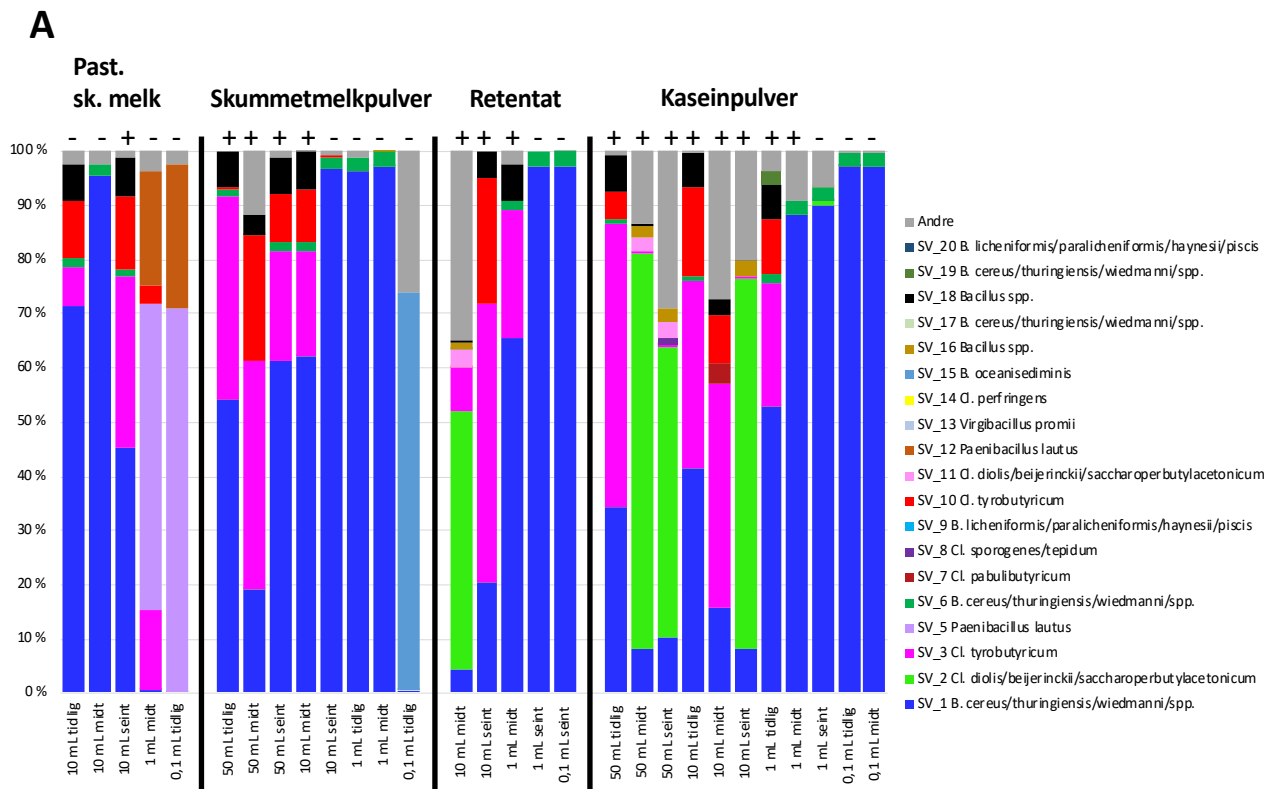
A



B



Figur 4.5. Sporesammensetning (%) i rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte og pasteurisert skummet melk fra uttak 2 med prøver inkubert ved 37°C. Hver søyle i plottene representerer en prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.



Figur 4.6. Sporesammensetning (%) i pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver fra uttak 2 med prøver inkubert ved 37°C. Hver søyle i plottene representerer en prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.

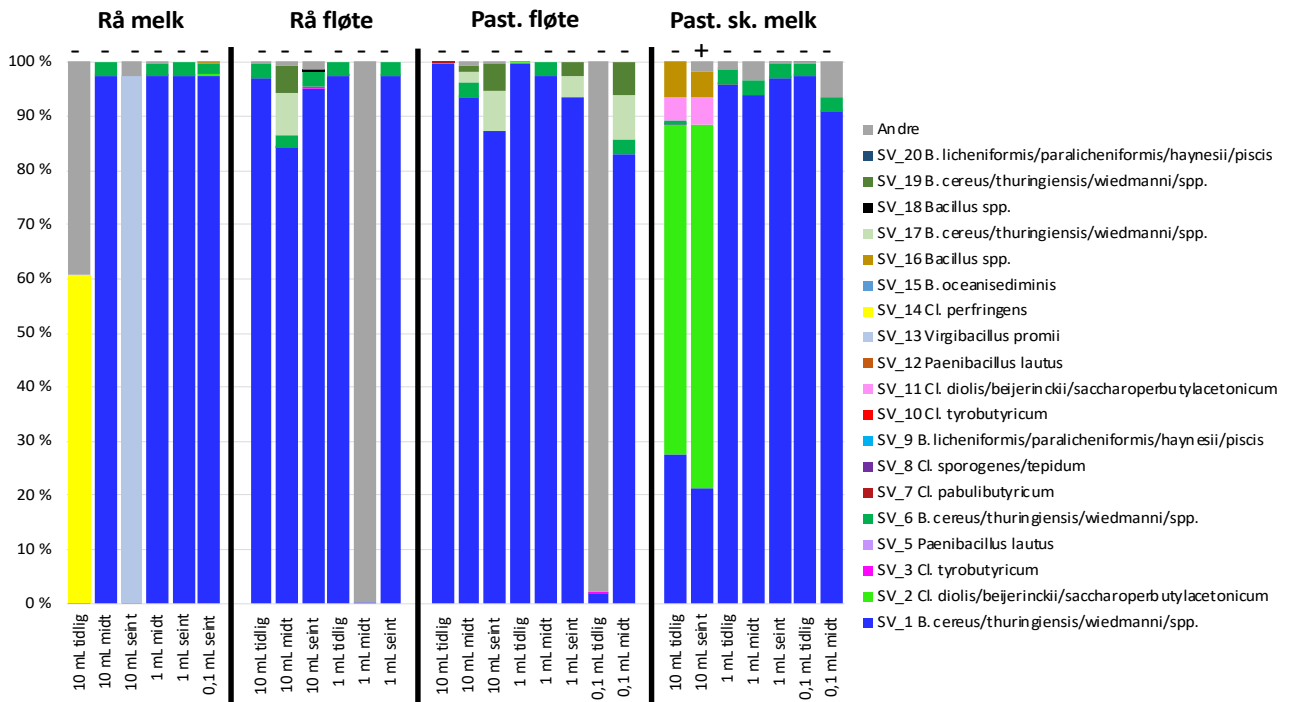
Fra uttak 2 viser figur 4.5A at også ved dette uttaket ble sporesammensetningen påvirket av separering. Dene ene prøven fra rå melk var dominert av *Cl. sporogenes/tepidum* (SV_8), men denne ble ikke observert verken i fløte eller pasteurisert skummet melk. Fløten var dominert av få arter; i rå fløte var *Paenibacillus lautus* (SV_12/SV_5) dominerende, mens i pasteurisert fløte hadde sammensetningen endret seg til i hovedsak å bestå av *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1). Med unntak av rå fløte for prøve «0,1 mL midt» viser figur 4.5B at verken rå fløte eller pasteurisert fløte inneholdt Klostridier. Sammensetningen i pasteurisert skummet melk var en miks av sammensetningen til rå fløte og pasteurisert fløte, men prosentandelen av Klostridier i form av *Cl. tyrobutyricum* (SV_10/SV_3) var høyere. Fra de rørene det ble observert gassproduksjon ble det detektert Klostridier. Klostridier ble også funnet i rå fløte for prøve «0,1 mL seint» og i pasteurisert skummet melk for prøve «10 mL tidlig» og «1 mL midt» til tross for at det her ikke ble observert noen gassproduksjon.

Figur 4.6A viser at for alle prøver var *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1) overrepresentert i små prøvevolum, mens i større prøvevolum tok Klostridiane overhånd. *Paenibacillus lautus* (SV_5/SV_12), som ble funnet i pasteurisert skummet melk, ble borte i det melka ble tørket til skummetmelkpulver. Ellers var sammensetningen mellom disse lik. Sammensetningen i retentat og kaseinpulver så ut til å være lik sammensetningen i skummetmelkpulver, i tillegg til at disse prøvene inneholdt *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2/SV_11). Ellers var *Cl. tyrobutyricum* (SV_3/SV_10) mest dominerende i disse prøvene fra dette uttaket. Fra alle prøvene der det ble produsert gass ble det også detektert Klostridier. Det ble ikke observert noen gassproduksjon i pasteurisert skummet melk for prøve «10 mL tidlig» og «1 mL seint», men disse inneholdt likevel Klostridier.

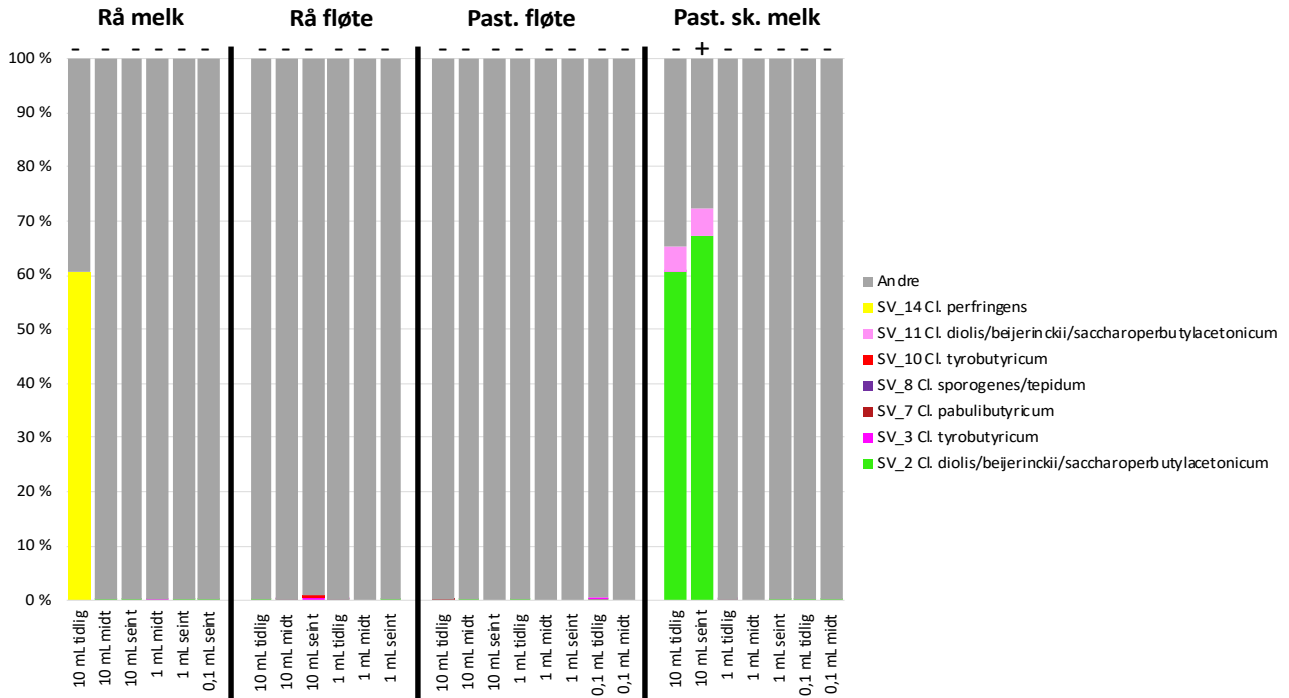
I skummetmelkpulver for prøve «0,1 mL tidlig» ble det detektert *B. oceanisediminis* (SV_15). Denne prøven ble sekvensert ved en «glipp», da det fra denne prøven verken ble observert noen gassproduksjon eller blakket buljong (buljongen var helt klar).

4.5.3 Uttak 3

A

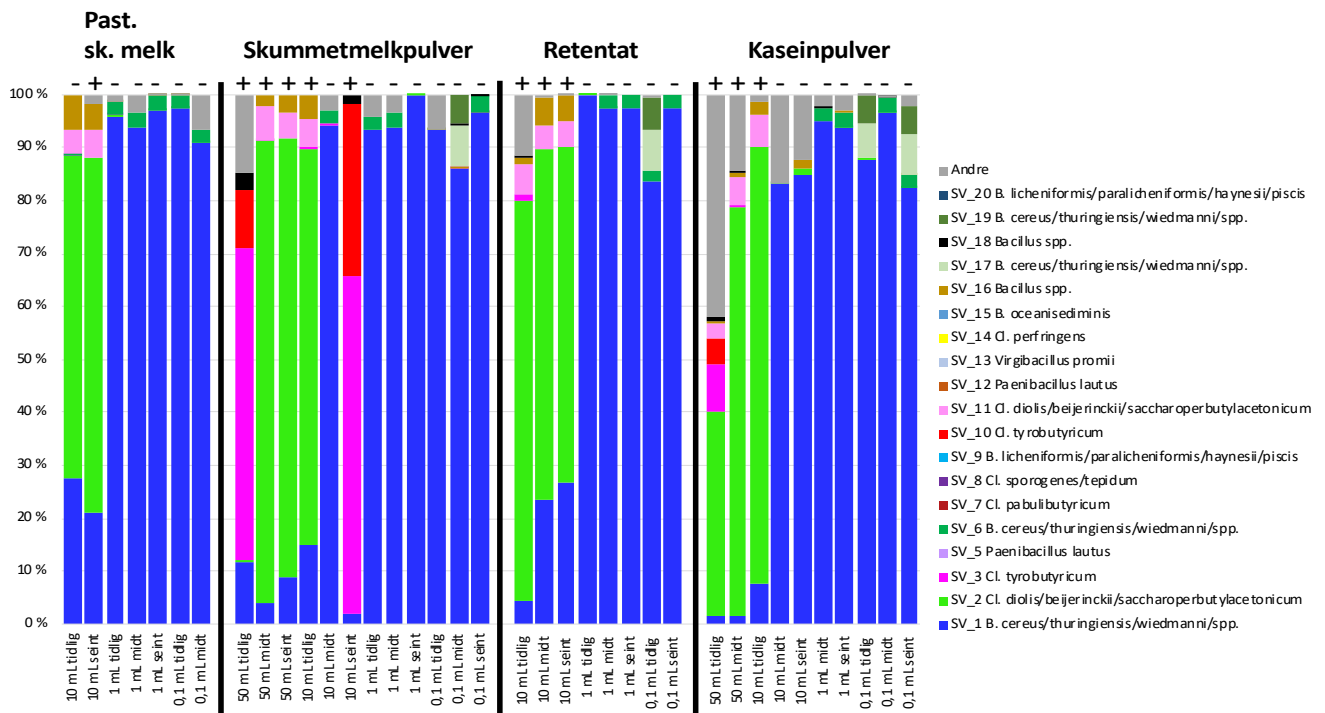


B

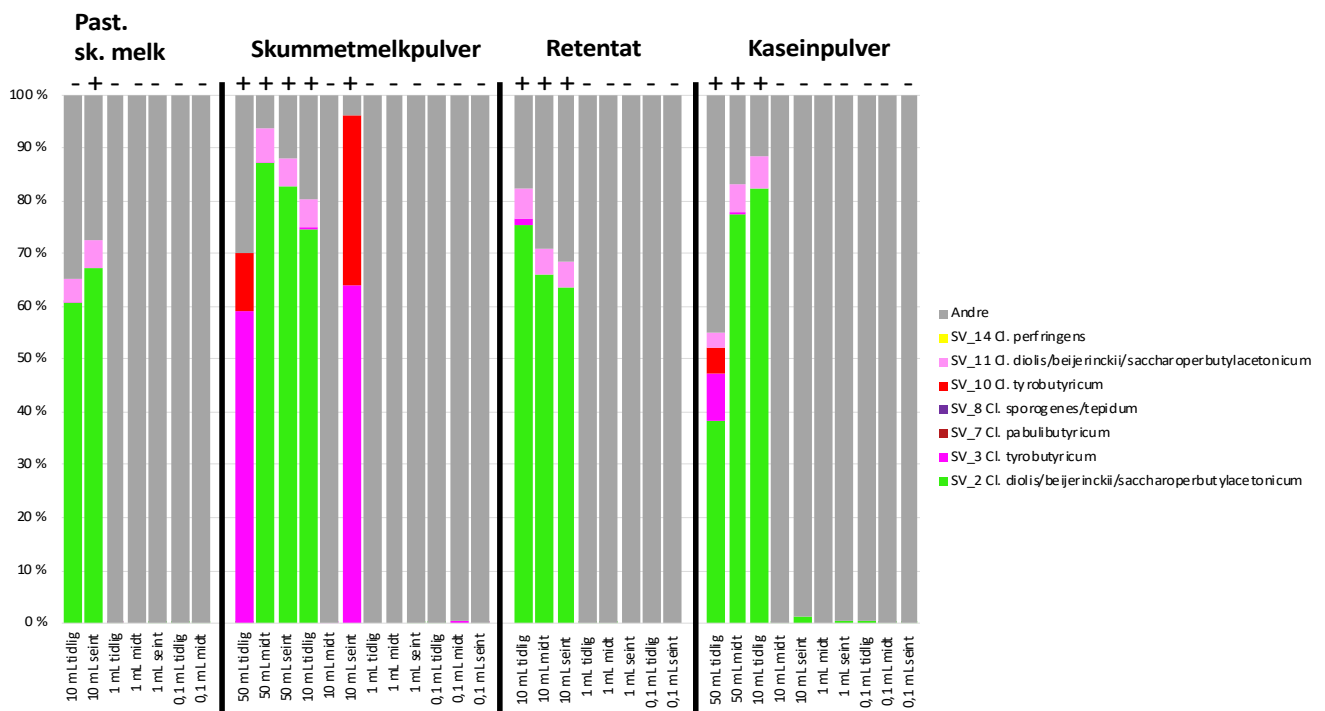


Figur 4.7. Sporesammensetning (%) i rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte og pasteurisert skummet melk fra uttak 3 med prøver inkubert ved 37°C. Hver søyle i plottene representerer én prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.

A



B



Figur 4.8. Sporesammensetning (%) i pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver fra uttak 3 med prøver inkubert ved 37°C. Hver søyle i plottene representerer en prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.

Fra uttak 3 viser Figur 4.7A at prosentandelen av Klostridier var lav i rå melk, men *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1) vokste bra her. Likevel var prosentandelen av *Cl. perfringens* (SV_14) høy i prøve «10 mL tidlig». I tillegg ble det for prøve «10 mL seint» detektert *Virgibacillus promii* (SV_13). Ved separeringen av rå melk så det ut til at *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* ble separert både i fløte og skummet melk, mens det så ut til at *Virgibacillus promii* (SV_13) og *Cl. perfringens* (SV_14) forsvant. Rå fløte og pasteurisert fløte var så å si fri for Klostridier, med unntak av en liten observasjon i rå fløte for prøve «10 mL seint». Også pasteurisert skummet melk var dominert av *B. cereus/thuringiensis-wiedmanni/spp.* (SV_1) i små prøvevolum, i tillegg til at *Cl. diolos/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2/SV_11) og *Bacillus spp.* (SV_16) gjorde seg synlig i større prøvevolumer. Figur 4.7B viser at det ble kun observert gassproduksjon fra pasteurisert skummet melk for prøve «10 mL seint», og denne prøven inneholdt også Klostridier. Det ble ikke observert gassproduksjon i rå melk for prøve «10 mL tidlig», i rå fløte for prøve «10 mL seint», i pasteurisert fløte for prøve «0,1 mL tidlig» og i pasteurisert skummet melk for prøve «10 mL tidlig» til tross for at disse inneholdt Klostridier.

Figur 4.8A viser at sammensetningen i pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver i stor grad reflekterte hverandre. I små prøvevolum var sammensetningen dominert av *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1), men i det prøvevolumet ble økt til 10 mL og 50 mL vokste Klostridiene bedre og utkonkurrerte SV_1. Av Klostridiene var *Cl. diolos/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2/SV_11) overrepresentert, men det ble også detektert noe *Cl. tyrobutyricum* (SV_3/SV_10) i skummetmelkpulver og kaseinpulver. Figur 4.8B viser at fra alle rør der det ble observert gassproduksjon ble det også detektert Klostridier i prøven. I pasteurisert skummet melk for prøve «10 mL tidlig» ble det ikke observert gass, men prøven inneholdt likevel Klostridier.

4.5.4 Sporesammensetningen oppsummert

Felles for alle uttakene var at separering syntes å være et prosesseringssteg som påvirket hvordan sammensetningen ble i fløte og skummet melk. Det var for eksempel få tilfeller av Klostridier i fløte. Videre var sammensetningen i pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver forholdsvis lik. *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1) syntes å være overrepresentert i de fleste prøver fra alle uttak i mindre prøvevolum (0,1 mL til 1 mL). I større prøvevolum (10 mL til 50 mL) var Klostridiene mer dominerende. Sammensetningen mellom uttakene var noe forskjellig, spesielt uttak 2 skilte seg ut. Pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver fra uttak 1 og 3 (figur 4.4 og 4.8) så ut til å være dominert av *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2), *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1) og noe *Cl. tyrobutyricum* (SV_3/SV_10). Fra uttak 1 ble også *Cl. pabulybutyricum* (SV_7) observert. Tilsvarende prøver fra uttak 2 (figur 4.6) var derimot mer dominert av *Cl. tyrobutyricum* (SV_3/SV_10), men også noe *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* (SV_2) i retentat og kaseinpulver. Fra uttak 2 ble også *Paenibacillus lautus* (SV_5/SV_12) detektert i rå fløte og pasteurisert skummet melk (figur 4.5).

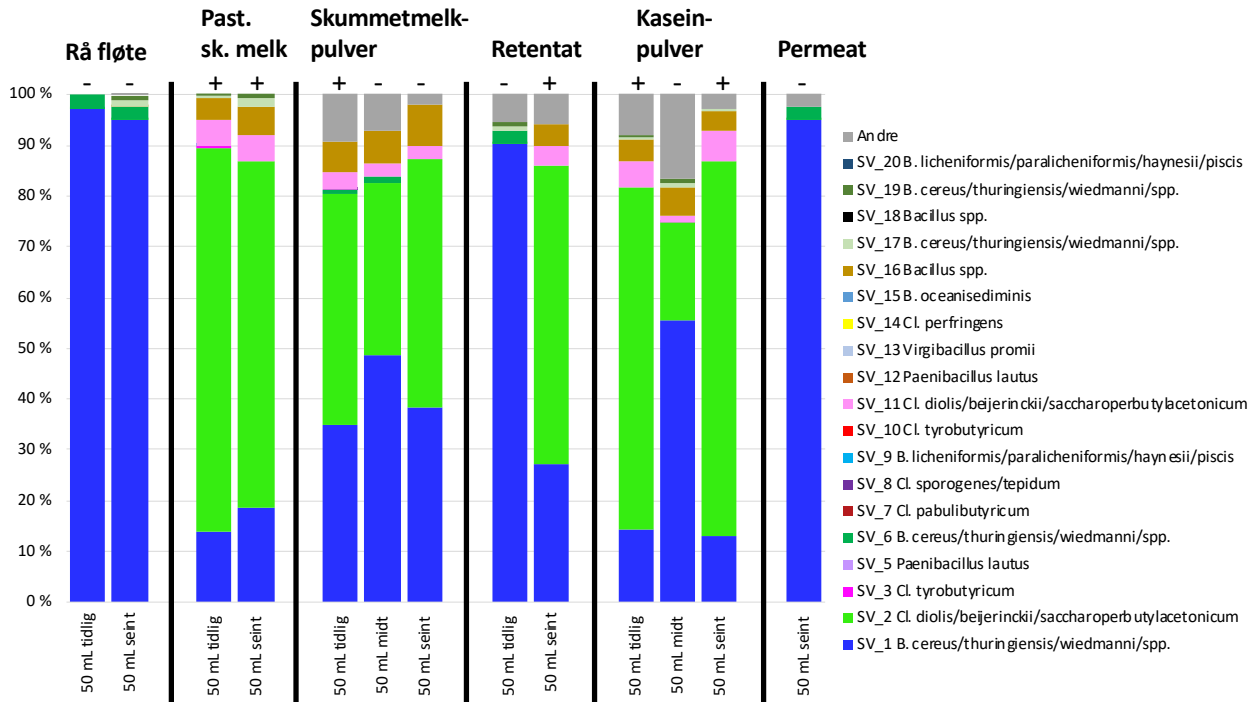
Med hensyn til Klostridier så det ut som at for alle uttak ble verken *Cl. perfringens* (SV_14) og i liten grad *Cl. sporogenes/tepidum* (SV_8) med videre utover i produksjonslinjen fra pasteurisert skummet melk ble tørket til skummetmelkpulver eller filtrert til retentat (figur 4.4 fra uttak 1, figur 4.6 fra uttak 2, og figur 4.8 fra uttak 3).

4.6 Sporesammensetning fra prøver inkubert ved 22°C for uttak 1, 2 og 3

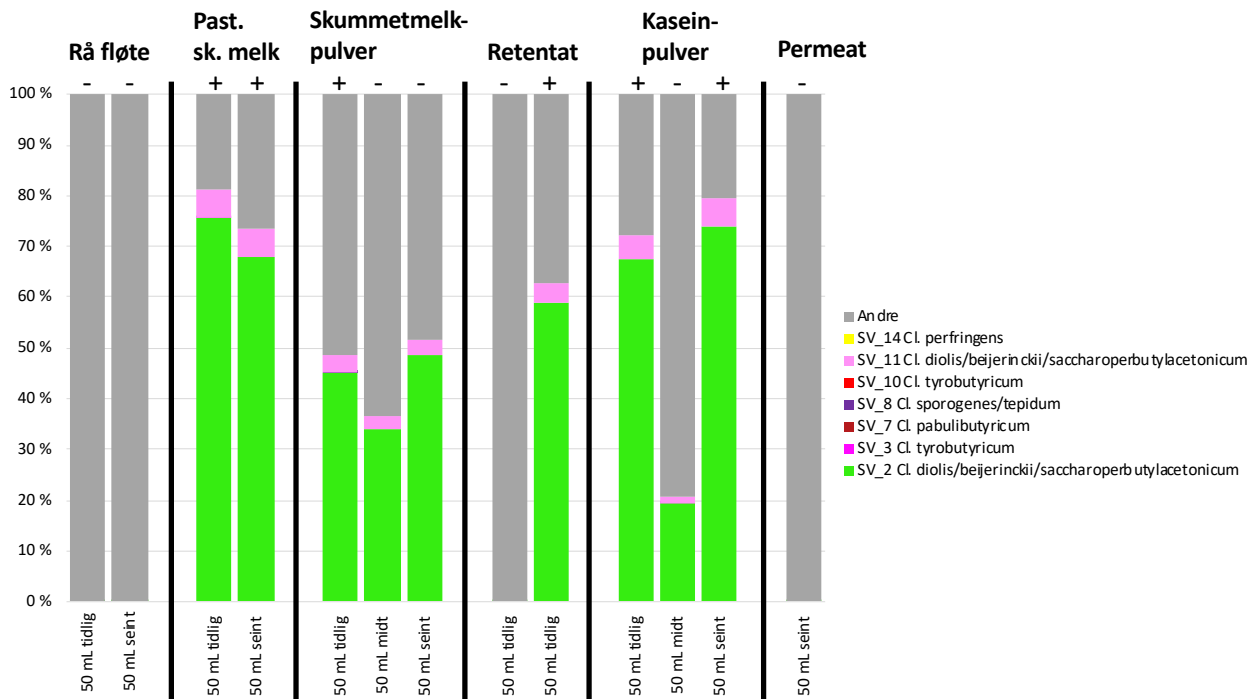
Figur 4.9-4.11 under viser hvordan sporesammensetningen med hensyn til sporene presentert i figur 4.2 endret seg gjennom produksjonslinjen for melkepulver fra uttak 1, 2 og 3 med prøver inkubert ved 22°C. Ved 22°C ble det ikke inkubert like mange rør som ved 37°C, og alle prøvene for hvert prosesseringssteg presenteres derfor i én figur. Hver figur illustrerer hvordan sporesammensetningen endret seg med hensyn til genus *Clostridium*, *Bacillus* og *Paenibacillus* (A), og hvordan sporesammensetningen endret seg kun med hensyn til genus *Clostridium* (B). Prøvene som ble undersøkt var rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte (med unntak av uttak 1), skummetmelkpulver, retentat, kaseinpulver og permeat (kun fra uttak 1). Hver søyle i plottene representerer én prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gassproduksjon (+) eller om buljongen bare var blakket (-). Alle prøvene som det var sekvensdata fra er representert i plottene, dvs. at prøver der det ikke ble observert vekst fra, prøver der det ikke ble dannet PCR-produkter eller prøver med mindre enn 1000 sekvenser er utelatt.

Figurene viser at sammensetningen og overlevelsen av sporene var forholdsvis lik mellom uttakene. Når det ble detektert Klostridier i en prøve var det kun *Cl. diolis/beijerinckii/saccharperbutylaceticum* (SV_2/SV_11) som ble detektert fra alle uttakene. I de prøvene der Klostridier vokste var veksten av *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* (SV_1) dårligere. Ellers var SV_1 overrepresentert i samtlige prøver, med unntak av i rå melk for prøve «10 mL seint» ved uttak 2. Denne prøven hadde en overvekt av *B. licheniformis/paralicheniformis/haynesii/piscis* (SV_9/SV_20). Ellers ble det observert få tilfeller av Klostridier i rå fløte, med unntak av rå fløte for prøve «10 mL tidlig» ved uttak 3. Det ble heller ikke observert Klostridier i pasteurisert skummet melk ved uttak 2. sammenlignet med prøver inkubert ved 37°C. Alle prøver med gassproduksjon inneholdt Klostridier. Ellers ble det spesielt for uttak 1 og uttak 2 observert flere prøver med innhold av Klostridier der det ikke ble observert gass.

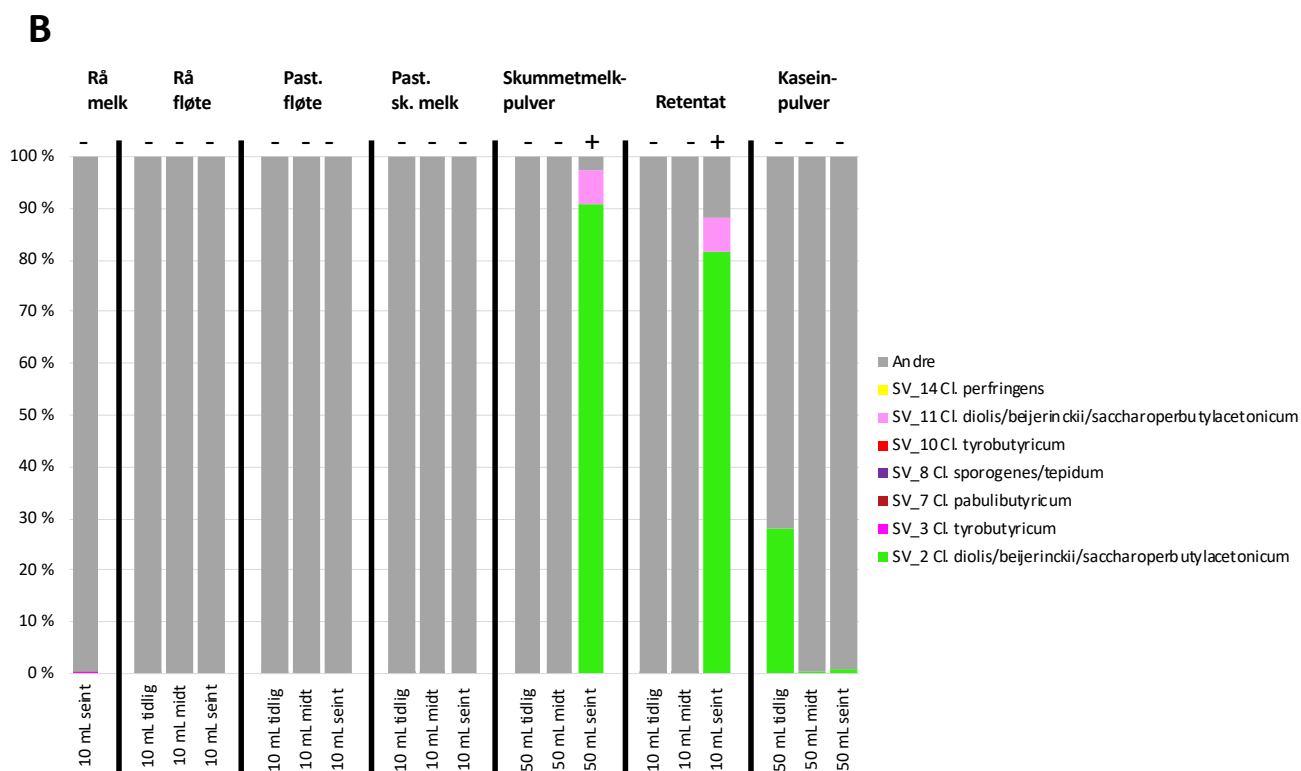
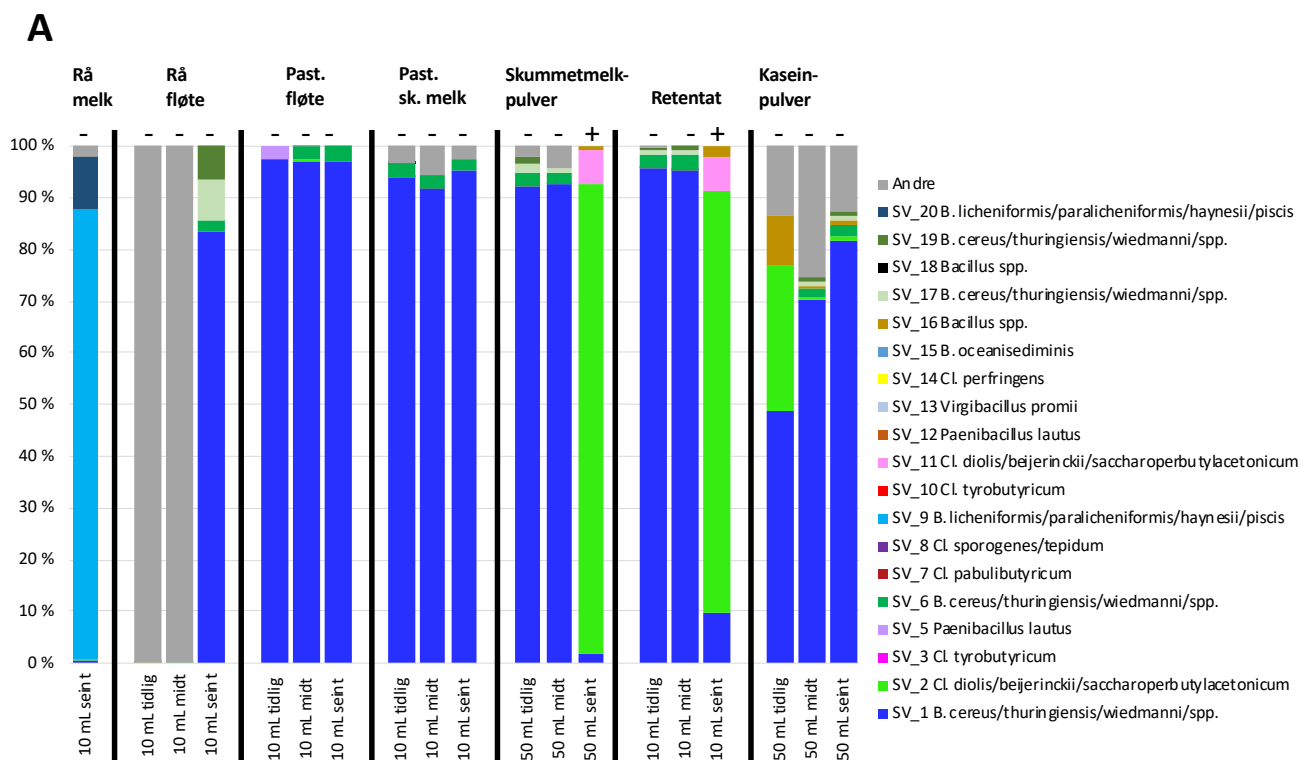
A



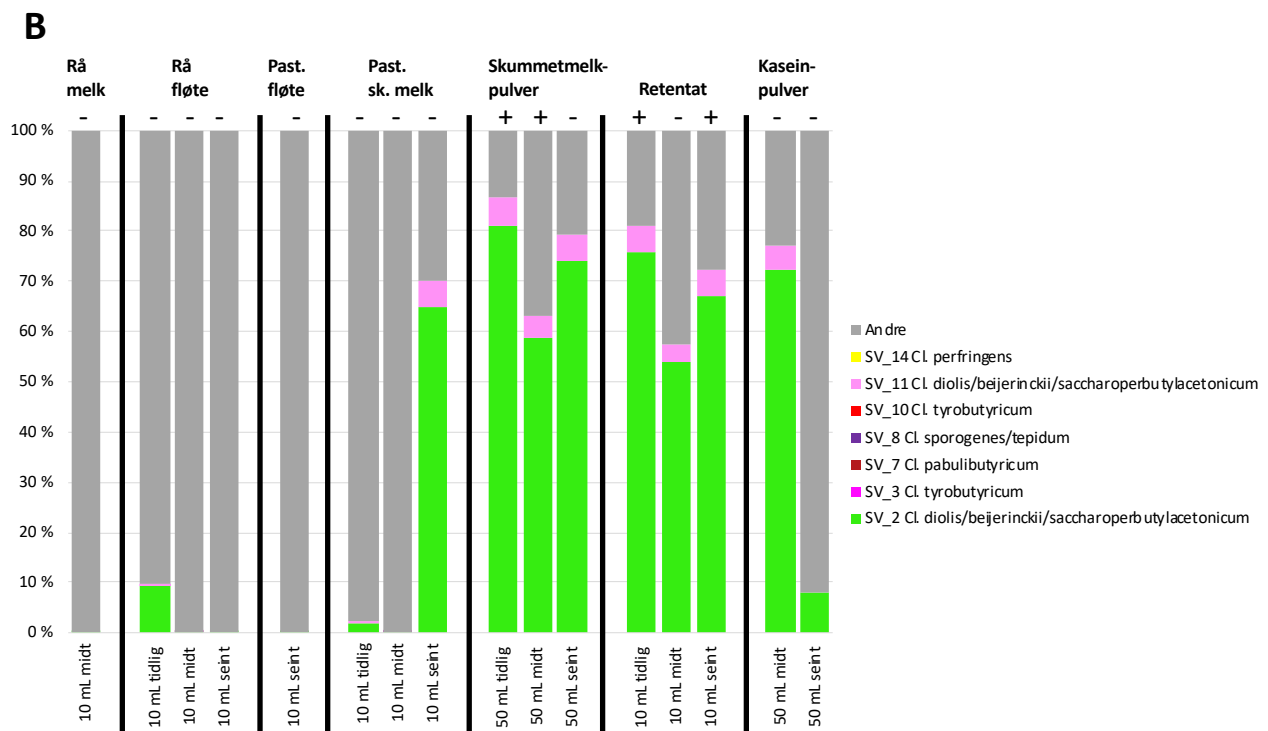
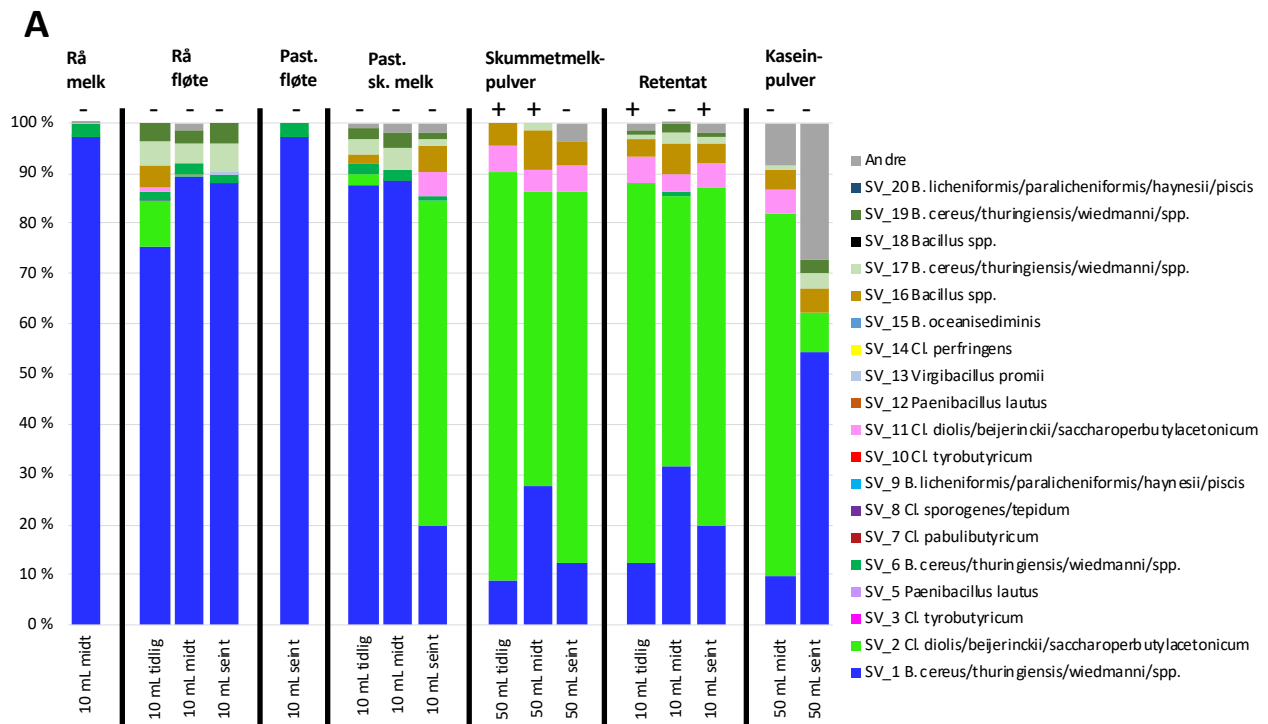
B



Figur 4.9. Sporesammensetning (%) i rå melk, rå fløte, pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat, kaseinpulver og permeat fra uttak 1 med prøver inkubert ved 22°C. Hver søyle i plottene representerer én prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.



Figur 4.10. Sporesammensetning (%) i rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte, pasteurisert skummet melk, skummetmelk-pulver, retentat og kaseinpulver fra uttak 2 med prøver inkubert ved 22°C. Hver søyle i plottene representerer én prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.

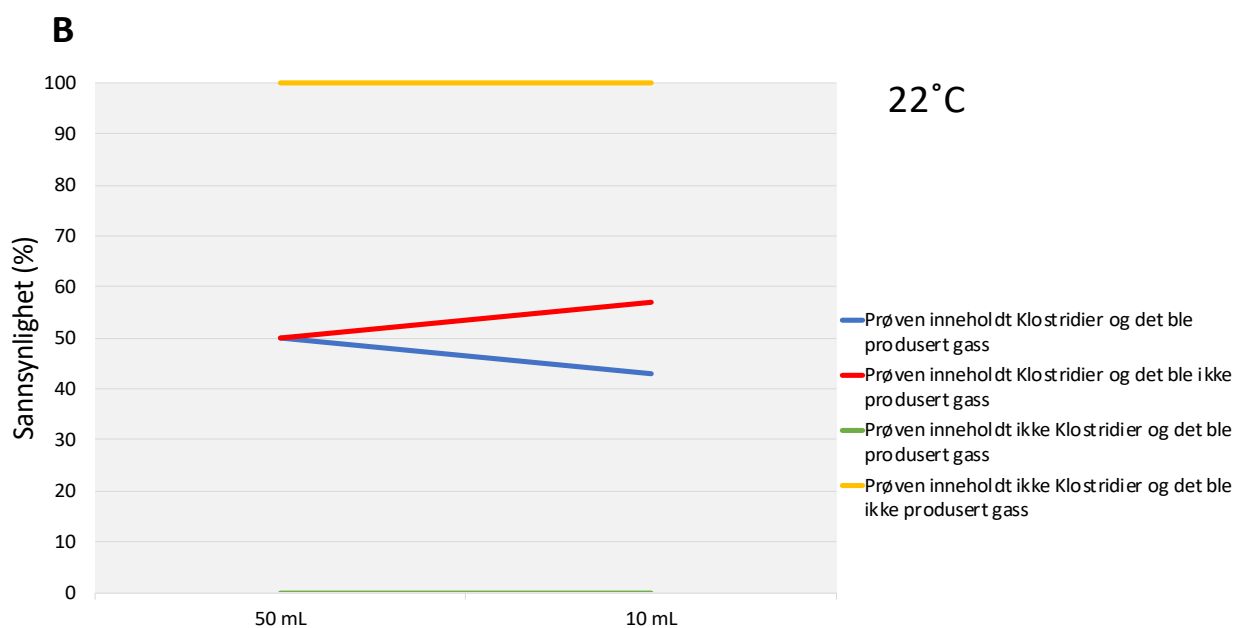
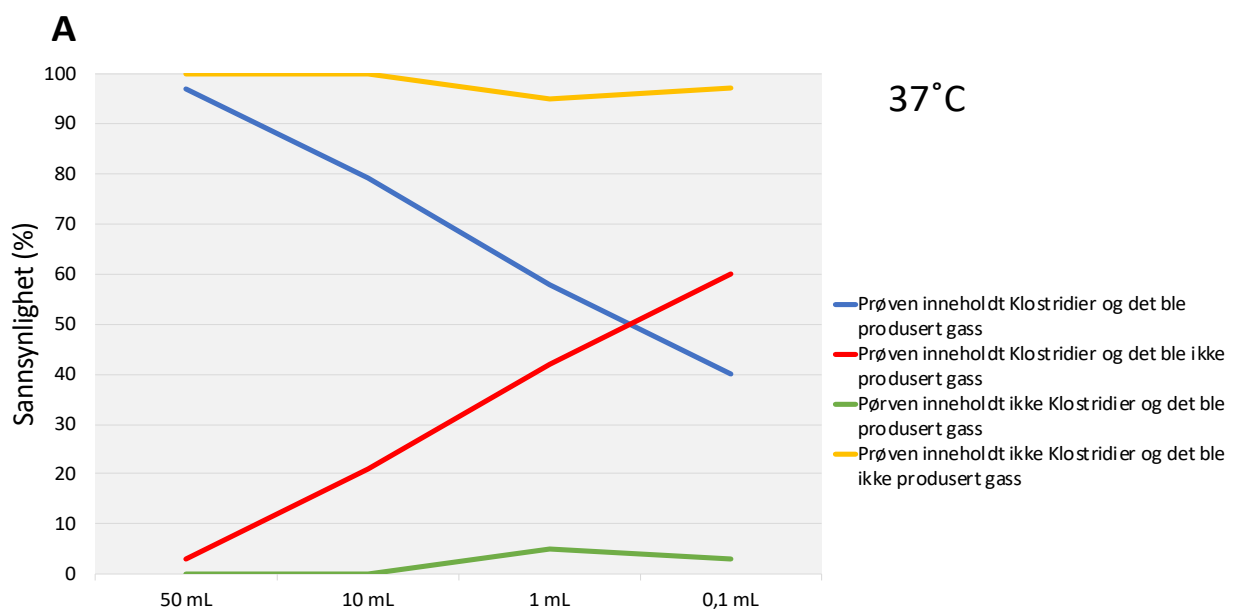


Figur 4.11. Sporesammensetning (%) i rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte, pasteurisert skummet melk, skummetmelkpulver, retentat og kaseinpulver fra uttak 3 med prøver inkubert ved 22°C. Hver søyle i plottene representerer én prøve, og over hver søyle illustreres det om det ble observert gass (+) eller ikke (-). Prøvene er sortert etter volum med 50 mL lengst til venstre og 0,1 mL lengst til høyre. (A) illustrerer sammensetningen med hensyn til SV_1 til SV_20 (minus SV_4). (B) illustrerer sammensetningen kun med hensyn til genus *Clostridium*.

4.7 Sammenhengen mellom gassproduksjon og prøvens innhold av Klostridier

Fra alle rør inkubert ved 37°C ble det detektert Klostridier fra en prøve med gassproduksjon, med unntak av to tilfeller i skummetmelkpulver for prøve «1 mL seint» og «0,1 mL seint» ved uttak 1 og i kaseinpulver for «1 mL midt» ved uttak 2. Det ble derimot observert flere tilfeller der det ikke ble produsert gass (men buljongen var blakket), men prøven inneholdt likevel Klostridier. Fra alle rør inkubert ved 22°C ble det detektert Klostridier når røret hadde gassproduksjon, men også her ble det observert flere tilfeller der det ikke ble produsert gass til tross for at prøven inneholdt Klostridier. Figur 4.14A viser sannsynligheten for fire ulike utfall (blå, rød, grønn og gul) for prøver inkubert ved 37°C i volum 50 mL, 10 mL, 1 mL og 0,1 mL. Figur 4.14B viser sannsynligheten for fire ulike utfall (blå, rød, grønn og gul) for prøver inkubert ved 22°C i volum 50 mL og 10 mL. De fire ulike utfallene var:

- Blå: «Prøven inneholdt Klostridier og det ble produsert gass».
- Rød: «Prøven inneholdt Klostridier og det ble ikke produsert gass».
- Grønn: «Prøven inneholdt ikke Klostridier og det ble produsert gass».
- Gul: «Prøven inneholdt ikke Klostridier og det ble ikke produsert gass».



Figur 4.12. Sannsynligheten for fire ulike utfall: «Prøven inneholdt Klostridier og det ble produsert gass» (blå), «Prøven inneholdt Klostridier og det ble ikke produsert gass» (rød), «Prøven inneholdt ikke Klostridier og det ble produsert gass» (grønn) og «Prøven inneholdt ikke Klostridier og det ble ikke produsert gass» (gul). 3.14A viser sannsynligheten for utfallene for prøver inkubert ved 37°C i volum 50 mL, 10 mL, 1 mL og 0,1 mL. 3.14B viser sannsynligheten for utfallene for prøver inkubert ved 22°C i volum 50 mL og 10 mL.

For prøver inkubert ved 37°C viser figur 4.12A at det var økt sannsynlighet for at det ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier i større prøvevolum (50 mL og 10 mL), mens sannsynligheten var mindre i mindre prøvevolum (1 mL og 0,1 mL). Motsatt var det økt sannsynligheten for at det ikke ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier i mindre prøvevolum, og mindre sannsynlighet for at det ikke ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier i større prøvevolum. Videre viser figuren at det var ingen sannsynlighet for at det ble produsert gass fra en prøve som ikke inneholdt Klostridier i prøvevolum 50 mL og 10 mL, men i prøvevolum 1 mL og 0,1 mL var det derimot en liten sannsynlighet for dette. Motsatt var det 100% sannsynlighet for at det ikke ble produsert gass fra en prøve som ikke inneholdt Klostridier i prøvevolum 50 mL og 10 mL. I prøvevolum 1 mL og 0,1 mL var sannsynligheten for dette fremdeles høy men litt mindre.

For prøver inkubert ved 22°C viser figur 4.12B at det var økt sannsynligheten for at det ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier i prøvevolum 50 mL enn i 10 mL, men sannsynligheten var mindre sammenlignet for samme prøvevolum inkubert ved 37°C. For prøvevolum 50 mL var det mindre sannsynlighet for at det ikke ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier enn i 10 mL, men sannsynligheten var også her mindre sammenlignet for samme prøvevolum inkubert ved 37°C. Videre var det ingen sannsynlighet for at det ikke ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier, og det var 100% sannsynlighet for at det ikke ble produsert gass fra en prøve som ikke inneholdt Klostridier.

5. Diskusjon

I denne masteroppgaven ble det gjennom et dyrkningsforsøk gjort en kartleggingsstudie på sammensetningen og overlevelsen av sporedannere langs produksjonslinjen for melkepulver med spesielt fokus Klostridier. I dette kapittelet diskuteres resultatene opp mot publisert forskning.

5.1 Endring av totalantall bakterier og sporeantall (MPN)

gjennom produksjonslinjen

Langs produksjonslinjen for melkepulver ble vegetative bakterier og sporer utsatt for ulike prosesseringssteg: Rå melka ble separert i fløte og skummet melk, fløten og skummet melka ble pasteurisert, noe pasteurisert skummet melk ble tørket til skummetmelkpulver og noe mikrofiltrert til retentat og permeat. Deretter ble retentatet tørket til kaseinpulver. Totalantall bakterier og sporeantall (MPN) i de ulike prøvene reflekterer hvordan sporer og vegetative bakterier ble påvirket av disse prosesseringsstegene. MPN ble også utregnet for 3 ulike observasjoner. Betydningen av disse funnene diskuteres nærmere i kapittel 5.7.1.

5.1.1 Totalantall bakterier

I følge McHugh et al. (2017) vil sporene kunne være med melka hele veien til melkepulver, mens de vegetative bakteriene drepes underveis i prosessen av pasteurisering og tørking. Det er derfor ikke usannsynlig at bakteriene som ble detektert i rå melk og rå fløte i all hovedsak var vegetative bakterier, mens bakteriene som ble detektert videre utover i produksjonslinjen mot ferdig melkepulver var aerobe sporer som hadde begynt å germinere etter å ha blitt stimulert av pasteuriseringen. Becker et al. (1994) skiller mellom raskt-germinerende og seint-germinerende *B. cereus* sporer: 24 timer etter en varmebehandling på 72°C i 10 sekunder vil raskt-germinerende sporer begynne å germinere, mens seint-germinerende sporer begynne å germinere 24 timer etter en varmebehandling på 80°C i 10 minutter. I denne studien inkuberte agarene i 2 dager. Dette var lenge nok til at sporene kunne begynne å germinere og vokse på agarene.

Resultatene fra denne studien viste at totalantall bakterier i en prøve kunne variere mellom BHI- og blodagar, og i noen tilfeller ble det bare detektert kolonier på den ene agaren. I henhold til teorien kan dette tyde på at det var ulike bakteriearter som vokste på de ulike agarene (Aspholm,

2020). Ut ifra sekvenseringsresultatene presentert i kapittel 4.5 og 4.6 er det likevel vanskelig å kunne si hvilke bakteriearter som vokste bedre på den ene eller andre agaren. At agarene viste ulik vekst tyder også på at sammensetningen av sporer og bakterier var ulik mellom prøver og mellom uttak, noe som diskuteres i kapittel 5.5.

Rå melk er rik på vegetative bakterier, og at det ble detektert bakterier i rå melk var derfor forventet. Videre viste resultatet at det også ble detektert bakterier i rå fløte. I henhold til teorien var det ikke forventet vekst av bakterier verken i rå fløte eller pasteurisert fløte, da bakterier og sporer er tunge og vil gå i skummetmelkfasen når rå melk separeres (Walstra et al., 2006). Resultatet tyder imidlertid på at noen bakterier og sporer ble separert til fløtefasen, og ved uttak 2 var totalantall bakterier høyere i pasteurisert fløte enn i pasteurisert skummet melk. Det er ikke utenkelig at når rå melk fra dette uttaket ble separert fikk pasteurisert fløte en bakteriesammensetning som vokste bedre på BHI- og blodagar enn hva bakteriene som befant seg i pasteurisert skummet melk gjorde.

Videre viser resultatene at totalantall bakterier økte gjennom prosessen fra pasteurisert skummet melk til skummetmelkpulver, og fra pasteurisert skummet melk til retentat for alle uttakene. Dette var som forventet da det vil skje en oppkonsentrering av bakteriene i det melka tørkes (det fjernes vann) eller filtreres (vann, laktose, mineraler og myseproteiner filtreres gjennom membranen til permeatet, mens kaseiner og bakterier holdes tilbake i retentatet). Det var også forventet at totalantall bakterier skulle øke når retentat ble tørket til kaseinpulver. Det ble observert en økning på BHI-agar, men på blodagar så det ut til at veksten av totalantall bakterier heller ble redusert. Pasteurisert skummet melk og retentat ble ikke tørket før dagen etter, og i mellomtiden er det i henhold til Becker et al. (1994) ikke utenkelig at sporer i pasteurisert skummet melk og retentatet kan ha begynt å germinere. Når retentat så har blitt tørket kan dette ha vært en påkjenning stor nok til å drepe de germinerte sporene, og derfor ble det detektert færre bakterier på blodagar. Videre blir retentat fremstilt fra en mikrofiltreringsprosess som foregår ved en temperatur som også kan tenkes å ha stimulert sporene til germinering, noe som også kan forklare hvorfor totalantall bakterier i kaseinpulver fra alle uttak jevnt over (med noen unntak) var mindre på BHI- og blodagar sammenlignet med skummetmelkpulver.

Det ble som forventet ikke detektert noen bakterier i permeat fra noen av uttakene. Dette tyder på at membranen med sin porediameter på 0,14 µm holdt sporer tilbake i retentat og derfor ikke

slapp gjennom noen sporer til permeatet. At membranen hadde god filtreringsevne viste også kontrollen av protein i permeatet, da det ikke ble analysert kaseiner i permeatet verken tidlig, midt eller seint i prosessen fra noen av uttakene. Dette tyder på at kaseiner holdes igjen av membranen, noe som var forventet ved bruk av en membran med porediameter 0,14 µm.

5.1.2 MPN

For observasjon 1 og 2 endret sporeantallet seg nesten etter samme mønster som totalantall bakterier: Fra alle uttakene så det ut til at tørking av pasteurisert skummet melk til skummetmelkpulver og mikrofiltrering oppkonsentrerte prøven slik at sporeantallet i henholdsvis pulver og retentat ble høyere. Fra uttak 1 og 3 var sporeantallet mindre i kaseinpulver sammenlignet med retentat og skummetmelkpulver, noe som kan forklares i henhold til det som ble diskutert i kapittel 5.1.1. Ellers kunne det fra alle uttakene, som forventet i henhold til teorien (Walstra et al., 2006), se ut som at sporeantallet var høyere i pasteurisert skummet melk enn i fløte.

For observasjon 1 og 2 var permeatet sporefritt, men for observasjon 3 inneholdt permeatet noe sporer. Sekvenseringsresultatene viste at dette var Basillusporer og årsaker til dette funnet diskuteres nærmere i kapittel 5.4.2.

5.2 Funn av Klostridiearter

Som forventet ble det fra dyrkningsforsøket funnet både *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. beijerinckii* og *Cl. sporogenes*, som i henhold til teorien er arter man vet er et kvalitetsproblem i ost (Doyle et al., 2014). I tillegg ble den patogene *Cl. perfringens* detektert. Andre arter som ble detektert var *Cl. pabulybutyricum*, *Cl. tepidum*, *Cl. diolis* og *Cl. saccharoperbutylaceticum*.

Cl. pabulybutyricum er en ny art som ble isolert fra silofôr i Japan så sent som i 2017 (Kobayashi et al., 2017). Også *Cl. tepidum* en ny art som ble isolert fra en ikke-melkebasert proteinshake samme år (Dobritsa et al., 2017). Det finnes så langt begrenset litteratur på disse artenes egenskaper, men *Cl. pabulybutyricum* skal i følge Kobayashi et al. (2017) være i stand til å produsere smørsyre og den er genetisk lik en stamme av *Cl. tyrobutyricum*. Det er derfor naturlig å tenke at den oppfører seg omtrent likt som *Cl. tyrobutyricum*, og dens tilstedeværelse i silofôr gjør at den har potensiale til å komme over i melkeproduksjonslinjen.

Biebl og Spröer (2002) karakteriserer *Cl. diolis* som en fermentativ bakterie som omdanner glukose og glyserol til 1,3-propandiol, eddiksyre og smørsyre, og dens evne til å produsere 1,3-propandiol med stort utbytte har gjort den attraktiv til industriell bruk (Wang et al., 2013). Verken Wang et al. (2013) eller Biebl og Spröer (2002) kan rapportere om at denne produserer gass. Også *Cl. saccharoperbutylacetonicum* er av interesse for industriell bruk til produksjon av acetone, butanol og etanol, men den produserer også smørsyre, CO₂ og H₂ (Keis et al., 2001). Det er ikke blitt funnet litteratur på at *Cl. pabulybutyricum*, *Cl. tepidum*, *Cl. diolis* eller *Cl. saccharoperbutylacetonicum* kan utgjøre et kvalitetsproblem i ost eller andre melkeprodukter, men samtlige av dem produserer både gass (med unntak av *Cl. diolis*) og smørsyre som er forbundet med kvalitetsødeleggelse i ost. Det bør derfor undersøkes videre hvilken betydning disse bakteriene kan ha i melkeproduksjonslinjen.

Det er verdt å nevne at funnene i denne masteroppgaven ble basert på en 16S rRNA-analyse, noe som gjør at resultatene er forbundet med en viss usikkerhet. Selv om 16S rRNA-genet innehar mye informasjon som kan brukes for å klassifisere bakterier, kan sensitiviteten på artsnivå være varierende (Janda & Abbott, 2007). Innenfor nærstående arter kan sekvenslikheten i følge Janda og Abbott (2007) være over 99,5%, og de viser til flere genus der feilidentifisering på artsnivå har vært et problem på grunn av dette. Det er ikke utenkelig at dette også kan gjelde for andre genus som ikke nevnes i deres studie, blant andre genus *Clostridium*. For eksempel har man lenge visst at *Cl. botulinum* gruppe 1 og *Cl. sporogenes* er genetisk like hverandre. Dobritsa et al. (2017) nevner et eksempel fra New Zealand i 2013 der man trodde at myseproteinkonsentrat var blitt kontaminert av *Cl. botulinum*, som senere viste seg å være *Cl. sporogenes*. En helgenomsekvensering vil kunne gi et sikrere funn.

5.3 Betydningen av Basillusporer i ost og melkepulver

I tillegg til funn av Klostridiearter, viser resultatet at det også ble funnet en del Basillusarter og Paenibasillusarter. Dette bekrefter teorien om at RCM-mediet ikke er selektivt på Klostridier, men at også fakultativt anaerobe Basillus kan vokse her (Jonsson, 1990).

At Basillus og Paenibasillus kan vokse anaerobt, til tross for at de i litteraturen omtales som aerobe, gjør at også de kan tenkes å være en potensiell trussel i det anaerobe miljøet i osten når den modnes. Dette støttes opp under av Gopal et al. (2015) som ikke utelukker at Basillusarter kan bidra til produksjon av biogene aminer i ost. Biogene aminer er toksisk og dannes ved nedbrytning av aminosyrer i mat, og proteolysen som skjer under modningen frigir aminosyrer som bakteriene kan nyttiggjøre seg av. Selv om mikrobiell ødeleggelse av ost først og fremst er forbundet med smørsyre- og gassproduksjon med hensyn til Klostridiesporer, viser dette at ost har et miljø som også Basillus kan vokse og trives i. I arbeidet med denne masteroppgaven har det ikke blitt funnet litteratur på at Basillus produserer smørsyre, men Porter et al. viser til flere studier lenger bak i historien der det er blitt vist at fakultativt anaerobe Basillus kan produsere gass i form av CO₂ og H₂ (Porter et al., 1936). Det er derfor ikke utenkelig at gassproduserende Basillus i noen tilfeller kan bidra til at osten blåses opp under modning, uten at det er funnet konkrete studier på dette. På bakgrunn av dette bør forskningen være åpen for at det ikke bare er Klostridiesporer som er kan være et kvalitetsproblem i ost.

I denne studien ble det også sådd ut på RCM-agar både fra rør der det hadde blitt observert gassproduksjon, men også fra rør der prøven bare var blakket. Når denne masteroppgaven er levert skal disse isolatene reindyrkes videre og senere identifiseres, noe som kan gi informasjon om hvilke spesifikke arter, både av genus *Clostridium* og genus *Bacillus*, som har evne til å produsere gass og hvilke som ikke gjør det. På den måten kan man finne ut hvilke spesifikke arter som har potensiale til å ødelegge osten når den modnes, og kanskje kan man finne andre gassproduserende arter enn de som allerede er et kjent problem.

I forhold til melkepulver understreker McHugh (2017) at selv om Klostridiesporer kan forekomme i melkepulver, har det vist seg at Basillusporer er mer utbredt og skaper større problemer. Dette støttes opp under av denne studien, der det kunne se ut som at det var høyest forekomst av *B.cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp* langs produksjonslinjen. Dessuten er flere av de Basillusartene som ble detektert i denne studien vanlig forekommende i melkepulver, deriblant *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* og *B.cereus*. Sistnevnte er en kjent patogen, selv om

flere stammer av denne faktisk er apatogen. Becker et al. (1994) viser til at *B.cereus*, på lik linje med *Cl. botulinum*, er en spore som ikke er ønskelig i melkepulver som blant annet brukes til spedbarnsmat. Som nevnt i teorien kan sporer begynne å germinere i tarmen hos nyfødte, og vil derfor være mer mottakelig for patogene sporer (Doyle et al., 2014). *B.cereus* er ikke like farlig som *Cl. botulinum*, men den produserer likevel emetiske toksiner som kan oppleves ubehagelige (Gopal et al., 2015).

5.4 Sporenes sammensetning og overlevelse gjennom produksjonslinjen

Som diskutert i kapittel 5.1 utsettes sporene for ulike prosesseringer som påvirker deres overlevelse, og plottene i resultatkapittel 4.5-4.6 viser hvilke sporer som overlevde og hvordan sporesammensetningen endret seg gjennom produksjonslinjen etter hvert som melka ble prosessert på ulik måte. Miller et al. (2015) viser i sin studie at sporesammensetningen med hensyn til *Basillus* er signifikant forskjellig mellom rå melk og ulike typer melkepulver. Selv om det ikke ble testet om det var en signifikant forskjell i sporesammensetning mellom de ulike prøvene i denne studien, kunne det se ut som at sammensetningen var forskjellig i rå melk og melkepulver både med hensyn til *Basillus*arter men også *Klostridie*arter. Det kunne også virke som at sammensetningen av bakterier i prøvene i de ulike uttakene var noe forskjellig, og dette var spesielt tydelig for uttak 2. Der ble det funnet større prosentandel *Paenibacillus lautus* i rå fløte. Videre var uttak 2 mer dominert av *Cl. tyrobutyricum* blant *Klostridie*ne. I perioden det ble hentet ut melk fra Ås gård til denne studien (uke 7 til uke 11) er det blitt gitt informasjon om at det ble skiftet fra plansilo til rundball, og rundt uke 11 var det også et utbrudd av bovin Coronavirus på ku. Bovint Coronavirus gjør at kua får diarè (Whist, u.å), og avføring vil derfor lettere bli overført til spene og kontaminere melka. At det ble skifte fra plansilo til rundball og det var utbrudd av Coronavirus, kan derfor være en naturlig forklaring på hvorfor sporesammensetningen var noe forskjellig mellom uttakene.

I mikrobiologiens verden samarbeider og konkurrerer bakterier med hverandre og dette kan påvirke hvordan de vokser. Det er ikke utenkelig at sporesammensetningen gjennom produksjonslinjen reflekteres av dette «fenomenet», da melka prosesseres på ulike måter som gjør at noen sporedannere får bedre vekstvilkår enn andre i den modifiserte melka slik at sammensetningen endrer seg. Det var en gjennomgående trend for alle uttakene at når prøvevolumet økte vokste *Klostridie*er bedre, og det kan virke som at de hadde en tendens til å

utkonkurrere *Basillus*. Videre er det viktig å huske på at forsøksoppsettet i denne masteroppgaven ble basert på en dyrkningsavhengig metode på RCM. Funnene i denne masteroppgaven gir derfor ikke et korrekt bilde av hvordan dynamikken mellom de ulike bakteriene er i virkeligheten, men den gir en indikasjon på hvilke arter av bakterier som finnes og hvordan ulike prosesseringssteg påvirker deres overlevelse. Til videre arbeid kan det derfor være interessant å gjøre forsøket med en dyrkningsuavhengig metode. Under diskuteres hvordan prosessene separering, pasteurisering, tørking og filtrering påvirket sporesammensetningen gjennom produksjonslinjen for melkepulver.

5.4.1 Separering og pasteurisering

At det kun ble funnet sporer i pasteurisert skummet melk og pasteurisert fløte viser at pasteuriseringen hadde vært effektiv for å drepe de vegetative cellene. Videre ble det observert at sammensetningen endret seg i det den rå melka ble separert til fløte og skummet melk, da noen sporer gikk i fløtefasen mens andre gikk i skummetmelkfasen. Dette til tross for at det i henhold til teorien forventes at sporer ikke skal gå i fløtefasen (Walstra et al., 2006): Fra uttak 1 ble det observert at rå melk var rik på *Cl. sporogenes/tepidum*, *Cl. pabulibutyricum* og *B.licheniformis/paralicheniformis/haynesii/psicis*, men når melka ble separert til fløte og skummet melk var disse nesten borte både i fløte og skummet melk. I stedet var både pasteurisert skummet melk og rå fløte dominert av *Cl. diolos/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum*, *Cl. tyrobutyricum* og *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp*. I tillegg inneholdt pasteurisert skummet melk *Cl. perfringens*. Fra uttak 2 ble det i den ene prøven med vekst detektert *Cl. sporogenes/tepidum* i rå melk, men heller ikke denne ble funnet igjen i pasteurisert skummet melk, rå fløte eller pasteurisert fløte. Fra uttak 3 ble det observert at rå melk var rik på *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp*. og noe *Cl. perfringens* og *Virgibacillus promii*, men i pasteurisert skummet melk, rå fløte og pasteurisert fløte var de to sistnevnte borte.

Det er ikke utenkelig at når noen sporer gikk i fløtefasen og andre i skummetmelkfasen, ville dette bidra til endret bakteriedynamikk slik at sporer som kanskje var undertrykt i den rå melka fikk bedre vekstvilkår i pasteurisert skummet melk fordi den sporen som hadde vært en konkurrent heller gikk i fløtefasen. Dette er også en mekanisme som kan tenkes å påvirke hvordan sammensetningen ble i fløte og pasteurisert skummet melk.

Til tross for at det ble observert sporer i fløten, kunne det se ut til at sammensetningen av sporer i rå fløte og pasteurisert fløte var dominert av færre arter, i hovedsak noen Basillusarter og Paenibacillusarter (med unntak av uttak 1). Pasteurisert skummet melk så derimot ut til å vise større diversitet. Det er derfor nærliggende å tro at de fleste sporene gikk i skummetmelkfasen slik teorien antyder. Med unntak av uttak 1 viste Klostridier tendens til ikke å gå i fløten, og i lys av Carrera et al. (2006) sin studie som ser på ulikheter i sporestørrelse mellom Basillusarter (fra $0,160\mu\text{m}^3$ til $0,894\mu\text{m}^3$), er det ikke utenkelig at ulike Klostridiearter kan vise samme variasjon.

I henhold til fysikkens lover impliserer økt volum ofte økt masse. Yang et al. (2008) sin studie viser at noen Klostridiesporer (*Cl. sporogenes* og *Cl. hungatei*) kan ha en diameter helt opp mot $2,4\mu\text{m}$. Til sammenligning kan de Basillusartene som Carrera et al. (2006) har studert «bare» ha en diameter opp mot $0,98\mu\text{m}$, noe som kan tyde på at Klostridiene er større. Dette kan være en forklaring på hvorfor det ble observert mindre Klostridier i fløte.

Når det produseres ost blandes fløten sammen med ystemelka etter at ystemelka er mikrofiltrert/baktofugert. Dette innebærer at fløten ikke gjennomgår den samme prosesseringen for å fjerne sporene som ystemelka gjør, og det kan slik tenkes at sporene i fløten kan gå uhindret hele veien til osten. Ofte UHT-behandles imidlertid fløten før den tilsettes ystemelka. At det nesten ikke ble funnet Klostridiesporer i fløten kan bety at dette er en mindre viktig innfallsport for Klostridiesporer i ost, og at det først og fremst er Basillussporene som finner veien til osten via fløten.

5.4.2 Tørrking og filtrering

Fra uttak 1 forsvant *Cl. perfringens* helt fra prøvene etter hvert som skummet melka ble tørket eller filtrert, mens *Cl. pabulybutyricum* heller funnet i de senere stegene i prosessen. Ved alle uttakene var sammensetningen av sporer i pasteurisert skummet melk, retentat, skummetmelkpulver og kaseinpulver dominert av

Cl. diolis/beijerinckii/-saccharoperbutylaceticum og *Cl. tyrobutyricum*. At disse var mer dominerende på slutten av produksjonslinjen kan antyde at disse kanskje utgjør et større problem i det endelige melkeproduktet, selv om det er blitt rapportert om tilfeller av *Cl. perfringens* i melkepulver (Gopal et al., 2015). I henhold til teorien er det også kjent at også *Cl. sporogenes* kan vokse i ost (Doyle et al., 2014).

Fra uttak 1 og 3 var pasteurisert skummet melk, retentat, skummetmelkpulver og kaseinpulver dominert av *Cl. diolos/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum*. Videre var det få tilfeller der denne vokste sammen med *Cl. tyrobutyricum* i RCM-mediet. RCM-mediet skal ha en pH på 6,8 (Thermo Scientific, Ukjent), og i henhold til teorien vokser *Cl. beijerinckii* bedre ved høyere pH i forhold til *Cl. tyrobutyricum* (Pahlow et al., 2003). Videre er det gjort studier som viser at metabolitter fra *Cl. butyricum*, *Cl. beijerinckii* og *Cl. sporogenes* vil stimulere veksten av *Cl. tyrobutyricum* (Doyle et al., 2014; Le Bourhis et al., 2006). Det er ikke usannsynlig at dette kan forklare hvorfor mengden av *Cl. tyrobutyricum* jevnt over var mindre i disse prøvene, fordi veksten av denne kommer senere i gang.

Fra uttak 2 derimot kunne det seg ut som at *Cl. tyrobutyricum* var mer dominerende. Det er ikke usannsynlig at *Cl. diolos/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* hadde vært i melka på et tidligere tidspunkt, men at tilfeldighetene ved dette uttaket gjorde det slik at veksten av *Cl. tyrobutyricum* hadde kommet bedre i gang og slik hadde begynt å utkonkurrere *Cl. diolos/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum*.

I denne masteroppgaven ble melka filtrert ved en porediameter på 0,14 µm, men for senere studier kan det også være interessant å gjøre et forsøk der melka filtreres ved en porediameter på 1,14 µm som er nærmere den porediameteren meieriindustrien bruker når de produserer ost. Ved denne porediameteren forventes det at noen sporer vil slippe gjennom til permeatet, mens sporene som holdes igjen i retentatet blir UHT-behandlet. Det er derfor sporene i permeatet som først og fremst utgjør et problem i osteproduksjon, og å kartlegge overlevelsen til disse sporene kan derfor være nyttig.

Forskningshistorien har flere eksempler på at funn har blitt oppdaget ved tilfeldigheter. I denne masteroppgaven ble det detektert *B. oceanisediminis* i en prøve av skummetmelkpulver som i utgangspunktet ikke skulle blitt sekvensert fordi denne prøven hadde helt klar buljong (negativ vekst). Likevel ble denne «ved en feil» sekvensert, og sekvenseringsresultatet viste at det man trodde var en negativ prøve likevel inneholdt sporer. Dette viser at en forsker bør være kritisk til de metodene som brukes og huske på at virkeligheten ikke alltid gjenspeiler teorien.

Det var ikke forventet at det i permeatet fra uttak 1 seint i prosessen skulle bli detektert Basillusporer, da sporer med sin størrelse på 1 til 1,5 µm i diameter (Walstra et al., 2006) i teorien skal være for store til å passere en membran med porediameter på 0,14 µm. At det

likevel skjedde kan å ha sammenheng med så kalt «fouling» på membranens overflate, som betyr at porene tilstoppes av partikler slik at filtreringen blir mindre effektiv (Garzia et al., 2012). Fouling bygges opp over tid noe som kan forklare hvorfor sporer ble detektert i permeat kun seint i prosessen. Fouling oppstår gjerne når temperaturen økes til mellom 50 og 55°C slik at forholdene for mikrobiell vekst i membranen blir bedre og etter hvert vil biofilmdannelse kunne skje (Griep et al., 2018). I denne studien ble melka filtrert nettopp ved denne temperaturen. For å kompensere for den dårligere filtreringsevnen kan trykket økes, og det er ikke utenkelig at sporer som har bygget seg opp i membranen da vil kunne bli presset gjennom membranens porer til tross for at de egentlig var for store. Burgess et al. (2010) trekker frem *Basillus* som en sporedanner som er kjent for å vokse i biofilm i meierianleggene, noe som sammenfaller med funnet av *B. cereus/thuringiensis/wiedmanni/spp.* i permeatet. Nå var riktig nok analysen av kasein i permeatet seint i prosessen negativ som en kontroll på at membranen hadde god filtreringsevne, noe som ikke støtter teorien om fouling som årsak til sporer i permeatet.

5.5 Effekten av temperatur på vekst

I denne masteroppgaven ble et sett med rør inkubert ved 22°C selv om dette ikke er standard prosedyre i meieriindustrien. Ost modnes ved en temperatur mellom 5-20°C (McSweeney et al., 2017) og å se hvilke Klostridiearter som vokste ved lavere temperatur ville gi et mer korrekt bilde av virkeligheten og gi nyttig informasjon for å bedre forstå hvilke arter som kan være et problem ved kvalitetsødeleggelse av ost. Litteraturen gir ofte inntrykk av at *Cl. tyrobutyricum* er den store «syndebukken» når ost modnes, men resultatene fra dyrkning på rør inkubert ved 22°C viste at *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* var den eneste som vokste. Nå ble riktig nok rørene bare inkubert i 4 dager og det kan tenkes at dette var for kort tid for bakterien å etablere seg ved denne temperaturen, slik at *Cl. tyrobutyricum* ikke fikk den stimulansen den trengte for å begynne å vokse som diskutert over. Om det likevel skulle vise seg at *Cl. tyrobutyricum* ikke vokser ved temperatur ned mot modningstemperatur, er dette et interessant funn som bør så tvil om denne bakterien utgjør et så stort problem som man hittil har trodd. Og at det heller er andre sporedannere som utgjør hovedårsaken til problemene som man registrerer i ost.

5.6 Sammenhengen mellom gassproduksjon og kjente gassproduserende Klostridier

Denne studien viste at fra prøver inkubert ved 37°C var det økt sannsynlighet for at det ble observert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier i større prøvevolum (50-10 mL), men sannsynligheten var synkende i mindre prøvevolum (1-0,1 mL). Samtidig viser resultatene at det var ingen sannsynlighet for at det ble produsert gass fra en prøve som ikke inneholdt Klostridier i store prøvevolum, men sannsynligheten økte noe i mindre prøvevolum selv om sannsynligheten fremdeles var liten. Dette kan tyde på at Klostridierne er den store bidragsyteren til gassproduksjon, og når meieriindustrien oppfatter et rør som positivt kun med hensyn til at det observeres gass kan de være rimelig sikre på at prøven inneholder Klostridier. Likevel finnes det en viss sannsynlighet for at selv om det observeres gass så er det ikke Klostridier tilstede i prøven, noe som tyder på at Basillusarter kan være i stand til å produsere gass, og som tidligere diskutert bør deres kvalitetsforriggende egenskaper i ost undersøkes videre.

Sannsynlighetsberegningene viste imidlertid at det var økt sannsynlighet for at det ikke ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier i små prøvevolum. Dette taler for at meieriindustrien ikke kan være sikre på at de detekterer alle Klostridier bare ved å definere gass som vekst. Dessuten preparerer ikke meieriindustrien prøver på 50 mL og det vil derfor være økt sannsynlighet for at det ikke produseres gass fra en prøve som inneholder Klostridier.

Fra prøver inkubert ved 22°C var trenden noenlunde lik, men selv om det var økt sannsynligheten for at det ble produsert gass fra en prøve som inneholdt Klostridier i store prøvevolum, var sannsynligheten likevel mindre sammenlignet med prøver inkubert ved 37°C. Altså var det økt sannsynlighet for at en prøve som kun var blakket likevel inneholdt Klostridier. Denne observasjonen sammenfaller med det som ofte observeres på ysteriene der osten modnes ved lavere temperatur, at osten ikke alltid blåses opp, men at det likevel utvikles dårlig lukt og smak som gjør at hele paller må kasseres (Eide, 2020). Som diskutert over taler dette for at overlevelsen til *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* i ost er noe som det er verdt å undersøke videre.

5.7 Rørmetodens svakheter

5.7.1 Positive versus negative rør

Beregning av MPN er basert på positive rør, og i denne studien ble MPN beregnet basert på tre ulike måter ut ifra hvordan positive rør kan defineres. Meieriindustriern oppfatter et rør som positivt dersom det bare observeres gassproduksjon (med blakking) (observasjon 1), noe som betyr at prøven inneholder gassproduserende Klostridiesporer. Et rør som det ikke observeres gass fra, men som er blakket, blir altså oppfattet som negativt. Det kan virke som at meieriindustrien går ut ifra at en prøve inneholder Klostridier bare når det produseres gass og at når det produseres gass så må prøven inneholde Klostridier. Dette uten at de kan være sikre på at en prøve som bare er blakket også kan inneholde Klostridier eller gassproduksjonen kan komme fra andre sporedannere. I denne studien ble derfor MPN også beregnet for en prøve der «røret var positivt, dersom det ble observert gassproduksjon, eller dersom det ble observert blakket buljong uten gassproduksjon gitt at prøven inneholdt Klostridier» (observasjon 2) og for en prøve der «røret var positivt, dersom det ble produsert gassproduksjon (med blakking), eller dersom det ble observert blakket buljong (uten gassproduksjon) der prøven inneholdt Klostridier og/eller andre sporer». MPN viste at for observasjon 2 ble antallet anaerobe sporer lik eller noe høyere sammenlignet med MPN for observasjon 1, noe som betyr at antall anaerobe sporer i ystemelk i virkeligheten kan være noe høyere enn de tallene meieriindustrien opererer med.

Videre var MPN-tallene betraktelig høyere for observasjon 3. Dette er nyttige funn om meieriindustrien i fremtiden velger å videreutvikle 9-rørsmetoden til kvantifisering av anaerobe sporer i ystemelk til også å gjelde de prøvene som bare er blakket. For selv om sekvenseringsresultatene viste at det var sannsynlig at kun blakkede prøver også inneholdt Klostridier og burde bli oppfattet som positive, er dette ingen garanti da sekvenseringsresultatene også viste at det var sannsynlig at blakkede prøver i flere tilfeller bare inneholdt Basillusporer. Å basere MPN på blakkede prøver som man ikke vet hva inneholder kan slik gi et uriktig MPN-tall, og da er det bedre om MPN kun baseres på gassproduksjon slik det gjøres i dag. Sekvenseringsresultatene viser imidlertid at det var liten sannsynlighet for at det ble produsert gass fra en prøve som ikke inneholdt Klostridier, og på bakgrunn av dette kan meieriindustrien være rimelig sikre på at kvantifisering av anaerobe sporer med hensyn til gassproduksjon er pålitelig.

5.7.2 Gassproduksjon og inkubasjonstid

Montville (1982) har utført en studie der han så på sammenhengen mellom gass- og proteaseproduksjon og dyrkningsbetingelser hos stammer av *Cl. botulinum*. Resultatene hans kunne tyde på at glukosekonsentrasjon og pH i dyrkningsmediet (Botulinum assay medium) hadde effekt på vekst, gassproduksjon og toksisitet. Gassproduksjon fra et medium med pH < 5,50 var fraværende i opptil 6 dager etter at mediet ble blakket, og i et medium uten glukose i tillegg var gassproduksjon fraværende ved pH helt opp mot 7. Likevel ble det fra noen stammer detektert botulinumtoksiner. Det er ikke usannsynlig at samme mekanisme er tilfelle for andre arter av genus *Clostridium*, og dette betyr at å basere en rørmetode på observasjon av gass for å bestemme om det er kvalitetsforringende anaerobe sporer tilstede eller ikke kan være innbefattet med usikkerhet når rørene ikke inkuberes lenger enn 3 dager.

6. Oppsummering

Funnene i denne masteroppgaven viste at sporene ble påvirket av ulike prosesseringer. Dette kunne ses fordi sporesammensetningen, sporeantall og totalantall bakterier endret seg i de ulike prøvene. Klostridiesporene ble ikke separert til fløtefasen i særlig stor grad, noe som tyder på at fløten er en mindre sentral innfallsport for Klostridier i ost. Dette betyr at hvordan sammensetningen av Klostridiearter er i skummetmelkfasen, vil ha betydning for hvilke arter som går hele veien til ost, melkepulver eller andre melkeprodukter.

Denne studien viste at det først og fremst var *Cl. tyrobutyricum* og *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum* som gikk hele veien til melkepulver og som kan utgjøre et problem i det ferdige melkeproduktet. I tillegg ble *Cl. pabulybutyricum* detektert utover i produksjonslinjen fra uttak 1, og denne arten kan det derfor være interessant å gjøre ytterligere forskning på. Blant disse er ingen kjente patogener. Derfor bør det være trygt å anvende melkepulver til produksjon av ulike matvareprodukter.

Prøvene inkubert ved 22°C viste bare funn av *Cl. diolis/beijerinckii/saccharoperbutylaceticum*. Fordi 22°C er nærmere modningstemperaturen for ost enn 37°C, kan dette tyde på at disse artene bidrar til kvalitetsødeleggelse av ost når den modnes, heller fremfor *Cl. tyrobutyricum* som man lenge har antatt å være «syndebukken».

I denne studien ble det i tillegg til Klostridiesporer også detektert Basillusporer og Paenibasillusporer, og det var en viss sannsynlighet for at det ble observert gass fra en prøve som inneholdt noen av disse. Dette gir mistanke om at også disse kan produsere gass i det anaerobe miljøet i osten, og kanskje er det ikke bare Klostridiesporene som er «problemet» i kvalitetsødeleggelse av ost.

7. Veien videre

Denne studien har gitt forståelse for hvordan sporer blir påvirket av ulike prosesseringer langs produksjonslinjen for melkepulver og hvilke spesifikke Klostridiearter som kan være et problem i melkeprodukter. Men studien har også gitt innsikt og åpnet opp for nye spørsmål som kan være interessante å finne svar på til videre arbeid.

Forsøksoppsettet i denne studien baserte seg på en dyrningsavhengig metode. I dyrkningsavhengige metoder dyrker man frem de bakteriene man er ute etter og de kan utkonkurrere andre bakterier som kan ha like stor verdi. Resultatene kan derfor gi et modifisert bilde av hvordan bakteriedynamikken er i virkeligheten. Til videre arbeid vil det derfor være interessant å basere forsøksoppsettet på en dyrningsuavhengig metode der DNA fra bakteriene ekstraheres direkte fra prøven uten at den må dyrkes opp først.

I denne studien ble den pasteuriserte skummet melka mikrofiltrert gjennom en membran med porediameter på 0,14 μm . Sporer har en størrelse på 1-1,5 μm i diameter, slik at de er for store til å slippes igjennom til permeatet ved denne porediameteren. I meieriindustrien mikrofiltreres ystemelka vanligvis gjennom en membran med porediameter på 1,14 μm , altså stor nok til at noen sporer kan slippes gjennom til permeatet. Retentatet som er rik på sporer blir UHT-behandlet slik at sporene drepes, men permeatet vil ikke få den samme varmebehandlingen fordi myseproteinenes koaguleringssegenskaper må ivaretas. Det er derfor først og fremst sporene i permeatet som kan utgjøre et problem i osteproduksjon, og til videre arbeid vil det derfor være nyttig å gjøre studien ved bruk av en porediameter på 1,14 μm for å kartlegge hvilke arter som finnes i permeatet.

Det er lett å konkludere med at gassen som ble observert fra en del prøver i denne studien ble produsert av Klostridier da disse er kjente gassprodusenter, men denne studien viste at det også ble produsert gass fra prøver der det ikke hadde blitt detektert Klostridier. Det er også nyttig å vite hvilke spesifikke Klostridiearter som produserer gass. Til videre arbeid vil det derfor være interessant å rendyrke isolater fra prøver det ble observert gass, for så å identifisere hvilke arter disse prøvene inneholdt.

Det ble detektert en del Klostridiearter som ikke er et kjent problem i ost og andre melkeprodukter. Disse artene var *Cl. pabulybutyricum*, *Cl. tepidum*, *Cl. diolis* og

Cl. saccharoperbutylaceticum. Med unntak av *Cl. diolis* produserer produserer samtlige av dem gass, og alle produserer smørsyre. Om disse kan utgjøre et kvalitetsproblem i ost og andre melkeprodukter bør undersøkes videre.

I denne studien ble det forventet at totalantall bakterier og sporeantall skulle øke i det retentat ble tørket til kaseinpulver (det fjernes vann) og det burde vært høyere enn i skummetmelkpulver (retentat skal ha høyere bakterieantall enn skummet melk, og melkepulver fra retentat skal derfor ha et høyere bakterieantall enn melkepulver fra skummet melk). Likevel viste resultatene at totalantall bakterier og sporeantall jevnt over var lavere i kaseinpulver sammenlignet med retentat og skummetmelkpulver. Dette kan tyde på at sporer blir stimulert av mikrofiltreringsprosessen til germinering og slik «være klar» til å begynne å vokse i for eksempel ost der ystemelka har blitt mikrofiltrert. Til videre arbeid kan det være interessant å gjøre en grundigere undersøkelse på hvordan ulike prosesseringer kan påvirke sporenes germinering.

FNs bærekraftsmål nummer 2 skal sikre matsikkerhet og bærekraftig landbruk innen år 2030 (FN-sambandet, 2020). I følge Smolan og Vaksvik (2014) definerer FN matsikkerhet slik: «Matsikkerhet eksisterer når alle mennesker til enhver tid har fysisk og økonomisk tilgang til nok mat og trygg mat for et fullgodt kosthold som møter deres ernæringsmessige behov og preferanser. Det danner grunnlag for et aktivt liv med god helse». Innenfor meieriteknologifaget betyr dette at man er opptatt av å bruke hele melken slik at ingenting går til spille; det er god miljøpolitikk! Dette innebærer at meieriindustrien hver dag jobber mot melkeprodukter som er fri for kvalitetsforringende- og patogene mikroorganismer i kampen mot matsvinn. Klostridier har en biologi som gjør dem vanskelig å bekjempe langs produksjonslinjen. Det er uheldig at ost må kastes på grunn av smørsyresporene og det er synd at forbrukeren kan bli syk av melkeproduktene som konsumeres. Resultatene fra denne masteroppgaven har vist hvordan ulike prosesseringer påvirker sammensetningen og overlevelsen av ulike Klostridiearter i vinterhalvåret, og forhåpentligvis kan funnene brukes i den videre forskningen til CLOBIO på veien mot å eliminere innhold av Klostridier i melkeprodukter. Når man har identifisert artene som finnes og hvordan de blir påvirket av ulike prosesseringer, vil dette gi innsikt i hvilke som kan være en årsak til at maten kvalitetsforringes eller gjør maten utrygg å spise. Dette gir muligheter for å utvikle metoder som raskt kan identifisere spesifikke Klostridiearter før de gjør skade på det ferdige melkeproduktet. Dette er noe CLOBIO skal forske videre på.

8. Referanser

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2014). *Essential Cell Biology*. New York, USA: Garland Science.
- Aspholm, M. (2020). *Prosjektleder CLOBIO ved NMBU Veterinærhøgskolen*. : Etter samtale på e-post 2020.06.11.
- Bahl, H. & Durre, P. (2001). *Clostridia - Biotechnology and Medical Applications*. Germany: Wiley - VCH Verlag GmbH. Tilgjengelig fra: <https://www.amazon.com/Clostridia-Biotechnology-Medical-Applications-Hubert-Bahl/dp/3527301755>.
- Becker, H., Schaller, G., Wolfgang, Wiese, v. & Terplan, G. (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90218-6).
- Beckman Coulter. (2016). *Instructions For Use. Agenvourt AMPure XP. PCR Purification: Manual*.
- Bermúdez, J., González, M. J., Olicera, J. A., Bergueno, J. A., Juliano, P., Fox, E. M. & Reginensi, S. M. (2016). Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10079>.
- Biebl, H. & Spröer, C. (2002). Taxonomy of the Glycerol Fermenting Clostridia and Description of *Clostridium diolis* sp. nov. doi: 10.1078/07232020260517616.
- Burgess, S. A., Lindsay, D. & Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027.
- Bylund, G. (1995). *Dairy processing handbook*. Sverige: Tetra Pak Processing Systems
- Carrera, M., Zandomeni, R. O., Fitzgibbon, J. & Sagripanti, J.-L. (2006). Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03111.x.
- Dobritsa, A. P., Kutumbaka, K. K., Werner, K., Wiedmann, M., Asmus, A. & Samadpour, M. (2017). *Clostridium tepidum* sp. nov., a close relative of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum* Group I. doi: 10.1099/ijsem.0.001948.
- Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, P. R., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2014). Anaerobic sporeformers and their significans with respect to milk and dairy products. 197: 77-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>.
- Eide, V. (2020). *Laboratorieleder, Tine Meieriet Byrkjelo*. : Etter samtale på telefon 2020.05.27.
- Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotmann, R. M. & Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene aequencing on the Illumina MiSeq platform. doi: <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>.
- Faille, C., Bénézech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., Ronse, A. & Slomianny, C. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.004>.
- FN-sambandet. (2020). *FNs bærekraftsmål*. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal> (lest 2020.06.09).
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2.utg. utg. Cork, Ireland: Springer.
- Garzia, L. F., Blanco, S. À. B. & Rodríguez, F. A. R. (2012). Microfiltration applied to dairy streams: removal of bacteria. doi: 10.1002/jsfa.5935.

- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A. & Cotter, P. D. (2015). The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning - smitte gjennom mat og vann*. 4. utg. Oslo: Cappelen Damm Akademisk.
- Gray, M. W., Sankoff, D. & Cedergren, R. J. (1984). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC320035/> (lest 2020.04.05).
- Griep, E. R., Cheng, Y. & Moraru, C. I. (2018). Efficient removal of spores from skim milk using cold microfiltration: Spore size and surface property considerations. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14888>.
- Hagenes, M. (2019). *Bakterier fra juret til kyr. Vekst og metabolisme i melk hos utvalgte isolater av melkesyrebakterier og patogener*. . Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.
- Henriques, A. O. & Moran, C. P. (2007). Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. Volum 61: 555-588.
- Illumina. (2016). *Illumina Sequencing by Synthesis (Now in 3D)*. Tilgjengelig fra: <https://www.illumina.com/company/video-hub/fCd6B5HRaZ8.html> (lest 2020.05.09).
- Illumina. (2017). *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. Tilgjengelig fra: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.
- Invitrogen Corporation. (2008). *SeqalPrep™ Normalization Plate (96) Kit*: Thermo Fisher Scientific. Katalognummer: A10510-01.
- Jakobsen, M. (2020). *Produktrådgiver, Tine Meieriet Brummundal*: Etter samtale på telefon 2020.05.27.
- Janda, M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
- Jany, J.-L. & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. doi: 10.1016/j.fm.2008.06.003.
- Johansen, A., Stokstad, M., Randby, Å. T., Lindback, T. & Njaastad, K.-M. (2013). Sporedannende bakterier. Utfordringer for mjølk kvalitet, fôr kvalitet og dyrehelse. *Bioforsk Rapport*.
- Jonsson, A. (1990). Enimeration and Confirmation of Clostridium tyrobutyricum in Silages Using Neutrak Red, D-Cycloserine, and Lactate Dehydrogenase Activity. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78725-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78725-5).
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyte, D. & Bobinas, C. (2012). Fermentation processes using Lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. . doi: 10.5772/30692.
- Jørgensen, C. E., Abrahamsen, R. K., Rukke, E.-O., Hoffmann, T. K., Johansen, A.-G. & Skeie, S. B. (2018). Processing of high-protein yoghurt. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002>.
- Keis, S., Shaheen, R. & Jones, D. T. (2001). Emended descriptions of Clostridium acetobutylicum and Clostridium beijerinckii, and descriptions of Clostridium

- saccharoperbutylaceticum sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2095>.
- Kobayashi, H., Nakasato, T., Sakamoto, M., Ohtani, Y., Terada, F., Sakai, K., Ohkuma, M. & Tohno, M. (2017). *Clostridium pabulibutyricum* sp. nov., a butyric-acid-producing organism isolated from high-moisture grass silage. doi: 10.1099/ijsem.0.002387.
- Le Bourhis, A.-G., Dorè, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R. & Tholozan, J.-L. (2006). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.027>.
- LGC. *Mag midi kit*. Germany: Biosearch technologies
- Lordan, R., Tsoupras, A., Mitra, B. & Zabetakis, I. (2018). Dairy Fats and Cardiovascular Disease: Do We Really Need to Be Concerned? doi: 10.3390/foods7030029.
- MAFFT. (u.å). *Multiple sequence alignment and NJ/UPGMA phylogeny*. Tilgjengelig fra: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> (lest 2020.06.08).
- Martin, K. (u.å). *Types of PCR used for Genetic Research: Applications where different types of PCR play a vital role*: Gold Biotechnology. Tilgjengelig fra: <https://www.goldbio.com/articles/article/Types-of-PCR-used-for-Genetic-Research> (lest 2020.05.09).
- McHugh, A. J., Feehily, C., Hill, C. & Cotter, P. D. (2017). Detection and Enumeration of Spore-Forming Bacteria in Powdered Dairy Products. doi: 10.3389/fmicb.2017.00109.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D. & Everett, D. W. (2017). *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. 4. utg utg.
- Miller, R. A., Kent, D. J., Watterson, M. J., Boor, K. J., Martin, N. H. & Wiedmann, M. (2015). Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9943>.
- Montville, T. J. (1982). Dependence of *Clostridium botulinum* Gas and Protease Production on Culture Conditions. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242325/> (lest 2020.05.23).
- Nasjonalt råd for ernæring. (2011). *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer. Metodologi og vitenskapelig kunnskapsgrunnlag*. Oslo, Norge: Helsedirektoratet.
- National Center for Biotechnology Information. (u.å). *Basic Local Alignment Search Tool*: USA. Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (lest 2020.08.06).
- Norsk Helseinformatikk. (2019). *Gassgangren*. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/bakteriesykdommer/gassgangren/> (lest 2020.03.17).
- Oblinger, J. L. & Koburger, J. A. (1975). Understanding and Teaching the Most Probably Number Technique.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Elferink, S. J. W. H. O. & Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of Ensiling. doi: 10.2134/agronmonogr42.c2.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P. & Sarker, M. R. (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. doi: 10.1016/j.tim.2010.10.004.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., et al. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification

- of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>.
- Porcellato, D. & Skeie, S. B. (2016). Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.05.005>.
- Porcellato, D., Aspholm, M., Skeie, S. B., Monshaugen, M., Brendehaug, J. & Mellegård, H. (2017). Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.004>.
- Porter, R., McCleskey, C. S. & Levine, M. (1936). The Facultative Sporulating Bacteria Producing Gas from Lactose. Lastet ned fra NMBU 2020.05.30.
- Qiagen. *MON PowerFood® Microbial DNA Isolation Kit. Instruction manual*. Mo Bio Laboratories, I. (red.).
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, P. R., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2012). The complex microbiota of raw milk. doi: 10.1111/1574-6976.12030.
- Samul, D., Worsztynowicz, P., Leja, K. & Grajek, W. (2013). Beneficial and harmful roles of bacteria from the Clostridium genus. Tilgjengelig fra: <http://psjd.icm.edu.pl/psjd/element/bwmeta1.element.bwnjournal-article-abpv60p515kz> (lest 2020.04.07).
- Schøyen, R. (2011). *Mikroorganismer og sykdom. Lærebok i mikrobiologi og infeksjonssykdommer for helsepersonell*. Oslo: Gyldendal Akademiske.
- Scott, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. & Flint, S. H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. doi: 10.1111/j.1471-0307.2007.00309.x.
- Sjøberg, N. O. (2013). *Molekylær genetik. Genteknologi - humant DNA*. 5.utg utg. Høvik: Forlaget vett og viten.
- Skeie, S. B., Håland, M., Thorsen, I. M., Narvhus, J. & Porcellato, D. (2019). Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14083>.
- Smolan, G. & Vaksvik, S. (2014). *HACCP. Arbeid med mattrygghet*. Oslo: Yrkeslitteratur as.
- Sølverød, L., Nybakken, D., Østerås, O., Kvamsås, H. & Brodshaug, E. (u.å.). *Kanskje verdens fineste melk. Faktahefte om melkekvalitet*. : TINE Råvare og TINE Rådgivning. Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/praktisk-informasjon/eierdemokrati/horinger/attachment/377362?ts=153d2df009b> (lest 2020.04.07).
- Tesin, D. (2019). *DNA library normalization for NGS: why and how?*: Cytiva. Tilgjengelig fra: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/dna-library-normalization-in-ngs-10001> (lest 2020.05.10).
- Thermo Scientific. (Ukjent). *Dehydrated Culture Media - Reinforced clostridial medium (RCM)*. Tilgjengelig fra: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0149&org=53&c=UK&lang=EN (lest 2020.31.05).
- Tine Råvare. (2015). *TINEs regelverk om bedømmelse og betaling av melk etter kvalitet ved levering til TINE Råvare. Vedtatt av Koserstyret i TINE SA, gjeldende fra 1.1.2015*. Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/praktisk-informasjon/tines-regelverk/attachment/346898?ts=14a7119b071> (lest 2020.06.09).

- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P. & Lankveld, J. M. G. (2006). Improving Farm Management by Modeling the Contamination of Farm Tank Milk with Butyric Acid Bacteria. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72148-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72148-8).
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2.utg utg. USA: Taylor and Francis Group.
- Wang, Y., Tao, F., Tang, H. & Xu, P. (2013). Genome Sequence of Clostridium diolis Strain DSM 15410, a Promising Natural Producer of 1,3-Propanediol. doi: 10.1128/genomeA.00542-13.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2014). *Molecular biology of the gene*. 7.utg utg. New York: Cold spring harbor laboratory press. Pearson.
- Westergaard, V. (2010). *Milk Powder Technology. Evaporation and Spry Drying*. København, Danmark: GEA Niro.
- Whist, A. C. (u.å). *Symptomer på at du har fått BRSV og BCoV inn i besetningen*: Tine Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/fagprat/brsv-bcov-kontrollprogrammet/symptomer-på-at-du-har-fått-brsv-og-bcov-inn-i-besetningen> (lest 2020.06.22).
- Yang, W. W., Crow-Willard, E. N. & Ponce, A. (2008). Production and characterization of pure Clostridium spore suspensions. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03931.x>.
- Ødegård, I. (2015). *Reinforced Clostridial Medium (RCM-rør), medium til anaerobe sporedannere. Tillaging*. : TINE FoU: Styringsdokument. Ref.nr: 11127. MA-metode: MA 285. Godkjent av Johanne Brendehaug 16.01.2015. .
- Ødegård, I. (2016). *Anaerobe sporedannere (clostridier) i råmelk og ystemelk, 9-rørs-prøve med RCM*. . TINE FoU: Styringsdokument. Ref.nr: 11389. MA-metode: MA 556. Godkjent av Anne Jorunn Polden 15.03.2016. .

Vedlegg

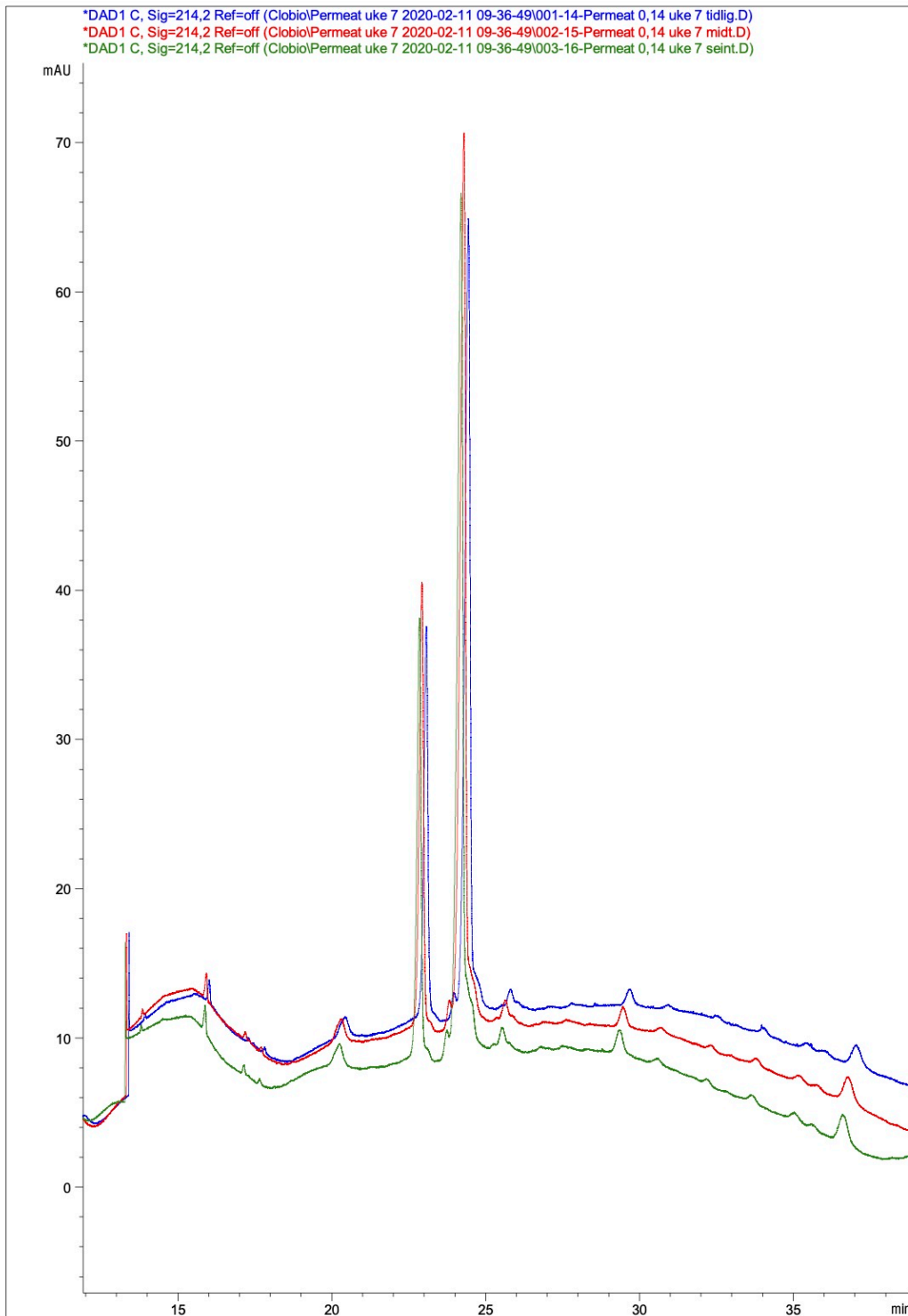
Vedlegg 1

Tabell 1. Vekst på RCM-rør fra dyrkningsforsøk inkubert ved 37°C og 22°C for rå melk, rå fløte, pasteurisert fløte (med unntak av uttak 1), pasteurisert skummet melk, permeat (kun uttak 1), retentat, skummetmelkpulver og kaseinpulver ved uttak 1, 2 og 3. Observasjon av vekst ble gjort med hensyn til gassproduksjon (2), kun blakket vekstmedium (1) og ingen vekst (0). Noen prøver ble ikke sekvensert (*) eller hadde mindre enn 1000 sekvenser (#).

Prøve	Uttak	(°C)	Observasjon											
			Tidlig				Midt				Seint			
			50 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	50 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	50 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL
Rå melk	1	37	2	1*	2	1*	2	1	2#	1	2	1*	1	1*
Rå fløte	1	37	1	1	1	0*	2	1*	1	0*	2	2#	1*	0*
Past. sk. melk	1	37	2	2	2	1	2	2	1	0*	2	2	1	0*
Permeat	1	37	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1	1	1#	0*
Retentat	1	37	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1
Skummetmelkpulver	1	37	2	2	1	1	2#	2	2	2	2	2	2	2
Kaseinpulver	1	37	2	2	1	1	2	2	1	0*	2	2	1	1
Rå melk	2	37		1*	1*	1*		1*	1*	1*		1*	1*	2
Rå fløte	2	37		1	1	1		1	1	1*		1	1	1
Past. fløte	2	37		1	1	1#		1	1	1		1#	1	1
Past. sk. melk	2	37		1	1#	1		1	1	0*		2	1#	0*
Permeat	2	37		0*	0*	0*		0*	0*	0*		0*	0*	0*
Retentat	2	37		2*	2*	1*		2	2	1#		2	1	1
Skummetmelkpulver	2	37	2	1#	1	1	2	2	1	0*	2	1	2#	0*
Kaseinpulver	2	37	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	0*
Rå melk	3	37		1	1*	1*		1	1	1*		1	1	1
Rå fløte	3	37		1	1	1*		1	1	1*		1	1	1#
Past. fløte	3	37		1	1	1		1	1	1		1	1	1*
Past. sk. melk	3	37		1	1	1		1#	1	1		2	1	0*
Permeat	3	37		0*	0*	0*		0*	0*	0*		0*	0*	0*
Retentat	3	37		2	1	1		2	1	1		2	1	1
Skummetmelkpulver	3	37	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1
Kaseinpulver	3	37	2	2	1#	1	2	1	1	1	2*	1	1	1
Rå melk	1	22	1*								1*			
Rå fløte	1	22	1								1			
Past. sk. melk	1	22	2								2			
Permeat	1	22	1				0*				0*			
Retentat	1	22	2								1			
Skummetmelkpulver	1	22	1				1				2			

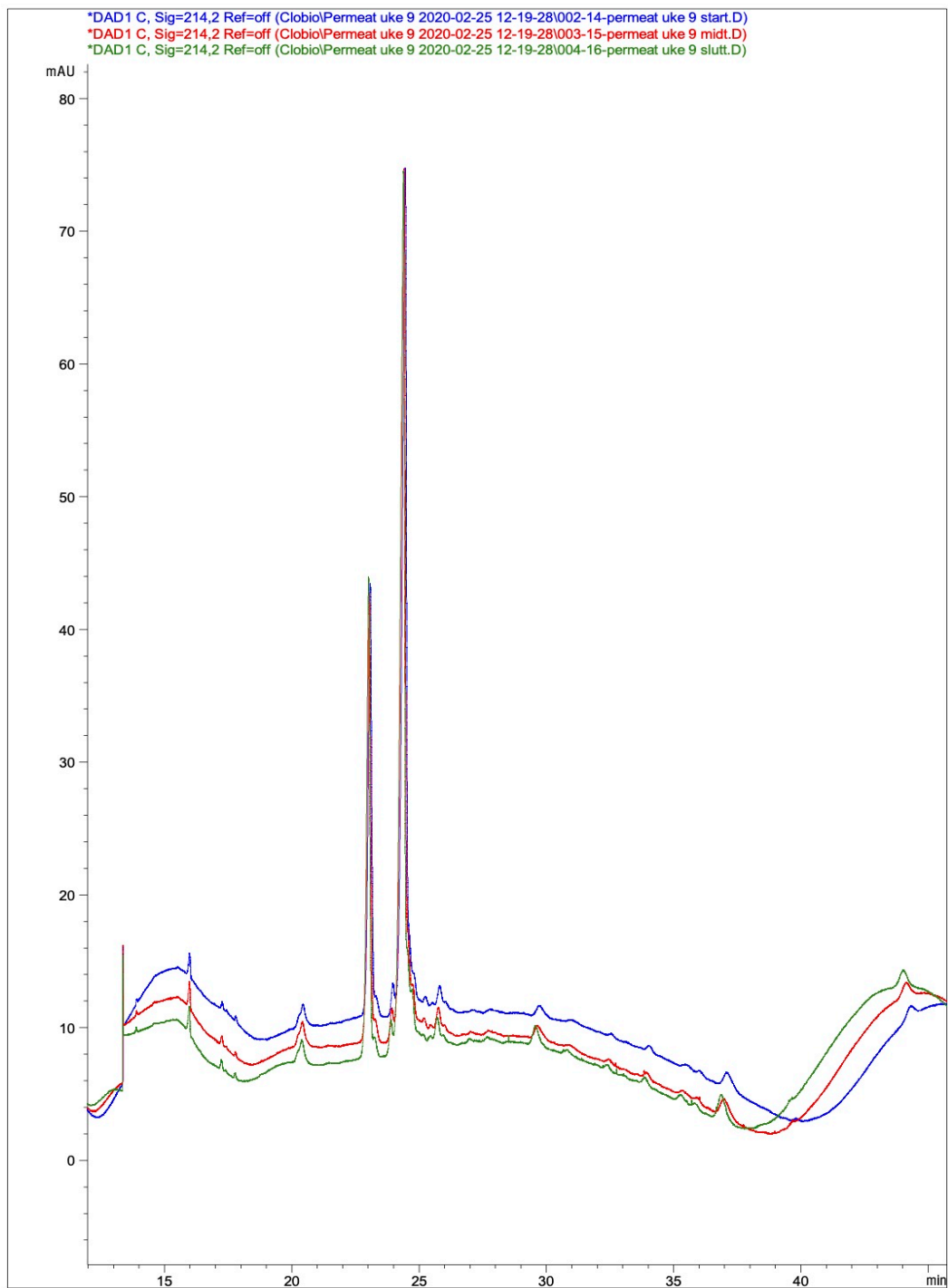
Kaseinpulver	1	22	2				1				2			
Rå melk	2	22		1*				1*				1		
Rå fløte	2	22		1				1				1		
Past. fløte	2	22		1				1				1		
Past. sk. melk	2	22		1				1				1		
Permeat	2	22		0*				0*				0*		
Retentat	2	22		2				1				1		
Skummetmelkpulver	2	22	2				1				1			
Kaseinpulver	2	22	1				1				1			
Rå melk	3	22		1*				1				1*		
Rå fløte	3	22		1				1				1		
Past. fløte	3	22		1#				1#				1		
Past. sk. melk	3	22		2				1				1		
Permeat	3	22		0*				0*				0*		
Retentat	3	22		2				1				2		
Skummetmelkpulver	3	22	1				2				2			
Kaseinpulver	3	22	1				2				2			

Vedlegg 2



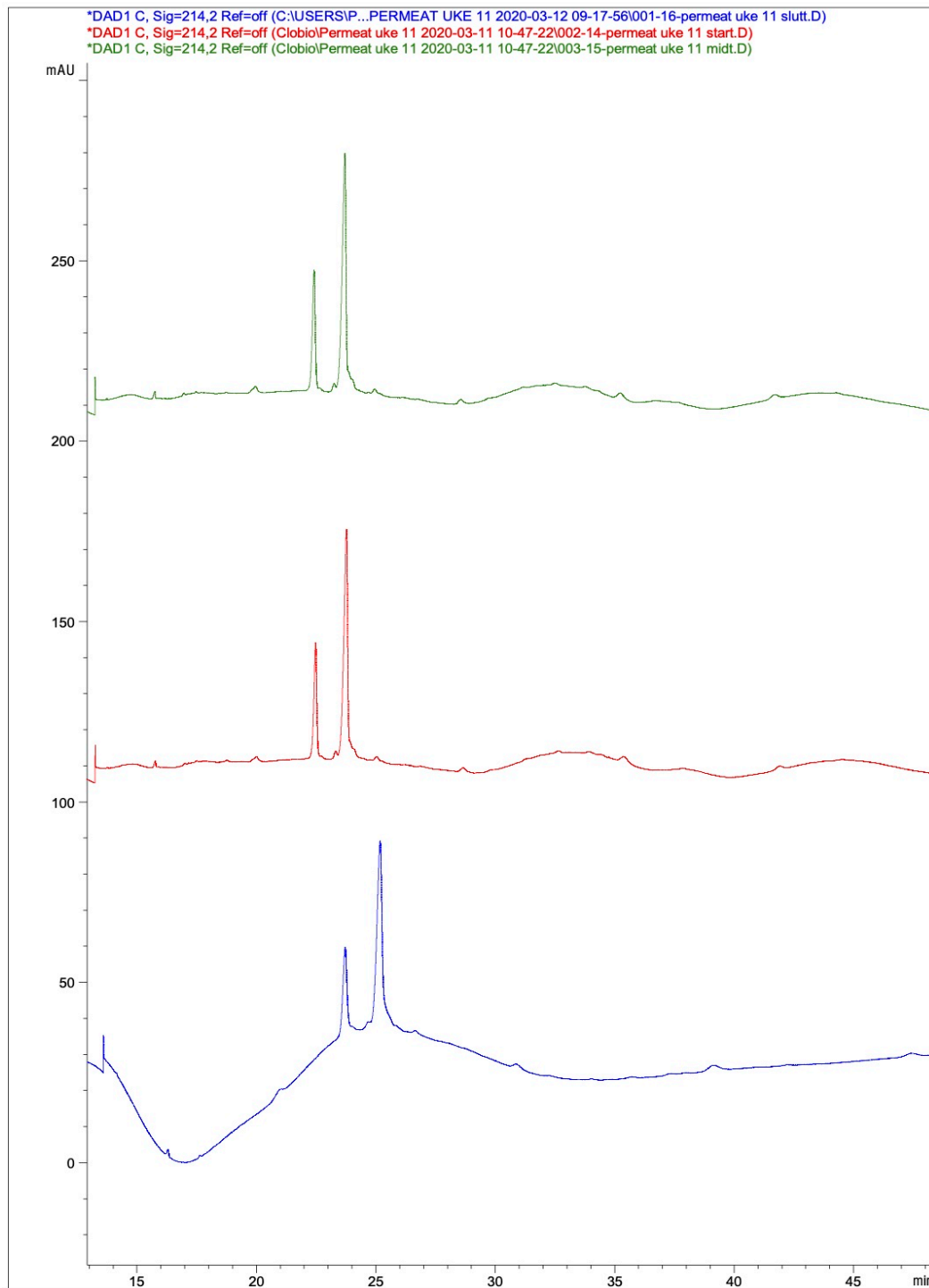
Figur 1. Elektroferogram fra permeat tidlig (blå graf), midt (rød graf) og seint (grønn graf) i prosessen for uttak 1 (uke 7). Etter ca. 23 og 25 minutter ble det detektert proteiner som ble analysert til å være henholdsvis α -laktalbumin og β -laktoglobulin. Det ble ikke detektert proteiner som kunne være kaseiner.

Vedlegg 3



Figur 2. Elektroferogram fra permeat tidlig (blå graf), midt (rød graf) og seint (grønn graf) i prosessen for uttak 2 (uke 9). Etter ca. 23 og 25 minutter ble det detektert proteiner som ble analysert til å være henholdsvis α -laktalbumin og β -laktoglobulin. Det ble ikke detektert proteiner som kunne være kaseiner.

Vedlegg 4



Figur 3. Elektroferogram fra permeat tidlig (rød graf), midt (rød graf) og seint (blå graf) i prosessen for uttak 3 (uke 11). Etter ca. 23 og 25 minutter ble det detektert proteiner som ble analysert til å være henholdsvis α -laktalbumin og β -laktoglobulin. Det ble ikke detektert proteiner som kunne være kaseiner.

Vedlegg 5

Tabell 2. Beregning av MPN basert på antall positive rør med hensyn til kun gassproduksjon. MPN er beregnet etter samme 9-rørsmetode som meieriindustrien bruker for ystemelk i 10 mL, 1 mL og 0,1 mL i 3 replikater inkubert ved 37°C i 3 dager. Tidlig, midt og seint i prosessen ble betraktet som 3 replikater. Positive rør illustreres med 1 og negative rør illustreres med 0.

Prøve	Uttak	Observasjon									MPN per 100 mL melk/10 g melkepulver
		Tidlig			Midt			Seint			
		10 mL	1 mL	0,1 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	
Rå melk	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	6
Rå fløte	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
Past. sk. melk	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	45
Permeat	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	45
Skummetmelkpulver	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	200
Kaseinpulver	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	25
Rå melk	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
Rå fløte	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Past. fløte	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Past. sk. melk	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
Permeat	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	2	1	1	0	1	1	0	1	0	0	95
Skummetmelkpulver	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	7
Kaseinpulver	2	1	1	0	1	1	0	1	0	0	95
Rå melk	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rå fløte	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Past. fløte	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Past. sk. melk	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
Permeat	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	25
Skummetmelkpulver	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	9
Kaseinpulver	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4

Vedlegg 6

Tabell 3. Beregning av MPN basert på antall positive rør med hensyn til gassproduksjon og at røret kun var blakket gitt at prøven inneholdt Klostridier. MPN er beregnet etter samme 9-rørsmetode som meieriindustrien bruker for ystemelk i 10 mL, 1 mL og 0,1 mL i 3 replikater inkubert ved 37°C i 3 dager. Tidlig, midt og seint i prosessen ble betraktet som 3 replikater. Positive rør illustreres med 1 og negative rør illustreres med 0. Ikke-sekvenserte rør er merket *.

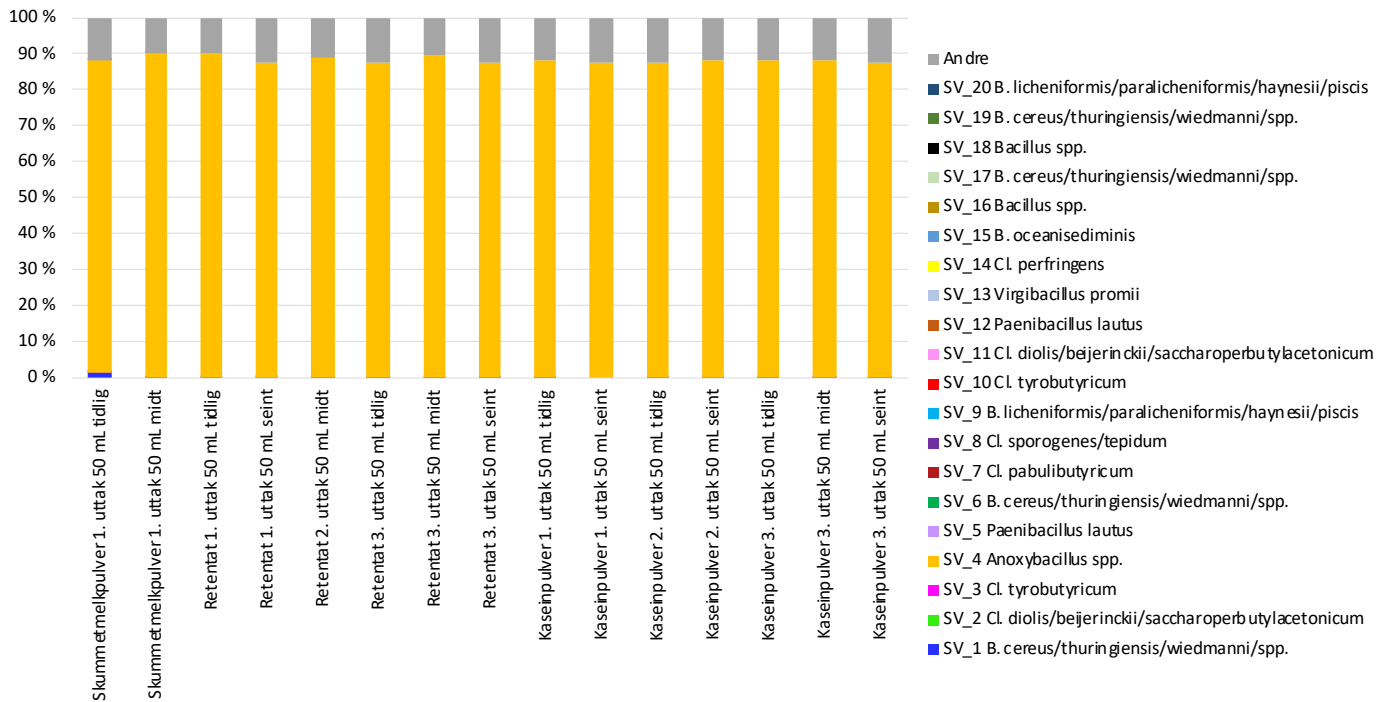
Prøve	Uttak	Observasjon									MPN per 100 mL melk/10 g melkepulver
		Tidlig			Midt			Seint			
		10 mL	1 mL	0,1 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	
Rå melk	1	1*	1	0	0	1	1	0	1	0	16
Rå fløte	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	15
Past. sk. melk	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	95
Permeat	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	45
Skummetmelkpulver	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	200
Kaseinpulver	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	25
Rå melk	2	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1	3
Rå fløte	2	0	0	0	0	0	0*	0	0	1	3
Past. fløte	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Past. sk. melk	2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	15
Permeat	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	2	1*	1*	0*	1	1	0	1	0	0	250
Skummetmelkpulver	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	7
Kaseinpulver	2	1	1	0	1	1	0	1	1	0	250
Rå melk	3	1	0*	0*	0	0	0*	0	0	0	4
Rå fløte	3	0	0	0*	0	0	0*	1	0	0	4
Past. fløte	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0*	3
Past. sk. melk	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	4
Permeat	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	25
Skummetmelkpulver	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	9
Kaseinpulver	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	9

Vedlegg 7

Tabell 4. Beregning av MPN basert på antall positive rør med hensyn til gassproduksjon og at røret kun var blakket der prøven inneholdt Klostridier og/eller andre sporer. MPN er beregnet etter samme 9-rørsmetode som meieriindustrien bruker for ystemelk i 10 mL, 1 mL og 0,1 mL i 3 replikater inkubert ved 37°C i 3 dager. Tidlig, midt og seint i prosessen ble betraktet som 3 replikater. Positive rør illustreres med 1 og negative rør illustreres med 0.

Prøve	Uttak	Observasjon									MPN per 100 mL melk/10 g melkepulver
		Tidlig			Midt			Seint			
		10 mL	1 mL	0,1 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	
Rå melk	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Rå fløte	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	450
Past. sk. melk	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	450
Permeat	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	7
Retentat	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Skummetmelk pulver	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Kaseinpulver	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1100
Rå melk	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Rå fløte	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Past. fløte	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Past. sk. melk	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	450
Permeat	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Skummetmelk pulver	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	450
Kaseinpulver	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1100
Rå melk	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Rå fløte	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Past. fløte	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Past. sk. melk	3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	>1100
Permeat	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retentat	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Skummetmelk pulver	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100
Kaseinpulver	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>1100

Vedlegg 8



Figur 4. Sporesammensetning i melkepulver fra past. sk. melk, retentat og melkepulver fra retentat ved uttak 1, 2 og 3 analysert fra dyrkningsuavhengig metode.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway