



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 30 stp
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Initiell mikrobiota i Gouda-type ost fra kaseinstandardisert ystemelk

Initial Microbiota in Gouda-type Cheese from
Casein-standardized Cheese Milk

Christine de Billot
Matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven er en del av prosjektet «Effekt av råstoffets beskaffenhet på ystingsegenskaper av kaseinkonsentrat» og er et samarbeid mellom Tine og Institutt for kjemi- bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- biovitenskapelige universitet (NMBU). Selve oppgaven har tatt for seg den mikrobielle delen av prosjektet og har fokusert på membranfiltrerings effekt på mikrobiota under ysting og lagring frem til 1. måned for de ulike behandlingsmetodene benyttet i oppgaven.

Det er mange nøkkelpersoner som har vært involvert og som har vært med på å forme denne oppgaven, jeg vil gjerne få takke alle som har bidratt. Jeg vil derfor takke May Helene Alberg, Kari Olsen og Ahmed Abdelghani for godt humør og hjelp på labben. Takk til Ola Tjåland, Geirfin Lund og Arnold Olsen for hjelp og veiledning i forbindelse med ysting og etterbehandling av osten.

En spesiell takk til veilederne mine Professor Siv Skeie (NMBU), Post. Doc Davide Porcellato (NMBU) og Dr. Anne-Grethe Johansen (NMBU & Tine) for gode tilbakemeldinger, veiledning, oppfølging og praktisk hjelp til gjennomføring av oppgaven. Jeg vil også takke Tine for muligheten til å ta del i dette spennende prosjektet og for den økonomiske støtten. Jeg ser frem til å følge med på den videre utviklingen av prosjektet.

Ås, desember 2016

Christine de Billot

Sammendrag

I dette forsøket har Gouda-type ost blitt produsert fra kaseinstandardisert ystemelk. Målet med oppgaven var å kartlegge ostens mikrobiota og se på effekten av melkebehandling på mikrobiota. Ystemelken som ble benyttet ble kaseinstandardisert ved mikrofiltrering. Retentatet fra mikrofiltreringen ble brukt til ysting og til videre diafiltrering. Tre ulike behandlinger av ystemelken ble brukt til ysting i tillegg til en kontroll uten behandling. Under ysting og modning frem til 30 dager ble prøver til mikrobiell analyse tatt ut og pH og tørrstoffinnholdet i ostene ble målt. Prøvene fra forsøket ble analysert ved kulturavhengige og kulturavhengige metoder. Prøvene ble analysert ved tradisjonelle metoder og innstøpt i M17, LBS og VRBA. De samme prøvene uten og med PMA-behandling ble analysert med kvantitativ PCR og 16S rRNA amplifisering og Illumina sekvensering.

Resultatene for pH viste at den mikrofiltrerte og diafiltrerte ystemelken ga en ost med redusert pH i forhold til kontrollen med vanlig ystemelk for ferskost og frem til osten hadde modnet i 30 dager. Osten som ble produsert med mikrofiltrert melk hadde en høyere pH i forhold til kontroll osten. Det var signifikant effekt for behandling på pH for ferskost og ost modnet i 30 dager. Effekt av kaseinstandardisering på tørrstoffet i osten ble også undersøkt. Resultatene viste at det var en signifikant effekt av kaseinstandardisering på tørrstoffinnholdet. Osten som ble ystet med kaseinstandardisert ystemelk hadde et økt tørrstoffinnhold i forhold til kontroll osten. Det var signifikant effekt for behandling av ystemelken på tørrstoff for fersk ost og ost modnet i 30 dager.

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke utviklingen av mikrobiota for de ulike behandlingene. Resultatene viste at det ikke var noen signifikant effekt av behandling på mikrobiota. Hoveddelen av mikrobiota i osten for samtlige behandlinger var *Lactococcus*. Over 95 % av OTU resultatene fra Illumina sekvenseringen for total mikrobiota var av arten *Lactococcus*. Videre undersøkelser viste at store deler av *Lactococcus* i osten bestod av ulike slekter *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Antall OTU for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* økte under modningsforløpet til osten. Det var også OTU for *Leuconostoc mesenteroides/Leuconostoc pseudomesenteroides* og *Lactococcus raffinolactis* for alle ostene med ulik behandling. Hypotesen om at det ved kaseinstandardisering fører til endringer i mikrobiota for Gouda-type ost ble forkastet. Det er i denne oppgaven ikke noen effekt av kaseinstandardisering på initell mikrobiota. Dette forsøket har vist at det er mulig å benytte mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk til produksjon av Gouda uten å påvirke ostens mikrobiota.

Abstract

In this study, the microbiota of Gouda cheese produced with casein-standardized milk was investigated. The cheese was produced from milk obtained from three different protein standardization methods in addition to a control cheese produced with normal milk. The aim of this study was to analyse the microbiota of Gouda cheese during production and the initial stages of maturation for casein-standardized milk. Cheese was produced from the retentate from microfiltrated milk and microfiltrated and diafiltrated milk with 90 min and 30 min pre-ripening. The pH and dry matter was measured and samples for microbial analysis were extracted during cheese making and ripening. Culture-dependent and culture-independent methods were used to analyse the different cheeses produced in this study. Traditional methods with plating, quantitative PCR and 16S rRNA amplification and Illumina sequencing were used to analyse the different samples in this study. For analysis with molecular methods two samples for each extraction was used, and one was PMA-treated.

The results for pH showed an effect for the treatment of the milk for the pH. The cheese produced with microfiltrated and diafiltrated cheese had a lower pH for cheese after 24 hours until 30 days of maturation. The treatment of the milk had significant effect for the cheese after 24 hours and 30 days. The dry matter content of the cheese varied for the different milk treatments used for the cheeses. There was a significant effect of the treatment of cheese for the dry matter content. The cheeses produced with casein-standardized milk had a higher dry matter content then the control cheese.

There were no significant results for any of the methods used to analyse the microbiota. The majority of OTU of the microbiota for all of the treatments consisted of mostly *Lactococcus*. Further analysis of the *Lactococcus* for OTU revealed that the majority of *Lactococcus* in the cheese microbiota consisted of different strains of *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. One group of *Lc. lactis* subsp. *lactis* was especially dominating, and increased from approximately 20 % in concentration from fresh cheese to approximately 70 % after 30 days of maturation for the PMA-treated samples. The results for OTU also showed results for low numbers of OTU for *Leuconostoc mesenteroides*/*Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactococcus raffinolactis*. This study has shown that it is possible to produce a Gouda cheese with casein-standardized milk without compromising or changing the microbiota of the cheese.

INNHALDSFORTEGNELSE

INNLEDNING	1
LITTERATUROVERSIKT	5
<i>Melkens sammensetning</i>	5
<i>Melkeproteiner</i>	5
<i>Kasein</i>	6
<i>Laktose</i>	8
<i>Fett</i>	8
<i>Bakterier i melk</i>	9
TEKNOLOGISKE ASPEKTER VED OSTEPRODUKSJON	10
<i>Varmebehandling av melk</i>	10
<i>Standardisering</i>	11
<i>Membranfiltrering</i>	12
<i>Koageldannelse</i>	13
<i>Produksjon av Gouda-type ost</i>	15
<i>Modningsprosess</i>	16
OSTENS MIKROBIOLOGI	18
KULTURAVHENGIGE- OG KULTURUAVHENGIGE ANALYSE METODER	21
<i>Kvantitativ polymerase chain reaction (qPCR)</i>	22
<i>16S rRNA amplifisering og Illumina sekvensering</i>	23
MATERIALER OG METODER	27
FORSØKSDESIGN	27
YSTING	30
<i>Behandling av ystemelken</i>	30
<i>Syrekultur</i>	30
<i>Prøveysting</i>	31
<i>Hovedforsøk</i>	32
<i>Kontroll (C)</i>	33
<i>MF</i>	35
<i>MF/DF</i>	37
<i>Tillegssysteming</i>	38
<i>Lagring og etterbehandling av osten</i>	38
<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)</i>	38

<i>pH-måling</i>	38
<i>Tørrstoff</i>	39
<i>Avvik</i>	39
MIKROBIELLE ANALYSER	40
KULTURAVHENGIGE METODER	40
<i>M17</i>	40
<i>Lactobacillus selektiv agar (LBS)</i>	40
<i>Violet Red Bile Agar (VRBA)</i>	41
KULTURUAVHENGIGE METODER	42
<i>Isolering av bakterier fra ost</i>	42
<i>Isolering av bakterier fra melk</i>	42
<i>PMA-behandling av bakterieprøver</i>	42
<i>DNA-ekstraksjon</i>	43
<i>Dyrking av prøver til standardkurve for qPCR</i>	44
<i>Qubit Assay</i>	44
<i>Tillagning av prøver til kvantitativ PCR</i>	44
<i>Tillagning av prøver til 16S rRNA amplifikasjon og Illumina sekvensering (MiSeq)</i>	46
AVVIK	47
STATISTISK ANALYSE	48
RESULTATER	51
<i>Komponenter i Ystemelken</i>	51
PH	52
TØRRSTOFF	55
<i>Kulturavhengige og kulturuavhengige resultater Resultater for vekst på LBS og M17</i>	57
<i>Standardkurve for qPCR</i>	62
<i>Resultater for amplifisering av prøver med qPCR</i>	64
<i>16S rRNA amplifisering og Illumina sekvensering</i>	67
DISKUSJON	71
SAMMENSETNING AV YSTEMELKEN	73
PH-UTVIKLING	74
TØRRSTOFF	77
MIKROBIOTA UNDER YSTING OG I OSTEN	78
KONKLUSJON OG VEIEN VIDERE	83
REFERANSER	85
VEDLEGG	I

Innledning

Produksjon av ost har foregått i 8000 år og det er mer enn 1000 ulike typer ost (Fox, P.F. et al. 2017). Produksjonen av de fleste typer ost er basert på de fire ingrediensene melk, løype, mikroorganismer og salt (Beresford et al. 2001). Ost er et meieriprodukt og er et fermentert melkebasert produkt med ulike egenskaper. Produksjonen av ost er et resultat av koagulering av proteinene i melken. Dette fører til at det dannes en ostemasse, og at myse skilles ut. Denne ostemassen er utgangspunktet for alle typer ost som produseres. Ved å regulere parametere som syrekultur, pH, temperatur, modning, skjæring osv. kan ulike typer ost produseres. Ostens sammensetting avhenger av ystemelken og ulike variabler under produksjonen. Sammensetningen, størrelse, form, innhold av vann, fett og salt er faktorer som avgjør ostens kvalitet. For produksjon av ost er det standarder og regler som avgjør hvilken type ost som blir produsert. Disse standardene kan omfatte innhold av vann, salt og fett i tørrstoffet (Walstra et al. 2006). Generelt er kvaliteten til et osteprodukt målt i den graden forbruker aksepterer produktet. Kvalitetskriterier for ost omfatter sensorisk kvalitet, fysisk kvalitet, ettervarmingstemperatur, næringsinnhold, kjemisk kvalitet og hvor trygt produktet er for forbrukeren (Law & Tamime 2010). Avhengig av ostetype vil disse kriteriene variere.

Når ost blir produsert er det flere faktorer som må tas hensyn til, blant annet laktasjonstid. Laktasjonstidspunktet er viktig, og innholdet av næringsstoffer i melken vil variere i de ulike laktasjonsstegene. Det er derfor viktig å ha oversikt over melkesyklusen til kyrne som produserer melk til ysting ved småskala produksjon. Sen laktasjonsmelk har et lavere prosentvis innhold av kasein, et høyere innhold av frie fettsyrer og et høyere innhold av væske. Laktasjonstidspunktet kan påvirke ostens pH og nedbrytning av α_{s1} -kasein ved modning (Law & Tamime 2010).

Under osteproduksjonen dannes det en gel. Denne gelen kan være et resultat av syrning og/eller tilsetting av løype. Når gelen kuttes vil myse skilles ut og tørrstoffet i osten vil øke. Ved osteproduksjon gir 100 kg melk ca. 10 kg ost. Det skjer en kraftig reduksjon i innhold av vann, fra ca. 80 % i melk til ca. 40 % i ost. Innhold av protein og fett reduseres noe ved produksjonen fordi myse og noe fett er mistet til mysen. Selv om fett og proteiner blir mistet gjennom myseavtapp vil den prosentvise andelen øke på grunn av reduksjon av vanninnhold og økning av tørrstoff. Derfor er det en høyere prosentandel fett og proteiner i ost enn i melk (Walstra et al. 2006).

Osteproduksjon krever flere steg, lang tid og det skjer flere biokjemiske endringer av råstoffet. Det er variasjonene innenfor disse stegene og prosessen som fører til produksjon av ulike ostevarianter. Osteproduksjon er et resultat av blant annet produksjonsprosessen, fysikk, kjemi og mikrobiologi. Kort forklart starter osteproduksjon med oppvarming av ystemelk og tilsetning av syrekultur. Videre blir løype tilsatt som fører til aggregering av kasein som danner et nettverk som omslutter serumfasen og fettene i melken. Dette fører til at det dannes en gel. Kutting og røring av ostemassen fører deretter til at myse blir skilt ut. Desto mindre biter gelen blir skjært opp i, desto mer myse skilles ut. Resultatet blir en fastere ost med et høyere tørrstoffinnhold. Ostemassen blir vasket og mysen fortynnes. Dette gjøres for å kontrollere innholdet av laktose (Fox, P.F. et al. 2017). Under produksjonen blir laktose omdannet til melkesyre som et resultat av tilsatt syrekultur. Syrekulturen består av ulike melkesyrebakterier som fører til omdanning av laktose til melkesyre. Denne prosessen senker pH, og stanser når det ikke er mer tilgjengelig laktose igjen. Under produksjon kan salt (NaCl) tilsettes. Saltet påvirker ostens smak og konsistens. Neste steg er å omdanne ostekornene til en ostemasse. Dette gjøres ved å presse ostemassen til en ost som videre skal gjennom en modningsprosess. Etter pressing blir osten plassert i forlager, gjæringsbu og til slutt i modningslager for modning av osten (Walstra et al. 2006).

Modningsprosessen er viktig for ostens sluttkvalitet. Osteproduksjon består av mange ledd og faktorer som fører til at resultatet kan variere selv om produksjonsprosessen er lik. Ved å overvåke modningen av osten ved å analysere innhold av mikroorganismer og deres biprodukter kan informasjon om smak, struktur og modningen av osten i større grad forstås. Det er ulike metoder som kan benyttes for å identifisere de ulike mikroorganismene i ost. Disse metodene deles ofte inn i kulturavhengige og kulturuavhengige metoder. Kulturavhengige metoder er ofte knyttet til vekst av kolonier på et medie der veksten analyseres ved tradisjonelle mikrobiologiske metoder. Kulturuavhengige metoder er ofte knyttet til isolering av mikroorganismer fra råstoffet for så å kartlegge DNA ved å amplifisere og sekvensere DNA-et med molekylære metoder (Ercolini 2013).

Det er flere faktorer som påvirker sluttresultatet av osteproduksjonen. Kasein og fett er viktige komponenter, og innholdet av disse stoffene er viktig for osteutbyttet. Ved å øke innholdet av kasein i melken kan også osteutbyttet økes. Bruken av membranfiltrering av skummetmelk kan øke utbyttet ved å oppkonsentrere kasein i melken. Hensikten med denne oppgaven er å

benytte standardisering av proteinene i melken ved mikrofiltrering med og uten diafiltrering for så å kartlegge mikrobiota i osten. Dette ble gjort ved kulturavhengige og kulturuavhengige metoder under produksjon og modningen av osten. Resultatene fra disse analysene benyttes for å observere variasjonen mellom ost ystet med kaseinstandardisert ystemelk med og uten diafiltrering og normal ystemelk. Diafiltrering ble benyttet til å regulere laktoseinnholdet i ostemassen. Regulering av laktoseinnholdet gjør det mulig å redusere ystetiden ved å fjerne mysefortynningssteget (Flaatten 2016). To ulike formodningstider ble benyttet med ulik podeprosent for å undersøke effekten av formodningstid. Det er flere studier som har beskrevet bruk av MF retentat til produksjon av ost. Denne oppgaven er en del av et større prosjekt mellom Tine og NMBU. Tidligere har Flaatten (2016) undersøkt effekten av diafiltrering og formodningstid på Gouda produsert med kaseinstandardisert melk. Ediassen (2016) har på samme prosjekt undersøkt effekten av formodning ved ysting av Gouda fra kaseinstandardisert melk, og innvirkningen av kalsiuminnholdet og konsistensen i osten. Undertegnede oppgave tar for seg variasjonen mellom de ulike ystingsteknikkene og effekten av kaseinstandardisert melk på den mikrobielle sammensetningen i Gouda-type ost.

Målsetting

Denne oppgaven bygger videre på prosjektet «Effekt av råstoffets beskaffenhet på ystingsegenskaper av kaseinkonsentrat». Hovedmålet med dette prosjektet er å undersøke egenskapene til kaseinstandardisert melk ved ysting av Gouda-type ost. Hovedmålet med denne oppgaven er å undersøke effekten av kaseinstandardisering på mikrobiota i Gouda-type ost. Mikrobiota i osten og spesielt melkesyrebakterier er svært viktige for produksjon og modning av ost. For å kartlegge mikrobiota i osten ble kulturavhengige og kulturuavhengige metoder anvendt. I tillegg til dette skulle kaseinstandardiserings effekt på pH og tørrstoff undersøkes. Hypotesen om at kaseinstandardisering av melken med mikrofiltrering med/uten diafiltrering fører til endring i ostens mikrobiota ble undersøkt i denne oppgaven.

Litteraturoversikt

Melkens sammensetning

Melk er et næringsrikt produkt som kommer fra pattedyr og består av en kompleks blanding av lipider, proteiner, karbohydrater, vitaminer og mineraler. Sammensetningen av melken påvirkes av rase, fôr og dyrets helsetilstand. For ysting er det melk fra sau, geit og ku som benyttes i størst grad (Walstra et al. 2006). I Norge er hoveddelen av ost produsert med kumelk. Tidligere har andelen fett blitt sett på som den viktigste egenskapen å avle melkekuer på, men nå har fokuset i større grad skiftet til proteinkonsentrasjon. Fett ga tidligere høyest økonomisk gevinst innen meieriindustrien, men det er nå økt fokus på proteinene i melk. Dette er delvis på grunn av proteiners rolle i osteproduksjon (Ruska & Jonkus 2014). Kuer som har et høyere protein/fett forhold blir derfor i større grad avlet frem (Fenema 2008).

Melk har en pH på 6,6-6,8 og komponentene i melken befinner seg i kompliserte og sammensatte strukturer. Normalt er bestanddelene i melk 86,6 % vann, 4 % fett, 3,6 % protein, 5 % laktose og 0,7 % aske. Disse tallene kan variere som følge av rase, alder, laktasjonsperiode, fôr etc. I tillegg til dette inneholder melken små bestanddeler glukose, organiske syrer, vitaminer, ikke-protein nitrogenholdige forbindelser og ulike enzymer. Melk er en olje i vann emulsjon, altså en suspensjon som består av olje dråper i vann (Walstra et al. 2006). Serumdelen i melken består av løselige komponenter som laktose, myseproteiner, noen mineraler, sitronsyre og mindre komponenter. Ved produksjon av ost skjer det en kontrollert dehydrering som fører til utskillelse av serum og oppkonsentrering av kasein og noen mineraler (Law & Tamime 2010).

Melkeproteiner

For osteproduksjon er proteinene i melk essensielle. Proteiner er store molekyler som er bygget opp av mindre enheter med aminosyrer. Kaseiner har en gjennomsnittlig molekylvekt på ca. $7,2 \times 10^5$ kDa, myseproteinene er mindre enn kasein og veksten varierer fra 150 til 1000 kDa (Dalglish & Corredig 2012). Omtrent 95 % av nitrogenet i melken befinner seg i proteinene. De resterende 5 % nitrogen befinner seg i komponenter som ikke er protein (Walstra et al. 2006). Hoveddelen av ikke proteinholdig nitrogen (NPN) i melk er urea, og dette er den mest stabile NPN. Gruppen med NPN består også av frie aminosyrer, kreatin, urinsyre, peptider, organiske syrer og fosfolipider (Ruska & Jonkus 2014). Hoveddelen av proteiner i melk er kasein og myseprotein. Omtrent 80 % av proteinene i melk er kasein og ca.

20 % består av myseprotein (Walstra et al. 2006). I melk befinner laktose, nativ myse og noen mineraler seg i serum delen av melken. Kasein og hoveddelen av kalsium og fosfat befinner seg i makromolekylære forbindelser kalt miceller (Anema 2014).

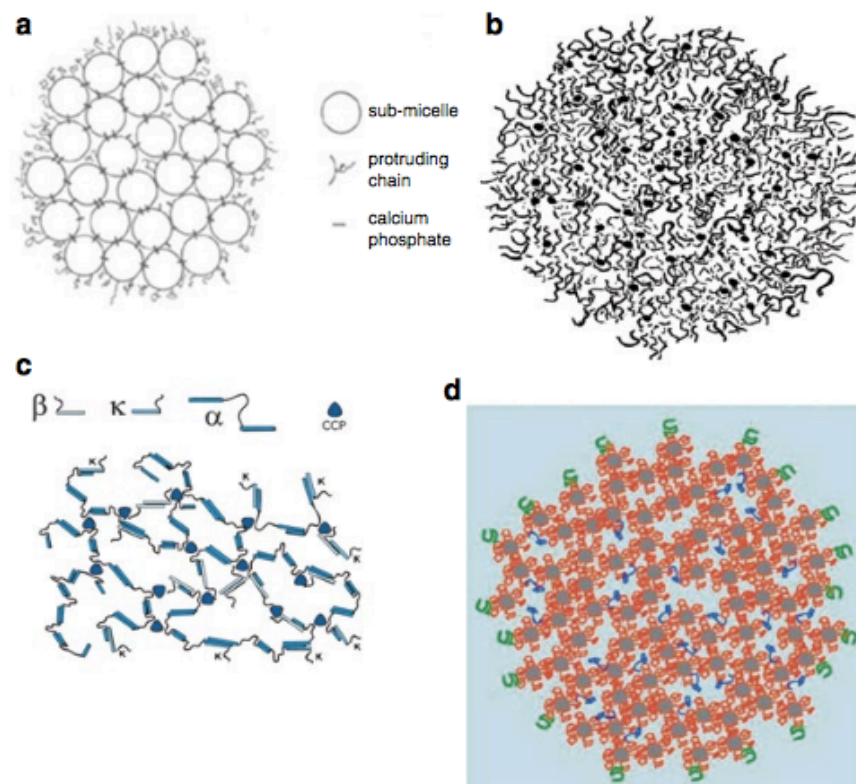
De proteinene som finnes i høyest konsentrasjon i melk er β -kasein, α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, κ -kasein, β -laktoglobulin og α -laktalbumin. β -kasein, α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, κ -kasein er kaseiner, og β -laktoglobulin og α -laktalbumin. Felles for myseproteiner er at de er globulære proteiner med sekundære og tertiære strukturer. β -laktoglobulin og α -laktalbumin har sin native struktur i et begrenset temperatur område, og ved temperaturer > 70 °C vil disse denaturere (Fenema 2008). Når disse myseproteinene blir utsatt for store temperaturforskjeller kan det også resultere i denaturering og aggregering av proteinene (Anema 2014). Denaturerte proteiner, spesielt β -laktoglobulin er mindre løselig og felles lettere ut av kalsiumioner (Fenema 2008). Varmebehandling kan derfor påvirke tilstanden til myseproteiner og ved pasteurisering av skummetmelk ved 73 °C i 15 sekunder vil innholdet av nativ myse reduseres (Svanborg et al. 2014).

Myse og kasein har ulike egenskaper. Ved pH 4,6 ved 20 °C er myse løselig og kasein uløselig. Kasein kan felles ut av melk, og myseproteinene befinner seg stort sett i serum delen av melken. Fettkulemembran proteinene befinner seg på overflaten av fettkulemembranen og frigjøres kun ved mekanisk bearbeiding som f.eks. kjerneing av smør (Walstra et al. 2006). De ulike egenskapene til myseprotein og kasein utnyttes ved produksjon av ost.

Kasein

Kasein befinner seg i et kompleks som kalles kaseinmicelle sammen med kalsiumfosfat. Strukturen til kaseinmicellen er omdiskutert, og submicelle modellen til Walstra (1984) var tidligere ansett som riktig. Nylig har modellen til Dalgleish (2011) blitt presentert, og er nå sett på som en mulig fremstilling av kaseinstrukturen. Denne modellen har κ -kasein på overflaten som stabiliserer micellen og sørger for at den ikke destabiliseres av andre miceller og kolloidale partikler. Laget med κ -kasein er tett nok til å stabilisere micellen, men er ikke så tett at det ikke tillater interaksjoner med denaturerte myseproteiner og para- κ -kasein og dissosiering av β -kasein i micellen (Anema 2014). Modellene for kaseinmicellen er illustrert i Figur 1. Kaseinmicellene har trolig en porøs struktur med interaksjoner mellom kasein og kalsiumfosfat nanokluster som utgjør skjelettet. Kaseinmicellen består av kolloidale partikler.

α_s -kasein og β -kasein befinner seg hovedsakelig i den indre delen av micellen der de danner interaksjoner med kalsiumfosfat nanoklusterne. β -kasein er trolig det kaseinet som er mest hydrofobt og danner interaksjoner med de hydrofobe delene av kalsiumfosfat. Kaseinmicellen består av store deler vann, og β -kasein stabiliserer porene med vann i kaseinmicellen. β -kasein er løst bundet til micellene og kan dissosiere ved temperaturendringer (Dalglish & Corredig 2012).



Figur 1. Ulike modeller for kaseinmicellen. Sub-micelle modellen **a)** presentert av Walstra og Jenness (1984), **b)** Fox og Mcsweeney (1998), **c)** Horne (1998) og **d)** Dalglish (2011) (Fox, P.F. et al. 2017).

Dalglish (2011) sin kaseinmicelle modell har to viktige egenskaper. Den stabiliserende rollen til kolloidalt kalsiumfosfat i micellen, og plasseringen av κ -kasein (Fox, P.F. et al. 2017). Kaseinmicellene har negativ ladning og har 8 g kalsiumfosfat per 100 g kasein. Det er hydrofobe krefter og saltbroer som fører til at molekylene i kasein binder seg. κ -kasein befinner seg som en polymer og er bundet sammen av disulfidbroer på overflaten av micellen (Walstra et al. 2006). Kaseinmicellen er ikke stabil og strukturen kan endre seg over tid. Dette er et resultat av at det ikke er noe termodynamisk likevekt mellom micellene og deres omgivelser. Dette kan blant annet føre til at β -kasein lekker ut av serumfasen og kan derfor bli utsatt for proteolyse. Det kolloidale-fosfatet i kaseinmicellen er ikke stabilt og avhengig av

betingelsene kan det omdannes til mer stabile fosfater som for eksempel octa-kalsiumfosfat (Fox, P.F. et al. 2017).

Selv om det er ulike modeller for kaseinmicellen, har disse modellene stort sett kommet fra de samme forskningsresultatene (Fox, P.F. et al. 2017). Noen av modellene har derfor liknende egenskaper og strukturer. Blant disse er de hydrofobe interaksjonene og kolloidalt kalsiumfosfat sine stabiliserende egenskaper. Felles for modellene er også at κ -kasein befinner seg på overflaten av micellen. Micellens struktur kan modifiseres og ødelegges når kolloidalt kalsiumfosfat dissosieres (Anema 2014).

Laktose

Laktose er et karbohydrat som består av glukose og galaktose bundet sammen via β 1-4 glykosid bindinger. Dette karbohydratet finnes kun hos pattedyr. Laktose blir syntetisert fra glukose i blodet som blir omdannet til UDP-galaktose, og blir bundet til glukose via en reaksjon som er katalysert av enzymet laktose syntase. Konsentrasjonen av laktose i melk varierer mellom ulike raser. Det er også variasjoner innen laktasjonstidspunkt. Det er en reduksjon av laktose utover i laktasjonstiden. Laktose er en viktig komponent i melk av flere årsaker. Laktose og løselige uorganiske ioner gir melk sitt osmotiske trykk. Ved mastitt kan konsentrasjonen av NaCl øke, dette fører til en økning av det osmotiske trykket i melken. Når det osmotiske trykket øker som et resultat av økt konsentrasjon av løselige uorganiske ioner skjer det en reduksjon i laktoseinnholdet. Forholdet mellom NaCl og laktose er viktig. Melk med et høyt innhold av laktose vil ofte ha et lavt askeinnhold. Innholdet av laktose i melken er viktig fordi det er essensielt for fermenterte produkter, og er svært næringsrikt (Fox, P.F. et al. 2017). Ved fermentering gir laktose næring til mikroorganismer og er derfor viktig for produksjon av fermenterte produkter. For ferske melkeprodukter gir laktose næring til konsumenten, men for noen fermenterte meieriprodukter deriblant ost er det ikke noe laktose. (Fox et al. 2002).

Fett

Fettmolekylene i melk befinner seg i fettkuler. Disse fettkulene er de største komponentene i melk med en diameter på 2-6 μ m. Den gjennomsnittlige diameteren til fettkulemembranen er trolig 25 ganger større enn for kasein. Fettkulen har en membran som består av proteiner, enzymer, fosfolipider og kolesterol. Omtrent 70 % av fosfolipidene i melk befinner seg i fettkulemembranen (Fenema 2008). Normalt inneholder kumelk 3,7 g pr. 100 g fett, men dette

kan variere på grunn av rase, fôring og laktasjonssyklus. Triglyserid er hovedbestanddelen av fett i melk med 96-99 g per 100 g fett. De gjenværende fett-typene er fosfolipider, diaacylglyserol, steroler, karatenoider, fettløselige vitaminer og frie fettsyrer. Fettet i melken befinner seg i et dispergert system der fettkuler er omringet av en lipoprotein membran. Denne membranen stabiliserer fettene som befinner seg på innsiden av membranen og beskytter mot lipaser, koalesens og separasjon av de ulike fettfasene (Law & Tamime 2010).

Bakterier i melk

Bakterietallet kan variere fra ulike gårder og i ulike sesonger. De bakteriene som normalt er assosiert med melk er melkesyrebakterier, koliforme bakterier, smørsyrebakterier og propionsyrebakterier. Melkesyrebakterier finnes som kokker og staver, og de kan danne kjeder av ulike lengder. Melkesyrebakterier er fakultativt anaerobe og kan ikke danne sporer. Disse bakteriene foretrekker laktose som karbonkilde og fermenterer laktose til melkesyre. Avhengig av melkesyrebakterien kan fermenteringen foregå homofermentativt eller heterofermentativt. Aktiviteten til melkesyrebakterier varierer. Melkesyrebakterier produserer normalt 0.5-1.5 % melkesyre, men noen arter kan produsere 3 % melkesyre. Melkesyrebakterier trenger nitrogen for vekst og får nitrogen fra kasein ved å benytte seg av egne enzymer som splitter proteinene (Walstra et al. 2006).

Koliforme bakterier er fakultativt anaerobe med en optimal temperatur på 30-37 °C. Disse bakteriene blir drept ved pasteurisering, men kan reintrodes under produksjon ved kontaminasjon. Koliforme bakterier befinner seg i tarmen, avføring, jorden, kontaminert vann og på planter. *Pseudomonas* er en psykotrof bakterie som fermenterer laktose til melkesyre og andre organiske syrer. De danner også karbondioksid, hydrogen og bryter ned melkeproteiner som fører til uønsket lukt og smak. Koliforme bakterier kan være et spesielt stort problem ved osteproduksjon på grunn av høy gassproduksjon, som resulterer i en ost med store hull, sprekker, et oppblåst utseende og dårlig smak (Fox, P.F. et al. 2017; Walstra et al. 2006). Det er derfor viktig å forhindre kontaminasjon av ystemelken etter varmebehandling.

Smørsyrebakterier kan også være et problem ved osteproduksjon. *Clostridium tyrobutyricum* er spesielt problematisk. I noen tilfeller kan *Clostridium butyricum* også skape problemer under modning. Smørsyrebakterier er anaerobe spore-dannende mikroorganismer med en optimal temperatur for vekst på 37 °C. Ved fermentering blir laktose omdannet til melkesyre som nøytraliseres av kalsium og andre mineraler, som resulterer i dannelsen av kalsiumlaktat.

Smørsyrebakterier fermenterer enten ved bruk av laktat som substrat eller laktose og kan forekomme i starten av ostemodningen på gjæringsbu. Denne fermenteringen fører til produksjon av karbondioksid, hydrogen og smørsyre. Dette gir en uønsket tekstur og en harsk, søt smak av smørsyre. På grunn av smørsyrebakterienes egenskap til å danne varmeresistente sporer blir bakteriene ikke drept ved pasteurisering (Bylund 1995; Fox, P.F. et al. 2017). Hygiene under produksjon er viktig da ystemelken er en god næringskilde for mikroorganismer.

Teknologiske aspekter ved osteproduksjon

Varmebehandling av melk

All søtmelk i Norge blir varmebehandlet før salg i butikk. For osteproduksjon kan ulike teknikker benyttes for å varmebehandle melken. Varmebehandling reduserer potensiell farlig mikrobiell aktivitet ved å drepe patogene mikroorganismer. Normalt benyttes HTST pasteurisering som varmebehandling. Ved denne behandlingen blir melken varmet opp til 72 °C i 15 sekunder. Disse betingelsene blir normalt anvendt til ystemelk hvis melken varmebehandles før bruk. Tilstrekkelig pasteurisering måles ved at alkalisk fosfatase er inaktivert. Lavere temperaturer over lengre tid kan også benyttes for å få samme effekt. Tid og temperatur vil påvirke melken og lengre holdetid vil føre til endringer i melkens egenskaper og mikrobielle innhold.

Pasteurisering gjennomføres ikke for all produksjon av ost, men er mye brukt og reduserer risikoen for patogene mikroorganismer. Pasteurisering er spesielt viktig for fersk ost som ikke går gjennom et modningstrinn på over en måned. Pasteurisering hemmer patogene mikroorganismer og kan motvirke kvalitetsfeil fra mikroorganismer som koliforme bakterier som fører til uønsket smak og gassdannelse. Selv om pasteurisering er en effektiv måte å redusere innholdet av uønskede mikroorganismer er det fremdeles noen sporer fra sporedannende bakterier som kan overleve pasteuriseringen. Et godt eksempel på dette er *Clostridium tyrobutyricum* som kan produsere smørsyre og danne store mengder hydrogengass ved fermentering (Fox, P.F. et al. 2017; Walstra et al. 2006). Det er derfor ingen garanti for at pasteurisering fjerner all mikrobiell vekst i osten. Derfor er det viktig å behandle råstoffet på en hygienisk måte.

Melk som benyttes til ysting blir som regel ikke behandlet ved høyere temperaturer enn HTST. Når melken utsettes for høye temperaturer endrer melkens egenskaper seg. Kasein vil

ikke denatureres ved varmebehandling, men myseproteiner og spesielt β -laktoglobulin er varmesensitiv (Walstra et al. 2006). Denaturering av β -laktoglobulin starter ved 65 °C og kan bli denaturert ved varmebehandling ved 90 °C i 5 minutter. Denaturering av myse er en irreversibel prosess og fører til at β -laktoglobulin fester seg til κ -kasein via svovelbroer. Dette fører til at løypen ikke kommer til for å splitte kaseinmicellen og koagelet blir mykere. Høyere temperaturer ved pasteurisering gir oster med mykere koagel. Melk som har blitt varmet opp ved temperatur over 75 °C i mer enn 20-60 sekunder vil også få en kokt smak og lukt på grunn av utskillelse av svovelkomponenter fra β -lactoglobulin og andre proteiner som inneholder svovel (Bylund 1995; Fox, P.F. et al. 2017). Det er derfor viktig å benytte temperaturer som ikke påvirker ostens kvalitet i negativ grad. Hvis ystemelken skal pasteuriseres før ysting er det viktig å benytte den ideale tid og temperatur kombinasjonen på 72 °C i 15 sekunder for å få ost av høy kvalitet (Walstra et al. 2006). Varmebehandling er et viktig hjelpemiddel for å produsere en ost med et forutsigbart modningsforløp.

Standardisering

Et viktig hjelpemiddel for produksjon av meieriprodukter er standardisering. Standardisering er et vidt begrep som benyttes for regulering av innholdet av ulike komponenter i melken. Den mest brukte standardiseringsmetoden er standardisering av fett. For å standardisere fettinnholdet i melken kan en sentrifuge benyttes. Sentrifugen benytter seg av sentrifugalkreftene og skiller skummetmelk og fløte i to ulike fraksjoner. I nyere tid har mikrofiltrering, ultrafiltrering og diafiltrering blitt undersøkt for metoder som kan benyttes til å standardisere ystemelken før osteproduksjon. Utbyttet av osten henger ofte sammen med standardisering av råstoffet, og ved å regulere råstoffet ytterligere kan osteproduksjonen i større grad reguleres før ystingen (Fox, P. F et al. 2017).

Osteutbyttet kan beregnes fra forholdet mellom para-kasein og vann. Ved å regulere dette forholdet vil utbyttet kunne optimaliseres. Dette kan gjøres ved å benytte membranfiltrering. Videre kan diafiltrering benyttes for å regulere laktoseinnholdet i ystemelken. Ved å regulere laktoseinnholdet i melken kan mysefortynningssteget der vann tilsettes under oste produksjon fjernes. Dette fører til noe mer forberedelser før produksjon, men gir kortere produksjonstid (Flaatten 2016). Fettinnholdet justeres også i forhold til proteininnholdet. Skummetmelk kan benyttes for ysting, og fløte kan tilsettes etter proteinanalyser for å justere til ønsket fettinnhold. Ønsket forhold mellom fett/para-kasein er 1,05 (Van den Berg et al. 2005).

Membranfiltrering

Membranfiltrering kan benyttes for å sortere en væske i komponenter av ulik størrelse i ulike fraksjoner. Under membranfiltrering blir en løsning delt i permeat og retentat. Væsken blir delt i to ulike fraksjoner basert på trykket på membranen og porestørrelsen i membranen. Membranens sammensetning kan også være av betydning. Retentatet er den delen av løsningen som inneholder de partiklene og substansene som er for store til å gå igjennom filtreringsmediet og permeatet er den delen av substratet som har blitt filtrert (Ibarz & Barnosa-Cánovas 2003). De ulike membranfiltreringsprosessene er mikrofiltrering (MF), ultrafiltrering (UF), nanofiltrering (NF) og reversosmose (RO). Disse prosessene har ulik struktur, sammensetning, porestørrelse i membranen, filtreringstrykk og struktur. Hovedmålet med membranfiltrering kan være å fjerne vann og bakterier, men membranfiltrering kan også benyttes for å øke konsentrasjon av blant annet proteiner i en løsning (Ibarz & Barnosa-Cánovas 2003; Walstra et al. 2006).

Membranfiltrering er en teknikk som benyttes for å filtrere ut partikler av ulik størrelse fra en løsning ved å benytte seg av et filtreringsmedie under trykk. Hydrostatisk trykk over membranen fører til at det dannes et transmembrantrykk og væsken som filtreres går igjennom filtreringsmembranen (Walstra et al. 2006). Avhengig av membranens porestørrelse blir deler av løsningen ført igjennom membranen. Porestørrelsen blir som regel omtalt som membranens "cut-off" og er den porestørrelsen membranen har. Dette varierer med ønsket filtreringsgrad. En membran med porestørrelse på 0,05-0,2 μm kan filtrer melk i to fraksjoner, permeat og et kaseinrikt retentat. Dette resulterer i et permeat som er tilnærmet steril med nativ myse, laktose og mineraler. Ultrafiltrering og mikrofiltrering fører til et økt innhold av kalsium. Dette gir en høyere buffer kapasitet i retentatet og en treigere pH utvikling ved tradisjonell osteproduksjon (Svanborg et al. 2014). Mikrofiltrering har en membran med en porestørrelse på 0,1-1 μm med et trykk på < 1 bar. Denne porestørrelsen fører til at bakterier, fett og store proteiner blir holdt igjen i retentatet. Ultrafiltrering har en "cut-off" på 0,01-0,1 μm og blir utsatt for et trykk på 1-10 bar. Kombinasjonen av trykk og porestørrelse ved ultrafiltrering fører til at proteiner, fett og bakterier blir holdt igjen i retentat fraksjonen (Ibarz & Barnosa-Cánovas 2003; Walstra et al. 2006).

Det er flere teknologier og ulikt design som kan benyttes for membranfiltrering. De vanligste membranfiltrene i meieriindustrien er spiralformede membraner. Disse filtrene består av to lag med filter med et porøst permeabelt materiale i mellom. Dette laget sørger for at permeatet

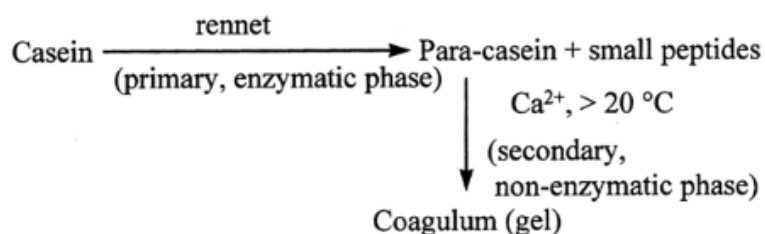
fritt kan passere igjennom membranen (Ibarz & Barnosa-Cánovas 2003). Mikrofiltrering kan benyttes for skummetmelk for å skille kasein fra serumproteiner. Serumproteiner blir i stor grad mistet under ordinær produksjon av ost og det vil derfor ikke påvirke ostens sluttkvalitet. Ved mikrofiltrering vil proteinene i større grad befinne seg i sin native struktur. Porestørrelse under filtrering fører også til minimalt tap av fett til myse som igjen optimaliserer osteproduksjonen og reduserer harskning fordi mysefraksjonen blir fettfri. Myse er en viktig ressurs og ved å forhindre fett i mysen vil dårlig smak grunnet oksidering av fett forhindres. Fett gir også reduserte skumdannelsesegenskaper og bør derfor fjernes fra mysen. Fordelen med membranfiltrering er at mysen får en økt verdi ved at mer av mysen befinner seg i sin native struktur og det vil ikke være syrekultur eller melkesyre i mysen. (Nelson & Barnano 2005).

Ved mikrofiltrering oppkonsentreres kaseinmiceller, bakterier og fett. Mikrofiltrering av skummetmelk fører til at vann, laktose, α -lactalbumin og β -lactoglobulin, løselige mineraler og ikke protein nitrogenholdige forbindelser går igjennom membranen og kasein blir holdt igjen (Neocleous et al. 2002). Diafiltrering kan benyttes til å redusere laktose, kalsiumfosfat, vann, myseproteiner og mineraler. Etter mikrofiltrering inneholder retentatet komponenter som i teorien skulle passert membranen. Diafiltrering er en prosess der vann blir tilsatt i retentatet før det filtreres på nytt (Shao & Zydney 2004). Dette filtreringssteget gjør det mulig å justere mengden laktose i ost, og dermed kontrollere melkesyreinnhold og pH. Kontroll av laktoseinnholdet før ysting gjør at mysefortynningssteget i osteproduksjon kan sløyfes. Mysefortynning benyttes for å kontrollere laktoseinnholdet og dette kan effektivisere produksjonen av ost (Flaatten 2016; Ibarz & Barnosa-Cánovas 2003).

Koageldannelse

Koageldannelse er en viktig del av produksjonen av ost og kan være et resultat av tre ulike prosesser. En gel kan induseres under osteproduksjon ved syrning, ved bruk av løype eller tilsatte syrer ved 20-40 °C for å senke pH til så nært isoelektrisk punkt for kasein. Det vil si så nære pH 4,6 som mulig (Law & Tamine 2010). Tilsetning av løype skjer normalt ved 30-31 °C og kutting av gelen skjer ca. 20-25 min etter løypelegging. CaCl_2 kan tilsettes i melken, og bidrar sammen med syrekulturen til en reduksjon i pH. Reduksjonen i pH gir en gel som er lettere å skjære med et minimalt tap av ostekorn (Van den Berg et al. 2005).

Løypeinduserte geler er den vanligste metoden for koagulering ved osteproduksjonen. All ost med lang modningstid er løype koagulerte. Omtrent 75 % av all ost er produsert med løype. Noen protolytiske enzymer kan modifisere melkens proteinsystem og kan føre til koagulering av melk. Disse enzymene kan komme fra ulike kilder, men normalt benyttes enzymer av animalsk opprinnelse. En fellesbetegnelse for de proteolytiske enzymene som benyttes til ysting er løype. Den viktigste løypen er chymosin som er et enzym som kommer fra magen til kalver. Løype-koagulerte geler er normalt mer stabile enn syreinduserte geler og benyttes i dag i størst grad ved produksjon av ost (Fox, P.F. et al. 2017). Når løype tilsettes i melk splitter løypen de negativt ladde glykomakropeptidene i κ -kasein. Dette fører til at para-kasein binder seg til kalsium og danner et nettverk rundt fett. Para- κ -kasein forblir derfor i micellen. Kaseinmicellen får endrede egenskaper og blir omdannet til para-kasein. Para-kasein er ikke løselig i serum delen av melk. Dette fører til at para-kaseinmicellene aggregerer hvis Ca^{2+} aktiviteten er tilstrekkelig. Løypeinduserte geler består av para-kaseinmiceller som har mistet deler av κ -kaseinet der bindingene mellom partiklene er bundet sammen av kalsiumbroer. Kasein aggregerer og de hydrofobe delene bindes. Ved kutting av koagelen vil myse bli skilt ut som et resultat av synerese. Synerese er en spontan prosess og fører til at koagelet trekker seg sammen og skiller ut myse. Økt synerese kan være et resultat av redusert pH, økt temperatur og økt grad av røring. Fettinnholdet vil også påvirke syneresen. Et høyt fettinnhold gir mindre synerese. Ved pH 5,5 er det mest myseutskillelse, og ved å kombinere pH 5,5 med en temperatur på 40 °C kan graden av myseutskillelse maksimeres. Skjæring av koagelet i mindre biter vil øke overflaten og føre til større grad av myseutskillelse (Law & Tamime 2010).



Figur 2. Oversikt over prosessene som inngår i løypekoagulering av melk. Første del er enzymatisk hydrolyse av κ -kasein. I andre del skjer det en aggregering av para-kasein micelller til et gel nettverk (Fox, P.F. et al. 2017).

Når kasein i skummetmelk koagulerer dannes det en gel-struktur der fettene befinner seg i porene i gelen. Denne prosessen kan skje som et resultat av syrning av melk og løypetilsetning. Når løype tilsettes starter enzymatiske reaksjoner som fører til flokkulering,

koagulering og geldannelse. Ved lav pH mister micellene kolloidalt-kalsiumfosfat og opprettholder strukturen med saltbroer og hydrofobe interaksjoner (Walstra et al. 2006). En reduksjon av kalsiumfosfat i micellene senker ladningen og fører til at de lettere aggregerer. Det er flere faktorer som påvirker koaguleringen, blant annet løypetype og mengde, temperatur, pH og tørrstoff. Et økt tørrstoff kan gi økt koagulerings tid på grunn av økt kaseininnhold, kortere avstand mellom kalsium øker koaguleringen. Ved koagulering av melk er kalsiumfosfat likevekten viktig. Kontroll av temperaturen kan forhindre lekkasje av kalsium fra kaseinmicellen til serumdelen av melken. Pasteurisering kan påvirke koageldannelsen ved at det skifter likevekten mot kolloidalt kalsiumfosfat og forbedrer rekonstruksjonen av micellestrukturen (Walstra et al. 2006).

Produksjon av Gouda-type ost

Gouda er en Nederlandsk ost, men produseres nå i hele verden. En av de mest kjøpte ostene i Norge er en Gouda variant kalt Norvegia. Norvegia produseres av pasteurisert melk, Gouda kan produseres med pasteurisert melk og råmelk (Østlie et al. 2004). Gouda blir tradisjonelt produsert av ystemelk med en fettprosent på 2,5-3,5. Løype fra kalv blir brukt til koagulering av melken under produksjon og typisk benyttes en blandingskultur som består av mesofile *Lactococci* og CO₂ produserende *Leconostoc* (Van den Berg et al. 2005). Nitrat kan tilsettes for å undertrykke vekst av *Clostridium* subsp. som produserer gass fra laktat under modning (Fox, P.F. et al. 2017). Vanninnholdet i osten skal i den fettfrie fraksjonen ligge på ca. 63 %, og osten har en lukket skorpe. Syrningen av Gouda skjer typisk i ostemassen etter myseavtapp, pressing og de første timene i saltlake. Osten legges i saltlake før Gouda osten formodnes i 10 dager, med 3 uker i gjæringsbu og minst 4 uker i modningslager for å oppnå høy grad av proteolyse i osten. Goudaproduksjonen kan variere. Dette resulterer i ulike former og en variasjon i fettinnhold i tørrstoff på 40 % til > 50 %, og saltinnholdet i vannfraksjonen varierer fra 1-7 %. Normalt vil også pH avhengig av metode være på 4,9-5,6 (Van den Berg et al. 2005).

Gouda er en halv-fast ost med små hull. Smaken og aromaen til Gouda kan variere. Lengre modningstid gir en hardere ost, og det kan oppstå aminosyre krystaller. Modningsforløpet til Gouda kan variere fra minst 4 uker til 2 år. Store Gouda oster har et lavere vanninnhold enn små oster og vil derfor kreve noe lengre modningstid. Det er aromatiske aminosyrer, forgreinede aminosyrer og metionin som er substratene for smaksutviklingen i Gouda. Det er flyktige svovelforbindelsene fra metionin som gir de essensielle aroma komponentene i

Gouda. Metantio, dimetyl sulfid og dimetyl trisulfid bidrar til de karakteristiske smakene i Gouda. Konsistensen til osten avhenger i stor grad av vanninnhold, grad av proteolyse, pH, NaCl og fettinnhold samt lagringsbetingelser som temperatur, masse og lagringstid (Van den Berg et al. 2005).

Modningsprosess

Modningen av ost er kritisk for å utvikle ulike karakteristiske egenskaper. Denne prosessen inkluderer biokjemiske, mikrobiologiske, strukturelle, fysiske og sensoriske endringer som skjer etter produksjonstiden. Endringene som skjer under modning er avhengig av modningstid, temperatur og emballering. Avhengig a type kan ost modnes i alt fra fire uker til mer enn to år. Hvor lang tid osten modner henger i stor grad sammen med forholdet tørrstoff til vann ved slutten av modningstiden. Parmesan som modnes lenge har et mye høyere tørrstoffinnhold enn Camembert som modnes i fire uker. Når osten lagres over tid vil det være lavere vannaktivitet og ost som modnes lenge vil derfor ha en lengre holdbarhet enn ost som går igjennom en kort modningsprosess. Det er fire ulike prosesser som dominerer for modningen av ost. Disse er glykolyse, proteolyse, lipolyse og mineral likevekt. Disse forandringene er forbundet med endringer i pH, protein hydrering, sammensmelting av fett og svelling av kaseinnettverket (Law & Tamine 2010).

Under glykolysen blir sukker og sukkerderivater brutt ned av enzymer fra syrekulturen eller sekundære kulturer. Avhengig av hvilken ost som produseres kan metabolismen av sukker foregå på ulike måter. Normalt omdannes rester av laktose til L(+)-laktat av syrekulturen. I de fleste oster er det ingen rester av laktose, og denne metaboliseres stort sett av syrekulturen i løpet av den første modningsuken (Law & Tamine 2010).

Proteolyse er en prosess der kasein hydrolyseres til peptider og frie aminosyrer av løyperester, proteinase fra syrekulturen og peptidaser. For harde oster er omdanning av kasein til frie aminosyrer forbundet med utvikling av typisk ostesmak. Hydrolyse av α_{s1} -kasein ved Phe₂₃-Phe₂₄ peptidbindingen fører til reduksjon i para-kasein nettverket. Dette bidrar til ostens konsistens. Under modningen reduseres kolloidalt kalsium og likevekten går mot løselig kalsium. Denne endringen fører til økt proteolyse. Proteolyse gir den typiske glatte og eleatiske strukturen i ost og gir også ønskede egenskaper ved smelting av osten. Graden av elastisitet ved smelting øker med graden av proteolyse til en viss grad før den reduseres.

Forskjeller mellom ulike ostesorter kan være et resultat av kaseinets aggregering og hydrofobiteten til peptidene i osten (Law & Tamime 2010).

Under modning kan triglyseridene i osten bli brutt ned til frie fettsyrer, diglyserider og monoglyserider av lipaser og esterase fra blant annet lipoprotein lipase, løype og syrekulturen. Graden av lipolyse og mengden frie fettsyrer varierer mellom ulike ostesorter og innholdet av frie fettsyrer er normalt moderat i Gouda-type ost (Law & Tamime 2010). Modningen av ost er komplisert og er et resultat av endrede egenskaper i osten. Disse egenskapene er et resultat av omgjøring av laktose, protein, fett og sitronsyre for Gouda-type ost (Van den Berg et al. 2005).

Ostens mikrobiologi

Ulike parametere kontrollerer veksten av bakterier i ost. Disse er vanninnhold, saltkonsentrasjon og pH. Variasjonen mellom disse parameterne påvirkes av produksjonsprosessen. Mikroorganismer som benyttes til produksjonen av ost kan deles inn i syrekultur, sekundærkultur og ikke starter melkesyrebakterier (NSLAB) (Beresford et al. 2001).

Syrekulturen er viktig for osteproduksjon og fører til flere endringer av ostemassen under lagring. En syrekultur kan bestå av ulike syrekulturbakterier, som er definert som isolater som produserer nok syre til å redusere melkens pH til $< 5,3$ i løpet av 6 timer ved $30-37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Melkesyreproduksjon fra laktose er en av de viktigste prosessene i osteproduksjon, og enzymene til melkesyrebakteriene driver proteolyse som fører til omdanning av aminosyrer til smaks- og aromakomponenter (Beresford et al. 2001). Syrekulturen som blir brukt er ofte nøye valgt ut til produksjonen, og tilsettes før løypelegging. Alle syrekulturer initierer produksjonen av melkesyre, og produksjonen av melkesyre fører til en reduksjon i pH. Reduksjonen i pH fremmer løypeaktiviteten, bidrar til økt utskillelse av myse fra ostekornene som fører til en reduksjon i vanninnhold og forhindrer vekst av uønskede bakterier. Det er flere typer syrekulturer med ulike egenskaper, disse kan deles inn i mesofile kulturer, termofile kulturer, definerte kulturer, blandingskulturer og naturlige kulturer (Fox, P.F. et al. 2017).

Melkesyrebakterier som benyttes i syrekulturer for produksjon av ost har ulike egenskaper. Disse bakteriene kan befinne seg i melken, eller bli tilsatt. For overflatemodnede oster benyttes ofte brevi baktier og coryne bakterier, propionsyre bakterier benyttes til Emmentaler type ost, og ulike mugg arter brukes til produksjon av Brie og Camembert. Tidligere ble ikke rene kulturer tilsatt, men mysen fra tidligere produksjon ble tilført i neste produksjon. Syrekulturer av den typen som benyttes i dag ble først registrert i Danmark i 1890 for produksjon av smør (Fox, P.F. et al. 2017). Syrekulturene deles ofte inn i termofile- og mesofile kulturer. Mesofile kulturer brukes til produksjon av Cheddar, Gouda, Edamer og Camembert. Termofile kulturer benyttes ofte til produksjonen av Emmental, Gruyère og Parmesan (Beresford et al. 2001). Termofile kulturer vokser godt opp til $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, og mesofile kulturer har en optimal vekst ved $20-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Termofile syrekulturer kan bestå av *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus og *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Mesofile bakterier som kan benyttes er *Lactococcus lactis* (med alle underarter), og *Leuconostoc*. Mikroorganismer kan også bli benyttet som sekundærkultur og ikke-starter melkesyrebakterier kan bli brukt i tillegg til syrekulturen. En syrekultur kan være en en-kultur eller en blandingskultur av mikroorganismer som ved tilsetning i mediet vokser og driver ønsket fermentering (Walstra et al. 2006).

Mesofile og termofile kulturer kan videre deles i blandingskulturer der kulturen er definert eller udefinert. Udefinerte kulturer inneholder et ukjent innhold av mikroorganismer. Blandingskulturer produserer melkesyre, aromakomponenter og CO₂. Syrekulturkulturen påvirker også ostens utseende, farge, næringsinnhold og gir osten økt holdbarhet. Mesofile blandingskulturer består ofte av *Lc. lactis* ssp. *cremoris* og *Lc. lactis* ssp. *lactis*, og kan inkludere stammer som driver citratfermentering. Termofile blandingskulturer produseres ofte ved å bruke myse fra tidligere produksjon og består hovedsakelig av *Streptococcus thermophilus*, men kan også inneholde *Enterococci*, *Lactococci* og *Leuconostoc* (Beresford et al. 2001).

Et eksempel på en definert kultur er DL-kulturen Bulk Set HM 505 (Danisco Deutschland GmbH, Niebüll, Tyskland) som består av *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* og *Lc. lactis* subsp. *diacetylus* (Danisco). Til Gouda-type ost er det DL-kulturer som normalt blir benyttet. De viktigste oppgavene til denne syrekulturen er å produsere melkesyre, bryte ned proteiner og produsere CO₂. Under produksjon av ost oppkonsentreres bakteriene i ostens koagel, syreproduksjon senker pH og fører til en økt synerese og utskillelse av kalsium og fosfat-forbindelser. I tillegg til dette fører produksjonen av melkesyre til redusert vekst av uønskede bakterier. Melkesyrefermentering stopper når det ikke er mer laktose igjen, og under syrning av ostemassen vil det med en egnet kultur produseres CO₂. Citrat er forgjengeren til diacetyl og acetat, det kan være små mengder citrat i systemelken. Igjennom sitronsyresyklusen blir CO₂ produsert fra citrat. Dette fører til hulldannelse og er viktig for Gouda-type ost. Citrat blir trolig katabolisert av *Lactobacilli* og *Leuconostoc*. (Fox, P.F. et al. 2017; Parente & Cogan 2004).

NSLAB er mesofile *Lactobacilli* og *Pediococci*, disse bakteriene er viktige for utvikling av den mikrobielle floraen igjennom modningen av osten. Bakteriene er ikke en del av syrekulturen, de vokser dårlig i melk og har ingen eller lav syreproduksjon (Beresford et al. 2001). NSLAB er viktig for produksjonen av ost, og har i nyere tid blitt analysert for forskjellige typer ost. Bakteriene i blant annet Jarlsberg og Norvegia har blitt analysert, og resultatene viste at 76% av floraen bestod av mesofile *Lactobacilli* (Linberg et al. 1996). Det betyr at NSLAB har en viktig rolle i produksjonen av ost. Resultater fra ulike studier viser at det skjer en endring i hvilke bakterier som dominerer til ulike tider. Over tid vil bakteriene fra syrekulturen reduseres samtidig som NSLAB floraen øker. Det er usikkert hvor NSLAB kommer fra da de er fremtredende i ost produsert med pasteurisert og upasteurisert melk. For upasteurisert ost kommer NSLAB trolig fra ystemelken. For ost produsert med pasteurisert melk er NSLAB ikke inaktivert ved pasteurisering eller er et resultat av kontaminering etter pasteurisering (Beresford et al. 2001).

Propionsyrebakterier er en sekundærkultur som er viktig for produksjonen av Sveitsisk type ost som Emmental, Jarlsberg etc. Propionsyrebakterier er gram positive stav-formede bakterier som kan drive metabolisme av laktat til propionsyre, acetat, CO₂ og H₂O. Sveitsisk type ost starter sekundær fermentering av propionsyrebakterier typisk ved 20-30 dager etter produksjon. Propionsyrebakteriene bidrar til utviklingen av karakteristiske smaker for Sveitsiske oster, og CO₂ produserer store hull (Beresford et al. 2001).

Mikrofloraen som befinner seg i ost er komplisert, og vil forandre seg igjennom modningsprosessen. Hvilke mikroorganismer som er involvert i de ulike prosessene ved osteproduksjon vil påvirke sluttresultatet. Det er derfor viktig å vite på forhånd hvilke egenskaper syrekulturen, og evt. sekundær kulturen som benyttes til produksjonen har. Hvis mikrofloraen ikke har de egenskapene som kreves for oste typen som skal produseres vil osten ikke ha de riktige karakteristikkene når den er ferdig modnet.

Kulturavhengige- og kulturuavhengige analyse metoder

Ved å benytte mikrobiologiske og molekylære metoder kan informasjon om ostens mikrobiologi kartlegges. Da kan informasjon om ostens mikroflora og modningsforløp undersøkes. Det er flere metoder og analyser som identifiserer og karakteriserer ulike mikroorganismer. Disse metodene kan deles i tre, metoder som er avhengig av dyrking av prøver med fenotypisk karakterisering, metoder som er avhengig av dyrkning og så analysert med molekylære metoder, og metoder som benytter seg kun av molekylær karakterisering (Beresford et al. 2001). De to første metodene er kulturavhengige, og den siste metoden er kulturuavhengige. Hvilken mikroflora som befinner seg i osten til ulike tider kan undersøkes ved kulturavhengige og kulturuavhengige metoder (Porcellato 2013).

Kulturavhengige metoder benyttes for å identifisere og karakterisere ulike mikroorganismer. Denne metoden har tradisjonelt blitt benyttet til analyser av mikrobiologien i ost. Dette kan gjøres ved å plate ut prøver, inkubere de for så å telle og identifisere veksten. Videre kan genotypetester utføres ved blant annet sekvensbaserte metoder. Fenotypisk identifisering kan også benyttes for prøvene ved å observere kulturene som har vokst frem. Dette kan blant annet gjøres i et mikroskop eller ved å se på fermenteringsmønsteret til de isolerte mikroorganismene. For å identifisere mikrobielle celler vil den fenotypiske metoden være utilstrekkelig fordi det er vekst på et medie som kan hemme vekst av deler av den mikrobielle floraen i osten. Det vil derfor gi et dårlig bilde av den mikrobielle situasjonen i en prøve, og en kombinasjon av tradisjonelle- og molekylære metoder kan derfor benyttes. Molekylære metoder gir generelt bedre oversikt enn tradisjonelle metoder. Noen av disse metodene er polymerasekjedereaksjon (PCR), protein ekstraksjon og optimalisering av deoksyribonukleinsyre (DNA). Det er flere fordeler ved å bruke disse metodene. De er mer økonomiske, er raskere og gir mer presise resultater. Fenotypiske metoder og molekylære metoder brukes ofte for å karakterisere og identifisere melkesyrebakterier i syrekulturen, ikke starter melkesyrebakterier og patogene mikroorganismer i ost (Porcellato 2013).

Kulturuavhengige metoder er metoder som baserer seg på isolering av DNA og benyttes for å se på mikrobiell aktivitet og mangfold. Kulturuavhengige metoder er ikke avhengige av vekst og anrikning av mikroorganismene og prøvene tas direkte fra kilden. Fordelen med denne metoden er den gir et mer helhetlig bilde på innholdet av mikroorganismer ved å inkludere alle de mikrobielle cellene som er tilstede i prøven. De kulturuavhengige metodene kan deles PCR-baserte metoder og metoder som ikke er PCR-baserte (Porcellato 2013). Paszyn'ska-

Wesolowska og Bartoszcze (2009) utførte komparative studier og avdekket at resultatene for identiske prøver utført med kulturavhengige og kulturuavhengige metoder fikk ulike resultater. Bruken av kulturmedier gir en parameter som favoriserer noen bakterier, og det er ikke alle bakterier som kan bli dyrket frem ved tradisjonelle metoder. Kulturuavhengige metoder som er basert på DNA gir resultater som er basert på den mikrobielle sammensetningen av prøven og minimerer risikoen for skjevhet i resultatene. Disse metodene kan gi informasjon om diversiteten av mikroorganismer, populasjonen i prøven og kan til en viss grad identifisere spesifikke komponenter (Quigley et al. 2013).

Det har skjedd store endringer innen bruken av molekylære metoder de siste årene. Tidligere har sanger sekvensering vært den mest brukte metoden for analysering av genmateriale. Sanger sekvensering tilhører første generasjons sekvensering, i denne oppgaven benyttes neste generasjons sekvensering (NGS). Disse metodene gjør det lettere å sekvensere store mengder med genmateriale. Neste generasjons sekvensering kan deles inn i forberedelser av kjente områder av DNA-et omtalt som templatet, sekvensering og analyser av data fra det sekvenserte materialet (Metzker 2010).

Kvantitativ polymerase chain reaction (qPCR)

PCR er en teknikk der korte spesifikke sekvenser av DNA amplifiseres med en prøve med få kopier. Kvantitativ PCR (qPCR) er en molekylær metode som benyttes for å amplifisere DNA og ribonukleinsyre (RNA). Denne metoden gir rask identifisering og kvantifisering av ønskede mikroorganismer (Quigley et al. 2013). Metoden benytter PCR der amplifiseringen av DNA registreres kontinuerlig igjennom prosessen. Denne metoden gjør det mulig til en hver tid å vite den relative konsentrasjonen av DNA i prøven. RNA kan også bli brukt som et templat, men da må RNA først bli revers-transkribert til DNA (cDNA) før den blir amplifisert ved qPCR, denne metoden heter qRT-PCR (Biosistemika 2016). qPCR benytter fluoriserende markører som kan fange opp små mengder nukleinsyrer i ulike prøver og kan effektivt kvantifisere nukleinsyrer (Bustin et al. 2009). Primere benyttes ved qPCR og er korte sekvenser av enkelttrådet DNA som er komplementære til sekvensen som skal kopieres. Denne reaksjonen skjer ved at DNA-polymerase begynner å syntetisere nytt DNA eksponentielt og den ønskede sekvensen blir kopiert (Ercolini 2013).

Ved konvensjonell PCR amplifiserer et enzym korte fragmenter av DNA i ulike sykluser. Tilsvarende skjer ved qPCR med unntak av at DNA-et blir markert med fluoriserende farge. Dette fører til at amplifiseringsprosessen kan overvåkes ved å observere mengden fluoriserende lys kontinuerlig gjennom prosessen. Under vanlig PCR amplifiserer enzymer korte regioner på templat DNA-et, der ulike deler av DNA-et kopieres i ulike sykluser for å få en eksponentiell amplifisering av spesifikke regioner av DNA-et. Forskjellen på normal PCR og qPCR er at det ved qPCR skilles det ut et fluoriserende lys som indikerer antall amplifiserte sekvenser. Det går dermed an å registrere DNA underveis i prosessen. Mengden fluoriserende lys er direkte korrelert til mengde amplifisert DNA. I første del av PCR blir DNA varmet opp til 95 °C og DNA-et denaturerer som fører til at det dobbeltrådet DNA-et deles i enkle tråder. Dette gjør at DNA-polymerase kan komme til, men det må være et dobbeltrådet DNA til stede for at polymeriseringen kan starte. Temperaturen senkes og ved å benytte primere vil spesifikke deler av DNA-et amplifiseres ved at DNA-polymerase amplifiserer seksjonene som hører til primerene. Dette gjøres til det ikke er noe mer templat igjen. Den ene syklusen fører til en dobling av spesifikke deler av DNA-et. Etter den første syklusen blir temperaturen på nytt økt og DNA-et denatureres på ny og blir tilgjengelig for polymerase. Det originale DNA-et og de komplementære DNA fragmentene kopieres, og antall DNA fordobles. Dette repeteres i 30-45 sykluser, og temperatur benyttes til å regulere prosessen (Biosistemika 2016).

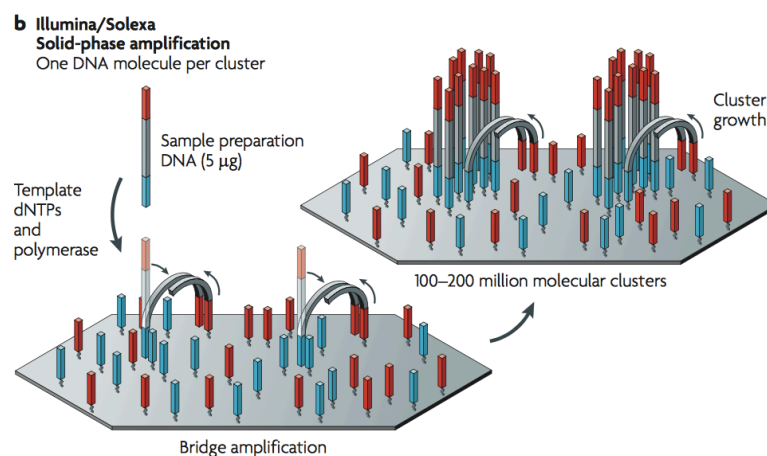
16S rRNA amplifisering og Illumina sekvensering

Sekvensering av PCR-produktet kan utføres for å identifisere ukjente mikroorganismer. Identifisering av mikroorganismer basert på DNA-metoder er forutsigbare og effektive fordi det kan differensieres mellom ulike arter og slekter. En metode som blir mye brukt i dag er 16S rRNA analyse. Denne metoden kan identifisere en bakteriestamme blant mange stammer på grunn av den individuelle egenskapen til stammen. (Law & Tamine 2010).

16S rRNA benyttes for å identifisere bakterier. 16S rRNA sekvensen er stabil over tid og består av ca. 1550 basepar (bp), men det er kun 500 bp som sekvenseres. Informasjon om gensekvensen til ulike bakterier har tidligere blitt analysert og ved å sammenligne egne resultater for 16S rRNA kan bakterier identifiseres på stamme nivå. Sekvenseringen av 16S rRNA genet er en identifisering av baserekkefølgen i spesifikke deler i DNA-et. Før sekvenseringen kan gjennomføres må genmaterialet amplifiseres ved PCR og så må prøvene renses og kjøres på gel elektroforese. Dette gjøres for å karakterisere de ulike lengdene på

fragmentene fra den siste basen. DNA-trådene sekvenseres i to omganger for hver del. Dette resulterer i identifisering av sekvenser for frem og revers. DNA-sekvensene som dannes ved å analysere sekvensene som går frem og tilbake benyttes til å analysere resultatet mot en database (Clarridge 2004).

Illumina sekvensering er en metode innen Next generation sequencing (NGS). Før 16S rRNA sekvensering med Illumina blir prøvene kjørt på PCR. MiSeq sekvensering benytter primere med Illumina adapter sekvenser, en indeks sekvens for revers primer, en 10-nt pute, 2-nt linker som ikke er komplementær til 16S rRNA genet og en gen-spesifikk primer. Sekvenseringen bruker primere på 5' enden og 3' enden for å få avlesninger med høy indeks. Illumina baserte metoder kan produsere mange sekvenser, og er en rimelig metode. Teknologien er basert på chip amplifisering, og sekvensering med reversible terminerende farge nukleotider. Avhengig av reagentene kan 300-500 sykluser gjennomføres ved å sekvensere med MiSeq. Denne metoden gir mye genmateriale med korte sekvenser av høy kvalitet (Kozich et al. 2013).



Figur 3. Illustrasjon av Illumina sekvensering. Figuren viser bro amplifisering der hver enhet på platen er et DNA-molekyl. Hver av disse enhetene amplifiseres via templat dNTP og polymerase (Metzker 2010).

Bro-amplifiserings metoden gir store mengder DNA og er avhengig av primere. Deler av Illumina sekvenseringen kan observeres i Figur 3. DNA-et befinner seg i små fraksjoner og adaptere brukes for å få DNA-et til et oligobrett. DNA denatureres og binder seg til oligo adapteren, polymerase danner en komplementær tråd. Det er ulike oligoer som korresponderer med hver sin ende av DNA-tråden. Det dannes broer av DNA som binder seg sammen i en ny oligo adapter, adaptere befinner seg på hver ende av sekvensen som hybridiseres og polymerase danner en komplementær tråd, oligoen oppfører seg som en primer og DNA-et

amplifiseres. Broen mellom DNA-trådene foldes ut fra broformasjonen med to kopier av sekvensen. Prøvene består nå av en revers tråd og en fremover tråd som denatureres. Amplifiseringsprosessen gjentas i klustere som fører til en rask amplifisering av store mengder DNA-tråder (Metzker 2010).

Etter amplifiseringen blir revers trådene vasket bort og primeren blokkeres i revers tråden. Sekvenseringen starter med en sekvenseringsprimer som initierer flouriserende nukleotider til å feste seg på DNA-tråden. Neste steg er å feste nukleotidene, og når nukleotidene fester seg skannes prøven og det tas et bilde av fargen som skilles ut. Dette bildet registrerer hvilken nukleotid som har festet seg. En laser maskin kan skanne deler av DNA-et med ulike flouriserende stoffer og strukturen til DNA-et analyseres ved å registrere de ulike flouriserende lysene og systematisere de. Denne prosessen kalles sekvensering ved syntese. Etter første avlesning fra tråden tilsettes en indeks 1 primer som initierer neste del av trådens sekvensering, vaskes av og index 2 sekvenserer neste del. Polymerase danner en ny bro av DNA-et, fremover tråden fjernes og revers tråden blir sekvensert på samme måte med primer 2, og resultatene leses av og sorteres i rekkefølge med DNA-et fra 5'enden og fra 3'enden. Resultatene fra denne prosessen sekvenserer de ulike slektene i prøven, og kan gi informasjon om hvilke slekter, og konsentrasjonen av disse slektene i en prøve. (Illumina 2014; Metzker 2010).

Materialer og metoder

Forsøksdesign

I denne oppgaven ble ysting av Gouda-type ost med et fettinnhold på 28 % ystet av ystemelk med ulike behandlinger. Det ble benyttet tre ulike ystingsteknikker i tillegg til en kontroll. Ystingene i hovedforsøket ble utført 16. september, 20. september og 27. september 2016. Prøveysting med et kar med kaseinstandardisert melk ble utført for å observere ystingsprosessen ved produksjon av ost fra filtrert melk før hovedforsøket. For hovedforsøket ble ystemelk med to ulike behandlinger benyttet, mikrofiltrert (MF) ystemelk, og mikrofiltrert og diafiltrert (MF/DF) ystemelk. Et kontroll (C) ystekar ble ystet med 350 L ystemelk. Det ble benyttet skummetmelk og fløte for å få ønsket fettforhold på 1,05 fett/kasein. De resterende ystekarene hadde et totalt volum på 250 L. Mengde fløte og ystemelk benyttet til hver av ystingene i de ulike karene står i Vedlegg A. Det var forventet at osteutbytte var likt for kontroll og ostene som var ystet av kaseinstandardisertmelk selv om ulikt volum av ystemelk ble brukt på grunn av ulik konsentrasjonsgrad av kasein.

Det ble ystet i fire kar ved de tre første ystingsdagene (ystingsblokk), i to av disse ble det benyttet MF/DF melk som hadde ulik formodningstid. Det ene MF/DF karet hadde en formodningstid på 90 minutter, og en podeprosent på 1,5 %. I det andre MF/DF karet ble det benyttet en formodningstid på 30 minutter og en podeprosent på 2,5 %. Kontrollkaret og MF karet hadde en podeprosent på 1,5 %, og hadde i motsetning til MF/DF karene et mysefortynningstrinn under ystingen. Det ble planlagt tre ulike ystingsdager med 4 ystekar for hver dag, men det ble en ekstra ystedag 11. november på grunn av en feil ved første ysting på karet med MF. I Tabell 1 er det en oversikt over de ulike ystingsblokkene, behandlingene og karet som ble benyttet til ystingen.

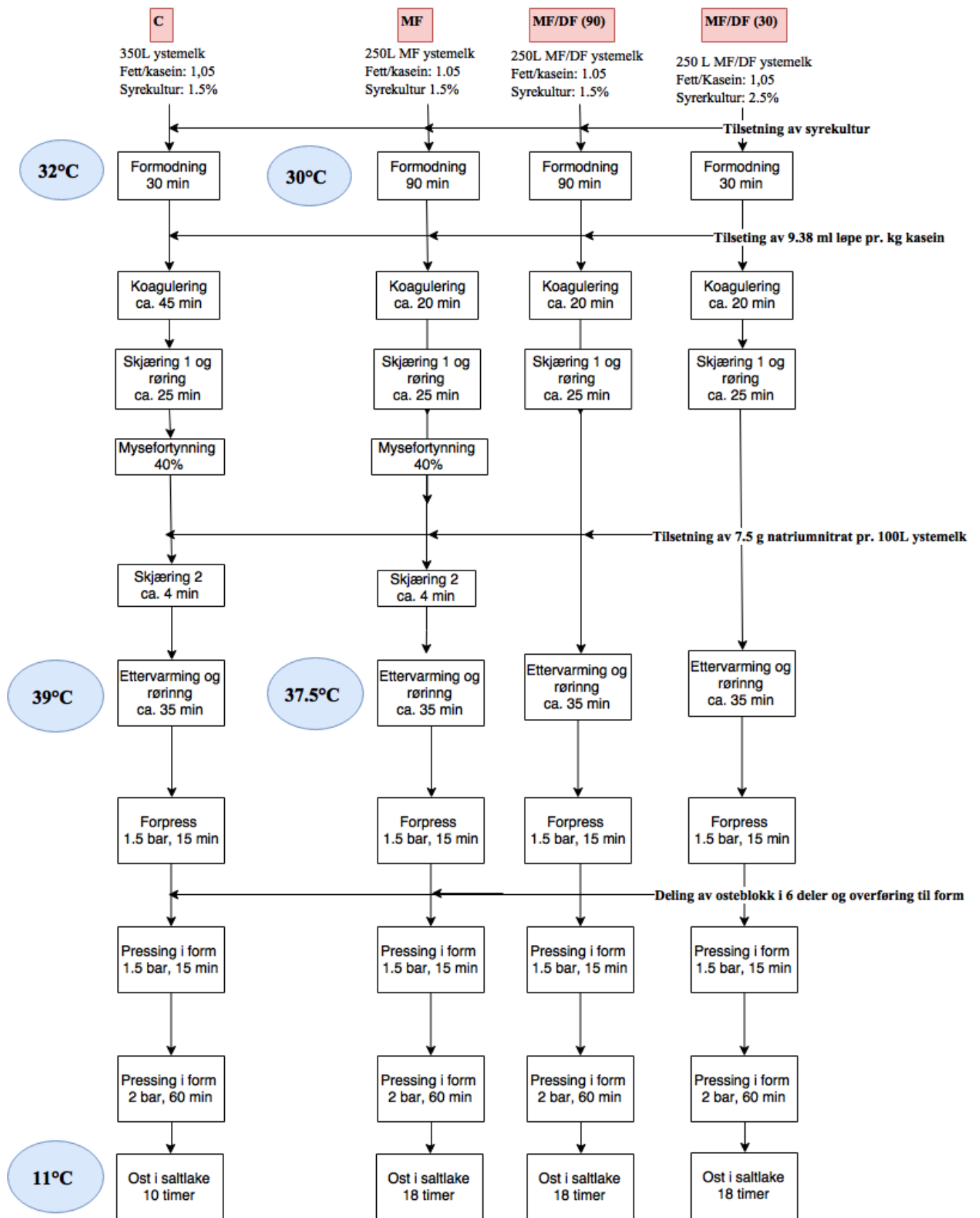
Tabell 1. Oversikt over de ulike forsøksfaktorene for de ulike ystingsdagene med et randomisert utvalg av yste kar. Metodene benyttet er ubehandlet ystemelk (C), mikrofiltrert ystemelk (MF) og mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 90 min (90) og 30 min (30) formodningstid.

Yste kar	Ysting 1	Ysting 2	Ysting 3	Ysting 4
1	MF/DF (30)	MF	MF/DF (90)	-
2	C	MF/DF (90)	MF	-
3	MF/DF (90)	C	MF/DF(30)	MF/DF (90)
4	MF	MF/DF (30)	C	MF

Fra hver av ystingene ble det tatt ut prøver med sterile bulkotester (SKALA prosesseteknikk, Oslo, Norge). Alle deler av forsøket ble utført ved pilotanlegget ved NMBU og på laboratoriet for meieriteknologi og matkvalitet ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM). Prøvene fra forsøket ble analysert ved tradisjonelle metoder ved utplating og ved molekylære metoder.

En prøve fra hver behandling ble tatt ut for mikrobiell analyse ved ulike tidspunkt. Disse prøvene ble tatt i ystingsprosessen av ystemelk med fløte (YMF), syrekultur etter behandling i viskubator (SK), ystemelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP) og ost etter forpress (OEFP). Etter ystingsprosessen ble det også tatt ut prøver ved ulike tidspunkt. Disse prøve ble tatt fra fersk ost 24 timer etter ysting (O24), ost etter formodning (O10d) og ost ut av gjæringsbu (O30d). For hvert av disse uttakene ble prøver analysert ved kulturavhengige og kulturuavhengige metoder. Bakterier ble isolert fra prøvene og analysert ved molekylære metoder og det ble utført en DNA-sekvensering for OEFP, O24, O10d og O30d.

Ystingsteknikkene ble utviklet med utgangspunkt i Skeie, Lindberg og Narvhus (2001), Ediassen (2016) og Flaatten (2016), og har blitt justert ved behov. For hvert kar ble det ystet 6 ost på ca. 5 kg. Det ble utført tre ystinger med fire kar og en ysting med to kar. Dette ga 84 oster totalt. En oversikt over hovedtrekkene fra de ulike ystingene kan observeres i Figur 4.



Figur 4. Flytskjema for de ulike ystingsteknikkene benyttet i forsøket. Behandlingene benyttet er ubehandlet ystemelk (C), mikrofiltrert ystemelk (MF) og mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 90 min (90) og 30 min (30) formodningstid.

Ysting

Behandling av ystemelken

Melken ble levert fra Ås gård NMBU dagen før ystingene ble utført. Råmelken ble separert ved 55 °C (SA 1-01—175, Westfalla Separator AG, Oelde, Tyskland). Videre ble skummetmelk fraksjonen pasteurisert ved 72 °C i 15 sekunder, og fløten ble pasteurisert ved 80 °C i 16 sekunder i en platevarmeveksler (A3-HRB, Alfa Laval, Lund, Sverige). Fløten ble så lagret på 50 L melkespann ved 4 °C før tilsetning i ystekaret. Skummetmelken som skulle benyttes til ysting med membranfiltrert melk ble videre fraksjonert i et mikrofiltreringsanlegg (UF/MF pilot MCC RV 01118340, APV, Slikeborg, Danmark). Dette mikrofiltreringsanlegget hadde en rørvarmeveksler som ga kjøling på permeatsiden under filtreringen, dette er forklart i patent no. 330181 av Hoffmann (2011). Den keramiske membranen (Inside Cèramic, Tami Industries, GEA, Frankrike) i mikrofiltreringsanlegget hadde en porestørrelse på 0.14 µm og en transmembrantrykk på 0,4 bar. Temperaturen under mikrofiltreringsprosessen var 50 °C. Etter mikrofiltreringen ble noe av melken som skulle brukes til MF ystekaret lagret ved 4 °C og resten diafiltrert med pasteurisert vann for å justere laktoseinnholdet. Før diafiltrering ble 35 % vann tilsatt til den mikrofiltrerte melken. Den diafiltrerte melken ble så lagret ved 4 °C til neste dag.

Syrekultur

Dagen før ystingen ble såer à 5 L med lokk og rørestav benyttet til produksjon av brukssyre. Syrekulturen ble lagret ved -40 °C og ble tint i romtemperatur før bruk. Skummetmelk ble varmebehandlet i 5 liters spann ved 90 °C i 30 min i en viskubator. I fire såer ble det inokulert 1 mL mesofil DL syrekulturkultur av typen Bulk Set HM 505 (Danisco Deutschland BmbH, Niebüll, Tyskland). Den varmebehandlede skummetmelken ble tilsatt syrekultur og inkubert i 20 timer ved 20 °C.

Tabell 2. Podingsprosent og mengde syrekultur for de ulike ystingene for ubehandlet ystemelk (C), mikrofiltrert ystemelk (MF) og mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 90 min (90) og 30 min (30) formodningstid.

Kar	Podeprosent (%)	Mengde (L)
DF/MF (30)	2,5	6,2
DF/MF (90)	1,5	3,7
MF	1,5	3,7
C	1,5	4,5

Prøveysting

Prøveystingen ble utført med en høyere podede prosent enn det typisk brukes for ysting, med 30 min formoding. Det vil si at det ble podet 2,5 % syrekultur i stedet for 1,5 % i MF/DF (30) karet. Et ystekar (ASTA eismann GmbH Food-Technology, Beckum, Tyskland) med MF/DF (30) ble ystet under forforsøket for å se på de ystingstekniske forskjellene på å yste med filtrert melk kontra ufiltrert melk. Prøveystingen ble primært gjennomført for å etablere rutiner og kjennskap til ysting med mikrofiltrert melk. Ystingskaret ble steamet, og ca. 230 L MF/DF melk ble tilsatt i karet. Videre ble ca. 20 L fløte tilsatt for å få et fett/kasein forhold på 1,05. Melken ble så varmet opp til 30 °C og tilsatt 2,5 % syrekultur (Danisco Deutschland GmbH) og holdt ved denne temperaturen i 30 min. Etter formodningen ble det tilsatt 9,38 mL løype (CHY-MAX® Plus, Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Danmark) pr. kg kasein. Etter ca. 20 min koaguleringsstid ble gelen vurdert som tilstrekkelig fast og ble kuttet og rørt som vist i Tabell 4. Røringen ble kontrollert fra et kontrollpanel koblet til ystekarene (ASTA eismann GmbH Food-Technology). Videre ble 18,75 g natriumnitrat tilsatt før ostemassen ble varmet opp til 37,5 °C under røring ved hastighet 7. Da ønsket temperatur var nådd ble hastigheten holdt ved 7 i 30 min som vist i Tabell 4. Etter 30 min ettervarming ble ostemassen overført til et forpressekar med 10 L ystevann med en temperatur på 42 °C. Der ble osten tildekket av myse presset i en rektangulær form i 15 min under 1,5 bar trykk. Osten ble etter forpress delt i 6 stykker, løse deler og mysen ble så fjernet. Hvert enkelt stykke ble plassert i en rund osteform (Laude, Tetra Pak, Nederland). Formene ble plassert i press i 15 min under 1,5 bar for så å øke trykket til 2 bar i 1 time. Etter pressingen ble osten plassert i saltlake ved 11 °C i 18 timer før lagring. Tilsvarende metode ble brukt til hovedforsøket, og en oversikt over de ulike stegene for ysting av MF/DF (30) står i Tabell 3.

Tabell 3. Kjøreplan for mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 30 min formodning (30), 2,5 % poding, 250L ystemelk.

MF/DF (30)			
Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
Tilsett syrekultur (formoding)	30 °C	30 min	2,5 %
Løypetilsetting Koagulering	30 °C	20 min	9,38 mL løpe pr. kg kasein
Skjæring og røring	30 °C	30 min	
Tilsett nitrat		0 sek	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L ystemelk
Etttervarming m/ røring	37,5 °C	5 min	
Ettterrøring	37,5 °C	30 min	
Forpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		60 min	2 bar
Ost i vann			
Ost i saltlake	11 °C	18 timer	
Ost ut av saltlake			

Hovedforsøk

Det ble satt opp fire ulike dager for ysting med fire ulike ystekar av typen ASTA Eismann (6mbH, 12958, 2014, Becum, Tyskland). I hvert av karene ble det produsert seks oster, og for hvert av karene ble det benyttet ulike ystingsteknikker. I et av karene ble ost produsert med MF ystet, i to av karene ble MF/DF benyttet, og i det siste karet ble det produsert ost med melk som ikke var konsentrert. På de tre ulike dagene ble karene rotert og det ble satt opp en ekstra dag i tilfelle store avvik ble gjort under en av ystingene. En oversikt over hvilke kar som ble benyttet på de ulike ystedagene er beskrevet i Tabell 1. Ystingskarene ble sterilisert med damp før bruk og alt utstyret som ble benyttet i forbindelse med ystingen ble steamet. Utstyret som var i kontakt med råstoffet ble kloret og/eller steamet før bruk. Personene som var med på ystingen brukte rene arbeidsklær og vasket hendene i klor eller sprit hver gang de var i kontakt med utstyr, råstoff og ost under lagring. Det er for hver av ystingsteknikkene en tilhørende tabell som viser de ulike stegene som ble benyttet i ystingsprosessen.

Tabell 4. Skjære og røreprogram for de ulike ystingsteknikkene.

Skjæring 1		Røring 1		Skjæring 2		Røring 2 (Ettervarming)	
Tid (fortløpende)	Hastighet	Tid	Hastighet	Tid	Hastighet	Tid	Hastighet
40 sek	2,5	2 min	3	1 min	7	5 min	7
1,30 min	4	10 min	4	2,5 min	9	30 min	7
2,20 min	6	13 min	5				
3,30	8						

Kontroll (C)

Det ble tilsatt 320 L skummetmelk i ferdig dampet ystekar. Videre ble ca. 30 L fløte ble tilsatt for å få et fett/kasein forhold på 1,05. Etter fløten ble tilsatt ble karet varmet opp til 32 °C. Da ønsket temperatur ble nådd ble 1,5 % syrekultur tilsatt. Etter syrekulturen ble tilsatt var det en formodningstid på 30 min. Løype (CHY-MAX® Plus) ble tilsatt etter formodning, og det ble benyttet 9,38 mL løype pr. kg kasein. Da melken hadde koagulert ble gelen kuttet og rørt i samsvar med skjæring 1 i Tabell 4 ved 30 °C. Det ble utført et myseavtapp der 40 % av mysen ble fjernet, og tilsvarende mengde vann ble tilsatt. Før skjæring 2 ble 7,5 g natriumnitrat tilsatt pr. 100 L ystemelk. Etter skjæring 2 ble ostemassen varmet opp til 39 °C og rørt ved hastighet 7 i 30 min. Så ble 40 % av mysen tappet av før ostemassen ble overført til et forpressekar med 10 L ystevann i bunn ved 42 °C. Ostemassen ble ført inn i en rektangulær form og presset ved 1,5 bar i 15 minutter. Osteblokken ble så delt i 6 biter og tatt ut av forpressen og i runde former (Laude Tetra Pak). Formene med ostemassen ble så presset ved 1,5 bar i 15 min og 2 bar i 60 minutter. Etter pressing ble osten tatt ut av formene og satt i saltlake ved 11 °C i 10 timer. Flytskjema i Figur 4 og kjøreplan i Tabell 5 gir en god oversikt over ystingsprosessen for ysting med kontroll (C).

Tabell 5. Kjøreplan for ysting av kontroll (C) med 350L ystemelk.

C			
Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
Tilsett syrekultur (formodning)	32 °C	30 min	1,5 %
Løypetilsetting (koagulering)	32 °C	45 min	9,38 mL løpe pr. Kg kasein
Skjæring og røring	30 °C	30 min	
1.myseavtapp		5 min	40 %
Vanntilsetting		5 min	40 %
Tilsett nitrat		0 sek	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L ystemelk
Skjæring 2		3.5 min	
Ettervarming m/ røring	39 °C	5 min	
Etterrøring	39 °C	35 min	
2.myseavtapp		5 min	
Forpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		60 min	2 bar
Ost i vann			
Ost i saltlake	11 °C	10 timer	
Ost ut av saltlake			

MF

Skummetmelk ble mikrofiltrert og retentatet fra mikrofiltreringen ble benyttet videre til ysting. Omtrent 230 L MF ystemelk ble tilsatt i et allerede steamet kar og ca. 20 L fløte ble tilsatt for å få et fett/kasein forhold på 1,05. Ystemelken ble så varmet opp til 30 °C og tilsatt 1,5 % syrekultur. Karet ble holdt ved 30 °C i 90 min for formodning før tilsetning av 9,38 mL løype (CHY-MAX® Plus) pr. kg kasein. Etter ca. 30 min ble gelen kuttet med skjæreprogram 1 og rørt i henhold til Tabell 4. Etter røringen ble 40 % av mysen tappet ut av karet, så ble samme mengde vann tilsatt i karet. Videre ble ostemassen kuttet med skjæreprogram 2 vist i Tabell 4 før tilsetning av 18,75 g natriumnitrat. Karet ble varmet opp til 37,5 °C og rørt ved hastighet 7 vist i Tabell 4. Etter 30 min ved 37,5 °C ble det gjennomført et 40 % myseavtapp før ostemassen ble overført i et forpressekar med 10 L ystevann med en temperatur på 42 °C i bunn av forpressekaret. Videre ble osten presset og plassert i saltlake som forklart tidligere i avsnittet om prøveysting. En fullstendig oversikt over de ulike trinnene i ystingen med MF ystemelk står i Tabell 6.

Tabell 6. Kjøreplan for mikrofiltrert ystemelk (MF), 250L ystemelk.

MF			
Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
Tilsett syrekultur (formodning)	30 °C	90 min	1,5 %
Løpetilsetting (koagulering)	30 °C	20 min	9,38 mL løpe pr. kg kasein
Skjæring og røring	30 °C	30 min	
1. myseavtapp		5 min	40 %
Vanntilsetting		5 min	40 %
Tilsett nitrat		0 sek	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L ystemelk
Skjæring 2.		3.5 min	
Ettervarming m/ røring	37,5 °C	5 min	
Etterrøring	37,5 °C	30 min	
2.myseavtapp		5 min	
Forpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		60 min	2 bar
Ost i saltlake	11 °C	18 timer	
Ost ut av saltlake			

MF/DF

Før produksjon startet ble ystemelken mikrofiltrert, videre ble retentatet fra filtreringen diafiltrert for å regulere innholdet av laktose. Det ble benyttet to kar med MF/DF ystemelk for blokk 1-3 med MF/DF ystemelk. Det ene ystekaret hadde en formodningstid på 30 min og det andre ystekaret hadde en formodningstid på 90 min. Karet med lavest formodningstid ble podet med 2,5 % syrekultur (Danisco Deutschland BmbH) og karet med lengst formodningstid ble podet med 1,5 % syrekultur (Danisco Deutschland BmbH). Ystingen med MF/DF ystemelk ble utført som tidligere forklart i avsnittet om prøveysting. En oversikt over de ulike trinnene for MF/DF (30) er beskrevet i Tabell 3 og de ulike trinnene for MF/DF (90) er beskrevet i Tabell 7.

Tabell 7. Kjøreplan mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodning (MF/DF (90)), 250L ystemelk.

MF/DF (90)			
Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
Tilsett syrekultur (formodning)	30 °C	90 min	1,5 %
Løypetilsetting (koagulering)	30 °C	20 min	9,38 mL løpe pr. kg kasein
Skjæring og røring	30 °C	30 min	
Tilsett nitrat		0 min	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L ystemelk
Ettervarming m/ røring	37,5 °C	5 min	
Etterrøring	37,5 °C	30 min	
Forpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		15 min	1,5 bar
Etterpress		60 min	2 bar
Ost i vann			
Ost i saltlake	11 °C	18 timer	
Ost ut av saltlake			

Tillegssysteming

Det ble i første ystingsblokk flere feil og avvik som førte til usikre resultat for MF. Disse feilene var blant annet tilsetning av løype på feil tidspunkt og feil mengde syrekultur tilsatt i karet. Det ble derfor besluttet å utføre et duplikat av to av karene fra ysting 1. Duplikatene ble gjort for MF og MF/DF (90), og ble utført som beskrevet tidligere.

Lagring og etterbehandling av osten

Etter osten ble tatt opp fra saltlaken (22be, 11°C, pH: 5.0-5.3) ble ostene satt på et stativ i 15 min der lake fikk rent av osten før osten ble satt på forlager i 10 dager ved 11°C med 65 % luftfuktighet. På forlageret ble osten snudd hver dag og en avfukter som reduserte luftfuktigheten ble benyttet. Under forlagring ble osten dekket med to lag Ceska-coat® (CSK Food Enrichment, Leeuwarden, Nederland) på hver side av osten. Ceska-coat® (CSK Food Enrichment) består av parafin og plastikk, og ble benyttet for å beskytte osten fra mugg og for å forhindre at osten tørket ut. Ostene ble overført fra forlager til gjæringsbu etter 10 dager. Osten var på gjæringsbu i 3 uker ved 19°C ved 70 % luftfuktighet, og ble snudd hver dag. Videre ble osten overført til modningslager, osten ble vakuumpakket i semipermeable osteposer (Sealed Air CRYOVAC®, Fredensborg, Danmark) før de ble overført til et modningslager ved 4°C. På modningslageret ble osten snudd en gang i uken.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Ystemelken som ble benyttet ble analysert av en MilkoScan™ FT1 FTIR (Foss Analytical, Hilleroed, Danmark). Resultatene fra analysen ble benyttet for å beregne fløtemengde i karene, løypemengde og for å få informasjon om protein- og fettinnhold.

pH-måling

Under produksjonen ble pH målt hver gang det ble tatt ut en mikrobiellprøve under ystingen. Det ble brukt et PHM 210 standard pH-meter (Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Frankrike) for pH-analyser. Før pH ble målt var pH-meteret kalibrert med buffer 4 og buffer 7. Alle prøver under ystingen ble målt ved å ta ut væske fra ulike steg med et bulkotestbeger (SKALA prosessteknikk). Ostens pH ble målt ved å plassere pH-proben direkte i osten.

Tørrstoff

Tørrstoffanalyse av osten for O24, O10d og O30d ble foretatt etter IDF standard 4:2004 (ISO/IDF, 2004).

Avvik

Ystingsblokk 1

Ved ystingsblokk 1 var podeprosenten for de ulike karene ikke i samsvar med ønsket podeprosent. For C ble podeprosenten 2,7%, podeprosenten for DF/MF (90) ble 2,5% og for DF/MF (30) og MF var podeprosenten på 1,1%. Løype ble tilsatt i MF før ønsket tid. Målinger for OEFP ble ikke gjort for ystingsblokk 1 fordi det ikke ble tatt ut prøve. Det ble heller ikke tatt ut noen prøver for YMF i karet med MF melk. Det ble på grunnlag av dette besluttet å yste MF og MF/DF (90) på nytt.

Ystingsblokk 2

Det ble under ysting 2 en feil som resulterte i et lavere utbytte for MF/DF (30). Risten som samler ostekorn i forpressekaret var ikke ordentlig montert og det var en liten åpning som ikke ble registrert før etter første pressing. Dette førte til at noe av ostekornene ble mistet sammen med mysen, og osten hadde derfor en unormalt liten masse. Forsøket ble ikke gjentatt for MF/DF (30) fordi avviket ble ansett som av liten betydning for videre resultater.

Ystingsblokk 3

Ystevann ble ikke tilsatt i forpressekarene for C og MF/DF (30).

Ystingsblokk 4

Ingen avvik

Mikrobielle analyser

Fra hver ysting ble det tatt ut prøver ved ulike steg som forklart i forsøksdesignet. Disse prøvene ble benyttet til analyser av mikrobiota ved kulturavhengige og kulturuavhengige metoder. For hvert prøveuttak ble det tatt ut tre prøver. En av disse prøvene ble benyttet til innstøpning i ulike medier i petriskål. De to resterende prøvene ble brukt til analyser. Av de to resterende prøvene ble en prøve PMA-behandlet (propidium monoazide) for å skille mellom levende og døde bakterier. Videre ble det utført en DNA-ekstraksjon av begge prøvene. Disse prøvene ble benyttet til sekvensering og til qPCR.

Kulturavhengige metoder

M17

For tillagning av M17-agar ble det målt opp 42,5 g/L M17-buljong (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), og 12 g/L agar-agar (Merck) og plassert i 250 mL flasker. Videre ble 200 mL destillert vann tilsatt i hver flaske og plassert i et kokevannbad til mediet løste seg opp. Da buljongen og agaren hadde dannet en homogen væske ble flaskene autoklavert ved 121°C i 15 min. Etter at M17-mediet ble autoklavert og mediet skulle brukes ble flasken plassert i kokevannbad til gelen i flasken ble flytende og var homogen. Videre ble flaskene med M17 plassert i vannbad ved 48 °C. Det ble benyttet innstøpnings metode for utplating i steril petriskål. Faste og flytende prøver ble benyttet til mikrobiologisk analyse, flytende prøver ble brukt direkte eller fortynnet. For faste prøver ble 11 g målt opp og blandet i en Omni-Mixer (Omni International, Kennesaw, USA) med 99 mL 2 % NaCitrat vann og homogenisert i 2 min ved hastighet 4. Da blandingen var ferdig ble en fullstendig fortynningsrekke laget og 1 mL fra ønskede fortynninger ble overført til sterile petriskåler og instøpt med M17. For hver av fortynningene ble det laget to paralleller for hver fortynning. Den ene parallellen ble inkubert ved 40 °C i 2 dager, og den andre parallellen ble inkubert ved 20 °C i 5 dager.

***Lactobacillus* selektiv agar (LBS)**

Ved dyrkning av *Lactobacillus* ble BBL™ LBS-agar (BD, Becton, Dicson and Company, Le Pont de Claix, Frankrike) benyttet. Det ble brukt 84 g/L agar målt i 250 mL glassflasker. Etter at agaren ble målt opp i flasker ble 200 mL destillert vann tilsatt i flaskene. Videre ble 1,32 mL/L 100 % eddiksyre tilsatt i LBS-agar blandingen. Flaskene ble så ristet godt før de ble plassert i kokevannbad til LBS-agaren var homogen. Da blandingen var homogen ble flaskene plassert i et vannbad ved 48 °C frem til bruk. For instøpning av prøver i sterile

petriskåler ble innstøpings metode med 1 mL prøve benyttet og avhengig av prøvetype ble prøvene enten fortynnet direkte eller blandet i Omni-Mixer (Omni International) med citratvann som forklart tidligere i M17 avsnittet før fortynning. En parallel for hver prøvetype ble innstøpt og inkubert ved 30 °C i 3 dager anaerobt.

Violet Red Bile Agar (VRBA)

For å undersøke vekst av koliforme bakterier ble 38,5 g/L VRBA-agar (Oxoid LTD, Hampshire, England) benyttet. VRBA ble veid opp og plassert i 250 mL glassflasker og tilsatt 200 mL destillert vann. Prøvene ble så plassert i et kokevannbad til agaren hadde løst seg opp, og blandingen ble homogen. Videre ble flaskene med VRBA-agar (Oxoid LTD) plassert i et vannbad ved 48 °C frem til bruk. Ved utplating ble laveste fortynning av hver prøve benyttet og 1 mL ble tilsatt i petriskåler ved innstøpings metode med fortynningsrekke i parallel. Prøvene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

Kulturuavhengige metoder

Isolering av bakterier fra ost

For isolering av bakterier fra ost ble 11 gram ost fortynnet i 99 mL citratvann med en temperatur på 30 °C for så å bli homogenisert av en Omni-mix (Omni International, Kennesaw, USA) i 2 min ved hastighet 4. Etter homogeniseringen hvilte prøvene i 2 min så ble 10 mL av supernatanten overført til et 15 mL sterilt falconrør. For hvert uttak ble det laget to prøver. Prøvene ble så sentrifugert ved 7012 g i 10 min ved 4 °C i en multifuge X3R (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Supernatanten ble helt av og pelleten ble vasket med 1 mL citratvann og overført til 1,5 mL eppendorfrør. Løsningen ble videre sentrifugert (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 16100 g i 3 minutter og supernatanten ble helt av etter sentrifugering. Pelleten ble så vasket med 1 mL citratvann og sentrifugert ved de samme betingelsene totalt 3 ganger. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet og den ene prøven ble behandlet med PMA og den andre prøven ble umiddelbart fryst ved -33 °C.

Isolering av bakterier fra melk

Fra hver melkeprøve ble 10 mL overført til et 15 mL eppendorfrør, prøven ble sentrifugert ved 7012 g i 10 min ved 4 °C i en multifuge X3R (ThermoFisher Scientific). Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 1 mL citratvann i et 1,5 mL eppendorfrør. Prøvene ble så sentrifugert ved 15100 g i 3 min og supernatanten ble så fjernet. Pelleten ble vasket med 1 mL citratvann og sentrifugert ved 16100 g i 3 min. Supernatanten ble fjernet og sentrifugert på nytt ved samme betingelser som tidligere. Etter sentrifugeringen ble supernatanten fjernet og pelleten ble fryst ved -33 °C.

PMA-behandling av bakterieprøver

Pelleten som ble preparert ved isolering av bakterier ble benyttet for PMA- behandling (Biotium, California, USA). Pelleten ble resuspendert i 500 µL citratvann og 1,25 µL 5 µM PMA (Biotium) ble tilsatt. Prøvene ble inkubert mørkt ved romtemperatur i 5 min. Prøvene ble så lagt på is og bestrålt med halogenlys (2×600W) i 5 min med 20 cm avstand fra lyset. Under lysbehandlingen ble prøvene ristet med jevne mellomrom. Etter lysbehandlingen ble prøvene sentrifugert ved 15700 g i 4 min. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble fryst ved -33 °C før DNA-ekstraksjon.

DNA-ekstraksjon

Pelleten som ble fremstilt tidligere ved å isolere bakterier ble resuspendert i 200 μL lysesbuffer (20 mM TrisCl pH 8,0, 2 mM natrium EDTA, 1,2 % Triton® X-100). Pelleten og bufferen ble så tilsatt i et rør med 0,5 g syrevaskede glassbiter (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland). En celleriver ble brukt i 50 sek på maksimal hastighet i 1 min i 3 omganger med prøvene på is i 1 min mellom hver omgang. Prøvene ble så sentrifugert i 1 min ved full hastighet før 50 μL med supernatant ble overført til en 96 brønnplate. Mag midi kit (LGC, Berlin, Tyskland) ble videre brukt for separasjon av DNA fra prøven. 50 μL lysesbuffer BLm (LGC) og 5 μL protease ble tilsatt og prøvene ble blandet ved å pipettere prøvene opp og ned 5 ganger. Prøvene ble så inkubert ved 55 °C i 20 min for så å bli kjølt ned til romtemperatur. Videre ble 50 μL etanol og BLm (LGC) tilsatt i hver prøve og blandet med pipette i 5 omganger. Prøvene ble deretter inkubert i 2 min ved romtemperatur. Platen med brønnene ble så ført på en magnet for å få mag partikler til å danne en pellet. Supernatanten ble fjernet med en multipipette og prøvene ble tatt vekk fra magneten. 170 μL vaskebuffer BLm1 (LGC) ble benyttet for å vaske pelleten ved å pipettere prøven opp og ned 5 ganger. Prøvene ble så ristet ved romtemperatur i 10 min. Prøvene ble videre satt på magnet i 1 min før supernatanten ble fjernet. 175 μL vaskebuffer BLm2 (LGC) ble tilsatt og blandet ved å pipettere prøvene 5 ganger opp og ned, de ble så ristet i 10 min ved romtemperatur og satt på magnet i 1 min før supernatanten ble fjernet. Vasking med BLm2 (LGC) ble gjentatt som forklart over før pelleten ble tørket ved 55 °C i 5 min. 50 μL elueringsbuffer BLm (LGC) ble tilsatt i prøvene, pelleten ble så resuspendert og blandet med en pipette til pelleten ble oppløst. Prøven ble videre inkubert ved 55 °C i 20 min og ristet ved jevne mellomrom. Prøvene ble igjen satt på magnetplaten i 3 min til mag-partiklene dannet en pellet. 50 μL av supernatanten ble så plassert i en ny brønnplate. Den nye brønneplaten med DNA fra supernatanten ble så lagret ved -33 °C.

Dyrking av prøver til standardkurve for qPCR

Renkulturer av *Lactococcus lactis* (Ar-1) og *Lactobacillus casei* (INF448) ble benyttet til standardkurver. Renkulturene ble spredt på petriskåler med M17 (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) for Ar-1 og MRS (Merck) for INF448. Ved tillagning av næringsmedie ble prosedyren beskrevet tidligere benyttet. Prøvene ble så inkubert ved 30 °C i 3 dager. Av disse prøvene ble en koloni overført med en steril podenål til reagensrør i MRS (Merck) buljong for INF448 og M17 buljong (Merck) for Ar-1. Disse prøvene ble inkubert ved 30°C i 3 dager. Det ble videre laget en fortynningsrekke med 1 mL av prøve med buljong fra fortynningene 10^0 - 10^{-7} for INF448 og Ar-1 prøvene, disse ble benyttet som standardkurve til qPCR.

Qubit Assay

For å måle mengden DNA i prøvene til amplifisering ble Qubit Assay (ThermoFisher Scientific) benyttet. Metoden som er beskrevet i pakningsvedlegget for Qubit Assay ble brukt og en arbeidsløsning med 199 µL dsDNA broad range buffer og 1 µL broad range Qubit reagens ble brukt. Standarder ble laget ved å tilsette 10 µL vann og 190 µL arbeidsløsning i et rør. Prøvene som skulle måles ble laget ved å benytte 199 µL arbeidsløsning og 1 µL DNA-prøve. Standardene og prøvene ble tilsatt i et eppendorfrør og ristet i 2-3 sekunder og ble så inkubert ved romtemperatur i 2 min. Prøvene ble så lagt i flourometeret for avlesning.

Tillagning av prøver til kvantitativ PCR

Kvantitativ PCR (qPCR) ble utført med LightCycler 480 II system (Roche, Menheim, Tyskland). Primerpar Lac1F og Lac2R ble brukt for å amplifisere *Lactobacillus*, *Leuconostoc* og *Pediococcus*. Primerpar Lac3F og Lac2R ble brukt for å amplifisere *Lactococcus*, *Streptococcus* og *Enterococcus*, sekvensen og molekylærvekten til primerparene som ble benyttet er i Tabell 8. En standardkurve ble benyttet til qPCR. Standardkurven ble brukt i analysen for å ha et forholdstall med antall amplifikasjoner med fortynningsgrad for en renkultur. Ar-1 og INF448 ble benyttet til tillaging av standardkurven, og Qubit (ThermoFisher Scientific) ble brukt til å kalkulere sluttkonsentrasjonen av prøvene benyttet til standardkurven i henhold til Formel 1.

Formel 1. Formel benyttet til utregning av verdier til standardkurve for renkulturene *Lactobacillus casei* (INF448) og *Lactococcus lactis* (AR-1)

$$\frac{DNA\ mengde \times 6,022 \times 10^{23}}{DNA\ lengde / 1 \times 10^9 \times 650}$$

Tabell 8. Primersett og produktinformasjon for primere før tillagning.

Primer	Sekvens	Molekylærvækt (MW)
Lac1F*	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	17,00 nmol
Lac2R**	ATTCACCGCTACACATG	23,00 nmol
Lac3F*	AGCAGTAGGGAATCTTCGG	20,00 nmol

*Forover **Revers

En mastermiks ble laget i sterilbenk for prøvene fra DNA-ekstraksjon og til standardkurvene. Sluttvolumet til qPCR mastermiksen for hver prøve var 10 µL med LightCycler® 480 Probes Master (Roche). Mastermiksen bestod av 5 µL LightCycler® 480 SYBR Green I (Roche), 0,5 µL 0,2 µM primer Lac1F (ThermoFisher Scientific), og 0,5 mL 0,2 µM primer Lac2R (ThermoFisher Scientific), og 1 µL PCR H₂O. Tilsvarende miks ble laget med 0,5 µL 0,2 µM Lac3F (ThermoFisher Scientific) i stedet for Lac1F for hver prøve. Prøvene ble sentrifugert og 9 µL av mastermiksen ble så tilsatt i en brønneplate med 1 µL prøve med 3,7-75 ng DNA i hver brønn. PCR amplifisering ble kjørt i henholdt til Tabell 9 i Lightcycler® 480 II (Roche).

Tabell 9. Amplifiseringsprogram for qPCR.

	Temperatur	Tid (min)	Antall sykluser
PCR amplifisering	95 °C	05.00	1
	95 °C	00.10	1
	61 °C	00.20	35
	72 °C	00.20	1
Smeltetemperatur	95 °C	00.05	1
	65 °C	01.00	1
	97 °C	Kontinuerlig	1
	37 °C	00.04	1

Tillagning av prøver til 16S rRNA amplifikasjon og Illumnia sekvensering (MiSeq)

PCR for 16S rRNA amplifisering og Illumnia sekvensering ble utført av Davide Porcellato (Post Doc, Forskningsgruppe for Meieriteknologi og Matkvalitet, NMBU). Amplifiseringen og sekvenseringen ble utført som beskrevet av Porcellato (2016). Sekvensene ble analysert med operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) klustermetoder med en 97 % sekvens identifisering. Prosentandelen ble kalkulert for hver OTU basert på det totale sekvensinnholdet for hver prøve.

Lactococcus spesifikke primere amplifiserte et 450 bp fragment av pepABC genen, og dette ble benyttet til å karakterisere populasjonen av *Lactococcus*. Primersekvensene benyttet var LacpepABC F 5'-AGARGCACAAATGATTTCCAAGA-3' og LacpepABC R 5'-STCAGAAGTTCCAACCTTCCAAAATT-3'. Sekvenseringen ble utført som beskrevet over for 16S rRNA sekvenseringen og OTU ble produsert fra 99 % sekvens klustering. De OTU sekvensene med flest kopier ble identifisert ved å bruke en nettside for BLAST-søk basert på nukleotider: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Det beste resultatet fra søket ble benyttet til å identifisere OTU. Gjennomsnittet av OTU for de ulike sekvensene ble kalkulert basert på totalt antall sekvenser for hver prøve.

Avvik

Kulturavhengige metoder

Ved inkubering av M17 ved 40°C var det noe avvik i temperatur, det var derfor ikke en jevnt temperatur under inkuberingen. Temperaturen i inkubasjonsskapet kunne variere fra 40-42 °C.

Ystingsblokk 1

Kulturavhengige metoder: manglende resultater for OEFP for M17, LBS og VRBA for alle behandlinger på ystingsblokk 1 på grunn av manglende uttak for mikrobiologisk analyse.

Kulturuavhengige metoder: DNA isolering ble ikke gjennomført for OEFP for MF uten PMA-behandling, og OEFP MF/DF (30) med PMA-behandling. Ved isolering av bakterier fra Y.1 etter 30 dager var det ikke tilstrekkelig PMA. Derfor ble det tilsatt 1 mL 30 % glukose til pelleten. Prøvene ble lagret ved 4 °C i to dager, før prøvene ble behandlet med PMA som tidligere.

Ystingsblokk 2

Kulturavhengige metoder: Manglende resultater for vekst på LBS for behandling C med prøve O24, og for OEFP og O24 for behandling MF/DF (30) på grunn av feil i fortynning.

Kulturuavhengige metoder: Ingen avvik.

Ystingsblokk 3

Kulturavhengige metoder: Ingen avvik.

Kulturuavhengige metoder: Ingen avvik.

Ystingsblokk 4

Kulturavhengige metoder: Manglende resultater for OEFP for MF for M1720°C på grunn av feil ved fortynning. Samme feil har skjedd for MF for prøven OEFP og O24 for vekst på LBS. Disse resultatene ble derfor estimert.

Kulturuavhengige metoder: Ingen avvik.

Statistisk analyse

Det ble benyttet statistiske analyser for å analysere effekten av behandlingsmetode, blokk og PMA-behandling for aktuelle prøver. De statistiske analysene ble utført med JMP® Pro 13.0.0 (© 2016 SAS Institute Inc) og analysene ble brukt i en lineær modell for varians analyse (ANOVA). Signifikansnivået som ble benyttet var $p < 0,05$ og ved signifikant effekt ble nullhypotesen forkastet. Modell, nullhypotese og alternativ hypotese for pH, tørrstoff og mikrobielle prøver dyrket med kulturavhengige metoder er illustrert i Figur 5. Prøver som ble undersøkt med molekylære og kulturuavhengige metoder med PMA-behandling ble analysert med modellen i Figur 6. Det ble ved signifikante resultater gjennomført en Tukey's HSD test.

Hypotese:	Modell:
$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = 0$	$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$
$H_1: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \neq 0$	Y_{ij} : respons
$\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$	j : 1, 2, 3, 4 (blokker)
	i : 1, 2, 3, 4 behandlingsmetode
	μ : gjennomsnittlig respons
	τ_i : behandling
	β_j : blokkeffekt
	ε_{ij} : uforklart variasjon
	NID: Normal og uavhengig distribuert
	0: gjennomsnitt
	σ^2 : varians

Figur 5. ANOVA modell, null hypotese og alternativ hypotese for effekt av filtrering og blokk for pH, tørrstoff og vekst av prøver i ulike vekstmedier.

Hypotese:	Modell:
H ₀ : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = 0$	$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + \varepsilon_{ij}$
H ₁ : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \neq 0$	Y _{ijk} : respons
$\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$	j: 1, 2, 3, 4 (blokker)
	i: 1, 2, 3, 4 behandlingsmetode
	μ : gjennomsnittlig respons
	τ_i : behandling
	β_j : effekt av PMA-behandling
	δ_k : blokkeffekt
	ε_{ij} : uforklart variasjon
	NID: normal og uavhengig distribuert
	0: gjennomsnitt
	σ^2 : varians

Figur 6. ANOVA modell, null hypotese og alternativ hypotese for effekt av filtrering, blokk og PMA-behandling for qPCR resultater og resultater fra 16rRNA amplifisering og Illumina sekvensering.

Resultater

Komponenter i Ystemelken

Ystemelken ble analysert med FTIR for innhold av fett, protein, laktose og kasein. Tabell 10 viser det gjennomsnittlige innholdet av fett, totalt protein, laktose og kasein for ystemelken benyttet til ystingsblokk 1-4 før standardisering med fløte.

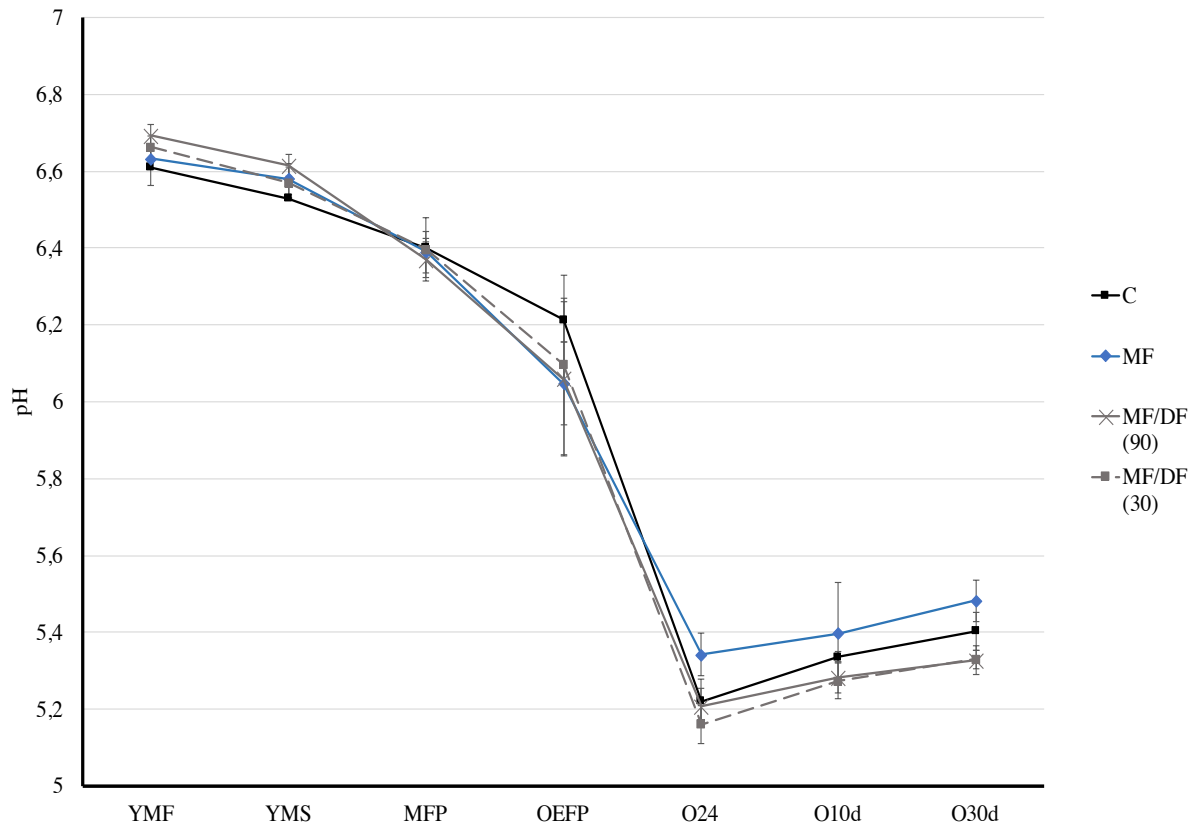
Tabell 10. Gjennomsnittlig innhold med SD av fett, totalt protein, laktose og kasein i ystemelken før standardisering med fløte målt med FTIR. Ystemelk uten forbehandling (C), mikrofiltrering (MF) og mikrofiltrering og diafiltrering (MF/DF).

Ystemelk	Fett (%)	Totalt protein (%)	Laktose (%)	Kasein (%)
C	0,08 ± 0	3,72 ± 0,06	4,64 ± 0,04	2,73 ± 0,04
MF	0,29 ± 0,24	4,50 ± 0,08	4,54 ± 0,06	3,29 ± 0,05
MF/DF	0,12 ± 0,005	4,29 ± 0,05	3,64 ± 0,03	3,14 ± 0,03

Innholdet av fett i de ulike behandlingene av ystemelk før standardisering varierte og det var mest fett i MF melken. Resultatene i Tabell 10 viser at det var høyest andel protein i MF med 4,59 % og minst protein i C med 3,72 %. Innholdet av laktose var høyest i C med 4,64 %. Det var noe mindre laktose i MF og det laveste innholdet av laktose var for MF/DF melk med 3,64 %. Kaseininnholdet i MF ystemelken var høyest med 3,29 %, og lavest i C med 2,73 %.

pH

Det ble gjort pH målinger under ysting av ferskost og under modning frem til 30 dager. Resultater med standardavvik er presentert i Figur 7. Verdiene for pH starter ved 5. Verdiene benyttet til Figur 7 og Tabell 11 finnes i Vedlegg E.



Figur 7. Gjennomsnittlig måling av pH med SD for de ulike ystingsteknikkene med kontroll (C), mikrofiltrert systemelk (MF) og mikrofiltrert og diafiltrert systemelk (MF/DF) med 90 min formodning (90) og 30 min formodning (30). pH prøver ble tatt av systemelk med tilsatt fløte (YMF), systemelk med tilsatt syrekultur (YMS), Myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), fersk ost (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Tabell 11. Signifikansnivåer fra variansanalyse (ANOVA) med effekten av blokk og behandling på pH ved de ulike pH målingene for ystemelk tilsatt fløte (YMF), ystemelk med syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ferskost (O24), ost etter 10 dager (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Resultatene viser også R^2 som viser forklart variasjon/total variasjon. Verdier som ikke har signifikant effekt ($p > 0,05$) er vist ved n.s. Tukey HSD test ble utført for behandling.

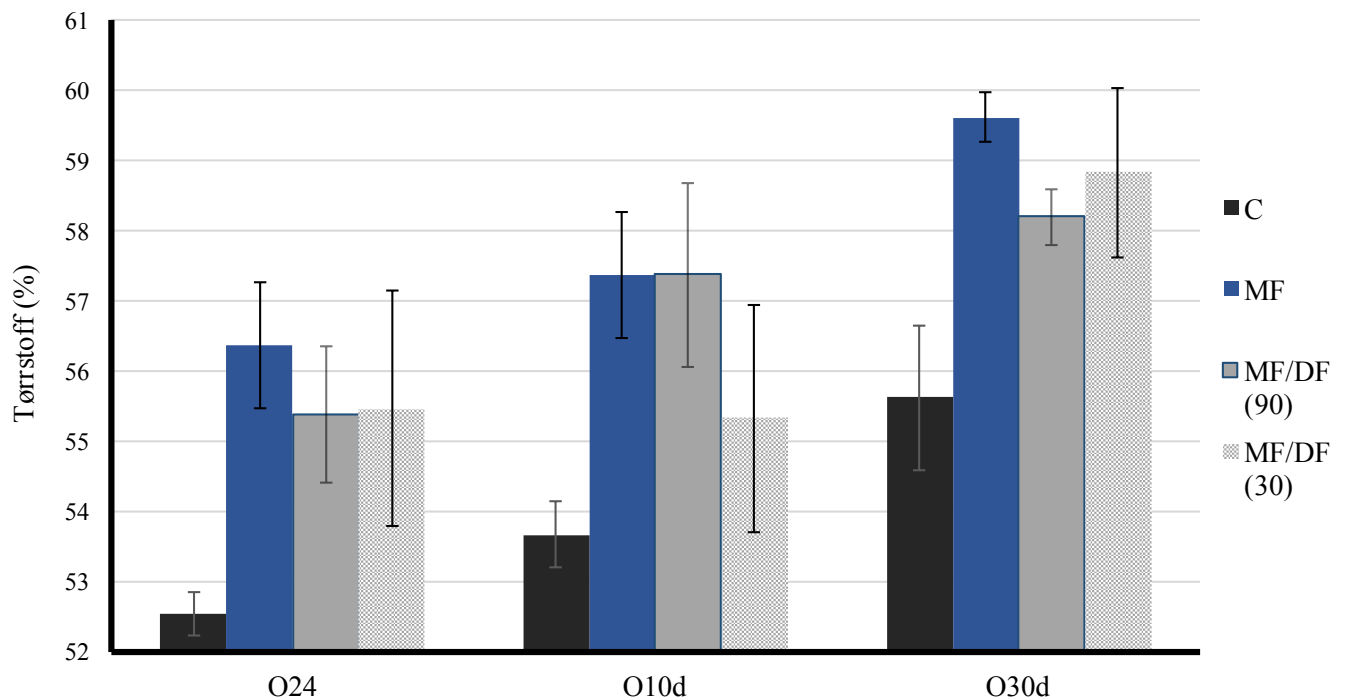
Prøve	Blokk (p-verdi)	Behandling (p-verdi)	Tukey (gruppering)				R^2
			C	MF	MF/DF (90)	MF/DF (30)	
YMF	n.s.	n.s.	-	-	-	-	0,47
YMS	n.s.	n.s.	-	-	-	-	0,45
MFP	n.s.	n.s.	-	-	-	-	0,05
OEFP	< 0,05	n.s.	-	-	-	-	0,78
O24	n.s.	< 0,05	AB	A	AB	B	0,62
O10d	n.s.	n.s.	-	-	-	-	0,31
O30d	n.s.	< 0,01	AB	A	B	B	0,70

Det var en reduksjon av pH under ystingsprosessen. pH har for de ulike melkebehandlingene gått fra ca. 6,7 i ystemelken til ca. 5,2-5,4 for ferskost. Det var dermed en betraktelig reduksjon i pH ved ysting. Den største reduksjonen i pH skjedde mellom ost etter forpress (OEFP) og ferskost (O24). Ystemelken med behandling (MF og MF/DF) hadde en høyere pH under ystingen enn kontroll (C) ystemelken. Etter ost etter forpress (OEFP) hadde kontroll (C) osten høyere pH enn de resterende ostene med melkebehandling. Resultatene fra Figur 7 viser et liknende pH mønster for alle ostene. Det var en gradvis reduksjon i pH fra YMF til O24. pH har deretter en svak økning fra O24 til O30d. Fra O24 til O30d har begge MF/DF behandlingene samme pH mønster, og de har de laveste pH målingen av de ulike behandlingene. For det samme tidspunktet hadde MF osten høyest pH. Kontroll (C) ost ligger mellom MF og MF/DF målingene etter O24. Fra O24 til O30d var pH for MF høyest, og C og MF/DF har resultater som var mest like. For OEFP var det en signifikant effekt av blokk, og resultatene fra ANOVA analysen viser også en signifikant effekt av behandling for O24 og O30d. R^2 var for OEFP 0,78 og det var derfor variasjon som ikke ble forklart av modellen. Det ble utført en Tukey's HSD test for prøvene for gruppering med tanke på behandling. Dette viste en signifikant forskjell for de ulike behandlingene. MF ost ved O24 var signifikant

ulik MF/DF (30). Osten ystet med mikrofiltrert ystemelk ved O30d var signifikant forskjellig fra MF/DF ost på dette tidspunktet.

Tørrstoff

Det ble gjennomført en tørrstoffanalyse for ferskost og modnet ost. De gjennomsnittlige resultatene med standardavvik er vist i Figur 8. Verdiene starter ved 52 % og verdiene benyttet til Figur 8 og Tabell 12 er vist i Vedlegg D.



Figur 8. Gjennomsnittlig innhold av tørrstoff med SD for ost uten forbehandling (C), mikrofiltrert ystemelk (MF), mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 90 min formodningstid (90) og mikrofiltrert og 30 min formodningstid (30). Uttakene for tørrstoff ble gjort for ferskost (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Tabell 12. Signifikansnivåer fra variansanalyse (ANOVA) med effekten av blokk og behandling på tørrstoff ved målingene for ost 24 timer (O24), ost etter 10 dager (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Resultatene viser også R^2 som viser forklart variasjon/total variasjon. Verdier som ikke har signifikant effekt ($p > 0,05$) er vist ved n.s. Tukey's HSD test ble utført for behandling.

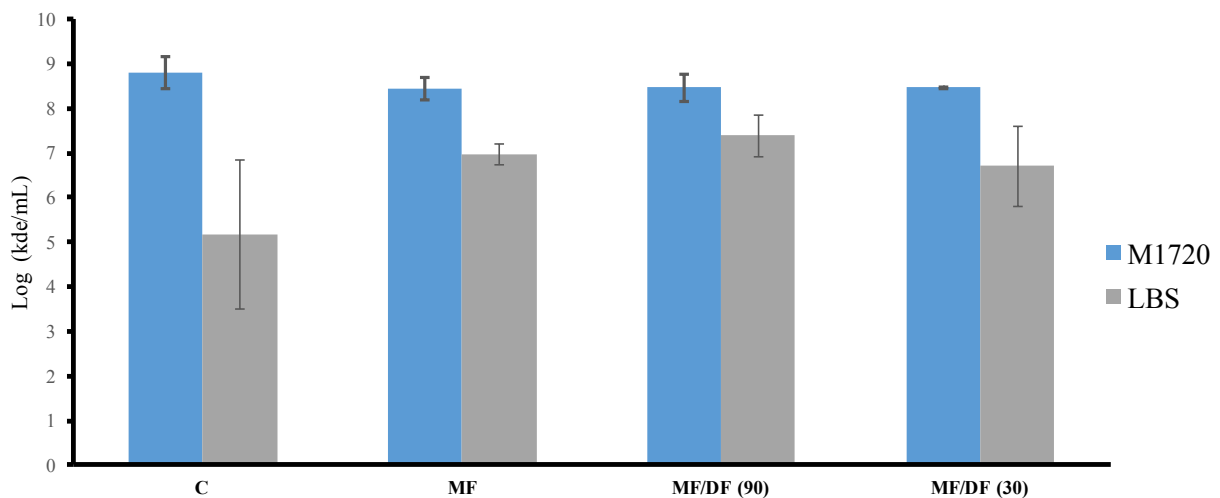
Prøve	Blokk (p-verdi)	Behandling (p-verdi)	Tukey (gruppering)				R^2
			C	MF	MF/DF 90	MF/DF 30	
O24	n.s.	< 0,05	B	A	AB	AB	0,66
O10d	n.s.	n.s.	-	-	-	-	0,35
O30d	n.s.	< 0,01	B	A	A	A	0,81

De gjennomsnittlige resultatene i Figur 7 for innhold av tørrstoff viste en variasjon mellom de ulike ystingsmetodene. Gjennomsnittlig verdi for tørrstoff for O24 var tilnærmet likt for ystemelk ystet av MF/DF behandling. Tørrstoffet var høyest ved O24 for MF med 56,3 % og lavest for C ost med 52,5 %. Kontroll (C) osten hadde et lavere tørrstoffinnhold enn de resterende ostene (MF, MF/DF). MF ost hadde et generelt høyere tørrstoffinnhold enn de andre ostene etter 10 dager (O10d) der MF/DF (90) ost og MF/DF (30) ost var tilnærmet lik MF ost etter O10d. Resultatene fra Figur 7 viser en tendens til at den kaseinstandardiserte ystemelken førte til et høyere tørrstoff enn vanlig ystemelk (C). Resultatene fra Tabell 12 viser at melkebehandlingen har hatt signifikant betydning for tørrstoffinnholdet i osten ved O24 og O30d. Det var lave resultater for R^2 for O24 og O10d, dette betyr at modellen ikke forklarer variasjonen godt. Modellen var bedre for O30d, der R^2 var $> 0,8$. En Tukey's HSD test ble gjennomført for gruppering av ostene med ulik melkebehandling. Dette viste at melkebehandlingen gav en signifikant forskjell mellom tørrstoffinnholdet i ostene. I ferskost (O24) var det en signifikant forskjell på MF ost og C ost. Etter 30 dager (O30d) var det signifikant forskjell på kontroll (C) og ostene laget av kaseinstandardiserte melk.

Kulturavhengige og kulturuavhengige resultater

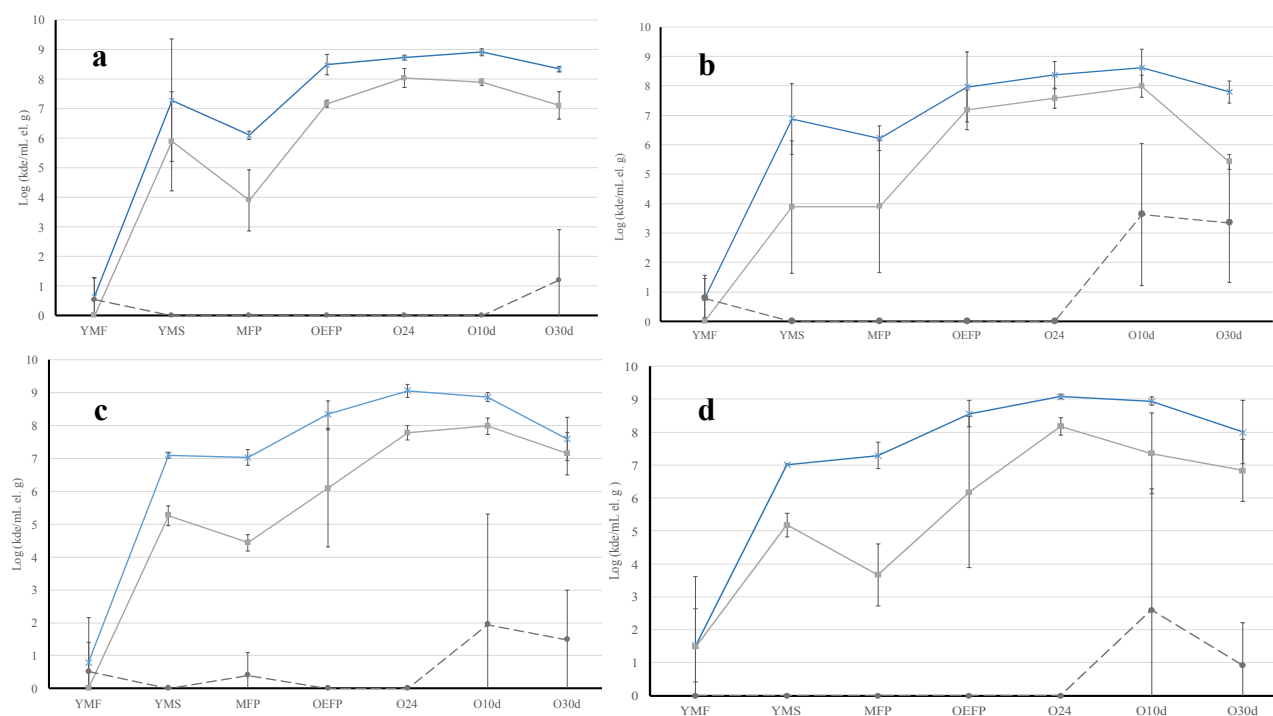
Resultater for vekst på LBS og M17

Prøver ble tatt av syrekulturen, under ystingen og av ostene ved O24, O10d og O30d. Disse prøvene ble benyttet til innstøping med M17 og LBS agar og inkubert ved ulike temperaturbetingelser. Resultatene for vekst fra prøvene med syrekultur før inokulering er illustrert i Figur 9 og viser det gjennomsnittlige resultatene med standardavvik for de 4 ystingsblokkene. Resultatene fra de ulike ystingsmetodene under ysting og uttak for ostene under lagring er vist i Vedlegg G.



Figur 9. Gjennomsnittlig vekst med SD av prøver tatt fra syrekulturen benyttet til ysting uten forbehandling (C), mikrofiltrert ystemelk (MF), mikrofiltrert og diafiltrert (MF/DF) ystemelk med 90 min formodningstid (90) og 30 min formodningstid (30). Prøvene ble innstøpt i LBS anaerobt ved 30°C og M17 i petriskåler ved 20°C (M1720°C) og 40°C (M1740°C). Det var ingen vekst for M1740°C, resultatene er derfor ikke vist i figuren.

I Figur 9 er de gjennomsnittlige resultatene i \log_{10} kde/mL for syrekulturen benyttet til inokulering av ystemelken for de ulike ystingsmetodene benyttet i forsøket. Resultatene viser en variasjon i \log_{10} kde/mL for LBS og M1720°C, men ingen synlig vekst for M1740°C prøvene. Det var forventet at alle syrekulturene hadde samme bakterietall, men som vist i Figur 9 hadde syrekulturen benyttet til ysting av C ost den laveste veksten for LBS og den høyeste veksten på M1720°C. Syrekulturen benyttet til MF/DF (90) hadde den største konsentrasjonen av vekst for LBS.



Figur 10. Gjennomsnittlig vekst med SD for prøver innstøpt i petriskål med LBS agar (—■—) inkubert ved 30°C anaerobt og M17 agar inkubert ved 20°C (---×---) (M1720°C) og 40°C (---●---) (M1740°C) for **a**) ubehandlet systemmelk (**c**), **b**) mikrofiltrert systemmelk (MF), **c**) mikrofiltrert og diafiltrert systemmelk med 90 min formodning (MF/DF (90)) og **d**) mikrofiltrert og diafiltrert systemmelk med 30 min formodning (MF/DF(30)). Prøvene ble tatt av systemelken med tilsatt fløte (YMF), systemmelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). De fire første prøveuttakene er målt i kde/mL og de fire siste prøveuttakene er målt i kde/g.

Tabell 13. Signifikansnivåer fra variansanalyse (ANOVA) med effekten av blokk og behandling på alle systemetodene for vekst på M17 ved 20°C (M1720°C) for systemmelk tilsatt fløte (YMF), systemmelk med syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer (O24), ost etter 10 dager (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Resultatene viser R² som viser forklart variasjon/total variasjon. Verdier som ikke har signifikant effekt ($p > 0,05$) er vist ved n.s.

Prøve	Blokk (p-verdi)	Behandling (p-verdi)	R ²
YMF	n.s.	n.s.	0,19
YMS	n.s.	n.s.	0,33
MFP	n.s.	n.s.	0,45
OEFP	n.s.	n.s.	0,08
O24	n.s.	n.s.	0,56
O10d	n.s.	n.s.	0,15
O30d	n.s.	n.s.	0,37

M1720°C

Det var størst vekst på M1720°C i for alle prøvene etter at syrekultur ble tilsatt som vist i Figur 10. Uavhengig av melkebehandling viste vekstmønsteret vist samme trend. Etter tilsetning av syrekultur (YMS) ble det observert en kraftig økning for YMF fra ca. \log_{10} 0,5 til 7 kde/mL for samtlige prøver. Ystingene med MF melk og kontroll (C) melk hadde en reduksjon i vekst ved MFP, mens ystingene med MF/DF melk hadde ingen reduksjon på dette tidspunktet. For ystingene med MF og kontroll (C) melk var det en svak økning frem til 10 dager gammel ost (O10d) og videre en reduksjon fra O10d til 30 dager (O30d). For MF/DF ostene var det en svak økning frem til O24 og en reduksjon frem til O30d. Resultatene i Figur 10 for M1720°C fulgte de samme trendene uavhengig av melkebehandling, men det var en større likhet mellom MF og kontroll (C) og for de ulike MF/DF prøvene. Resultatene i Tabell 13 viste ingen signifikant effekt av behandling av blokk eller behandling, men R^2 er lav for samtlige prøver. Modellen forklarer derfor ikke all variasjonen, og variasjonen i resultatet er derfor forklart av noe annet enn forsøksfaktorene.

Tabell 14. Signifikansnivåer fra variansanalyse (ANOVA) med effekten av blokk og behandling på alle behandlingene for vekst på LBS anaerobt ved 30°C for ystemelk tilsatt fløte (YMF), ystemelk med syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer (O24), ost etter 10 dager (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Resultatene viser også R^2 som viser forklart variasjon/total variasjon. Verdier som ikke har signifikant effekt ($p > 0,05$) er vist ved n.s.

Prøve	Blokk (p-verdi)	Behandling (p-verdi)	R^2
YMF	n.s.	n.s.	0,35
YMS	n.s.	n.s.	0,27
MFP	n.s.	n.s.	0,07
OEFP	n.s.	n.s.	0,35
O24	n.s.	n.s.	0,40
O10d	n.s.	n.s.	0,08
O30d	n.s.	n.s.	0,09

LBS

Det var et liknende vekstmønster for alle ystingene/ostene på LBS i Figur 10. Vekstmønsteret for alle ystingene/ostene startet med kraftig vekst fra ca. \log_{10} 0,5 kde/mL ved YMF til ca. \log_{10} 5 kde/mL for YMS. Videre var det en liten reduksjon for alle ystingene med unntak av MF melk for tidspunktet YMS. Fra MFP til O24 var det en kraftig økning for MF/DF ost med en økning fra ca. \log_{10} 4 kde/g til \log_{10} 8 kde/g. Det var tilsvarende økning for MF og kontroll (C) ost, men økningen var størst mellom MFP og OEFP. Kontroll (C) og MF/DF (30) hadde en nedgang i vekst på LBS fra O24 til O30d. For det samme tidspunktet var det en økning for MF og MF/DF (90) ost, med en reduksjon fra O10d. Forskjellen mellom MF ost og de ostene etter O30d var $> \log_{10}$ 1 kde/g. MF ost hadde en lavere vekst ved O30d for LBS enn de resterende ostene. Det er for resultatene i Tabell 14 ingen signifikante effejter for melkebehandling eller blokk for vekst på LBS. Resultatene for R^2 for samme tabell viser har lave resultater for samtlige prøver. Modellen benyttet til statistiske analyser forklarer derfor ikke all variansen i forsøket.

Tabell 15. Signifikansnivåer fra variansanalyse (ANOVA) med effekten av blokk og behandling på alle systemetodene for vekst på M17 ved 40°C (M1740°C) for systemelk tilsatt fløte (YMF), systemelk med syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer (O24), ost etter 10 dager (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Resultatene viser også R^2 som viser forklart variasjon/total variasjon. Verdier som ikke har signifikant effekt ($p > 0,05$) er vist ved n.s. En Tukey's test ble utført for blokk×behandling, men det hadde ingen signifikans.

Prøve	Blokk (p-verdi)	Behandling (p-verdi)	R^2
YMF	< 0,05	n.s.	0,58
YMS	-	-	-
MFP	n.s.	n.s.	0,36
OEFP	-	-	-
O24	-	-	-
O10d	< 0,05	n.s.	0,56
O30d	n.s.	n.s.	0,48

M1740°C

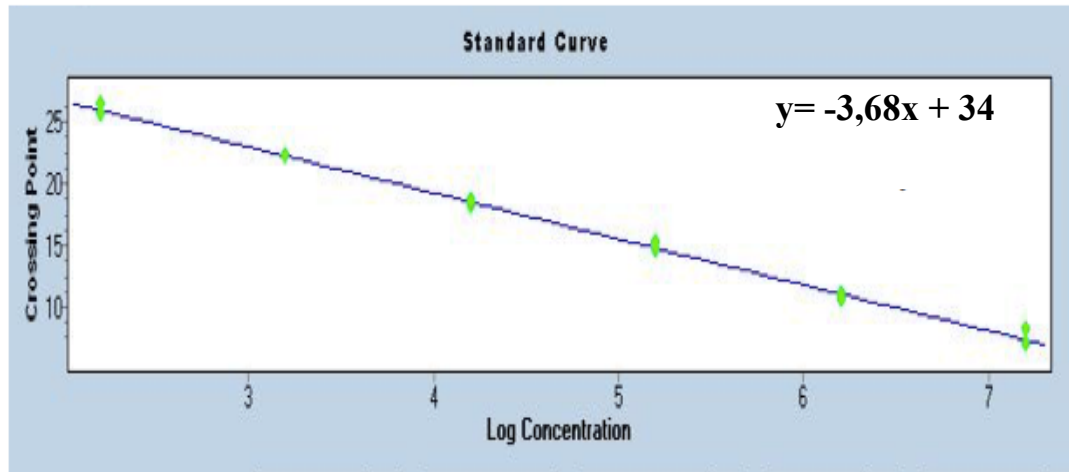
Det var generelt lav vekst på M1740°C som vist i Figur 10. Variasjonen mellom de ulike behandlingene var større for M1740°C enn for LBS og M1720°C. Alle YMF prøvene hadde en konsentrasjon på ca. \log_{10} 0,5 kde/mL. MF/DF (90) ost hadde vekst ved MFP på ca. \log_{10} 0,5 kde/mL. Det var ingen synlig vekst for M1740°C for prøveuttakene ved YMS, OEFP eller O24 for noen av behandlingene. Det var imidlertid vekst ved O10d for alle de kaseinstandardiserte ostene, og MF osten hadde spesielt høy vekst med \log_{10} 3,5 kde/g. Alle ostene hadde vekst ved O30d, men MF osten hadde ca. \log_{10} 2 kde/g mer i vekst enn de andre ostene. Det var ingen signifikant effekt for behandling for M1740°C i Tabell 15, men det var signifikant effekt for blokk ved YMF og O10d. Det var lave verdier for R^2 for M1740°C og modellen forklarer derfor trolig ikke alle variasjonen for M1740°C.

Resultater for vekst på Violet Red Bile Agar (VRBA)

Det var vekst for noen av uttakene for VRBA, alle resultatene for VRBA er vist i Vedlegg G. Prøvene ble skilt ved vekst og ikke vekst, og koloniene hadde en glatt lys overflate. Ved ystingsblokk 2 var det vekst på VRBA for prøver av syrekulturen for MF/DF (90). Ved ystingsblokk 3 var det vekst for på MF melk/ost på tidspunktene YMS, OEFP, O24, O10d og O30d. Ved ystingsblokk 4 var det vekst for prøver av O30d for MF ost og MF/DF (90) ost.

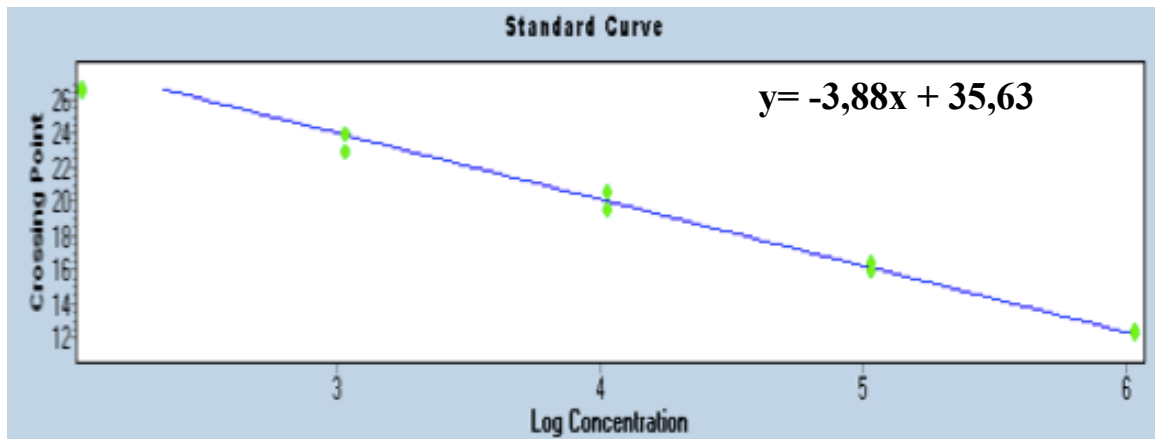
Standardkurve for qPCR

Kvantitativ PCR (qPCR) ble benyttet for uttakene OEFP, O24, O10d og O30d. Det ble tatt ut prøver med og uten PMA-behandling for alle ystingsdagene. Oppsett for brønneplassing av de ulike prøvene er i Vedlegg H og resultatene fra qPCR er i vedlegg I. Det ble benyttet to standardkurver for qPCR, Ar-1 for *Lactococcus lactis* og INF448 for *Lactobacillus casei*. Effektiviteten til standardkurvene viser hvor god standardkurven er. En standardkurve med en effektivitet på 2 er optimal.



Figur 11. Standardkurve fra qPCR for renkultur av *Lactobacillus casei* (INF448) til amplifiseringsplate 1 med primerpar 1F og 2R for amplifisering av *Lactobacillus*, *Leuconostoc* og *Pediococcus*. Effektiviteten til standardkurven var 1,86.

Figur 11 viser standardkurven benyttet til plate 1 for renkulturen av *Lactobacillus casei*. Standardkurve fra fortynningene med 10^3 - 10^7 ble brukt. Effektiviteten til standardkurven var 1,86 og den er derfor ikke optimal.

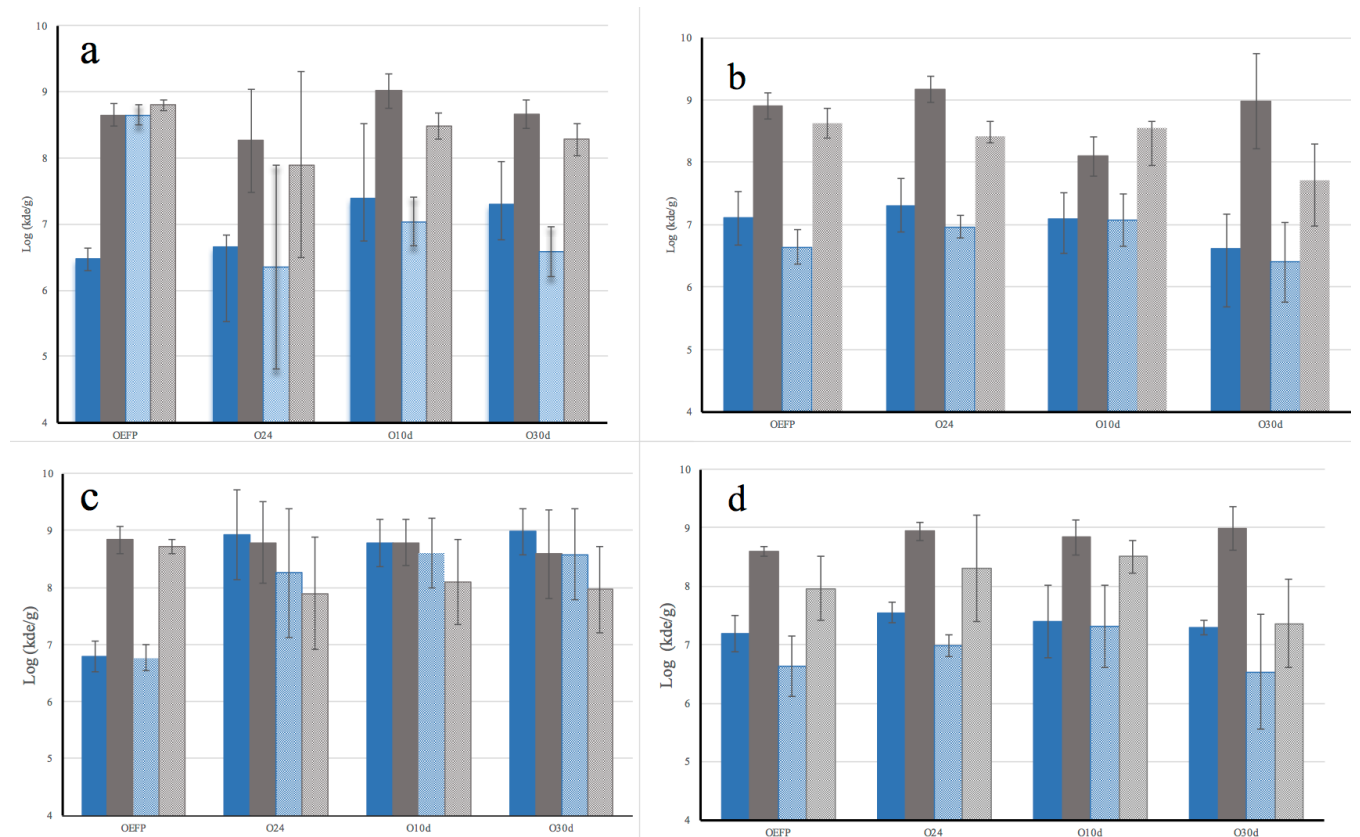


Figur 12. Standardkurve fra qPCR for renkultur av *Lactococcus lactis* (Ar-1) til amplifiseringsplate 1 med primerpar 3F og 2R for amplifisering av *Lactococcus*, *Streptococcus* og *Enterococcus*. Effektiviteten til standardkurven var 1,80.

Figur 12 viser standardkurven for renkulturen *Lactococcus lactis*. Amplifiseringen hadde et avvik for amplifisering av den første prøven med størst konsentrasjon og siste prøven med lavest konsentrasjon. Standardkurven ble derfor beregnet for prøvene med fortynningene 10^3 - 10^6 . Effektiviteten var 1,80 og er derfor ikke optimal.

Resultater for amplifisering av prøver med qPCR

Resultatene for qPCR for faste prøver av C, MF, MF/DF (90) og MF/DF (30) er vist i Figur 13. Verdiene brukt i Figur 13 og til statistikken i Tabell 16 og Tabell 17 er i Vedlegg I. De ulike primerene benyttet til qPCR viser et utvalg av hvilke bakterier som befinner seg i prøven, og resultatene er derfor for en gruppe ulike melkesyrebakterier.



Figur 13. Gjennomsnittlig resultater for kvantitativ PCR (qPCR) med SD for ysting med **a**) ystemelk uten forbehandling (C), **b**) mikrofiltrert ystemelk (MF), **c**) mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodning (MF/DF(90) og **d**) mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 30 min formodning (MF/DF (30). Prøvene benyttet til analysering var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Primere Lac1F og Lac2R ble benyttet til amplifisering av *Lactobacillus*, *Leuconostoc* og *Pediococcus* (■) og til tilsvarende prøve med PMA behandling (▣). Primere Lac3F og Lac2R ble benyttet til amplifisering av *Lactococcus*, *Streptococcus* og *Enterococcus* uten (■) og med PMA-behandling (▣).

Tabell 16. Signifikansnivåer fra variansanalyse (ANOVA) med effekten av blokk, behandling og PMA-behandling for resultatene for qPCR med primere for *Lactobacillus*, *Leuconostoc* og *Pediococcus*. Prøvene som ble analysert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer (O24), ost etter 10 dager (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Resultatene viser også R^2 som viser forklart variasjon/ total variasjon. Verdier som ikke har signifikant effekt ($p > 0,05$) er vist ved n.s.

Prøve	Blokk (p-verdi)	Behandling (p-verdi)	PMA-behandling (p-verdi)	R^2
OEFP	< 0,05	n.s.	n.s.	0,32
O24	n.s.	n.s.	n.s.	0,17
O10d	n.s.	n.s.	n.s.	0,27
O30d	n.s.	n.s.	< 0,05	0,27

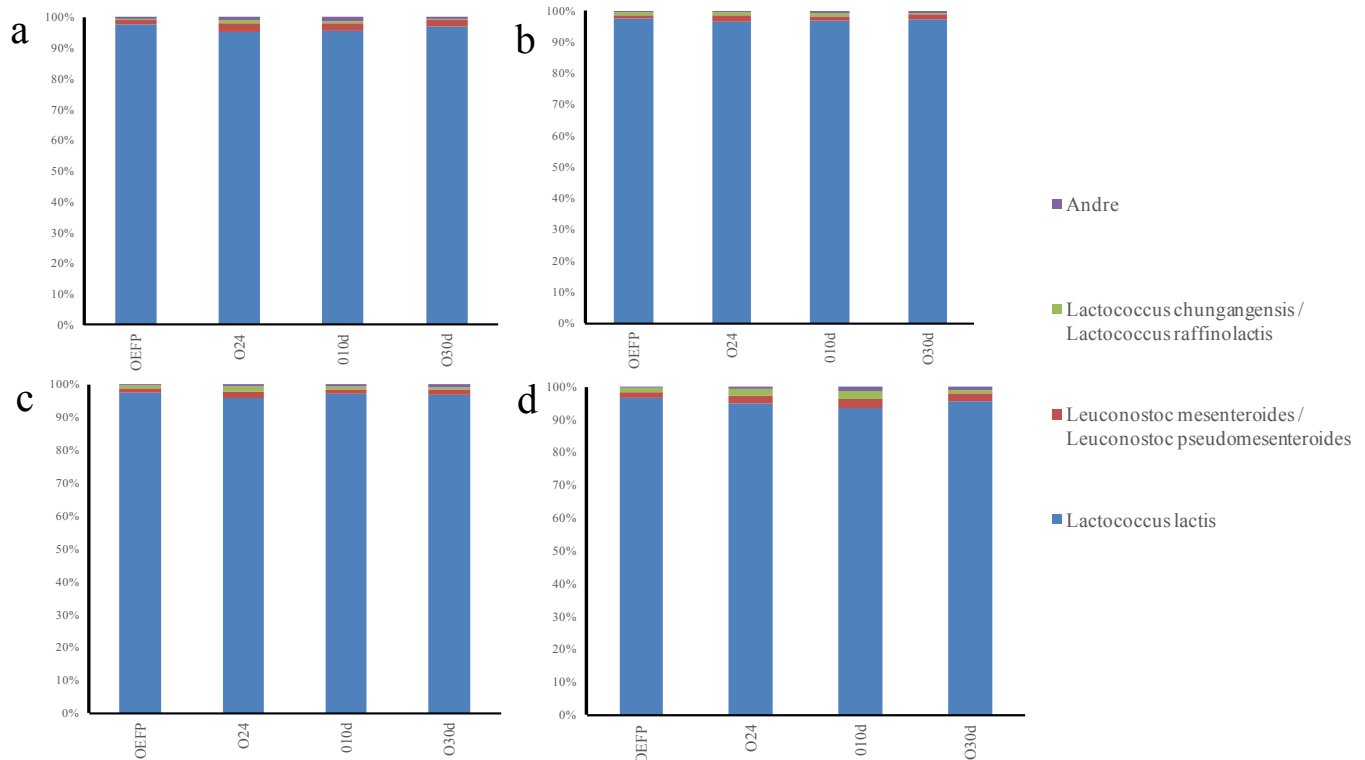
Tabell 17. Signifikansnivåer fra variansanalyse (ANOVA) med effekten av blokk, behandling og PMA-behandling for resultatene for qPCR med primere for *Lactococcus*, *Streptococcus* og *Enterococcus*. Prøvene som ble analysert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer (O24), ost etter 10 dager (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Resultatene viser også R^2 som viser forklart variasjon/total variasjon. Verdier som ikke har signifikant effekt ($p > 0,05$) er vist ved n.s.

Prøve	Blokk (p-verdi)	Behandling (p-verdi)	PMA- behandling (p-verdi)	R^2
OEFP	n.s.	n.s.	n.s.	0,08
O24	n.s.	n.s.	n.s.	0,13
O10d	n.s.	n.s.	< 0,05	0,23
O30d	n.s.	n.s.	< 0,01	0,40

Antall kopier av *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* og *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* med og uten PMA-behandling ble analysert med qPCR. PMA-behandling gjør det mulig å skille mellom levende og døde bakterier. De PMA-behandlede prøvene representerer antall levende bakterier. Prøvene uten PMA-behandling skiller ikke mellom levende og døde bakterier. Resultatene for kontroll (C), MF og MF/DF (30) ostene hadde liten variasjon. For MF/DF (90) ostene var det generelt en høyere konsentrasjon for *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* enn for de andre ostene. Med unntak av prøvene fra MF/DF (90) ost var det få variasjoner mellom de ulike melkebehandlingene før ysting. Konsentrasjonen av *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* var på ca. $\log_{10} 7$ kde/g for de øvrige ostene. For MF/DF (90) ost hadde OEFP en konsentrasjon på ca. $\log_{10} 7$ kde/g, mens de resterende ostene hadde en konsentrasjon på ca. $\log_{10} 8,5$ kde/g. Sett bort fra den PMA-behandlede prøven for kontroll (C) osten har den PMA-ubehandlede prøven av denne osten en liten økning av *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* fra OEFP til O30d. Det var generelt liten forskjell for ostene med og uten PMA-behandling. Det var for kontroll (C) ost en feil for OEFP der prøven med PMA-behandling hadde høyere konsentrasjon enn prøven uten PMA-behandling. Den samme feilen har oppstått for MF ost etter O10d, der prøven med PMA-behandling hadde høyest konsentrasjon. Det var kun signifikant effekt av PMA-behandlingen etter 30 dagers modning (O30d) for *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus*, det vil si at det utfra den statistiske modellen som ble benyttet stort sett ikke var noen effekt av PMA-behandling. Det var signifikant effekt for blokk for OEFP. R^2 var lav for samtlige prøver, det er derfor mulig at modellen ikke dekker all variasjonen. Det var ingen signifikant effekt for blokk eller melkebehandling for *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus*. Det var signifikant effekt for PMA-behandling for O10d og O03d for *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus*. R^2 var lav for *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus*, spesielt for OEFP med 0,08.

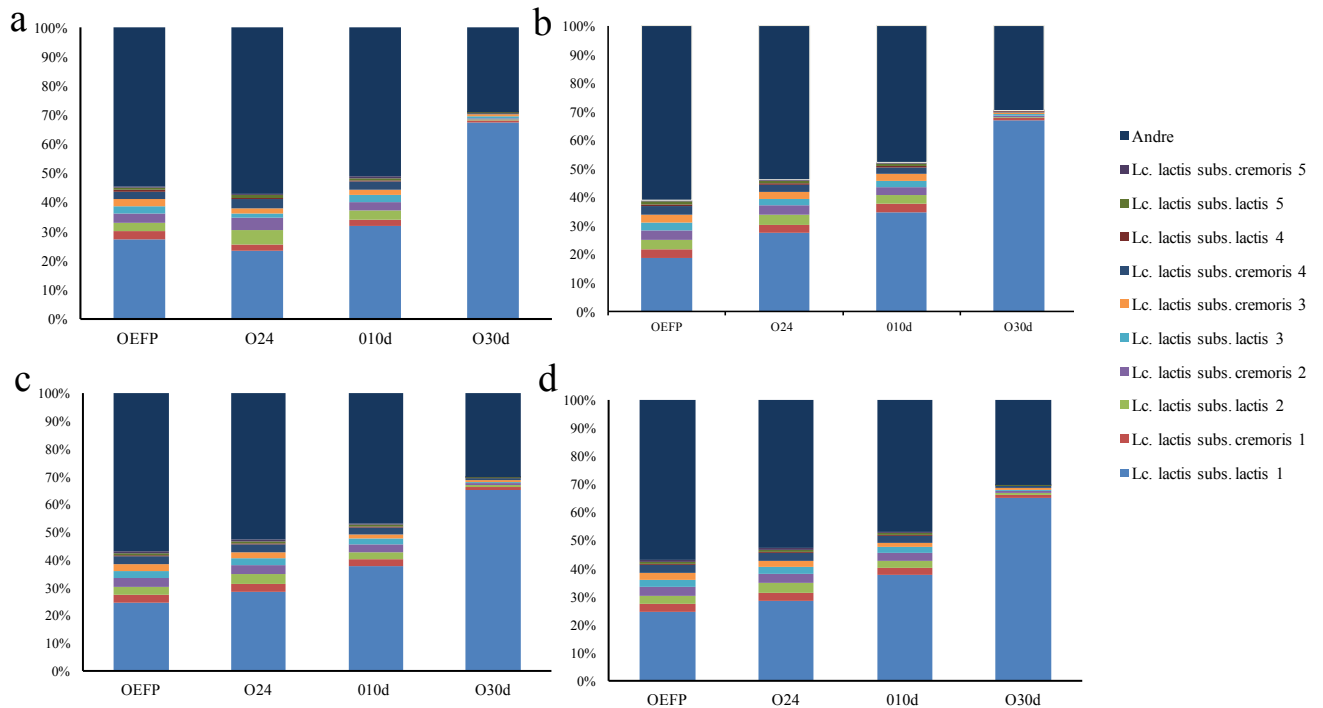
16S rRNA amplifisering og Illumina sekvensering

Nedenfor er resultatene for 16S rRNA amplifisering og Illumina sekvensering. For Figur 14 og 15 ble verdiene fra ystingsblokk 3 med PMA-behandling benyttet, men samme mønster ble funnet i alle blokkene. Rådata brukt i Figur 14, Figur 15 og Figur 16 er vist i Vedlegg K.



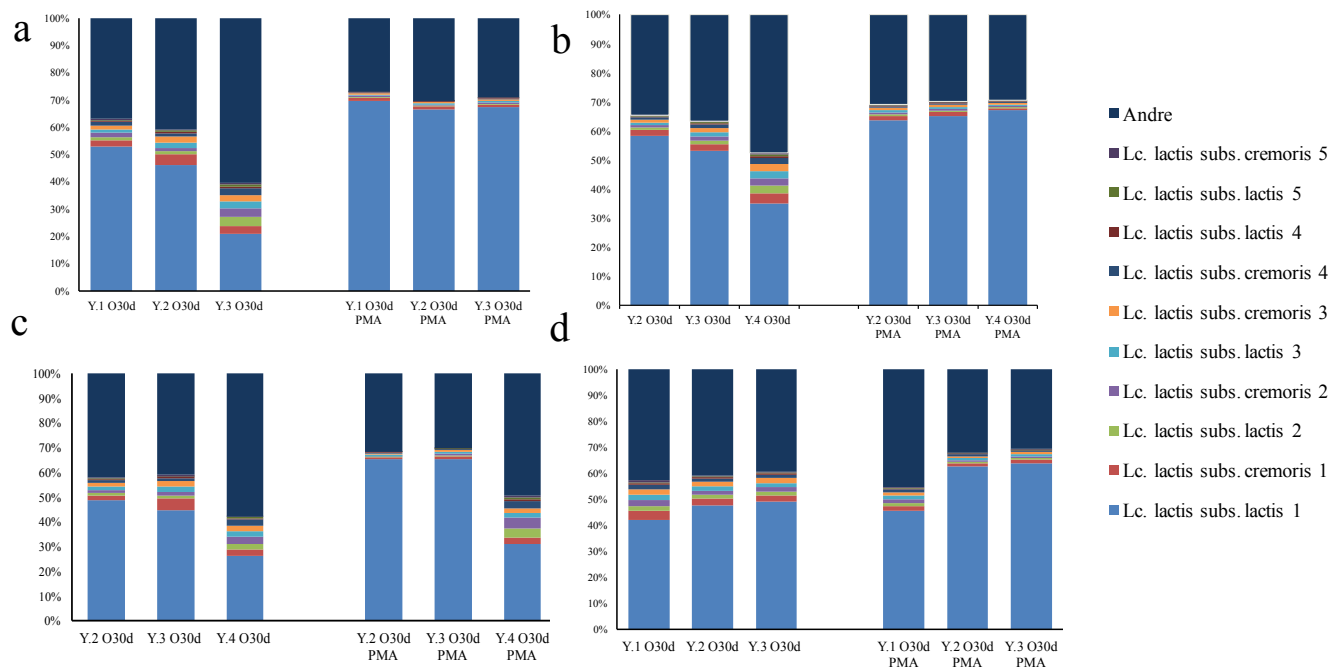
Figur 14. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for **a**) kontroll (C), **b**) mikrofiltrert systemekl (MF), **c**) mikrofiltrert og diafiltrert systemek med 90 min formodning (MF/DF (90)) og **d**) mikrofiltrert og diafiltrert systemek med 30 min formodning (MF/DF(30)). Resultatene fra de ulike blokkene hadde liten variasjon og resultater fra ystingsblokk 3 med PMA-behandling er illustrert i figuren. Prøver fra ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d) ble benyttet. Prøver med >1 % er representert i tabellen, de resterende prøvene er samlet i gruppen andre. *Lactococcus* og *Leuconostoc* er forkortet *Lc.* og *Leu.* i figuren.

Resultatene for OTU i Figur 14 viste at det var høyest konsentrasjon av *Lc. lactis* i alle ostep prøvene. Det var liten variasjon mellom de ulike melkebehandlingene. Kontroll (C) osten skiller seg ut ved at det var større konsentrasjon for *Leu. mesenteroides/Leu. pseudomesenteroides* enn de andre ostene ystet med MF eller MF/DF melk. Det var også noe mer *Lc. chungangensis/Lc. raffinolactis* i MF/DF (30) ost. Det var lite endring i OTU gjennom den initielle modningen (fra OEFP til O30d). Felles for alle ostene var en reduksjon i antall *Lc. chungangensis/Lc. raffinolactis* fra OEFP til O30d.



Figur 15. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for *Lactococcus* (*Lc.*) gjennom den initielle modningen for **a**) kontroll (C), **b**) mikrofiltrert systemelk (MF), **c**) mikrofiltrert og diafiltrert systemelk med 90 min formodning (MF/DF (90)) og **d**) mikrofiltrert og diafiltrert systemelk med 30 min formodning (MF/DF (30)). Figuren viser resultater for ystingsblokk 3 med PMA-behandling for ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). OTU med >1 % er representert i tabellen, de resterende prøvene er samlet i gruppen andre. Det var >500 ulike OTU for *Lactococcus*.

Figur 15 viser resultatene for OTU for *Lactococcus* for ostene ystet av melk med ulik MF behandling. Det var liten variasjon mellom de ulike prøvene for ostene fra ost etter forpress (OEFP) til ost modnet i 10 dager (O10d). Det var en gradvis økning av slekten *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1 gjennom modningsprosessen til ostene. For ost etter forpress (OEFP) var det ca. 25 % *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1 og etter 30 dagers modning (O30d) bestod ca. 70 % av prøven av denne slekten. Det var mer enn 500 ulike OTU for *Lc. lactis*. *Lactococcus* i ostene var ulike slekter av *Lc. lactis* subsp. *lactis* og *Lc. lactis* subsp. *cremoris*.



Figur 16. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for *Lactococcus* (*Lc.*) i ost 30 dager (O30d) etter ysting for ystingsblokk 1-4 (Y.1-Y.4) for **a**) ubehandlet ystemelk (C), **b**) mikrofiltrert ystemelk (MF), **c**) mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodning (MF/DF (90)) og **d**) mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 30 min formodning (MF/DF (30)). Figuren viser resultater uten og med PMA-behandling for ost 30 dager etter ysting (O30d) med og uten PMA-behandling. OTU med > 1 % er representert i tabellen, de resterende prøvene er samlet i gruppen andre. Det var > 500 ulike OTU for *Lactococcus*.

Resultatene i Figur 15 viste at det var en høyere konsentrasjon for *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1 ved O30d enn de andre prøveuttakene. I Figur 16 er alle resultatene for O30d fremstilt. Resultatene viser at det var en forskjell på ost med og uten PMA-behandling. Det var en høyere konsentrasjon av *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1 for de PMA-behandlede osteprøvene. Det var også mindre variasjon av *Lc. lactis* slekter for i osteprøvene som var PMA-behandlet. Det var to prøver som skilte seg ut etter PMA-behandling, i MF/DF (90) osten hadde den PMA-behandlede prøven fra blokk Y.4 en lavere konsentrasjon av *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1 enn tilsvarende osteprøver fra de andre ystingsblokkene. Den PMA-behandlede prøven fra MF/DF (30) fra blokk Y.1 hadde også en lavere konsentrasjon for *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1 enn de andre prøvene.

Diskusjon

Nye metoder for produksjon av ost blir i økende grad benyttet for å undersøke mulige forbedringer for ysteprosessen, bedret sensorisk kvalitet og reduksjon i produksjonskostnader (Heino et al. 2009). Hensikten med denne oppgaven er å se på betydningen av mikrofiltrering og diafiltrering av ystemelk på utvikling av mikrobiota under ysting og initiell modning av osten. Disse ystingsmetodene har blitt undersøkt for potensiell optimalisering av ystingsprosessen og for å forbedre kvaliteten til mysen ved å øke graden av nativ myse. Dette gjøres ved at det for diafiltrert melk skjer en kontrollert reduksjon av laktose som fører til at mysefortynningssteget i ystingsprosessen fjernes. Dette er viktig av flere årsaker. Blant annet reduserer dette ystingstiden ved at det ikke er noe mysefortynningssteg. Mysen tas ut før ystingen for diafiltrert melk som videre øker kvaliteten og verdien på mysen. Kvaliteten på den native mysen forbedres fordi den fjernes fra ystemelken før ysteprosessen har startet. Tradisjonelt vil mysen inneholde bakterier fra syrekulturen, ha en redusert næringsverdi på grunn av temperatur behandling og at den inneholder enzymer fra løype. Dette reduserer kvaliteten til mysen og gir et lavere innhold av nativ myse. Det vil derfor være fordelaktig å fjerne myse før ystingen har startet. Ved å filtrere ystemelken før bruk vil det skje en oppkonsentrering av kasein, som videre fører til et økt utbytte ved ysting. Dette kan potensielt føre til en mer lønnsom produksjon ved at en større mengde ost produseres for hvert ystekar eller ved å benytte et mindre volum ystemelk for ysting.

Det har tidligere blitt gjennomført to masteroppgaver i tilknytning til prosjektet denne oppgaven er en del av. Masteroppgaven til Ediassen (2016) kaseinstandardiserte ystemelken med mikrofiltrering. Sistnevnte oppgave fokuserte på innvirkningen av kalsiuminnholdet og konsistensen på den mikrofiltrerte osten. Resultatene fra denne masteroppgaven viste en signifikant effekt av formodning på pH utviklingen i ystingsprosessen, og i noen tilfeller ga lengre formodning lavere pH. Det ble ikke funnet noe signifikant effekt av formodning på innhold av kalsium og fosfat i ostene. Masteroppgaven til Flaatten (2016) baserte seg på metodene og resultatene fra oppgaven til Ediassen (2016). Det ble i oppgaven til Flaatten (2016) ved mysefortynningssteget tilsatt mer ystevann. Flaatten (2016) undersøkte effekten av diafiltrering og formodningstid av ost produsert med kaseinstandardisert ystemelk. I oppgaven viste resultatene at det var en lavere pH for ost med diafiltrert ystemelk enn for ost med mikrofiltrert ystemelk. De sensoriske analysene viste også en forskjell i konsistens for de ulike behandlingene. Ost produsert med MF var fastere og mer elastisk enn MF/DF ost.

Resultater fra den samme oppgaven viste høyest tørrstoffinnhold i osten med lengst formodningstid. Felles for begge masteroppgavene er at de konkluderte med at det var mulig å yste Gouda-type ost av kaseinstandardisert melk. Denne oppgaven har bygget videre på prinsippene fra de to sistnevnte oppgavene, men har fokusert på den mikrobielle kulturen og modningsforløpet til ost av kaseinstandardisert melk.

Effekten av proteinstandardisering har blitt undersøkt med varierende resultater for osteutbytte. Forsøk har tidligere vist lovende resultater for ost med ultrafiltrert ystemelk, men noe mer varierende resultater for mikrofiltrert ystemelk (Neocleous et al. 2002; Singh & Waungana 2001). Selv om det har vært mye forskning knyttet til bruken av membranfiltrert ystemelk er det lite publisert forskning på ysting av Gouda-type ost med proteinstandardisert melk. Modning av Gouda er knyttet til proteolyse. Det har derfor tidligere vært en bekymring at proteinstandardiseringen av ystemelken kan føre til en saktere proteolyse i osten og dermed en modnet ost med mindre av de typiske Gouda kvalitetene. Tidligere forskning har også vist at proteinstandardisering kan ha en effekt på konsistensen på osten. Dette ble undersøkt av Heino et al. (2009) for Cheddar og av Flaatten (2016) for Gouda. Begge arbeidene viste en sammenheng mellom proteinstandardisering og endret konsistens. Dette kan være et resultat av redusert proteolyse som videre kan gi en fastere ost. Selv om membranfiltrering av ystemelken førte til en økt fasthet i osten var begge ostetyperne fra de ulike forsøkene innenfor godkjent kvalitetsstandard. Typisk var osten med MF/DF behandling av ystemelken i Flaatten (2016) sin oppgave myk og deiget og osten ystet av MF behandlet melk ble beskrevet som elastisk og fast. Normalt deles teksturutvikling inn i to faser. I den første fasen hydrolyserer løypeenzymer ca. 20 % av α_{s1} -kasein til α_{s1} -I kasein. Nedbrytningen av kaseinnettverket er viktig for utviklingen av en mykere og mer homogen struktur. Den andre fasen er en sakte enzymatisk hydrolysering det gjenværende α_{s1} -kaseinet (Lawrence et al. 1987). Mye tyder på at det ved utvikling av en riktig teknologisk metode kan ystes en halv-fast ost av en god kvalitet med kaseinstandardisert melk. Det er fremdeles en del uløste problemstillinger knyttet til modningen og utvikling av konsistens i osten med denne typen standardisert melk. Første del av nedbrytningen av kasein er et resultat av hydrolyse via løypeenzymer som nevnt tidligere. Plasmin har også en viktig rolle og står trolig for nedbrytningen av α_{s2} -kasein og β -kasein under modning. Den endrede teksturen i ost av ultrafiltrert melk kan være et resultat av nedsatt aktivitet for plasmin og løype (Benfeldt 2005). Det er også mulig at de forhøyede verdiene av myseproteiner har hemmet plasmin og løype aktivitet.

Sammensetning av ystemelken

Innholdet av ystemelken ble undersøkt før ysting for å sørge for at det var riktig fett/kasein forhold og for å se på variasjonen mellom komponentene fett, totalt protein, laktose og kasein. Membranfiltreringen ble benyttet for å kaseinstandardiserte ystemelken og diafiltrering ble benyttet til å justere laktoseinnholdet i ystemelken. Det er derfor forventet et høyere innhold av proteiner totalt og kasein i ystemelken med membranfiltrering. Det ble utført FTIR analyser av innholdet av komponenter i melken før tilsetning av fløte for å kartlegge sammensetningen av ystemelken etter behandling. De ulike filtreringsmetodene MF og MF/DF ble benyttet til oppkonsentrering av kasein i ystemelken og oppkonsentrering av kasein og standardisering av laktoseinnholdet for MF/DF. Det var som forventet et økt innhold av proteiner i den kaseinstandardiserte melken. Det gjennomsnittlige proteininnholdet i MF ystemelk var høyest, etterfulgt av MF/DF og kontroll (C) hadde som forventet det laveste proteininnholdet. Den høyeste konsentrasjonen av kasein var i MF og MF/DF. Det var som forventet lavest konsentrasjon i MF/DF ystemelken. Det var en høyere konsentrasjon av fett i MF og MF/DF melken. Dette er trolig et resultat av oppkonsentrering av fett under filtreringsprosessen.

Kaseinstandardisering kan føre til et økt utbytte av ost ved osteproduksjon. Det er ingen faktor som er mer avgjørende for utbytte av ysting enn melkens sammensetning, spesielt innholdet av fett og kasein (Fox, P.F. et al. 2017). Osteutbytte vil derfor kunne optimaliseres ved å kontrollere innholdet av fett og kasein i ystemelken. Dette fører til at mindre volum med melk kan benyttes for å produsere ost. Diafiltrering fører til en videre standardisering av laktose før ysting, og mysefortynningssteget kan derfor fjernes under produksjon. Dette fører til at osteproduksjonen får et økt utbytte ved at det er mindre tap av ostekorn ved mysefortynning og redusert produksjonstid. En annen grunn til at denne ystemetoden med kaseinstandardisering benyttes er for å bedre utnyttelsen av myseproteinene. Dette gjøres ved å redusere behandlingen av myseproteinene og dermed fremme myseproteinenes funksjonelle egenskaper. I dette tilfelle har ystemelken blitt pasteurisert før filtrering, og en liten andel av myseproteinene vil derfor være denaturert. Det vil derfor være en reduksjon i den native myse fraksjonen på grunn av varmebehandlingen. Myseproteinene utgjør hoveddelen av proteininnholdet i permeat fraksjonen. Det vil være en økt konsentrasjon av kasein i retentatet ved mikrofiltrering og ved å diafiltrere ystemelken vil en ytterligere mengde myseprotein tas ut før ysteprosessen. Dette øker kvaliteten på mysen ved at det ikke er løype eller bakterier fra

syrekulturen i mysefraksjonen fordi den tas ut før ysteprosessen. Ved å redusere innholdet av laktose i ystemelken med diafiltrering vil det ved ysting ikke være behov for mysefortynning og mysen tas ut før ysting. Det kan diskuteres om det hadde vært en fordel å mikrofiltrere ystemelken før pasteurisering for å øke kvaliteten på mysen ytterligere og beholde mer av mysen i sin native form. Tidligere har Svaneborg et al. (2014) undersøkt det pasteuriserte permeatet fra skummetmelk mikrofiltrering. Resultatene fra forsøket viste et lavere innhold av native myseproteiner i den pasteuriserte melken sammenlignet med den upasteuriserte melken. Dette var trolig et resultat av denaturering og dannelse av β -LG/ κ -kasein komplekser, myseprotein aggregater eller andre aggregater med kaseiner og myseproteiner. Samtidig kan det være problematisk å mikrofiltrere ystemelken før pasteurisering med tanke på den mikrobiologiske kvaliteten av retentatet. Ved mikrofiltrering blir bakteriene oppkonsentrert i retentatet sammen med myse, og risikoen for uønskede bakterier i fraksjonen med myse vil dermed øke.

pH-utvikling

pH utviklingen under ysting og modning av osten er viktig. Reduksjon av pH har sammenheng med syrekulturen og hvor godt de syreproduserende bakteriene trives. Melkesyrebakteriene fra syrekulturen produserer melkesyre ved å metabolisere laktose. Produksjonen av melkesyre fører til en reduksjon i pH. Det er forventet at syrekulturen skal senke pH i osten til $< 5,3$ i løpet av 24 timer. Dette har skjedd for alle behandlingene med unntak av ost ystet med MF melk som hadde en pH på 5,35 24 timer etter ysting (O24). Resultatene fra pH målingene viser de samme trendene for alle prøvene, men for MF/DF (90) ost var pH til ost etter forpress (OEFP) lavere enn for de andre behandlingene. Dette er trolig et resultat av den lange formodningstiden på 90 min. MF ost har samme formodningstid, men noe høyere pH for de samme målingene. Det kan være et resultat av økt bufferkapasitet for MF ost. Det kan være mer bufferkomponenter i MF enn i MF/DF som kan ha ført til at MF har en økt motstand mot endring i pH (Brandsma & Rizvi 1999). pH-utviklingen under ysting kan knyttes til videre utvikling av ostens kvalitet. Som nevnt tidligere vil økt laktose gi reduksjon i pH, bufferkapasiteten til melken og aktiviteten til syrekulturen er også viktig for utvikling av pH. Når pH senkes fører dette til at kalsiumfosfatet løses opp som resulterer i svakere bindinger og svelling av micellen og en delvis oppløsning av kaseinet. Dette kan resultere i at en ost med lav konsentrasjon av kalsium får en smuldrete konsistens og en ost med mye kalsium får en fast konsistens. Ved pH 6,7 er 68 % av kalsiumet og 47 % av fosfatet kolloidalt (Fox & Mcsweeney 2004). Dette kan derfor føre til at kaseinstandardisert ystemelk

har et høyere innhold av kalsium hvis melken mikrofiltreres ved pH 6,7. Dette skyldes at kalsiumet følger kaseinet (Brandsma & Rizvi 1999; Fox, P.F. et al. 2017). Det var i oppgaven til Flaatten (2016) en forskjell på kalsiuminnhold i MF ost og MF/DF ost. MF ost hadde et høyere innhold av kalsium enn MF/DF ost. Dette kan forklare forskjellen i konsistens, og hvorfor MF osten oppfattes som hardere (Mistry & Moubois 2004). Lavere pH ved myseavtapp kan også føre til økt konsentrasjon av løype i ostemassen som fører til økt enzymaktivitet under modning (Lawrence et al. 1987).

Normalt er pH i Gouda 4,9-5,6 (Van den Berg et al. 2005). pH målingene fra alle behandlingene ligger på mellom 5,3-5,6 for ost modnet i 30 dager (O30d). Dette er innenfor normalt pH område for Gouda, men det var høyest pH for MF ost, etterfulgt av C osten og med lavest pH for de MF/DF behandlede ostene. Alle ostene er derfor innenfor normalen som kan forventes av Gouda etter 30 dager (O30d). Det er ingen resultater for pH for ost lagret mer enn 30 dager, og det er dermed ingen pH resultater for ferdig modnet Gouda. Gouda modnes normalt i > 2 måneder, og det kunne derfor vært interessant å se på pH utviklingen for ost som har modnet lengre enn den ble i denne oppgaven. Men det var ikke mulig innenfor rammen av denne oppgaven. Variansanalysen for pH målingene viste en signifikant effekt av melkebehandlingen på pH etter 24 timer og 30 dager (O24 og O30d). pH ved O24 kan være retningsgivende for videre pH utvikling. Årsaken til at det var høyere pH for MF ost og kontroll (C) ost kan være på grunn av at laktose fjernes i mysefortynningsstegen. Dette kan ha ført til at pH i MF ost var høyere enn for de andre behandlingene. Det er noe variasjon mellom de ulike behandlingene, men de er alle innenfor forventede verdier for Gouda.

Det var som nevnt signifikant effekt av behandling på ystemelken for pH for ferskost (O24) og ost 30 dager etter modning (O30d). Tukey's HSD test viste at det var signifikant forskjell på pH for MF og MF/DF (30) for ferskost (O24). Det var også signifikant forskjell på pH for MF osten og de MF/DF behandlede ostene for ost modnet i 30 dager (O30d). De ulike behandlingene ser derfor ut til å ha hatt en effekt på pH for MF og MF/DF ost. pH for MF ost fra fersk ost frem til 30 dager modnet ost var høyere enn for MF/DF.

Proteinstandardisering med mikrofiltrering og ultrafiltrering for produksjon av Edamer har blitt undersøkt av Heino et al. (2009). Ystemelken ble mikrofiltrert og ultrafiltrert og justert til et proteininnhold på 4,2 %. Det ble i denne artikkelen ikke funnet noen sammenheng mellom standardisering av proteininnholdet og avvik i pH. Resultatene viste at standardiseringen ikke

påvirket syrekulturen, og det var derfor et normalt syrningsforløp under ysting og i osten. Resultatene for pH i undertegnedes oppgave er tilsvarende resultatene for Flaatten (2016). Det var lavest pH for MF/DF ostene både i undertegnedes og sistnevnte oppgave. Ved å justere laktoseinnholdet i systemelken ytterligere ved diafiltrering vil det kunne føre til en høyere pH i osten. pH utviklingen har derfor ikke variert mellom de ulike oppgavene innad i prosjektet.

Tørrstoff

Regulering av tørrstoffinnhold og pH er viktige parametere for ysting. Tørrstoff innhold kan reguleres ved å kontrollere skjæringen av koagelet. Ved å skjære koagelet i mindre biter øker tørrstoffinnholdet. Økt grad av røring og ettervarmings temperatur kan også øke tørrstoffinnholdet (Van den Berg et al. 2005). Tørrstoffet i osten ble målt for de ulike behandlingene fra ferskost (O24) til osten hadde modnet i 30 dager (O30d). Tidligere forsøk med kaseinstandardisert ystemelk for pizzaost av Govindasamy-Lucey et al. (2007) samt resultatene for tørrstoff av Flaatten (2016) og Ediassen (2016) har vist at proteinstandardisering kan ha en effekt på ostens tørrstoff. Ved å bruke kaseinstandardisert ystemelk kan innholdet av tørrstoff i osten øke. For denne oppgaven i dette studiet varierte tørrstoffet mellom de ulike ostene. Det var signifikant variasjon mellom tørrstoffinnholdet for de ulike behandlingene for ost etter 24 timer og 30 dager (O24 og O30d). Det var signifikant effekt av behandling for tørrstoff for ferskost (O24) og ost modnet i 30 dager (O30d). Resultatene fra Tukey testen viste signifikant forskjell for ferskost (O24) for MF ost og kontroll (C) ost. Det er også signifikant forskjell på kontroll (C) og de kaseinstandardiserte ostene.

Osten ystet med vanlig ystemelk hadde et lavere tørrstoffinnhold enn osten ystet med kaseinstandardisert ystemelk. Kontroll (C) osten hadde et tørrstoffinnhold på ca. 52,5 % og MF osten hadde det høyeste tørrstoffinnholdet på 56,5 % etter 24 timer (O24). Tørrstoffinnholdet uavhengig av behandlingen økte over tid. Ved 30 dagers uttaket var det høyest tørrstoffinnhold i MF ost med 59,5 % etterfulgt av MF/DF med ca. 58 % for (90 min formodning) og ca. 58,8 % (30 min formodning). Kontroll (C) osten hadde et tørrstoff på 55,8 % etter 30 dager (O30d). Det var derfor forskjell på tørrstoffinnholdet for ostene med og uten kaseinstandardisert melk. Forventet tørrstoff for en Gouda-type ost er ca. 57 % (Van den Berg et al. 2005). For å øke vanninnholdet i osten med MF og MF/DF kunne koagelet blitt kuttet i større biter under skjæring. Dette kunne ført til mindre variasjon innen tørrstoffinnhold (Govindasamy-Lucey et al. 2007).

Mikrobiota under ysting og i osten

For å få et bilde av den mikrobielle variasjonen under ysting og initiell modning av Gouda har kulturavhengige og kulturuavhengige metoder blitt benyttet. Disse metodene har gjort det mulig å få resultater basert på vekst i agar og ved hjelp av molekylære metoder. Metodene ga oversiktlige resultater for den mikrobielle sammensetningen i osten. Prøvene benyttet til molekylære metoder har blitt behandlet med PMA. Dette gjør at døde og levende bakterier kan differensieres. Denne behandlingen er derfor svært viktig for å se på hvilke bakterier som bidrar aktivt til modningen i osten. I denne oppgaven har den initielle mikrobiota frem til 30 dager gammel ost blitt undersøkt. Det er derfor forventet små endringer i den mikrobielle sammensetningen mellom de ulike melkebehandlingene.

Den proteolytiske nedbrytingen av kasein under modningen av ost er et resultat av flere steg som starter med splitting av kasein (Parente & Cogan 2004). Dette fører til dannelsen av større peptider og dannelsen av frie aminosyrer og smakskomponenter. Den første nedbrytningen skjer som et resultat av aktivitet fra gjenværende løype nedbrytning og plasminer. Dannelsen av frie aminosyrer og mindre peptider er et resultat av mikrobielle enzymer fra syrekulturen, sekundærkulturen og NSLAB (Benfeldt 2005). Syrekulturen og ostens mikrobiota er derfor viktig for modning og utvikling av osten. Denne prosessen er spesielt viktig for Gouda-type ost.

Det er lite informasjon og forskning gjort på mikrobiota i ost ved ysting og modning for proteinstandardisert Gouda. Det er derfor i denne oppgaven forsøkt å undersøke mikrobiota til Gouda ved kultuavhengige og kulturuavhengige metoder. Det er flere faktorer som kontrollerer store deler av modningen i osten med tanke på mikrobiell aktivitet. Disse er vanninnhold, pH, organiske syrer, nitrat, redokspotensiale og temperatur. Bakteriene fra syrekulturen fører til reduksjon i pH under produksjon ved å metabolisere laktose til melkesyre og bidrar til modning av osten. Ved modning autolyserer bakteriene fra syrekulturen og frigjør enzymer som bidrar til modning. Ulike slekter av samme melkesyrebakterie kan skille ut ulike enzymer, og det er derfor viktig å kunne differensiere mellom ulike arter og slekter i ostens mikrobiota. NSLAB er også viktige for modningen av osten, de reduserer ikke pH i osten, men bidrar med utvikling av aroma og smak. De vanligste NSLAB er *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* og *Enterococcus* (Beresford & Williams 2004).

Resultatene for vekst på agar viser et likende vekstmønster for alle behandlingene, og det er ingen signifikant effekt av ystingsmetodene på vekst på LBS eller M17. Det er også liten variasjon for vekst på LBS og M1720°C for syrekulturen som ble benyttet. Syrekulturen som ble tilsatt var dermed lik for alle de ulike ystingsblokkene og metodene. Instøpningsmedier gir ikke et svar på hvilke bakterier det er i prøvene. De er selektive og noen bakterier vil derfor hemmes av agaren og noen vil ha gode vekstvilkår. Veksten på disse mediene kan derfor gi noen indisier på hvilke bakterier som vokser i agaren, men er ingen fasit (Tortora et al. 2010).

Konsentrasjonen av bakterier på agar var jevnt over størst for MF/DF (90), men det var små forskjeller mellom de ulike behandlingene. Den største variasjonen var mellom prøvene etter 10 dagers modning (O10d) for M1740°C mellom de kaseinstandardiserte prøvene og kontroll (C) osten. For C var det ingen vekst for M1740°C etter 10 dager (O10d), men det var vekst på prøvene med kaseinstandardisert behandling. Vekst på M1740°C kan indikere tilstedeværelse av termofile *Streptococcus* eller *Enterococcus*, men det er vanskelig å bestemme uten videre undersøkelser. Resultatene fra vekst på M1720°C og LBS agar viser at det trolig er henholdsvis mesofile *Lactococcus* og *Leuconostoc* i ostens mikrobiota. Det var store variasjoner for de ulike prøvene som hadde vokst på M1740°C. Dette tyder på at innholdet av M1740°C varierer for de ulike ystingsblokkene. Det var i utgangspunktet ikke forventet vekst for M1740°C fordi hverken *Streptococcus* eller *Enterococcus* er i stor grad knyttet til den mikrobielle flora i den intielle modningen av Gouda. Veksten på M1740°C var spesielt høy for MF etter 10 dagers modning (O10d) sammenlignet med de andre melkebehandlingene. Dette kan være et resultat av bedre vekstvilkår for bakteriene i osten ved at det fra ferskost (O24) er en høyere pH for MF ost enn de resterende ostene. Det var også en kraftigere reduksjon av LBS etter ost modnet i 30 dager (O30d) enn for de resterende ostene. Dette kan tyde på at *Leuconostoc* i MF osten har vært stresset.

Det var mer vekst på VRBA for osten og melken med kaseinstandardisert ystemelk med lang formodningstid. Det kan være et resultat dårlig hygiene ved ysting eller for lav tilsetning av natriumnitrat under ysting. Det er vanskelig å si om veksten for koliforme på VRBA har en effekt på osten.

Resultatene for qPCR viser at det var *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* og *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* i alle prøvene tatt fra alle melkebehandlingene. Metoden som har blitt benyttet for analyse med qPCR skiller ikke mellom de ulike artene og de blir derfor presentert som tre mulige arter i resultatene. De ulike behandlingene hadde variasjon for resultater fra qPCR, men ingen av dem var signifikante. Resultatene for kontroll (C) viser at det er en høyere konsentrasjon av *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* for alle prøvene. Det var en økning på ca. $\log_{10} 0,5$ av *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* fra første prøve av osten etter forpress (OEF) til ost etter 30 dager (O30d). For nesten alle uttakene med unntak av MF/DF (90) var det en høyere konsentrasjon for *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* enn for *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus*. Prøvene fra MF/DF (90) ostene har en høyere konsentrasjon av *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* enn de andre ostene for alle undersøkte tidspunkt (O24, O10d og O30d). Ved å sammenligne disse resultatene med de operasjonelle taksonomiske enhetene (OTU) er det lite trolig at *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* har en større konsentrasjon enn *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus*. Det var derfor trolig en feil ved qPCR ved amplifisering, det kan for eksempel ha vært en feil med standardkurven eller ved DNA-ekstraksjon. Det er ca. $\log_{10} 2$ høyere konsentrasjon av *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* for disse uttakene for MF/DF (90) sammenlignet med de andre melkebehandlingsmetodene.

Det ble også gjennomført 16S rRNA amplifisering og Illumina sekvensering for de samme prøvene som ble kjørt på qPCR. Dette ble gjort for å få konkret informasjon om hvilke bakterier det er i de ulike prøvene fra de forskjellige behandlingene. Resultatene viser OTU for den generelle mikrobiota og for innholdet av *Lactococcus* og delt inn i ulike grupper. Det var liten variasjon mellom de ulike melkebehandlingene og resultatene med < 1 % ble ikke benyttet. Det var for den generelle mikrobiota høyest konsentrasjon av *Lc. lactis* for alle behandlingene med > 95 % konsentrasjon av denne bakterien. Det er også registrert OTU for *Leu. mesenteroides/Leu. Pseudomesenteroides* og *Lc. chungangensis/Lc. Raffinolactis*. Resterende resultater ble plassert i gruppen andre arter. Det har også blitt utført en sekvensering av de samme prøvene for innhold av *Lactococcus*. Disse resultatene viste at det var størst andel av en slekt av *Lc. lactis* subsp. *lactis*, konsentrasjonen av denne slekten har økt i takt med modningsprosessen. Det er ved modningen for alle ostene, uavhengig av melkebehandling en reduksjon i mangfold av slekter med *Lc. lactis*, med en gradvis økning av *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1. Dette kan tyde på at det er denne slekten som bidrar mest med

modning av osten for de ulike behandlingene. Resultatene for PMA-behandlede og ikke PMA-behandlede prøver viser at det var en høyere konsentrasjon av *Lc. lactis* subsp. *lactis* 1 for prøver med PMA-behandling. Det var derfor mindre variasjon ved ost etter 30 dager modning (O30d) med PMA-behandling enn uten.

Det var liten forskjell på prøver uten og med PMA-behandling for sekvenseringen av alle ostene etter forpress (OEFP) til etter ostene hadde modnet i 10 dager (O10d). Det var ingen effekt av PMA-behandling for de Illumina sekvenserte prøvene før etter O30d. Det var også liten effekt av PMA-behandling for qPCR. Det var kun signifikant effekt for PMA-behandlede prøver av ostene etter O30d ved qPCR av *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus*. For *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* var det signifikant effekt av PMA-behandling for O10d og O30d. Resultatene fra qPCR og sekvenseringen viser at PMA-behandling har signifikant effekt etter O10d for qPCR av *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* og etter O30d for de andre analyse resultatene. Dette kan tyde på at det ikke er stor forskjell på levende og døde bakterier frem til O10d, men at det etter dette tidspunktet skjer en endring som fører til endringer i ostens mikrobiota. De PMA-behandlede prøvene for O30d som ble sekvensert med Illumina hadde høyere OTU for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 enn prøvene uten PMA-behandling. Dette viser at det var en reduksjon i mangfold og en fremvekst av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 for ostene etter 30 dager med modning (O30d). Over tid har det trolig skjedd en reduksjon i mikrobiota og mangfoldet av ulike bakterier blir redusert når næringskilden reduseres. Dette fører til at de bakteriene som har hatt god vekst og som er tilpasset vilkårene under modningen trives og andelen av disse bakteriene øker i forhold til de resterende bakteriene (Van Hoorde et al. 2009). Resultatene viser dette ved at de PMA-behandlede prøvene har et høyere innhold av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 enn prøvene uten PMA-behandling.

Basert på resultatene for sekvensering kan det antas at vekst på de ulike selektive mediene er *Leuconostoc* for LBS, *Lactococcus* for M1720°C og *Streptococcus/Enterococcus* for M1740°C. Resultatene fra qPCR viste at det var størst antall *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus*, og det kan basert fra resultatene fra sekvenseringen antas at innholdet var primært *Lactococcus*. Det var også funnet OTU > 1% for *Lc. chunganensis/raffinolactis* og *Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides*. Videre sekvensering av *Lactococcus* i ostene viste at det var hovedsakelig en gruppe av *Lc. lactis* subsp. *lactis* som var dominerende. Det var mer enn 500 ulike OTU for *Lactococcus*, og det

er derfor tydelig at denne bakterien var viktig for den initielle modningen av Gouda-type ost. Hovedegenskapen til *Lactococcus* er omdanning av laktose til melkesyre (Parente & Cogan 2004). Dette fører til en reduksjon i pH. Det er fra myse fra forpress (MFP) en kraftig reduksjon i pH. Resultatene for vekst på selektive medier viser en økning i vekst av bakterier fra MFP. Det er derfor en synlig sammenheng mellom økt konsentrasjon av bakterier i prøvene med reduksjon i pH. Noen slekter av *Lc. lactis* subsp. *lactis* og *Leu. mesenteroides* kan metabolisere citrat (Cit⁺). Dette er spesielt viktig for hulldannelse i Gouda-type ost. Cit⁺ kan omdannes til acetat, diacetyl, acetoin og 2,3-butandiol. Citrat er i motsetning til laktose ikke en energikilde, men metaboliseres sammen med laktose eller andre sukkerarter (Fox, P.F. et al. 2017). Det var OTU for *Lc. chunganesis/raffinolactis* for alle behandlingene, men det var noe høyere konsentrasjon i MF/DF (30). *Lc. chunganesis* er ikke typisk i meieriprodukter og har tidligere blitt isolert fra slamvann fra et renseanlegg (Cho et al. 2008). Det er derfor trolig *Lc. raffinolactis* som er i ostene da den i større grad er forbundet med meieriprodukter. Denne bakterien var ikke en del av syrekulturen, og har trolig blitt introdusert under ystingsprosessen. *Lc. raffinolactis* kan fermentere α -galaktosider som *Lc. lactis* ikke kan fermentere (Kimoto-Nira et al. 2011). Denne bakterien benyttes ikke i syrekulturer, men kan være interessant med tanke på utvikling av nye syrekulturer.

Syrekulturen benyttet til ystingen i denne oppgaven bestod av melkesyrebakteriene *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (*Danisco*). Etter analysene fra de kulturuavhengige og kulturavhengige analysemetodene viser resultatene at hoveddelen av mikroiota i løpet av den første måneden er *Lc. lactis*. Fra sekvenserings analysene for *Lactococcus* viser resultatene at det er mest OTU for ulike slekter av *Lc. lactis* subsp. *lactis* og *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Det kan derfor utfra disse resultatene se ut til at det er bakteriene fra syrekulturen som er hovedbestanddelen av den initielle mikrobiota og at det ikke har vært noen stor utvikling av NSLAB.

Konklusjon og veien videre

I denne masteroppgaven har effekten av kaseinstandardisering av ystemelk med tilhørende ystetekniske endringer sin påvirkning på mikrobiota, tørrstoff og pH for osten blitt undersøkt. Resultatene fra den første måneden av modning har vist at det er få endringer i mikrobiota mellom de ulike behandlingene av ystemelken. Det er ingen signifikans for behandling av ystemelken for noen av analysemetodene. Hypotesen om at ulik behandling kan føre til endring i ostens mikrobiota må derfor forkastes for denne oppgaven med de analysemetodene som er benyttet. Dette kan være et resultat av at det ikke er noen effekt av behandling på modning. Et viktig aspekt ved denne oppgaven er at det kun er tatt prøver frem til 1. måned. Det er derfor ikke tatt prøver av osten når den er ferdig modnet ved 3 måneder. Det hadde vært interessant og informativt å få resultater frem til osten var ferdig modnet og videre gjennom modningsprosessen etter minimum modningstiden på 2 måneder. Det var ikke mulighet til å følge osten lengre enn det er gjort i denne oppgaven på grunn av tiden avsatt til en 30 stp masteroppgave og det er derfor ikke gjennomført noen sensorisk analyse av osten fordi osten ikke har modnet tilstrekkelig. En sensorisk analyse hadde vært en god måte å se på effekten av behandling på modningen til osten. I oppgaven til Flaatten (2016) og Ediassen (2016) hadde de problemer med bitter smak i osten de produserte i sine masteroppgaver. Det hadde vært interessant å undersøke osten i undertegnede oppgave sensorisk for å se om problemet med bitter smak fra de tidligere oppgavene knyttet til prosjektet vedvarer.

For analysene med kulturavhengige og kulturavhengige metoder er det ikke funnet noen stor variasjon eller signifikant effekt av behandling på mikrobiota i de ulike ostene. Det kan derfor antas at det ikke var noen effekt av behandlingen på den initielle mikrobiota i ostene. Det på tross av signifikant effekt på tørrstoff og pH for noen av behandlingene. Dette er svært interessant da det kan tyde på at standardisering av proteiner kan benyttes til ysting uten noen stor effekt på kvaliteten eller mikrobiota. Dette kan bidra til å redusere sesongvariasjonen og redusere ystingstiden og volumet i ystingskarene ved å benytte MF og DF for ystemelken. Ved å benytte DF vil også mysefortynningssteget kunne fjernes og kvaliteten til mysen vil kunne forbedres ved at mysen tas ut før tilsetning av løype og syrekultur. Basert på resultatene i denne oppgaven var det ingen effekt av proteinstandardisering av ystemelken på ostens mikrobiota. Dette er positivt med tanke på videre utvikling av ysting med kaseinstandardisert melk.

Referanser

- Anema, S. (2014). The Whey Proteins in Milk: Thermal, Denaturation, Physical Interactions, and Effects of the Functional Properties of Milk. I: Singh, H., Boland, M. & Thompson, A. (red.) *Milk proteins: From Expression to Food*: Elsevier.
- Benfeldt, C. (2005). Ultrafiltration of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 16: 600-608.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11 (4-7): 259-274.
- Beresford, T. P. & Williams, A. (2004). The Microbiology of Cheese Ripening. I: Fox, P. F., Mcsweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, s. 287-304: Elsevier Academic Press.
- Biosistemika. (2016). *Real-Time PCR Techology Basics*. I: Biosistemika (red.).
<http://biosistemika.com/workshops/qpcr-basics/>
(lest 25. August 2016).
- Brandsma, R. L. & Rizvi, S. S. H. (1999). Depletion of whey protein and calcium by microfiltration of acidified skim milk prior to cheese making. *Journal of Dairy Science*, 82 (10): 2063-2069.
- Bustin, A., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Hugget, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffi, W., Shipley, G., et al. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55.
- Bylund, G. (1995). *Dairy Processing Handbook*. Sweeden: Tetra Pak processing systems AB.
- Cho, S., Nam, S., Yoon, J., Lee, J., Sukhoom, A. & Kim, W. (2008). *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1844-1849.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 17 (4): 840-862 (lest 5. september 2016).
- Dalgleish, D. G. & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3.: 449-467.

Danisco. Bulk set HM 505 LYO 500. Tilgjengelig fra:

<http://www.casei.ch/index.php/de/docman/fiches-techniques-1/cultures-kulturen-1/lyo-1/218-probat-505-d-1/file> (lest 15. November).

Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving forwards in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 3148-3155.

Fenema, O. R. (2008). *Food Chemistry*. 4. utg. New York, USA: CRC Press.

Flaatten, G. K. (2016). *Produksjon av Norvegia type ost fra kaseinstandardisert ystemelk-Effekt av diafiltrering og formodningstid*. Masteroppgave. Ås, Norge: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap. 82 s.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & Mcsweeney, P. L. H. (2002). *Fundamentals of Cheese Science*: Aspen Publishers Inc. 559 s.

Fox, P. F. & Mcsweeney, P. L. H. (2004). Cheese: An Overview. I: Fox, P. F., Mcsweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*: Elsevier.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & Mcsweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*, b. 2.: Aspen Publishers Inc.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (2017). Overview of Cheese Manufacture. I: *Fundamentals of Cheese Science*, s. 11-25. New York: Springer.

Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., Wang, T. & Lucey, J. A. (2007). Use of Cold Microfiltration Retentates Produced with Polymeric Membranes for Standardization of Milks for Manufacture of Pizza Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90 (10): 4552-4568.

Heino, A., Uusi-Rauva, J. & Outinen, M. (2009). Pre-treatment methods of Edam cheese milk. Effect on cheese yield and quality. *Food Science and Technology*, 43 (4): 640-646.

Ibarz, A. & Barnosa-Cánovas, G. V. (2003). *Unit Operations in Food Engineering*. Food Preservation Technology CRC Press LLC.

Illumina, I. (2014). *Intro to Sequencing by synthesis: Industry-leading data quality*. Youtube. Tilgjengelig fra: <https://youtu.be/HMyCqWhwB8E> (lest 7. september 2016).

Kimoto-Nira, H., Aoki, R., Sasaki, K., Naito, H., Sawada, T. & Suzuki, C. (2011). Interactions between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk: Development of a new starterculture. *Journal of Dairy Science*, 95 (4): 2176-2185.

- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. & Schloss, P. D. (2013). Development of Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (17): 5112-5120.
- Law, B. A. & Tamime, A. Y. (2010). *Technology of Cheesemaking*. 2. utg. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K. & Gillies, J. (1987). Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 70: 1748-1760.
- Linberg, A. M., Christiansson, A., Rukke, E. O., Eklund, T. & Molin, G. (1996). Bacterial flora of Norwegian and Swedish semi-hard cheese after ripening, with special reference to *Lactobacillus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50: 563-572.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies-the next generation. *Application of Next-Generation Sequencing*, 11: 31-46. Tilgjengelig fra: <http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n1/pdf/nrg2626.pdf> (lest 09.11.16).
- Mistry, V. V. & Moubois, J. (2004). Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*: Elsevier.
- Nelson, B. K. & Barnano, D. M. (2005). A Microfiltration process to Maximize Removal of Serum Proteins from Skim Milk Before Cheese Making. *Journal of Dairy Science* 88 (5): 1891-1900.
- Neocleous, M., Barnano, D. M. & Rudan, M. A. (2002). Impact of Low Concentration Factor Microfiltration on the Composition and Aging of Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 85 (10): 2425-2437.
- Parente, E. & Cogan, T. M. (2004). Starter Cultures: General Aspects. I: Fox, P. F., Mcsweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 1 *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, s. 123-142: Elsevier Ltd.
- Porcellato, D. (2013). *Molecular methods to investigate the cheese microbiota: application of novel approaches*. Norway: Norwegian University of Life Sciences, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science. 37 s.
- Quigley, I., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Fitzgerald, G., Ross, P., Stanton, C. & Cotter, P. (2013). The microbial content of raw pasteurized cow milk as determined by molecular approach. *Journal of Dairy Science*, 96 (8): 4928-4937.
- Ruska, D. & Jonkus, D. (2014). *Crude Protein and Non-protein Nitrogen Content in Dairy Cow Milk*. Latvia University: Latvia University, Institute of Agrobiology.

- Shao, J. & Zydney, A. L. (2004). Optimization of Ultrafiltration/Diafiltration Process for Partially Bound Impurities. *InterScience*.
- Singh, H. & Waungana, A. (2001). Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal*, 11 (4-7): 543-551.
- Svanborg, S., Johansen, A., Abrahamsen, R. K. & Skeie, S. (2014). Initial pasteurisation effects on the protein fractionation of skimmed milk by microfiltration. *International Dairy Journal*, 37 (1): 26-30.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2010). *Microbiology An Introduction*. 10. utg.: Pearson.
- Van den Berg, G., Meijer, W. C., Düsterhöft, E. M. & Smith, G. (2005). Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. I: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (red.) b. 2 *Major Cheese groups*, s. 103-135: Elsevier Academic Press.
- Van Hoorde, K., Heyndrickx, M., Vandamme, P. & Huys, G. (2009). Influence of pasteurization, brining condition and production environment on the microbiota of artisan Gauda-type cheeses. *Food Microbiology*, 27 (3): 425-433.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2. utg.: CRC Press.
- Østlie, H. M., Eliassen, L., Florvaag, A. & Skeie, S. (2004). Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3): 287-299.

Vedlegg

Mengde fløte og melk benyttet i de ulike ystingsblokkene

Vedlegg A. 1. Mengde (L) tilsatt fløte i normal ystemelk (C) for alle ystingsblokkene.

Ystingsblokk	Fløte (L)	Ystemelk (L)
Y.1	20	330
Y.2	24,4	325,6
Y.3	20,5	329,5

Vedlegg A. 2. Mengde (L) tilsatt fløte i mikrofiltrert ystemelk (MF).

Ystingsblokk	Fløte (L)	Ystemelk (L)
Y.1	18.4	231,6
Y.2	23.8	226,2
Y.3	20.2	229,8
Y.4	16.3	233,7

Vedlegg A. 3. Mengde (L) tilsatt fløte i mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodningstid (MF/DF (90)).

Ystingsblokk	Fløte (L)	Ystemelk (L)
Y.1	20	230
Y.2	21	229
Y.3	19,3	230,7
Y.4	15,7	234,3

Vedlegg A. 4. Mengde (L) tilsatt fløte i mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 30 min formodningstid (MF/DF (30)).

Ystingsblokk	Fløte (L)	Ystemelk (L)
Y.1	20	230
Y.2	22,1	227,9
Y.3	19,2	230,8

Komponenter i ystemelken

Vedlegg B. 1. Innhold av fett, totalt protein, laktose og kasein i ystemelken brukt til ystingsblokk 1 målt med FTIR med normal behandling av ystemelk (C), mikrofiltrering (MF) og mikrofiltrering og diafiltrering (MF/DF).

Behandling	Fett (%)	Totalt protein (%)	Laktose (%)	Kasein (%)
C	0,08	3,74	4,68	2,76
MF	0,09	4,48	4,54	3,29
MF/DF	0,12	4,21	3,62	3,10

Vedlegg B. 2. Innhold av fett, totalt protein, laktose og kasein i ystemelken brukt til ystingsblokk 2 målt med FTIR med normal behandling av ystemelk (C), mikrofiltrering (MF) og mikrofiltrering og diafiltrering (MF/DF).

Behandling	Fett (%)	Totalt protein (%)	Laktose (%)	Kasein (%)
C	0,08	3,80	4,58	2,77
MF	0,10	4,58	4,57	3,34
MF/DF	0,13	4,34	3,62	3,18

Vedlegg B. 3. Innhold av fett, totalt protein, laktose og kasein i ystemelken brukt til ystingsblokk 3 målt med FTIR med normal behandling av ystemelk (C), mikrofiltrering (MF) og mikrofiltrering og diafiltrering (MF/DF).

Behandling	Fett (%)	Totalt protein (%)	Laktose (%)	Kasein (%)
C	0,08	3,64	4,66	2,66
MF	0,90	4,58	4,61	3,33
MF/DF	0,12	4,35	3,62	3,18

Vedlegg B. 4. . Innhold av fett, totalt protein, laktose og kasein i ystemelken brukt til ystingsblokk 3 målt med FTIR med normal behandling av ystemelk (C), mikrofiltrering (MF) og mikrofiltrering og diafiltrering (MF/DF).

Behandling	Fett (%)	Totalt protein (%)	Laktose (%)	Kasein (%)
MF	0,10	4,38	4,44	3,20
MF/DF	0,13	4,27	3,70	3,13

Kjøreplan for ystingsmetodene

Vedlegg C. 1. Kjøreplan for ysting med kontroll (C). Tabellen viser tidsskjema, forventet tid, steg, temperatur og anmerkninger til ystingsprosessen.

Tid	Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
09.25	Tilsett starterkultur (FM)	32 °C	30 min	1,5%
09.55	Løypetilsetting Koagulering	32 °C	45 min	9,38 mL løpe pr. Kg kasein
10.45	Skjæring og røring	30 °C	30 min	
11.15	1.myseavtapp		5 min	40 %
11.20	Vanntilsetting		5 min	40 %
11.20	Tilsett nitrat		0 sek	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L systemelk
11.25	Skjæring 2		3.5 min	
11.29	Ettervarming m/ røring	39 °C	5 min	
11.34	Etterrøring	39 °C	35 min	
12.09	2.myseavtapp		5 min	
12.04	Forpress		15 min	1,5 bar
12.29	Etterpress		15 min	1,5 bar
12.44	Etterpress		60 min	2 bar
13.44	Ost i vann			
22.00	Ost i saltlake	11 °C	10 timer	
08.00	Ost ut av saltlake			

Vedlegg C. 2. Kjøreplan for ysting med mikrofiltrert ystemelk (MF). Tabellen viser tidsskjema, forventet tid, steg, temperatur og anmerkninger til ystingsprosessen.

Tid	Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
10.15	Tilsett starterkultur (FM)	30 °C	90 min	1,5 %
11.45	Løypetilsetting Koagulering	30 °C	20 min	9,38 mL løpe pr. Kg kasein
12.05	Skjæring og røring	30 °C	30 min	
12.35	1.myseavtapp		5 min	40 %
12.40	Vanntilsetting		5 min	40 %
12.40	Tilsett nitrat		0 sek	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L ystemelk
12.45	Skjæring 2.		3.5 min	
12.48	Ettervarming m/ røring	37,5 °C	5 min	
12.53	Etterrøring	37,5 °C	30 min	
13.23	2.myseavtapp		5 min	
13.28	Forpress		15 min	1,5 bar
13.43	Etterpress		15 min	1,5 bar
14.58	Etterpress		60 min	2 bar
15.58	Ost i vann			
15.00	Ost i saltlake	11 °C	18 timer	
09.00	Ost ut av saltlake			

Vedlegg C. 3. Kjøreplan for ysting med mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodningstid (MF/DF (90)). Tabellen viser tidsskjema, forventet tid, steg, temperatur og anmerkninger til ystingsprosessen.

Tid	Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
09.30	Tilsett starterkultur (FM)	30 °C	90 min	1,5 %
11.00	Løypetilsetting Koagulering	30 °C	20 min	9,38 mL løpe pr. Kg kasein
11.20	Skjæring og røring	30 °C	30 min	
11.50	Tilsett nitrat		0 sek	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L ystemelk
11.50	Ettervarming m/ røring	37,5 °C	5 min	
11.55	Etterrøring	37,5 °C	30 min	
12.25	Forpress		15 min	1,5 bar
12.40	Etterpress		15 min	1,5 bar
12.55	Etterpress		60 min	2 bar
13.55	Ost i vann			
15.00	Ost i saltlake	11 °C	18 timer	
09.00	Ost ut av saltlake			

Vedlegg C. 4. Kjøreplan for ysting med mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 30 min formodningstid (MF/DF (30)). Tabellen viser tidsskjema, forventet tid, steg, temperatur og anmerkninger til ystingsprosessen.

Tid	Steg	Temperatur	Beregnet tid	Anmerkninger
09.00	Tilsett starterkultur (FM)	30 °C	30 min	2,5 %
09.30	Løypetilsetting Koagulering	30 °C	20 min	9,38 mL løpe pr. Kg kasein
09.50	Skjæring og røring	30 °C	30 min	
10.20	Tilsett nitrat		0 sek	7,5 g natriumnitrat pr. 100 L ystemelk
10.20	Ettervarming m/ røring	37,5 °C	5 min	
10.25	Etterrøring	37,5 °C	30 min	
10.55	Forpress		15 min	1,5 bar
11.10	Etterpress		15 min	1,5 bar
11.25	Etterpress		60 min	2 bar
12.25	Ost i vann			
15.00	Ost i saltlake	11 °C	18 timer	
09.00	Ost ut av saltlake			

Tørrstoff

Vedlegg D. 1. Resultater for måling av tørrstoff for kontroll (C) for alle ysteblokkene av prøver fra ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Ystingsblokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	Tørrstoff (%)
1	2	C	O24	52,1
2	3	C	O24	52,7
3	4	C	O24	52,8
1	2	C	O10d	54
2	3	C	O10d	54
3	4	C	O10d	53
1	2	C	O30d	57
2	3	C	O30d	54,5
3	4	C	O30d	55,4

Vedlegg D. 2. Resultater for måling av tørrstoff for mikrofiltrertystemelk (MF) for alle ysteblokkene av prøver fra ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Ystingsblokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	Tørrstoff (%)
1	4	MF	O24	55,7
2	1	MF	O24	57,4
3	2	MF	O24	57,1
4	4	MF	O24	55,3
1	4	MF	O10d	56,8
2	1	MF	O10d	57,4
3	2	MF	O10d	58,1
4	4	MF	O10d	58,1
1	4	MF	O30d	59,6
2	1	MF	O30d	60,2
3	2	MF	O30d	59,2
4	4	MF	O30d	59,5

Vedlegg D. 3. Resultater for måling av tørrstoff for mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodningstid (MF/DF (90)) for alle ysteblokkene av prøver fra ost etter forpress (OEF), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Ystingsblokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	Tørrstoff (%)
1	3	MF/DF (90)	O24	55,4
2	2	MF/DF (90)	O24	56,9
3	1	MF/DF (90)	O24	55,1
4	3	MF/DF (90)	O24	54,2
1	3	MF/DF (90)	O10d	56,3
2	2	MF/DF (90)	O10d	57
3	1	MF/DF (90)	O10d	59,6
4	3	MF/DF (90)	O10d	56,6
1	3	MF/DF (90)	O30d	58,3
2	2	MF/DF (90)	O30d	58,7
3	1	MF/DF (90)	O30d	58,2
4	3	MF/DF (90)	O30d	57,6

Vedlegg D. 4. Resultater for måling av tørrstoff for mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 30 min formodningstid (MF/DF (30)) for alle ysteblokkene av prøver fra ost etter forpress (OEF), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Ystingsblokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	Tørrstoff (%)
1	1	MF/DF (30)	O24	55,3
2	4	MF/DF (30)	O24	57,6
3	3	MF/DF (30)	O24	53,5
1	1	MF/DF (30)	O10d	54,9
2	4	MF/DF (30)	O10d	57,5
3	3	MF/DF (30)	O10d	53,6
1	1	MF/DF (30)	O30d	58,6
2	4	MF/DF (30)	O30d	60,4
3	3	MF/DF (30)	O30d	57,5

pH

Vedlegg E. 1. Resultater fra pH måling av normal ystemelk (C) for alle ysteblokkene i prosjektet med tilhørende blokk og kar. Vedlegget viser pH for ystemelk med tilsatt fløte (YMF), ystemelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Blokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	pH
1	2	C	YMF	6,67
2	3	C	YMF	6,56
3	4	C	YMF	6,6
1	2	C	YMS	6,53
2	3	C	YMS	6,53
3	4	C	YMS	6,53
1	2	C	MFP	6,37
2	3	C	MFP	6,4
3	4	C	MFP	6,43
1	2	C	OEFP	6,14
2	3	C	OEFP	6,22
3	4	C	OEFP	6,28
1	2	C	O24	5,28
2	3	C	O24	5,14
3	4	C	O24	5,24
1	2	C	O10d	5,34
2	3	C	O10d	5,32
3	4	C	O10d	5,35
1	2	C	O30d	5,46
2	3	C	O30d	5,34
3	4	C	O30d	5,41

Vedlegg E. 2. Resultater fra pH måling av mikrofiltrertystemelk (MF) for alle ysteblokkene i prosjektet med tilhørende blokk og kar. Vedlegget viser pH for ystemelk med tilsatt fløte (YMF), ystemelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Blokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	pH
1	4	MF	YMF	6,64
2	1	MF	YMF	6,66
3	2	MF	YMF	6,59
4	4	MF	YMF	6,64
1	4	MF	YMS	6,59
2	1	MF	YMS	6,53
3	2	MF	YMS	6,56
4	4	MF	YMS	6,64
1	4	MF	MFP	6,47
2	1	MF	MFP	6,34
3	2	MF	MFP	6,34
4	4	MF	MFP	6,41
1	4	MF	OEFP	5,88
2	1	MF	OEFP	6,1
3	2	MF	OEFP	6,04
4	4	MF	OEFP	6,17
1	4	MF	O24	5,4
2	1	MF	O24	5,25
3	2	MF	O24	5,36
4	4	MF	O24	5,36
1	4	MF	O10d	5,54
2	1	MF	O10d	5,18
3	2	MF	O10d	5,44
4	4	MF	O10d	5,43
1	4	MF	O30d	5,56
2	1	MF	O30d	5,42
3	2	MF	O30d	5,45
4	4	MF	O30d	5,5

Vedlegg E. 3. Resultater fra pH måling av mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodning (MF/DF (90)) for alle ysteblokkene i prosjektet med tilhørende blokk og kar. Vedlegget viser pH for ystemelk med tilsatt fløte (YMF), ystemelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Blokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	pH
1	3	MF/DF (90)	YMF	6,71
2	2	MF/DF (90)	YMF	6,65
3	1	MF/DF (90)	YMF	6,68
4	3	MF/DF (90)	YMF	6,73
1	3	MF/DF (90)	YMS	6,66
2	2	MF/DF (90)	YMS	6,58
3	1	MF/DF (90)	YMS	6,61
4	3	MF/DF (90)	YMS	6,61
1	3	MF/DF (90)	MFP	6,4
2	2	MF/DF (90)	MFP	6,3
3	1	MF/DF (90)	MFP	6,36
4	3	MF/DF (90)	MFP	6,42
1	3	MF/DF (90)	OEFP	5,78
2	2	MF/DF (90)	OEFP	5,42
3	1	MF/DF (90)	OEFP	6,15
4	3	MF/DF (90)	OEFP	6,25
1	3	MF/DF (90)	O24	5,26
2	2	MF/DF (90)	O24	5,13
3	1	MF/DF (90)	O24	5,22
4	3	MF/DF (90)	O24	5,22
1	3	MF/DF (90)	O10d	5,24
2	2	MF/DF (90)	O10d	5,28
3	1	MF/DF (90)	O10d	5,35
4	3	MF/DF (90)	O10d	5,26
1	3	MF/DF (90)	O30d	5,35
2	2	MF/DF (90)	O30d	5,27
3	1	MF/DF (90)	O30d	5,37
4	3	MF/DF (90)	O30d	5,32

Vedlegg E. 4. Resultater fra pH måling av mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 30 min formodning (MF/DF (30)) for alle ysteblokkene i prosjektet med tilhørende blokk og kar. Vedlegget viser pH for ystemelk med tilsatt fløte (YMF), ystemelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Blokk	Kar	Behandling	Prøveuttak	pH
1	1	MF/DF (30)	YMF	6,66
2	4	MF/DF (30)	YMF	6,63
3	3	MF/DF (30)	YMF	6,7
1	1	MF/DF (30)	YMS	6,62
2	4	MF/DF (30)	YMS	6,52
3	3	MF/DF (30)	YMS	6,57
1	1	MF/DF (30)	MFP	6,5
2	4	MF/DF (30)	MFP	6,3
3	3	MF/DF (30)	MFP	6,39
1	1	MF/DF (30)	OEFP	5,82
2	4	MF/DF (30)	OEFP	6,08
3	3	MF/DF (30)	OEFP	6,39
1	1	MF/DF (30)	O24	5,09
2	4	MF/DF (30)	O24	5,2
3	3	MF/DF (30)	O24	5,19
1	1	MF/DF (30)	O10d	5,21
2	4	MF/DF (30)	O10d	5,32
3	3	MF/DF (30)	O10d	5,29
1	1	MF/DF (30)	O30d	5,3
2	4	MF/DF (30)	O30d	5,33
3	3	MF/DF (30)	O30d	5,36

Fortynningsveiledning for innstøpning i vekstmedie for mikrobiologiske prøver

Vedlegg F. 1. Fortynningsrekker benyttet til innstøpning av prøver i M17 ved 20 °C (M1720) og 40 °C (M1740), LBS og VRBA ved 37 °C i forbindelse med prosjektet.

Prøveuttak	M1720	M1740	LBS	VRBA
Ystemelk med fløte (YMF)	10^{-10^3}	$1 \cdot 10^{-5}$	10^{-10^5}	1
Syrekultur (SK)	$10^3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10^3 \cdot 10^{-8}$	1
Ystemelk m/syrekultur (YMS)	$10^3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10^3 \cdot 10^{-8}$	1
Myse fra forpress (MFP)	$10^3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10^3 \cdot 10^{-5}$	1
Ost etter forpress. (OEFP)	$10^3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10^3 \cdot 10^{-8}$	10
Ost 24 timer	$10^3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10^3 \cdot 10^{-8}$	10
Ost 10 dager	$10^3 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10^3 \cdot 10^{-7}$	10
Ost 1 mnd.	$10^3 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10^3 \cdot 10^{-7}$	10

Resultater for mikrobiell vekst med tradisjonelle metoder

Vedlegg G. 1. Gjennomsnitt for vekst ved innstøpning i log (kde/mL e. g) med LBS og M17 ved 20 °C (M1720°C) og 40 °C (M1740°C) for kontroll (C) mikrofiltrertystemelk (MF), mikrofiltrert og diafiltrert (MF/DF) ystemelk med 90 min formodningstid (90) og 30 min formodningstid (30). Tabellen viser også standardavviket (SD) for de ulike uttakene. Uttakene benyttet til uplating er ystemelk med tilsatt fløte (YMF), ystemelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Behandling	Prøve	M1720°C (log)	SD (M1720)	M1740°C (log)	SD (M1740)	LBS	SD (LBS)
C	YMF	0,6514	0,615	0,5340	0,7552	0	0
C	YMS	7,2816	2,064	-	-	5,8906	1,6812
C	MFP	6,1003	0,141	-	-	3,9015	1,0293
C	OEFP	8,4809	0,340	-	-	7,1567	0,1182
C	O24	8,7200	0,086	-	-	8,0292	0,3235
C	O10d	8,9022	0,110	-	-	7,8928	0,1006
C	O30d	8,3321	0,098	1,200	1,6980	7,1042	0,4700
MF	YMF	0,7613	0,799	0,794	0,6589	-	-
MF	YMS	6,8789	1,200	-	-	3,8825	2,2438
MF	MFP	6,2187	0,412	-	-	3,8965	2,2438
MF	OEFP	7,9586	1,191	-	-	7,1710	0,6739
MF	O24	8,3706	0,454	-	-	7,5683	0,3372
MF	O10d	8,6049	0,629	3,633	2,4146	7,9792	0,3748
MF	O30d	7,7948	0,372	3,3439	2,0154	5,4246	0,2538
MF/DF (90)	YMF	0,7888	1,366	0,511	0,8856	-	-
MF/DF (90)	YMS	7,0909	0,094	-	-	5,2554	0,3083
MF/DF (90)	MFP	7,0197	0,241	0,400	0,6937	4,4325	0,2460
MF/DF (90)	OEFP	8,3315	0,424	-	-	6,0873	1,7854
MF/DF (90)	O24	9,0521	0,202	-	-	7,7735	0,2142
MF/DF (90)	O10d	8,8628	0,135	1,944	3,3680	7,9792	0,2468
MF/DF (90)	O30d	7,5874	0,663	1,481	1,5141	7,1448	0,6498
MF/DF (30)	YMF	1,5340	1,112	-	-	1,4923	2,1105
MF/DF (30)	YMS	7,0137	0,019	-	-	5,1783	0,3658
MF/DF (30)	MFP	7,2857	0,404	-	-	3,6652	0,9407
MF/DF (30)	OEFP	8,5581	0,395	-	-	6,1771	2,2907
MF/DF (30)	O24	9,0757	0,072	-	-	8,1718	0,2657
MF/DF (30)	O10d	8,9394	0,130	2,603	3,681	7,3549	1,2235
MF/DF (30)	O30d	8,0012	0,960	0,921	1,3026	6,8352	0,9480

Vedlegg G.2. Resultater for vekst ved innstøpning i log (kde/mL e. g) med VRBA ved 37°C i 24 timer for kontroll (C) mikrofiltrertystemelk (MF), mikrofiltrert og diafiltrert (MF/DF) ystemelk med 90 min formodningstid (90) og 30 min formodningstid (30). Tabellen viser også standardavviket (SD) for de ulike uttakene. Uttakene benyttet til uplating er ystemelk med tilsatt fløte (YMF), syrekultur (SK) ystemelk med tilsatt syrekultur (YMS), myse fra forpress (MFP), ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

Behandling	Prøve	Y.1	Y.2	Y.3	Y.4
C	YMF	-	-	-	
C	SK	-	-	-	
C	YMS	-	-	-	
C	MFP	-	-	-	
C	OEFP	-	-	-	
C	O24	-	-	-	
C	O10d	-	-	-	
C	O30d	-	-	-	
MF	YMF	-	-	-	-
MF	SK	-	-	-	-
MF	YMS	-	-	>1	-
MF	MFP	-	-	-	-
MF	OEFP	-	-	>1	-
MF	O24	-	-	>1	-
MF	O10d	-	-	>1	-
MF	O30d	-	-	>1	>1
MF/DF (90)	YMF	-	-	-	-
MF/DF (90)	SK	-	>1	-	-
MF/DF (90)	YMS	-	-	-	-
MF/DF (90)	MFP	-	-	-	-
MF/DF (90)	OEFP	-	-	-	-
MF/DF (90)	O24	-	-	-	-
MF/DF (90)	O10d	-	-	-	-
MF/DF (90)	O30d	-	-	-	>1
MF/DF (30)	YMF	-	-	-	
MF/DF (30)	SK	-	-	-	
MF/DF (30)	YMS	-	-	-	
MF/DF (30)	MFP	-	-	-	
MF/DF (30)	OEFP	-	-	-	
MF/DF (30)	O24	-	-	-	
MF/DF (30)	O10d	-	-	-	
MF/DF (30)	O30d	-	-	-	

Brønneplassering av prøver til qPCR

Vedlegg H. 1. Brønneplassering for prøver i PCR-plate 1 til qPCR fra ystingsblokk 1-3 (Y.1- Y.3). Ystingsmetoden normal systemelk (C), mikrofiltrert (MF) og mikrofiltrert of diafiltrert systemelk (MF/DF) med 90 min formodning (90) og 30 min formodning (30). Prøvene om ble analysert var ost etter forpress (OEF), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Standardkurve (std.kurve) ble benyttet for *Lactobacillus casei* (448) og *Lactococcus lactis* (Ar-1), og platen ble derfor kjørt to ganger for hver standardkurve.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve
2	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	Std.kurve	blank
3	Y.1.OEF P.C	Y.1.OEFP. C.PMA	Y.1.OEFP. .MF	Y.1.OEFP. MF.PMA	Y.1.OEFP. MF/DF90	Y.1.OEFP. MF/DF90. PMA	Y.1.OEFP. MF/DF30	Y.1.OEFP. MF/DF30. PMA
4	Y.1.O24. C	Y.1.O24.C .PMA	Y.1.O24. MF	Y.1.O24. MF.PMA	Y.1.O24. MF/DF90	Y.1.O24. MF/DF90. PMA	Y.1.O24. MF/DF30	Y.1.O24. MF/DF30. PMA
5	Y.1.O10 d.C	Y.1.O10d. C.PMA	Y.1.O10. MF	Y.1.O10d. MF.PMA	Y.1.O10d. MF/DF90	Y.1.O10d. MF/DF90. PMA	Y.1.O10d. MF/DF30	Y.1.O10d. MF/DF30. PMA
6	Y.1.O30 d.C	Y.1.O30d. C.PMA	Y.1.O30. MF	Y.1.O30d. MF.PMA	Y.1.O30d. MF/DF90	Y.1.O30d. MF/DF90. PMA	Y.1.O30d. MF/DF30	Y.1.O30d. MF/DF30. PMA
7	Y.2.OEF P.C	Y.2.OEFP. C.PMA	Y.2.OEFP. MF	Y.2.OEFP. MF.PMA	Y.2.OEFP. MF/DF90	Y.2.OEFP. MF/DF90. PMA	Y.2.OEFP. MF/DF30	Y.2.OEFP. MF/DF30. PMA
8	Y.2.O24. C	Y.2.O24.C .PMA	Y.2.O24. MF	Y.2.O24. MF.PMA	Y.2.O24. MF/DF90	Y.2.O24. MF/DF90. PMA	Y.2.O24. MF/DF30	Y.2.O24. MF/DF30. PMA
9	Y.2.O10 d.C	Y.2.O10d. C.PMA	Y.2.O10d. MF	Y.2.O10d. MF.PMA	Y.2.O10d. MF/DF90	Y.2.O10d. MF/DF90. PMA	Y.2.O10d. MF/DF30	Y.2.O10d. MF/DF30. PMA
10	Y.2.O30 d.C	Y.2.O30d. C.PMA	Y.2.O30d. MF	Y.2.O30d. MF.PMA	Y.2.O30d. MF/DF90	Y.2.O30d. MF/DF90. PMA	Y.2.O30d. MF/DF30	Y.2.O30d. MF/DF30. PMA
11	Y.3.OEF P.C	Y.3.OEFP. C.PMA	Y.3.OEFP. .MF	Y.3.OEFP. MF.PMA	Y.3.OEFP. MF/DF90	Y.3.OEFP. MF/DF90. PMA	Y.3.OEFP. MF/DF30	Y.3.OEFP. MF/DF30. PMA
12	Y.3.O24. C	Y.3.O24.C .PMA	Y.3.O24. MF	Y.3.O24. MF.PMA	Y.3.O24. MF/DF90	Y.3.O24. MF/DF90. PMA	Y.3.O24. MF/DF30	Y.3.O24. MF/DF30. PMA

Vedlegg H. 2. Brønneplassering for prøver i PCR-plate2 til qPCR fra ystingsblokk 3 (Y.3) til prøver fra ystingsblokk 4 (Y.4). Ystingsmetoden normal ystemelk (C), mikrofiltrert (MF) og mikrofiltrert of diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 90 min formodning (90) og 30 min formodning (30). Prøvene om ble analysert var ost etter forpress (OEF), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Standardkurve (std.kurve) ble benyttet for *Lactobacillus casei* (448) og *Lactococcus lactis* (Ar-1).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve Ar-1
2	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Std.kurve 448.	Blank
3	Y.3.O10 d.C	Y.3.O10d.C (PMA)	Y.3.O10d. MF	Y.3.O10d. MF (PMA)	Y.3.O10d. MF/DF90	Y.3.O10d. MF/DF90 (PMA)	Y.3.O10d. MF/DF30	Y.3.O10. MF/DF30 (PMA)
4	Y.3.O30 d. C	Y.3.O30d. C (PMA)	Y.3.O30d. MF	Y.3.O30d. MF (PMA)	Y.3.O30d. MF/DF90	Y.3.O30d. MF/DF90 (PMA)	Y.3.O30d. MF/DF30	Y.3.O30d. MF/DF30 (PMA)
5	Y.4.OEF P. C	Y.4.OEFP. C (PMA)	Y.4.OEFP. MF	Y.4.OEFP MF (PMA)	Y.4.O24. MF/DF90	Y.4.O24. MF/DF90 (PMA).	Y.4.O24. MF/DF30	Y.4.O24. MF/DF30 (PMA)
6	Y.4.O10 d. C	Y.4.O10d. C (PMA)	Y.4.O10d. MF	Y.4.O10d MF (PMA)	Y.4.O30d. MF/DF90	Y.4.O30d. MF/DF90 (PMA)	Y.4.O30d. MF/DF30	Y.4.O30d. MF/DF30 (PMA)
7	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve 448.
8	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Std.kurve Ar-1.	Blank
9	Y.3.O10 d. C	Y.3.O10d. C (PMA)	Y.3.O10d. MF	Y.3.O10d. MF (PMA)	Y.3.O10d. MF/DF90	Y.3.O10d. MF/DF90 (PMA)	Y.3.O10d. MF/DF30	Y.3.O10d. MF/DF30 (PMA)
10	Y.3.O30 d. C	Y.3.O30d. C (PMA)	Y.3.O30d. MF	Y.3.O30d. MF (PMA)	Y.3.O30d. MF/DF90	Y.3.O30d. MF/DF90 (PMA)	Y.3.O30d. MF/DF30	Y.3.O30d. MF/DF30 (PMA)
11	Y.4.OEF P. C	Y.4.OEFP. C (PMA)	Y.4.OEFP. MF	Y.4.OEFP MF (PMA)	Y.4.O24. MF/DF90	Y.4.O24. MF/DF90 (PMA)	Y.4.O24. MF/DF30	Y.4.O24. MF/DF30 (PMA)
12	Y.4.O10 d. C	Y.4.O10d. C (PMA)	Y.4.O10d. MF	Y.4.O10d MF	Y.4.O30d MF/DF90	Y.4.O30d. MF/DF90 (PMA)	Y.4.O30d. MF/DF30	Y.4.O30d. MF/DF30 (PMA)

Resultater qPCR

Vedlegg I. 1. Resultater fra standardkurvene benyttet til qPCR. En fortynningsrekke med *Lactobacillus casei* (INF448) og en fortynningsrekke med *Lactococcus lactis* (Ar-1) ble benyttet til qPCR.

	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
Standard 448	7,204119983	6,204119983	5,204119983	4,204119983	3,204119983	2,204119983
Standard Ar-1	7,033423755	6,033423755	5,033423755	4,033423755	3,033423755	2,033423755

Vedlegg I. 2. Tabellen viser resultatene for qPCR i \log_{10} med primerpar *Lac1F* og *Lac2R* med en renkultur av *Lactobacillus casei* (INF448) som standardkurve. Prøver fra ystingsblokk 1 (Y.1) til ystingsblokk 4 (Y.4) ble benyttet til analysen. Ystingsmetoden normal ystemelk (C), mikrofiltrert (MF) og mikrofiltrert of diafiltrert (MF/DF) ystemelk med 90 min formodning (90) og 30 min formodning (30). Prøvene om ble analysert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d).

	C	C (PMA)	MF	MF (PMA)	MF/DF (90)	MF/DF (90) (PMA)	MF/DF (30)	MF/DF (30) (PMA)
Y.1 OEFP	6,43	6,93	3,38	6,76	7,24	7,14	7,26	7,1
Y.1 O24	6,94	6,94	7,45	6,96	7,18	5,87	7,64	7,1
Y.1 O10d	7,17	7,02	7,42	7,27	7,43	6,96	7,05	6,51
Y.1 O30d	7,55	6,21	6,74	5,14	6,86	5,03	7,42	5,16
Y.2 OEFP	6,29	6,57	6,69	6,23	6,67	6,52	6,79	6,97
Y.2 O24	5,16	4,23	7,29	6,67	5,7	4,84	7,31	6,71
Y.2 O10d	6,72	6,59	6,749	6,71	7,49	5,95	6,88	7,23
Y.2 O30d	7,8	7,09	3,38	6,94	7,13	6,73	7,32	7,05
Y.3 OEFP	6,7	6,83	7,25	6,93	6,71	6,68	7,06	5,91
Y.3 O24		7,88	7,81	7,16	7,87	7,8	7,7	7,14
Y.3 O10d	8,27	7,5	7,92	7,56	6,48	7,55	8,28	8,22
Y.3 O30d	6,55	6,44	6,6	6,48	7,63	7,05	7,14	7,4

Y.4 OEFP	-	-	6,32	6,87	6,54	6,73	-	-
Y.4 O24	-	-	6,67	7,08	6,81	7,08	-	-
Y.4 O10d	-	-	6,46	6,6	7,34	7,26	-	-
Y.4 O30d	-	-	7,7	5,33	6,52	6,82	-	-

Vedlegg I. 3. Tabellen viser resultatene for qPCR i \log_{10} med primerpar *Lac3F* og *Lac2R* med en renkultur av *Lactococcus lactis* (Ar-1) som standardkurve. Prøver fra ystingsblokk 1- 4 (Y.1-Y.4) ble benyttet til analysen. Ystingsmetoden normal ystemelk (C), mikrofiltrert (MF) og mikrofiltrert of diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 90 min formodning (90) og 30 min formodning (30). Prøvene om ble analysert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter yting (O30d).

	C	C (PMA)	MF	MF (PMA)	MF/DF(90)	MF/DF(90) (PMA)	MF/DF (30)	MF/DF (30) (PMA)
Y.1 OEFP	8,65	8,95	3,75	8,76	9	8,66	8,96	8,61
Y.1 O24	9,2	8,95	9,11	8,56	8,95	7,44	9,1	9,6
Y.1 O10d	8,94	8,72	9,08	8,89	8,99	8,34	8,77	8,71
Y.1 O30d	8,9	8,35	9,15	7,21	9,5	8,82	9,51	7,1
Y.2 OEFP	8,73	8,86	8,74	8,43	8,67	8,91	9,07	9,02
Y.2 O24	7,31	5,91	8,66	8,24	7,42	6,51	8,74	7,62
Y.2 O10d	8,73	8,48	8,56	8,34	8,85	6,69	8,5	8,12
Y.2 O30d	8,72	7,95	8,86	8,51	7,9	7,12	8,66	8,39
Y.3 OEFP	8,57	8,74	9,22	8,69	8,55	8,72	8,87	7,72
Y.3 O24	8,27	8,85	9,44	8,45	9,33	9,03	8,99	7,7
Y.3 O10d	9,37	8,25	7,17	8,72	9,19	8,79	9,24	8,68
Y.3 O30d	8,37	8,54	8,68	8,34	9,21	8,6	8,78	6,6
Y.4 OEFP	-	-	8,7	9,08	9,13	8,58	-	-
Y.4 O24	-	-	8,58	8,21	8,45	8,6	-	-
Y.4 O10d	-	-	7,57	8,23	8,13	8,57	-	-
Y.4 O30d	-	-	9,23	6,77	7,74	7,31	-	-

Brønneplussering av prøver til 16rRNA og Illumina sekvensering (MiSeq)

Vedlegg J. 1. Brønneplussering for prøver til 16rRNA amplifisering og Illumina sekvensering fra ystingsblokk 1-3 (Y.1-Y.3). Ystingsmetodene kontroll (C), mikrofiltrert (MF) og mikrofiltrert of diafiltrert systemelk (MF/DF) med 90 min formodning (90) og 30 min formodning (30) ble analysert . Prøvene som ble analysert fra behandlingene var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Y.1 OEFP C	Y.1 O24 C	Y.1 O10d C	Y.1 O30d C	Y.2 OEFP C	Y.2 O24 C	Y.2 O10d C	Y.2 O30d C	Y.3 OEFP C	Y.3 O24 C	Y.3 O10d C	Y.3 O30d C
B	Y.1 C OEFP (PMA)	Y.1 O24 C (PMA)	Y.1 O10d C (PMA)	Y.1 O30d C (PMA)	Y.2 C OEFP (PMA)	Y.2 O24 C (PMA)	Y.2 O10d C (PMA)	Y.2 O30d C (PMA)	Y.3 O24 OEFP (PMA)	Y.3 O24 C (PMA)	Y.3 O10d C (PMA)	Y.3 O30d C (PMA)
C	Y.1 OEFP MF	Y.1 O24 MF	Y.1 O10d MF	Y.1 O30d MF	Y.2 OEFP MF	Y.2 O24 MF	Y.2 O10d MF	Y.2 O30d MF	Y.3 OEFP MF	Y.3 O24 MF	Y.3 O10d MF	Y.3 O30d MF
D	Y.1 OEFP MF (PMA)	Y.1 O24 MF (PMA)	Y.1 O10d MF (PMA)	Y.1 O30d MF (PMA)	Y.2 OEFP MF (PMA)	Y.2 O24 MF (PMA)	Y.2 O10d MF (PMA)	Y.2 O30d MF (PMA)	Y.3 OEFP MF (PMA)	Y.3 O24 MF (PMA)	Y.3 O10d MF (PMA)	Y.3 O30d MF (PMA)
E	Y.1 OEFP MF/DF (90)	Y.1 O24 MF/D F (90)	Y.1 O10d MF/DF (90)	Y.1 O30d MF/D F (90)	Y.2 OEFP MF/DF (90)	Y.2 O24 MF/D F (90)	Y.2 O10d MF/D F (90)	Y.2 O30d MF/D F (90)	Y.3 OEFP MF/D F (90)	Y.3 O24 MF/DF (90)	Y.3 O10d MF/D F (90)	Y.3 O30d MF/D F (90)
F	Y.1 OEFP MF/DF (90) (PMA)	Y.1 O24 MF/D F (90) (PMA)	Y.1 O10d MF/DF (90) (PMA)	Y.1 O30d MF/D F (90) (PMA)	Y.2 OEFP MF/DF (90) (PMA)	Y.2 O24 MF/D F (90) (PMA)	Y.2 O10d MF/D F (90) (PMA)	Y.2 O30d MF/D F (90) (PMA)	Y.3 OEFP MF/D F (90) (PMA)	Y.3 O24 MF/DF (90) (PMA)	Y.3 O10d MF/D F (90) (PMA)	Y.3 O30d MF/D F (90) (PMA)
G	Y.1 OEFP MF/DF (30)	Y.1 O24 MF/D F (30)	Y.1 O10d MF/DF (30)	Y.1 O30d MF/D F (30)	Y.2 OEFP MF/DF (30)	Y.2 O24 MF/D F (30)	Y.2 O10d MF/D F (30)	Y.2 O30d MF/D F (30)	Y.3 OEFP MF/D F (30)	Y.3 O24 MF/DF (30)	Y.3 O10d MF/D F (30)	Y.3 O30d MF/D F (30)
H	Y.1 OEFP MF/DF (30) (PMA)	Y.1 O24 MF/D F (30) (PMA)	Y.1 O10d MF/DF (30) (PMA)	Y.1 O30d MF/D F (30) (PMA)	Y.2 OEFP MF/DF (30) (PMA)	Y.2 O24 MF/D F (30) (PMA)	Y.2 O10d MF/D F (30) (PMA)	Y.2 O30d MF/D F (30) (PMA)	Y.3 OEFP MF/D F (30) (PMA)	Y.3 O24 MF/DF (30) (PMA)	Y.3 O10d MF/D F (30) (PMA)	Y.3 O30d MF/D F (30) (PMA)

Vedlegg J. 2. Brønneplassering for prøver til 16rRNA amplifisering og Illumina sekvensering fra ystingsblokk 4 (Y.4). Behandlingen mikrofiltrertystemelk (MF) og mikrofiltrert of diafiltrert ystemelk (MF/DF) med 90 min formodning (90). Prøvene som ble analysert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

	1	2	3
A	-	Y.4 OEFP MF/DF90	Y.4. OEFP. MF
B	-	Y.4 OEFP MF/DF(90) PMA	Y.4 OEFP MF PMA
C	-	Y.4 O24 MF/DF(90)	Y.4 O24 MF
D	-	Y.4 O24 MF/DF(90) PMA	Y.4 O24 MF PMA
E	-	Y.4 O10d MF/DF(90)	Y.4 O10d MF
F	-	Y.4 O10d MF/DF(90) PMA	Y.4 O10d MF PMA
G	-	Y.4 O30d MF/DF(90)	Y.4 O30d MF
H	-	Y.4 O30d MFDF90 PMA	Y.4 O30d. MF PMA

Resultater fra 16rRNA amplifisering og Illumina sekvensering (MiSeq)

Vedlegg K. 1. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for sekvensering og amplifisering av prøver fra kontroll (C) fra ystingsblokk 1-3 (Y.1-Y.3). Prøvene som ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

	Lc. lactis	Leu. mesenteroides / Leu. pseudomesente roides	Lc. chungangensis / Lc. raffinolactis	Pantoea agglomerans / Pantoea brenneri	Bacillus	Sphingomonas	Andre
Y.1 OEFP	71490	945	900	0	1	1	149
Y.1 OEFP PMA	63741	839	663	0	0	0	101
Y.2 OEFP	4311	77	46	0	1	0	15
Y.2 OEFP PMA	3926	97	21	0	0	0	12
Y.3 OEFP	79022	1113	1181	0	2	1	31
Y.3 OEFP PMA	74924	855	523	0	0	0	20
Y.1 O24	62912	1856	1100	1	1	0	40
Y.1 O24 PMA	15592	187	114	0	0	1	21
Y.2 O24	36782	572	149	0	2	0	77
Y.2 O24 PMA	23491	459	88	2	0	6	143
Y.3 O24	71572	1713	1173	0	2	1	17
Y.3 O24 PMA	66060	1987	808	0	0	0	10

Y1 010d	45454	1229	647	1	1	0	42
Y.1 010d PMA	47719	1596	539	0	0	1	47
Y.2 010d	46903	925	411	0	1	0	18
Y.2 010d PMA	47705	1506	251	0	3	0	10
Y.3 010d	46187	621	645	7	47	12	70
Y.3 010d PMA	50493	1193	536	4	69	23	56
Y.1 O30d	57417	523	552	0	3	0	48
Y.1 O30d PMA	60091	407	246	0	0	0	24
Y.2 O30d	61046	646	324	0	0	0	30
Y.2 O30d PMA	65688	1013	199	1	0	1	22
Y.3 O30d	66862	1130	574	5	1	10	69
Y.3 O30d PMA	66539	1226	224	8	1	11	70

Vedlegg K. 2. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) resultater for sekvensering og amplifisering av prøver fra kontroll (C) for ystingsblokk 1-3 for *Lactococcus*. Prøvene om ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

Prøve	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 5	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 5	Andre
Y.1 OEFP	8867	1286	1275	1323	1137	922	1160	223	335	185	24396
Y.1 OEFP PMA	7698	1219	1188	1154	1121	1018	1181	207	321	182	23251
Y.2 OEFP	1337 2	1624	1484	1543	1574	1266	1338	307	423	174	33853
Y.2 OEFP PMA	1248 3	1346	1202	1438	1311	1118	1224	269	402	191	26901
Y.3 OEFP	1048 0	1376	1267	1347	1333	1052	1186	259	344	179	26942
Y.3 OEFP PMA	1338 3	1403	1393	1574	1339	1155	1296	279	405	224	26851
Y.1 O24	1062 0	1531	1491	1507	1442	1311	1334	293	387	268	28520
Y.1 O24 PMA	7499	920	883	978	843	698	794	147	234	137	16408
Y.2 O24	1716 7	1567	1223	1398	1263	1145	1371	282	340	116	34047
Y.2 O24 PMA	1879 3	348	379	306	251	219	301	83	106	54	19888
Y.3 O24	9421	1284	1556	1390	1138	1030	1199	244	407	177	27416
Y.3 O24 PMA	3239	292	714	569	231	217	470	56	148	52	7913

Y1 010d	9142	1142	1079	1021	938	895	892	199	261	241	18224
Y.1 010d PMA	1378 2	1213	1018	1105	890	880	929	203	252	244	18497
Y.2 010d	3671	484	286	291	352	304	255	87	67	57	6086
Y.2 010d PMA	1482 1	1098	916	948	944	892	903	201	239	181	18648
Y.3 010d	4797	561	571	551	518	412	454	131	161	90	9954
Y.3 010d PMA	5427	381	561	482	413	333	467	72	136	86	8740
Y.1 O30d	2033 2	899	467	631	477	553	495	124	143	185	14211
Y.1 O30d PMA	3228 4	399	199	197	189	216	173	75	49	53	12463
Y.2 O30d	5128	433	123	137	226	242	116	74	47	53	4539
Y.2 O30d PMA	1026 8	166	58	58	70	77	28	30	12	7	4690
Y.3 O30d	9421	1284	1556	1390	1138	1030	1199	244	407	177	27416
Y.3 O30d PMA	2687 2	364	135	146	225	253	167	55	43	52	11589

Vedlegg K. 3. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for sekvensering og amplifisering av prøver fra mikrofiltrert ystemelk (MF) fra ystingsblokk 2-4 (Y.2-Y.4). Prøvene som ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

	Lc. lactis	Leu. mesenteroides / Leu. pseudomesente roides	Lc. chungangensis / Lc. raffinolactis	Pantoea agglomerans / Pantoea brenneri	Bacillus	Sphingomonas	Andre
Y.2 OEFP	4521	61	43	0	0	0	14
Y.2 OEFP PMA	4586	109	25	0	1	0	24
Y.3 OEFP	87150	643	1256	0	1	1	20
Y.3 OEFP PMA	77166	739	1039	0	0	0	38
Y.4 OEFP	4657	95	30	20	0	7	30
Y.4 OEFP PMA	39431	92	153	40	0	15	52
Y.2 O24	49589	1104	372	0	0	0	15
Y.2 O24 PMA	49893	1916	317	0	1	1	24
Y.3 O24	76141	1036	1056	0	0	0	13
Y.3 O24 PMA	74382	1511	815	0	2	0	29
Y.4 O24	39178	118	265	30	0	17	77
Y.4 O24 PMA	21153	74	165	43	0	12	72

Y.2 010d	55816	1122	442	0	0	0	14
Y.2 010d PMA	54470	1781	343	0	0	0	33
Y.3 010d	52889	497	885	8	68	19	68
Y.3 010d PMA	46156	614	552	4	55	20	84
Y.4 010d	15900	14	49	23	1	14	60
Y.4 010d PMA	33551	27	185	17	0	8	52
Y.2 O30d	69955	515	342	0	1	1	31
Y.2 O30d PMA	67361	398	320	0	2	0	38
Y.3 O30d	88326	608	923	7	1	11	128
Y.3 O30d PMA	73146	1140	434	5	1	16	120
Y.4 O30d	37942	58	144	5	0	9	47
Y.4 O30d PMA	19649	36	60	13	0	10	59

Vedlegg K. 4. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) resultater for sekvensering og amplifisering av prøver fra mikrofiltrert ystemelk(MF) for ystingsblokk 2-4 (Y.2-Y.4) for *Lactococcus*. Prøvene om ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

Prøve	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 5	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 5	Andre
Y.2 OEFP	1301 5	1753	1589	1501	1517	1362	1404	325	405	270	30714
Y.2 OEFP PMA	1351 3	1397	1226	1325	1169	1158	1184	258	344	199	26520
Y.3 OEFP	1001 4	1549	1768	1524	1520	1383	1497	301	486	247	31194
Y.3 OEFP PMA	1125 9	1898	1928	2009	1727	1647	1831	382	574	260	36917
Y.4 OEFP	1433 1	2200	1970	1980	1760	1719	1769	376	528	327	38031
Y.4 OEFP PMA	1490 0	2260	2061	2077	1840	1743	1831	407	560	309	39504
Y.2 O24	1365 8	2018	1725	1684	1605	1607	1554	343	430	304	32595
Y.2 O24 PMA	1932 1	1970	1638	1570	1562	1383	1399	313	407	224	33554
Y.3 O24	1172 0	1698	1878	1594	1339	1293	1433	298	466	307	30203
Y.3 O24 PMA	1879 4	1991	2358	2235	1661	1528	1787	377	599	344	36831
Y.4 O24	1276 5	1823	1681	1702	1606	1347	1484	342	445	269	32031
Y.4 O24 PMA	1554 9	1257	1291	1378	1028	1057	1284	196	371	161	29273

Y.2 010d	1874 6	2126	1505	1605	1349	1561	1403	364	378	387	29124
Y.2 010d PMA	2578 8	1985	1383	1370	1526	1467	1146	324	354	318	28274
Y.3 010d	6768	816	959	820	789	688	669	151	228	165	15892
Y.3 010d PMA	1803 8	1672	1459	1447	1246	1222	1240	264	388	276	24869
Y.3 010d	5186	590	300	316	326	310	242	117	66	68	8058
Y.4 010d PMA	2209 3	1725	1260	1338	1444	1264	1182	312	349	179	31638
Y.4 010d PMA	2679 1	895	347	387	425	455	356	140	83	129	15895
Y.2 O30d	3415 8	831	316	306	449	473	246	132	94	111	16653
Y.2 O30d PMA	1901 2	837	438	517	471	558	425	152	119	141	13132
Y.3 O30d	2752 1	599	188	191	288	329	222	108	70	72	12654
Y.3 O30d PMA	1794 9	1786	1301	1304	1256	1259	1076	307	313	278	24351
Y.4 O30d	3586 5	337	232	261	263	276	248	91	74	43	15813
Y.4 O30d PMA	1301 5	1753	1589	1501	1517	1362	1404	325	405	270	30714

Vedlegg K. 5. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for sekvensering og amplifisering av prøver fra mikrofiltrert og diafiltrert systemelk med 90 min formodningstid (MF/DF(90)) fra ystingsblokk 2-4 (Y.2-Y.4). Prøvene som ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

	Lc. lactis	Leu. mesenteroides / Leu. pseudomesente roides	Lc. chungangensis / Lc. raffinolactis	Pantoea agglomerans / Pantoea brenneri	Bacillus	Sphingomonas	Andre
Y.2 OEFP	3335	62	26	1	0	0	19
Y.2 OEFP PMA	3218	96	20	0	0	0	24
Y.3 OEFP	65371	853	1014	0	1	0	21
Y.3 OEFP PMA	66172	814	694	0	1	0	39
Y.4 OEFP	3664	146	17	26	0	14	51
Y.4 OEFP PMA	11574	29	108	12	0	3	16
Y.2 O24	9888	142	75	0	1	0	7
Y.2 O24 PMA	43246	936	110	1	3	10	423
Y.3 O24	19842	255	230	0	1	1	12
Y.3 O24 PMA	41710	549	648	6	53	21	60
Y.4 O24	34982	170	419	51	0	15	105
Y.4 O24 PMA	44331	123	554	76	0	23	101

Y.2 010d	37905	1031	494	0	0	1	13
Y.2 010d PMA	47429	2207	347	0	4	1	139
Y.3 010d	41710	549	648	6	53	21	60
Y.3 010d PMA	45623	556	452	7	53	16	57
Y.4 010d	52352	57	441	27	1	26	86
Y.4 010d PMA	45882	65	279	25	0	14	76
Y.2 O30d	52196	1057	263	0	1	0	22
Y.2 O30d PMA	49334	4563	238	0	1	0	43
Y.3 O30d	52593	970	650	5	2	14	66
Y.3 O30d PMA	62314	1021	468	2	1	7	79
Y.4 O30d	43255	135	475	6	0	8	61
Y.4 O30d PMA	39506	334	645	17	0	26	68

Vedlegg K. 6. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) resultater for sekvensering og amplifisering av prøver fra mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 90 min formodning (MF/DF(90)) for ystingsblokk 2-4 (Y.2-Y.4) for *Lactococcus*. Prøvene om ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

Prøve	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 5	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 5	Andre
Y.2 OEFP	13488	1353	1176	1234	1193	1086	1007	239	283	267	23586
Y.2 OEFP PMA	18729	1580	1235	1448	1179	1301	1265	260	339	364	24655
Y.3 OEFP	10959	1473	1564	1537	1441	1243	1346	293	394	244	28432
Y.3 OEFP PMA	9546	1046	1153	1192	1014	931	1067	223	291	169	22059
Y.4 OEFP	16884	2020	1834	1942	1665	1602	1662	351	519	340	34018
Y.4 OEFP PMA	17667	2306	2115	2356	1914	1731	1951	466	624	305	42479
Y.2 O24	24589	1059	875	874	1057	994	833	216	248	123	30253
Y.2 O24 PMA	25310	416	507	431	342	362	476	101	139	51	17723
Y.3 O24	14091	1954	2211	2064	1659	1573	1749	313	527	389	36604
Y.3 O24 PMA	14053	1421	1749	1692	1081	1089	1378	221	428	245	26052
Y.4 O24	14362	1984	1866	1981	1735	1561	1748	367	501	252	41633
Y.4 O24 PMA	12279	1648	1626	1720	1362	1305	1627	348	449	195	33642

Y.2 010d	21733	1860	1129	1233	1241	1278	1051	301	321	344	25219
Y.2 010d PMA	22587	492	439	486	478	469	471	116	127	90	15728
Y.3 010d	13467	1755	1728	1657	1476	1480	1453	317	431	355	30343
Y.3 010d PMA	10447	658	693	812	555	483	612	130	225	107	12945
Y.3 010d	9862	1544	1472	1507	1380	1312	1394	310	402	207	31809
Y.4 010d PMA	13848	1606	1372	1512	1342	1417	1239	327	399	299	25969
Y.4 010d PMA	28379	1066	666	603	917	915	715	203	196	105	24598
Y.2 O30d	10845	111	59	55	88	74	65	24	14	11	5283
Y.2 O30d PMA	5079	536	137	165	239	263	123	73	39	52	4674
Y.3 O30d	31174	500	252	354	278	332	245	72	75	95	14399
Y.3 O30d PMA	13340	1395	1174	1424	1209	1045	1243	253	308	118	29471
Y.4 O30d	2535	201	308	371	148	136	249	50	76	50	4039
Y.4 O30d PMA	13488	1353	1176	1234	1193	1086	1007	239	283	267	23586

Vedlegg K. 7. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) for sekvensering og amplifisering av prøver fra mikrofiltrert of diafiltrert ystemelk med 30 min formodning (MF/DF (30)) fra ystingsblokk 1-3 (Y.1-Y.3). Prøvene som ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

	Lc. lactis	Leu. mesenteroides / Leu. pseudomesente roides	Lc. chungangensis / Lc. raffinolactis	Pantoea agglomerans / Pantoea brenneri	Bacillus	Sphingomonas	Andre
Y.1 OEFP	45920	595	667	0	1	0	78
Y.1 OEFP PMA	13429	225	168	0	0	0	172
Y.2 OEFP	3388	64	35	0	0	1	15
Y.2 OEFP PMA	2838	56	40	1	0	0	16
Y.3 OEFP	63875	735	905	0	0	0	11
Y.3 OEFP PMA	51144	811	720	0	3	0	28
Y.1 O24	42298	915	514	0	0	0	16
Y.1 O24 PMA	45122	1393	608	0	0	0	26
Y.2 O24	37511	763	317	0	0	0	8
Y.2 O24 PMA	32330	1249	263	0	0	1	28
Y.3 O24	61769	1266	1210	0	0	1	14
Y.3 O24 PMA	53340	1455	1043	0	0	0	15

Y1 010d	37841	975	576	0	0	1	26
Y.1 010d PMA	39886	469	818	0	0	0	16
Y.2 010d	38205	393	296	0	0	0	12
Y.2 010d PMA	10155	120	120	0	0	0	13
Y.3 010d	43987	666	1089	4	49	19	53
Y.3 010d PMA	32614	907	801	5	59	9	46
Y.1 O30d	34316	423	354	0	2	1	11
Y.1 O30d PMA	50345	883	428	0	0	1	92
Y.2 O30d	56840	594	363	0	0	0	25
Y.2 O30d PMA	51634	836	472	0	1	0	29
Y.3 O30d	59508	1146	905	6	1	15	66
Y.3 O30d PMA	57773	1543	652	3	0	6	48

Vedlegg K. 8. Operasjonelle taksonomiske enheter (OTU) resultater for sekvensering og amplifisering av prøver fra mikrofiltrert og diafiltrert ystemelk med 30 min formodning (MF/DF (30)) for ystingsblokk 1-3 for *Lactococcus*. Prøvene om ble amplifisert og sekvensert var ost etter forpress (OEFP), ost 24 timer etter ysting (O24), ost 10 dager etter ysting (O10d) og ost 30 dager etter ysting (O30d). Prøvene markert med PMA er PMA-behandlet.

Prøve	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 1	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 2	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 3	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 4	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>lactis</i> 5	<i>Lc. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> 5	Andre
Y.1 OEFP	8867	1286	1275	1323	1137	922	1160	223	335	185	24396
Y.1 OEFP PMA	7698	1219	1188	1154	1121	1018	1181	207	321	182	23251
Y.2 OEFP	1337 2	1624	1484	1543	1574	1266	1338	307	423	174	33853
Y.2 OEFP PMA	1248 3	1346	1202	1438	1311	1118	1224	269	402	191	26901
Y.3 OEFP	1048 0	1376	1267	1347	1333	1052	1186	259	344	179	26942
Y.3 OEFP PMA	1338 3	1403	1393	1574	1339	1155	1296	279	405	224	26851
Y.1 O24	1062 0	1531	1491	1507	1442	1311	1334	293	387	268	28520
Y.1 O24 PMA	7499	920	883	978	843	698	794	147	234	137	16408
Y.2 O24	1716 7	1567	1223	1398	1263	1145	1371	282	340	116	34047
Y.2 O24 PMA	1879 3	348	379	306	251	219	301	83	106	54	19888
Y.3 O24	9421	1284	1556	1390	1138	1030	1199	244	407	177	27416
Y.3 O24 PMA	3239	292	714	569	231	217	470	56	148	52	7913

Y1 010d	9142	1142	1079	1021	938	895	892	199	261	241	18224
Y.1 010d PMA	1378 2	1213	1018	1105	890	880	929	203	252	244	18497
Y.2 010d	3671	484	286	291	352	304	255	87	67	57	6086
Y.2 010d PMA	1482 1	1098	916	948	944	892	903	201	239	181	18648
Y.3 010d	4797	561	571	551	518	412	454	131	161	90	9954
Y.3 010d PMA	5427	381	561	482	413	333	467	72	136	86	8740
Y.1 O30d	2033 2	899	467	631	477	553	495	124	143	185	14211
Y.1 O30d PMA	3228 4	399	199	197	189	216	173	75	49	53	12463
Y.2 O30d	5128	433	123	137	226	242	116	74	47	53	4539
Y.2 O30d PMA	1026 8	166	58	58	70	77	28	30	12	7	4690
Y.3 O30d	9421	1284	1556	1390	1138	1030	1199	244	407	177	27416
Y.3 O30d PMA	2687 2	364	135	146	225	253	167	55	43	52	11589



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway