



Mikrobiologiske og kemiske forandringer i rødkitost

Fremstillet af rå- og pasteuriseret mælk

Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole

Mejer- og Levnedsmiddelsinstituttet
Afdeling for Levnedsmiddelmikrobiologi

2004

Sammendrag

I Danmark bliver al mælk til fremstilling af bløde oste varmebehandlet, hvorved nogle mener, at ostene mister deres specielle smag. Et af hovedargumenterne mod pasteurisering er, at diversiteten i mælkesyrebakterierne forsvinder, hvilket underbygges med, hvad man ved om hårde oste; i cheddar og hårde schweizeroste er man inden for de sidste årtier begyndt at anerkende betydningen af medfølgefloraen som smagsdanner.

I dette speciale er forskellen i udviklingen af mikrobiologiske og enkelte kemiske parametre mellem oste fremstillet af rå og pasteuriseret mælk blevet undersøgt. Dette blev gjort ved at fremstille fire produktioner af en ost af munstertypen. I hver produktion blev der fremstillet en batch af rå mælk og en af pasteuriseret mælk.

Under produktionen og modningen af disse oste blev der på Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole foretaget en række mikrobiologiske undersøgelser, mens der samtidigt blev foretaget en række fysiske og kemiske målinger på Danmarks Jordbrugsforskning.

De fire produktioner foregik på forskellige tidspunkter af året, og der var derfor forskel på, om køerne var på græs eller gik på dybstrøelse inde i stalden, og på om foderet var græs eller ensilage. Der viste sig meget stor variation mellem ostene fra de fire produktioner, forskelle, der dog ikke alene kan tilskrives årstidsvariationen, men må forklares med fejl under produktionerne; I anden produktion blev der fundet flere *Enterobacteriaceae* i den pasteuriserede mælk end i den rå mælk, hvilket kun kan skyldes en efterkontaminering af mælken efter varmebehandling; I tredje produktion var der ikke ret mange *Enterobacteriaceae* i mælken, men pga. en inaktiv starterkultur nåede indholdet i begge typer oste op på ca. 10^7 CFU pr. g. efter 10 dage. I første og fjerde produktion foregik ostefremstillingen uden problemer, men de fremstillede oste var forskellige i størrelse og kan derfor ikke sammenlignes. Der blev i alle fire produktioner fundet et signifikant højere indhold af bakterier fra starterkulturen i råmælksostene, selvom den tilsatte mængde var den samme som i den pasteuriserede mælk

Medfølgefloraen i ostene kom først til sidst i modningen op på et niveau, hvor den ville kunne have betydning for smagsdannelsen. Derimod var der flere oste, som havde et meget højt niveau af *Enterobacteriaceae*, deriblandt *Hafnia alvei*, som danner putrescin sammen med mælkesyrebakterier.

Plasminaktiviteten i de tre produktioner - hvori den blev målt - var varierende og ikke som forventet højere i ostene af den pasteuriserede mælk. Der var en tendens til hurtigere modning i de oste, der havde høj plasminaktivitet.

I flere undersøgelser er indholdet af vand i fedtfri ost (VFFO) højere i oste fremstillet af pasteuriseret mælk end af rå mælk. Dette svarer til vores resultater i to af produktionerne, hvorimod indholdet var på samme niveau i en tredje produktion og højere i råmælksostene i en fjerde. Sidstnævnte kan muligvis forklares med, at fedtindholdet ikke var det samme i den rå mælk og i den pasteuriserede mælk.

Executive Summary

In Denmark, all milk used for production of soft cheese is pasteurized, a process believed by some to cause a loss of taste in the cheese. One of the main arguments against pasteurizing is the loss of diversity in the lactic acid bacteria. This is supported by evidence from hard cheeses; during the past decades the importance of non starter lactic acid bacteria as flavour producers in Cheddar and hard Swiss cheeses is increasingly being acknowledged.

The thesis examines the differences in the development of microbiological and some chemical indicators parameters in cheeses produced by raw and pasteurized milk respectively. This was done by producing four productions of a cheese of the Munster type. In each production a batch was developed by both raw milk and by pasteurized milk. During production and maturity of the cheeses a number of microbiological tests were carried out at the Royal Veterinary and Agricultural University. At the same time, a number of physical and chemical tests were carried out at Danish Institute of Agricultural Sciences. The four productions took place at different times of the year. This caused different results depending on whether the cows were grazing or in the stable. The results furthermore differed depending on the feed being grass or silage. The cheeses from the four productions showed quite large differences. These differences cannot be fully explained by seasonal differences but could be related to accidents during production. During the second production more *Enterobacteriaceae* were identified in the pasteurized milk than in the raw milk. This can only be caused by a post contamination of the milk following pasteurization.

The third production did not have significant numbers of *Enterobacteriaceae* in the milk. However, due to an inactive starter culture, the content of *Enterobacteriaceae* reached approximately 10^7 CFU per kilogramme after ten days. For the first and the fourth batches the production of cheeses did not create problems but the cheeses produced were of different sizes and are therefore not easily comparable. In all four batches a significantly higher level of bacteria from the starter culture was found in the cheeses from raw milk in spite of the quantity being identical to the quantity used in the pasteurized milk.

Only at a late stage of ripening did the Non Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) reach a level where it could have had an impact on the taste. On the other hand, several cheeses had a quite high level of *Enterobacteriaceae*, this includes *Hafnia alvei* which together with Lactic Acid Bacteria produces putrescin.

The level of plasmin activity in the three batches varied and was unexpectedly not higher in the cheeses made from pasteurized milk. A tendency to mature faster was identified in the cheeses with a high level of plasmin activity.

In several other studies the content of water in fat free cheese is higher in cheeses developed from pasteurized milk than in cheeses developed from raw milk. This confirms our results in two productions. On the other hand, the content of water was at the same level (in the two types of cheeses) in a third production and even higher in the cheeses from raw milk in a fourth production. The last result may be explained by different levels of fat in the raw milk and in the pasteurized milk.

Forord

Dette speciale i levnedsmiddelmikrobiologi med titlen ” Mikrobiologiske og kemiske forandringer i rødkitost - fremstillet af rå og pasteuriseret mælk” er udarbejdet på Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole ved Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet i perioden september 2002 til februar 2004. Specialet er udført som en del af et projektsamarbejde mellem Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole (KVL) og Danmarks Jordbrugsforskning (DJF), og er derfor udført indenfor en forudbestemt ramme.

En stor tak til Basheer Yousef Aideh, Anne-Marie Jydegaard Axelsen, Sandra Casani, Per Michael Christensen, Lene Gertman, Anne Lise Gravesen, Tina Beck Hansen, Susanne Knøchel, Peter Lange Møller, Dennis Sandris Nielsen, Joan Voss for hjælp og råd i laboratoriet samt hyggelig sameksistens.

Specielt tak til Henrik Kanstrup, Mogens Jensen og Evald Vestergaard for hjælp med ostefremstillingen.

Tak til Danmarks Jordbrugs Forskning; Jacob Holm Nielsen, Gitte Hald Kristiansen og Caroline Nebel.

Tak til René Højgaard for hjælp med tryk og printning.

En særlig tak til Tina Beck Hansen, Jesper Bruhn, Camilla Kruse og Julie Kruse for korrektur og konstruktiv kritik, uden jer ville dette speciale ikke være en realitet.

Til sidst en tak til mine vejledere Susanne Knøchel, Tina Beck Hansen og Peter Lange Møller.

Til allersidst en undskyldning til min datter Ella Kruse for at dette projekt har fyldt så meget i vores liv.

København, februar 2004

Kenneth S Højgaard
Stud. techn. al. B0963

Indholdsfortegnelse

Sammendrag	II
Executive Summary	II
Forord.....	III
Indholdsfortegnelse.....	IV
1 Indledning	1
2 Gennemgang af ostefremstilling	3
2.1 Ostetyper	6
3 Varmebehandling af mælk	8
3.1 Varmebehandlingsmetoder	8
4 Mælks fysisk-kemiske egenskaber	10
4.1 Kulhydrater	10
4.2 Fedt	10
4.3 Protein	11
4.4 Salte.....	14
4.5 Enzymer i mælken	15
4.6.....	18
5 Mikroorganismer i ost.....	19
5.1 Mælksens mikrobielle sammensætning.....	19
5.2 Starterkulturer	20
5.3 Patogene bakterier i mælk og ost.....	28
6 Metoder til undersøgelse af mikroorganismer i ost	31
6.1 Medier	31
6.2 Molekylære identifikationsmetoder	33
6.2.1 Bakteriers DNA (16s og 23s).....	33
6.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	35
6.2.3 Internal Transcribed Spacer-PCR (ITS-PCR).....	37
6.2.4 Sekventering	38
7 Materialer og metoder.....	39
7.1 Fremstilling af ostene.....	40
7.1.1 Pakning og transport af ostene.....	42
7.2 Mikrobiologiske analyser.....	43
7.2.1 Prøveudtagning	43
7.2.2 Medier	44
7.2.3 Isolering og rendyrkning.....	44
7.2.4 ITS-PCR.....	45
7.2.5 Sekventering	46
7.3 Kemiske analyser	48
7.3.1 pH.....	48
7.3.2 Vand i fedtfri ost	49
7.3.3 Fedt	49
7.3.4 Salt	49
7.3.5 D- og L-mælkesyre	49
7.3.6 Sensorisk bedømmelse.....	49
7.4 Dataanalyse	49
7.4.1 Beregning af CFU	49
7.4.2 PCA analyse.....	50
8 Resultater og deldiskussion.....	51
8.1 Symboler og koder	51

8.2	Første produktion	52
8.2.1	Sensorisk bedømmelse	52
8.2.2	Kemiske data – første produktion	53
8.2.3	Mikroorganismer i mælken – første produktion	54
8.2.4	Mikroorganismer i ostene – første produktion	55
8.3	Anden produktion	56
8.3.1	Kemiske data – anden produktion	57
8.3.2	Mikroorganismer i mælken – anden produktion	59
8.3.3	Mikroorganismer i ostene – anden produktion	60
8.4	Tredje produktion	61
8.4.1	Kemiske data – tredje produktion	62
8.4.2	Mikroorganismer i mælken – tredje produktion	64
8.4.3	Mikroorganismer i ostene – tredje produktion	65
8.5	Fjerde produktion	66
8.5.1	Kemiske data – fjerde produktion	67
8.5.2	Mikroorganismer i mælken – fjerde produktion	68
8.5.3	Mikroorganismer i ostene – fjerde produktion	69
8.6	Sammenligning af de fire produktioner	70
8.6.1	Mælkesyrebakterier	71
8.6.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	73
8.6.3	<i>Enterobacteriaceae</i>	74
8.6.4	Fækale coliforme bakterier	75
9	Opsamling og diskussion	76
10	Konklusion	84
11	Perspektivering	85
12	Forkortelsesliste	86
13	Litteraturliste	87

1 Indledning

I dag fremstilles stort set al ost i Danmark af varmebehandlet mælk, og i et forsøg på at distancere sig fra de store mejerier - og for at kunne forsvare en merpris for deres produkter – ønsker flere nye små mejerier at fremstille oste af ikke-varmebehandlet mælk (rå mælk). Det er for at sikre forbrugeren mod patogene bakterier, at mælken varmebehandles, men udover at inaktivere patogene bakterier, sker der også andre ændringer i mælken, som kan påvirke resultatet af en efterfølgende ostningsproces.

Produktion af ost foregår i tre stadier: fremstilling, primær modning og sekundær modning. Ved fremstillingen bliver mælken syrnede og det tilsatte løbeenzym får ostemassen til at koagulere. Det er hovedsagelig mælkesyrebakterierne *Lactococcus* spp. og *Lactobacillus* spp., der forårsager syrningen ved at forgære mælkesukker til mælkesyre. Denne syrning skal helst foregå så hurtigt som muligt, og ved et minimum af metabolisk diversitet for at undgå uønskede fermenteringsprodukter (Lawrence, Thomas & Terzaghi, 1976), samt for at sikre mod vækst af patogene bakterier i ostene (Tornadijo *et al.*, 2001). Selvom mesofile *Lactobacillus* spp. findes den rå mælk og i produktionsmiljøet, vil det være *Lactococcus* spp., der er dominerende under syrningen af rå mælk. *Lactobacillus* spp. vil være i mælken, hvor de bliver fundet som sekundær flora under modningen. Dette gælder primært for råmælksoste, men mesofile *Lactobacillus* spp. er også blevet fundet i oste fremstillet af pasteuriseret mælk. Under syrningen af ostene når mælkesyrebakterierne et niveau på ca. 10^9 CFU pr. g. men under modning falder niveauet hurtigt til 10^7 CFU pr. g. og en sekundær flora, også kaldet ”Non Starter Lactic Acid Bacteria” (NSLAB) (Shakeel, Fox & McSweeney, 2000), vil gro til et dominerende niveau.

Under den primære modning af ost fortsætter desuden hydrolyseringen af mælkens proteiner og polypeptider til mindre peptider og aminosyrer, og mælkefedtet hydrolyseres til frie fedtsyrer og glycerol. Disse hydrolyseringer, som er enzymatiske, bidrager til ostens smag og konsistens.

Den sekundære modning, som foregår samtidig med den primære, indebærer modificering af aminosyrer og frie fedtsyrer. Slutprodukterne forekommer i meget lave koncentrationer og bidrager mere til smagen end til konsistensen (Crow *et al.*, 1993). En varmebehandling af mælken vil føre til denaturering af serumproteiner samt ændringer i enzymaktivitet, f.eks. aktivering af plasminogen, inaktivering af lipaser og cathepsin D (Grappin & Beuvier, 1997), og vil derfor kunne indvirke på ostens konsistens og smag.

Hvis ostemælk ikke varmebehandles, er syrningen en af de største forhindringer for de patogene bakterier, og hastigheden samt graden af syrningen vil være altafgørende for sikringen af råmælksostene mod forekomst af patogene bakterier. Der er dog grænser for, hvor hurtigt syrningen kan foregå; for det første fordi løbeenzymene er svære at styre ved lavt pH, og høj aktivitet kan resultere i for faste oste (Hyldig, 1993); for det andet fordi en hurtig syrning, som følge af en høj startkoncentration af mælkesyrebakterier vil medføre en øget proteolytisk aktivitet, som giver en bitter smag i osten (Crow *et al.*, 1993). Men hvis det ikke er muligt at frembringe et hurtigt pH-fald i begyndelsen af osteproduktionen vil det betyde, at der er en vis risiko for forekomst af patogene bakterier i råmælksoste. Er det så den risiko værd? Eller er det muligt at fremstille oste af samme sensoriske kvalitet af pasteuriseret mælk? Nicol og Robinson (1999) stillede samme spørgsmål i en, for nogen,

meget provokerende artikel. I samme artikel forsøgte de også at afprøve tesen om, at råmælksoste skulle have en mere kompleks smag – kompleks ment som noget positivt for forbrugeren. De fremstillede to batcher oste, den ene af pasteuriseret mælk og den anden af rå mælk. Desværre var resultatet, at de fik fremstillet to, hvad angår konsistens, meget forskellige batcher. Råmælksosten scorede dobbelt så høj værdi i ”chewiness” og i hårdhed, og kun det halve i klæbrighed i forhold til den pasteuriserede ost. Dette mente Nicol og Robinson (1999) dog ikke havde betydning for bedømmelsen af smagen, som smagspanelet i øvrigt fandt ens. Denne opfattelse delte Cunynghame og Dennis (1999), der begge er fra Specialist Cheesemakers Association, dog ikke, og i en artikel udtaler de, at man ikke kan sammenligne råmælksost med ost fremstillet af pasteuriseret mælk, hvis de har forskelligt vandindhold. Der er da også kun få studier, der har prøvet at beskrive forskellene mellem råmælksoste og oste af pasteuriseret mælk på et videnskabeligt plan. Det har kun været muligt at finde nogle enkelte studier og kun omhandlende hårde og halv hårde oste. Schweizeroste fremstillet af rå mælk er blevet vurderet til at have en mere intens og skarp (pungency) aroma, mens de pasteuriserede oste i samme undersøgelse blev vurderet som mere sure og bitre (Beuvier *et al.*, 1997). Det samme blev fundet i cheddar, hvor et ekspertpanel vurderede højere score i frugtagtig/sød samt uren aroma jo mere rå mælk, der blev tilsat den pasteuriserede ostemælk (Rehman *et al.*, 2000). En anden undersøgelse har vist, at cheddar fremstillet af rå mælk havde et højere antal NSLAB end ost fremstillet af pasteuriseret mælk (McSweeney *et al.*, 1993). Hovedparten af alle undersøgelser af NSLAB er med cheddar (Wouters *et al.*, 2002), og enkelte med andre hårde og halv hårde oste. Det har ikke været muligt at finde artikler om NSLAB i bløde oste, derimod er der flere undersøgelser af mulige patogene bakterier i bløde oste. Bløde oste har været årsagen til en række levnedsmiddelforgiftninger, hvilket skyldes, at pH i en blød ost hurtigt kommer op på ca. 7 under modningen. Derfor er det i Danmark og en række andre lande ikke tilladt at fremstille bløde oste af rå mælk. De råmælksoste, der gives tilladelse til at producere i Danmark i dag, er af den hårde type og med en lagring på mindst 6 måneder.

Dette speciale omhandler dele af resultaterne fra projektet ”Production of raw milk cheese and content of phyto-estrogens from organic produced milk” med KVL og DJF, og ser på de forskelle, der var i bløde oste fremstillet af pasteuriseret mælk og rå mælk.

Formålet med og fokusområderne i dette speciales eksperimentelle arbejde var:

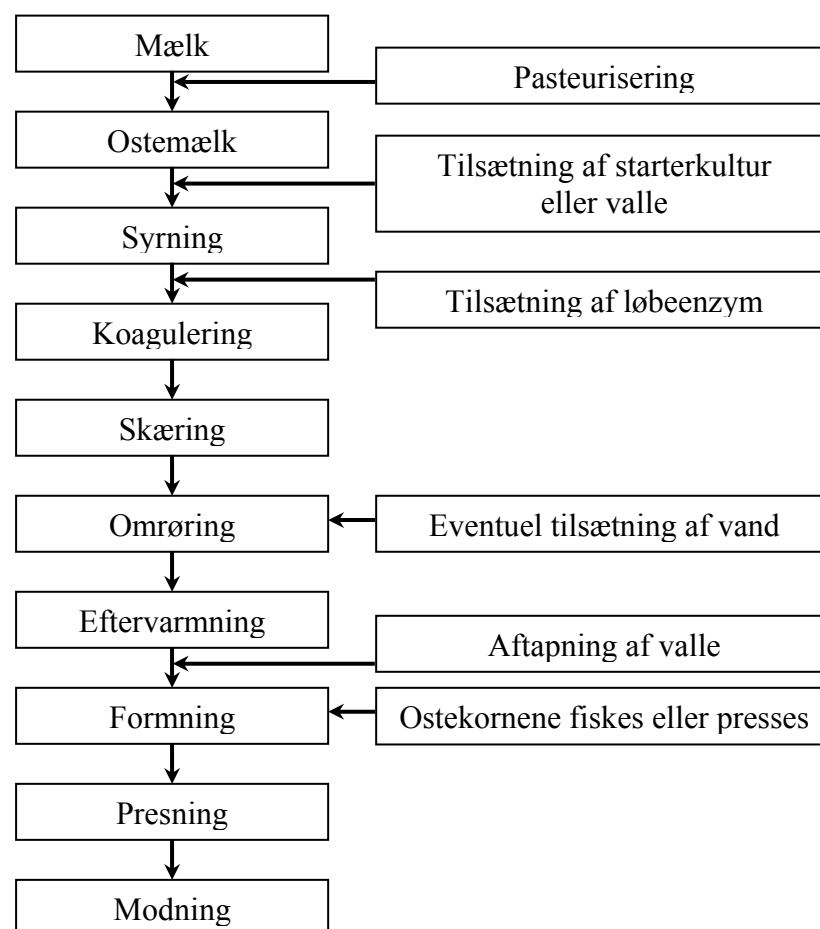
- 1) at dokumentere procesflowet for rødkitoste af munstertypen som et led i HACCP
- 2) at undersøge om der er forskel i udviklingen af mikrobiologiske og enkelte kemiske parametre mellem oste fremstillet af rå og af pasteuriseret mælk
- 3) at undersøge sæson- og anden variation mellem 4 produktioner over en et-årig periode

2 Gennemgang af ostefremstilling

Ost er en gammel måde at konservere mælk på, og under fremstillingen koncentrerer protein og fedt fra mælken. Således giver ca. 10 liter mælk 1 kg. ost.

En ost kan være hård eller blød, stærk eller mild, men den bliver fremstillet på stort set samme måde – disse forholdsvis store forskelle skyldes små justeringer under produktionen. Der er stor forskel på, hvilke ostetyper, der traditionelt produceres i forskellige lande; f.eks. cheddar i England, emmentaler i Schweiz, parmesan og gorgonzola i Italien, camembert i Frankrig, danbo i Danmark. I dette afsnit bliver den basale ostefremstilling gennemgået (Figur 2-1), og nogle af de væsentlige produktionsmæssige detaljer vil blive beskrevet i de følgende afsnit.

Fremstilling af ost



Figur 2-1 diagram over ostefremstillingens forskellige procestrin (Kristensen, 1995).

Al ostefremstilling starter med en standardisering af mælken, så det ønskede fedtindhold opnås.

Varmebehandling

Næsten alt mælk bliver i dag varmebehandlet for at sikre mod patogene bakterier. Sammen med de patogene bakterier vil også mælkesyrebakterier blive inaktiveret og diversiteten være begrænset. Varmebehandlingen påvirker mælken fysisk og kemisk, idet nogle af proteinerne og enzymerne i mælken vil denaturere og nogle af de kemiske ligevægte blive forskudt.

Råmælk er normalt betegnelsen for den første mælk, der kommer efter en fødsel (colostrum), men i osteproduktion er det betegnelsen for ostemælk, der ikke er varmebehandlet.

Syrning

Ostemælken bliver syrnede ved, at bakterier omsætter laktosen til mælkesyre (fermentering). Den mest kendte måde er at anvende en starterkultur, men de bakterier der findes i mælken (hovedsagligt i den rå mælk) kan også anvendes (spontanfermentering), eller der kan tilsættes nogle bakterier fra en tidligere osteproduktion i form af valle (backslopping)(afsnit 5). Denne mælkesyredannelse og dermed følgende pH-fald, er af stor betydning for ostens sammensætning, modningsensenzymernes virksomhed og ostens smag. Derudover bliver eventuelle patogener hæmmet af syren og desuden begrænset i vækst når laktosen opbruges. Styrken af syrningen afhænger primært af mængden af tilsat starterkultur, men også mælkenes kvalitet og temperaturen influerer (afsnit 4.5 og 5) (Nielsen, 2000).

Løbe

Efter syrningen bliver ostemælken tilsat enzymer (Løbe afsnit 4.5), som får mælken til at koagulere. Hvor hurtigt løben virker afhænger af temperatur og pH - en kombination af høj temperatur og lav pH vil give den hurtigste koagulering (Nielsen, 2000).

Skæring

Når den koagulerede ostemasse har den ønskede fasthed skæres den i (mindre eller større) tern, og vollen løber fra (synerese). Ternenes størrelse indvirker på, hvor meget valle der løber fra; mindre tern vil øge valleudskillelsen, mens store tern vil holde på vollen. Mængden af vand i fedtfri ost (VFFO), afhænger af, hvor meget valle der løber fra, og har indflydelse på konsistensen, syrningen og den bakterielle udvikling under den efterfølgende modning (afsnit 4.5). Et lavt indhold af VFFO vil give en hård ost (f.eks. parmesan og emmentaler, se Figur 2-2) og et højt indhold af VFFO vil give en blød ost (f.eks. camembert og munster, se Figur 2-2) (Nielsen, 2000).

Eftervarme

Koagelets evne til at binde løst vand afhænger af temperaturen. Vandbindingsevnen aftager med stigende temperatur og derfor benyttes eftervarme til fremstilling af faste og halvfaste oste, da varmen giver et mere fast koagel. En eftervarmning af ostemassen kan øge væksten af bakterier og syreproduktionen, men bliver eftervarmen for kraftig kan nogle af bakterierne blive inaktiveret og syreproduktionen i stedet falde. Der er derfor stor forskel på, hvor meget eftervarme der benyttes til henholdsvis termofile og mesofile starterkulturer (Figur 2-2). Eftervarmningen kan foregå ved tilsætning af varmt vand til vollen og osteternene. Derved bliver ostenes minimum-pH højere, idet mængden af bakterier fortyndes, og desuden fordi der sker en ændring i saltlige vægte i osten (afsnit 4.4) (Najera, de Renobales & Barron, 2003; Kristensen, 1995).

Valleaftapning

Ostemassen skal adskilles fra vollen, enten ved fiskning eller ved at osten bliver opstukket. Fiskning foregår ved, at vollen sigtes fra, og ostekornene fiskes op i nogle forme. Derved kommer ostekornene i kontakt med luften, hvilket kan give nogle kantede og ikke runde huller (f.eks. havarti, Figur 2-2). Opstukket ost bliver presset i bunden af ostekarret før vollen bliver tappet af. Derved kommer der ikke luft mellem ostekornene, og osten vil blive blank

uden huller, dog undtaget dem, der eventuelt senere bliver dannet af bakterierne (f.eks. danbo, Figur 2-2)(Kristensen, 1995).

Presning

Efter ostene er kommet i forme bliver de presset, og mængden af valle der løber fra afhænger af, hvor langt tid og hvor hårdt presset er. En parmesan ost bliver presset i 3 døgn, mens en danbo presses i en 1 time (Figur 2-2). Bløde oste bliver som regel ikke presset, men blot vendt nogle gange (Kristensen, 1995).

Saltning

De fleste oste saltes efter de er blevet formet, enten ved at blive lagt i saltlage eller ved tørsaltning. Saltet har flere funktioner i osten, dels giver det smag, men det påvirker også den bakterielle sammensætning og udvikling i osten (afsnit 22)(Nielsen, 2000).

Modning

Efter saltningen bliver mange oste smurt med en overfladekultur, som består af skimmel, gær og samt af forskellige bakterier. Denne overfladekultur vil bidrage til smag og konsistens under modningen. Modningen foregår i etaper. Første etape er ved ca. 20 °C og være ca. en uge, derefter bliver ostene flyttet til en lavere temperatur mellem 5-15°C – hvor de ligger mellem 2 uger og flere år afhængig af type.

Under lagringen bliver ostene visket med saltvand for at modvirke ukontrolleret skimmeldannelse på overfladen.

2.1 Ostetyper

En markant variation mellem forskellige typer ost, er konsistensen. Ostens konsistens dækker over en række fysiske egenskaber. Begrebet er ikke veldefineret, og der er ikke udviklet nogen målemetoder, som entydigt giver en værdi, der kan beskrive konsistens af en ost. Ostens konsistens kan opdeles i fasthed og brudstyrke, hvor fastheden er forholdet mellem fast og flydende stof og brudstyrken er den kraft, der skal til for at bryde osten (Nielsen, 2000).

Det er naturligt at skelne mellem fedtet og den fedtfri del. I den fedtfri del er der en sammenhæng mellem fastheden og mængden af vand i forhold til tørstof, derfor udtrykkes mængden af vand i en ost som procent vand i fedtfri ost (VFFO). Dette vand er enten fastbundet til proteinet, i osten som løst kapillarbundet vand eller som immobiliseret vand.

Det fastbundne vand er bundet i hydrogenbindinger til proteinet. Det kapillarbundne vand ligger i de kapillarer, der er mellem kaseinmicellerne, og det immobiliserede vand ligger som vand, fanget i ostemassen (Nielsen, 2000). Jo mere vand der er i en ost, desto mere blød er den (Tabel 2-1)(Nielsen, 2000).

Tabel 2-1 Gruppebetegnelser i forhold til Vand i fedtfri ost (Nielsen, 2000)

Betegnelse	Vand i fedtfri ost	Eksempel
Ekstra hård	< 51 %	parmesan
Hård	49-56 %	emmentaler
Fast	54-63 %	danbo
Halvfast	61-69 %	danablue
Blød	>67 %	brie, camembert og munster



Parmesan Hård	Emmentaler Mellemhård	Cheddar Mellemhård kort	Danbo Fast, smidig	Havarti Fast, smidig	Gorgonzola Halvfast, kort	Camembert Blød	Munster Blød
Råmælk	Råmælk	Past. 72°C	Past. 72°C	Past. 72°C	Råmælk	Past. 72°C	Past. 72°C
Min. pH 5,1	Min. pH 5,3	Min. pH 5,0	Min. pH 5,2	Min. pH 5,2	Min. pH 4,7	Min. pH 4,5	Min. pH 4,5
Thermofile + <i>Lc. lactis</i>	Thermofile + Propionsyre bakterier	<i>Lc. lact.</i> + <i>Lc. crem.</i>	<i>Lc. lact/crem</i> <i>Lc. diacetyl</i> <i>Leu. crem.</i>		Thermofile	<i>Lc. lact/crem</i> <i>Lc. diacetyl</i> <i>Leu. crem.</i>	<i>Lc. lact/crem</i> <i>Lc. diacetyl</i>
Skæres 2 mm	Skæres 2 mm	Skæres 5 mm	Skæres 6 mm	Skæres 10 mm	Skæres 10-20 mm	Skæres 20 mm	Skæres 10 mm
Eftervarme 56°C	Eftervarme 55°C	Eftervarme 38°C	Eftervarme 37°C	Eftervarme 38°C	Ingen eftervarme	Ingen eftervarme	Ingen eftervarme
Ingen vand- tilsætning	Ingen vand- tilsætning	Ingen vand- tilsætning	Tilsætning af 20% vand	Tilsætning af 20% vand	Ingen vand- tilsætning	Ingen vand- tilsætning	Ingen vand- tilsætning
Røring 1 time	Røring 2 timer	Røring 1½ time	Røring 1-1½ time	Røring 1-½ time	Let røring	Let røring	Let røring ½ time
Stukket	Stukket	Cheddaring	Stukket	Fisket	Fisket	Fisket	Fisket
Presning 3 døgn	Presning 20 timer	Presning 20 timer	Presning 1 time	Presning ½ time	Ingen presning	Ingen presning	Ingen presning
Saltlage 3 uger 2,5 % NaCl ^a	Saltlage 3 dage 0,8 % NaCl ^a	Tørsaltning 1,7 % NaCl ^a	Saltlage 2 dage 1,8 % NaCl ^a	Saltlage 2 dage 2,0 % NaCl ^a	Saltlage 2 dage 3,3 % NaCl ^a	Saltlage 4 timer 1,5 % NaCl ^a	Tørsaltning 2,0 % NaCl ^a
Ingen over- flademodning	Ingen over- flademodning	Ingen over- flademodning	Kit	Kit	<i>Penicilium</i> <i>roqueforti</i>	<i>Penicilium</i> <i>Camemberti</i>	<i>Brevibacteri</i> <i>um linens</i>
Modning 15-10°C 24 Mdr.	Modning 10, 25 & 10°C ½, 2 & 2 Mdr.	Modning 10°C 6-10 Mdr.	Modning 18-12°C 3-6 Mdr.	Modning 18-12°C 3-6 Mdr.	Modning 9°C 2-3 Mdr.	Modning 15-10°C 1 Mdr.	Modning 18-8°C 1 Mdr.
VFFO ^b 40%	VFFO ^b 53%	VFFO ^b 53%	VFFO ^b 59%	VFFO ^b 59%	VFFO ^b 63%	VFFO ^b 70%	VFFO ^b 70%

^a % NaCl af hele osten, ^b VFFO – Vand i fedtfri ost

Figur 2-2 Forskellige oste og deres karakteristika opstillet efter hårdhed (Nielsen, 2000; Fox, Cogan & McSweeney, 2000)

I rapporten vil blive nævnt flere forskellige oste og Figur 2-2 er et diagram over de forskellige procestrin, som har indflydelse på ostenes fremtræden. Dette diagram er tænkt som hjælp til et hurtigt overblik over forskelle og ligheder ostetyperne imellem.

3 Varmebehandling af mælk

I slutningen af det 19. århundrede skete der en stor udvikling i dansk mejeribrug. Det første andelsmejeri åbnede i 1882, og blot 18 år senere (år 1900) var der i Danmark 1029 andelsmejerier, 264 herregårdsmejerier, 266 privatmejerier (Kloster, 1980). Produktionen af mælkeprodukter steg over en kort årrække; fra 16 millioner kg i 1875 til 3.020 millioner kg mælkeprodukter i 1904 (Kloster, 1980). Centraliseringen af mælkeforsyningen gav anledning til epidemier, da sygdom fra en enkelt besætning kunne spredes til al mejeriets mælk. Der var i årene 1882-95 ikke færre end 98 epidemier (tuberkulose, kalvekastningsfeber og svingefeber/*Brucella* infektion) samt 53 tyfusepidemier, alle forårsaget af mælk (Kloster, 1980).

Louis Pasteur opdagede omkring 1860, at hvis vin blev opvarmet til 50-60 °C i få minutter, kunne mikrobiel ødelæggelse af vinen udskydes eller i bedste fald forhindres (Robinson, 2003). I årene efter 1884 udførte docent Fjord en række forsøg med at varmebehandle mælken før smørfremstilling. Mælken blev kontinuerligt opvarmet til omkring 75 °C og derefter afkølet til 5-6 °C. Konklusionen var, at kvaliteten af græssmør – smør fra køer som gik på græs - kunne højnes, og staldsmør – smør fra køer, der gik i stald om vinteren - kunne forbedres endnu mere. Allerstørst var forbedringen, hvis mælken havde et højt kimtal. Ligeledes blev det iagttaget, at en hurtig afkøling var afgørende for at undgå kogt smag og lugt (Lund, 1891).

I 1898 kom den første lov om varmebehandling af mælk i Danmark "Lov om foranstaltninger til bekæmpelse af tuberkulose hos hornkvæg". Den forbød mejerier at udlevere mælk og kærnemælk som kreaturføde uden at det havde været opvarmet til 85 °C, ligeledes måtte mælk ikke indføres fra udlandet, medmindre det havde været opvarmet til 85 °C. Denne lov siger intet om dansk mælk og mælkeprodukter til menneskeføde (Mælkeritidende 1899). Først i 1942 blev der indført en bestemmelse om tvungen varmebehandling af mælk, og siden har der ikke været egentlige epidemier forårsaget af mælk og mælkeprodukter i Danmark (Kloster, 1980).

Krav om varmebehandling af mælk til ostefremstilling kom først i 1994 (bekendtgørelse nr. 902 af 29/11 1993), der blev dog givet dispensation til to mejerier, der på daværende tidspunkt fremstillede oste af ikke-varmebehandlet mælk. De krav, der blev stillet i dispensationerne, er stort set lig EF-direktivet 92/46/EFØ af 16. juni 1992 om sundhedsbestemmelser for produktion og afsætning af rå mælk, varmebehandlet mælk og mælkebaserede produkter (Vitting, 1999).

3.1 Varmebehandlingsmetoder

Når mælk varmebehandles er det for at sikre produktet mod uønskede bakterier og enzymer, uden at det går ud over produktets nærings- og smagskvalitet. Derfor er det vigtigt at definere, hvilke mikroorganismer, der udgør en potentiel risiko, og udforme varmebehandlingen, så den eliminerer denne risiko uden at skade produktet. Bakterier i mælk vil blive gennemgået i afsnit 5. Der findes flere typer varmebehandling, og det er vigtigt at definere temperatur og tid for en given behandling, for derved at undgå misforståelser.

Lavpasteurisering

Lavpasteurisering kaldes også bare for pasteurisering, og er en varmebehandling på minimum 71,7 °C i 15 sekunder. I Danmark er det et lovkrav, at alle mælkeprodukter, udover blåskimmelmodnede oste, skal pasteuriseres. Ved en pasteurisering dræbes de fleste vegetative celler, men ikke sporer (de Buysen *et al.*, 2001; Nielsen, 1999). Fund af fosfatase i mælk bliver i mange lande brugt som indikator på mangelfuld pasteurisering, da mindst 99,6 % af fosfatase inaktiveres ved en pasteurisering på 72 °C i 15 sekunder eller ved 63 °C i 15 min. Allerede i 1927 blev det vist, at den varmebehandling, der skulle til for at inaktivere fosfatase var rigeligt til at sikre minimum en 4 log reduktion af *Mycobacterium tuberculosis* (Nielsen, 1999). Tuberkulosebakterien er anset som værende en af de mest varmeresistente blandt smittefarlige bakterier, der findes i mælk, og derfor sættes en negativ fosfatasetest lig en tilstrækkeligt varmebehandling for at sikre fødevarer (Nielsen, 1999).

Termisering

Den mest skånsomme metode kaldes for termisering, og er en varmebehandling på 57-68 °C i mindst 15 sekunder, som har til formål at reducere mikrobiel og enzymatisk aktivitet i mælken. Bruges mest til mælk beregnet til ostefremstilling, som er af dårlig kvalitet eller skal gemmes nogle dage (de Buysen *et al.*, 2001; Nielsen, 1999). Myndighederne brugte begrebet termisering i bekendtgørelse nr. 902 af 29/11 1993 om fremstilling af blåskimmelmodnet ost, hvor der gives lov til at benytte en varmebehandling, der er mere skånsom end pasteurisering. Termiseringen skal foretages senest 72 timer efter malkningen, og kimtallet før termiseringen må ikke overstige 300.000 CFU pr. ml. ved 30 °C (de Buysen *et al.*, 2001; Nielsen, 1999). Fucosidase kan bruges som indikator for, om mælken har gennemgået en termisering, da 50% af fucosidasen inaktiveres ved 60°C i 15 sekunder og 99% ved 65°C i 15 sekunder. Også fosfohexoseisomerase med en inaktivering på 50% ved 65 °C i 15 sekunder kan bruges som indikator (Nielsen, 1999).

Højpasteurisering

Højpasteurisering er en varmebehandling ved 87-90 °C i 15-29 sekunder, hvorved mælken bliver både fosfatase- og peroxidase-negative. Denne varmebehandling bliver brugt til fløde og smør, samt til mælk som skal syres til surmælksprodukter, men benyttes kun sjældent til ostemælk (de Buysen *et al.*, 2001; Nielsen, 1999). Peroxidase bliver i flere lande brugt som indikator for mangelfuld højpasteurisering, idet enzymet inaktives ved 83 °C i 15 sekunder. Denne inaktivering er dog kun midlertidig, idet enzymet igen er aktivt efter kort tid. Hvis inaktiveringen skal holde i mindst tre døgn skal varmebehandlingen minimum være 88-90 °C i 15 sekunder. Peroxidase er et bakteriostatisk stof, og de fleste bakterier vil vokse hurtigere efter en inaktivering af dette enzym (Nielsen, 1999).

Sterilisering

UHT-mælk (Ultra Høj Temperatur) har gennemgået en varmebehandling ved 135-150 °C i få sekunder og gør mælken steril dvs, at alle bakterier og sporer er dræbt. Denne metode benyttes ikke på mælk til osteproduktion (Nielsen, 1999).

Det er bedst at undgå begreber som u- eller ikke-pasteuriseret mælk, da det kan være uklart om der er tale om termiseret eller rå mælk (de Buysen *et al.*, 2001; Nielsen, 1999). Alle varmebehandlingstyper har til formål at forberede den mikrobiologiske kvalitet af mælken, men indvirker også på de fysiske og kemiske ligevægte. Hvad der sker i mælken vil blive beskrevet i afsnittet om mælkens bestanddele.

4 Mælks fysisk-kemiske egenskaber

Når en ko kælver, vil den begynde at producere mælk. Denne produktion vil stige de første par måneder, og vil herefter falde i resten af den periode, koen danner mælk (laktationsperioden).

Fra en fysisk-kemisk synsvinkel er mælk en meget kompliceret væske, der består af kulhydrater, protein, fedt, salte og vand (Fox & McSweeney, 1998). Hvis mælk påvirkes fysisk eller kemisk, vil alle ligevægte blive forskudt og mælken ændre karakter. Disse ændringer i mælken er årsagen til, at det er muligt at fremstille ost, og grunden til, at mælkenes bestanddele og ligevægte bliver beskrevet i det følgende afsnit.

4.1 Kulhydrater

Kulhydraterne i mælk findes primært i form af laktose, som derfor også kaldes mælkesukker. Mælk fra køer indeholder gennemsnitligt 4,9 % laktose, og er stigende gennem laktationsperioden (Walstra *et al.*, 1999).

Laktosen vil ikke blive påvirket af en almindelig pasteurisering, først ved højere temperatur (over 700 sekunder ved 115°C) vil der ske en Maillards reaktion mellem sukkeret og de fri aminogrupeer (Walstra *et al.*, 1999).

I produktion af ost vil laktose være den primære energikilde for mælkesyrebakterierne. Hvis mælk syrnes med en mesofil starterkultur (afsnit 5) vil syrningen og bakterievæksten standse ved omkring pH 4,5. På dette tidspunkt vil der stadig være omkring 3,8 % af laktosen tilbage så det er ikke på grund af mangel på næring, at væksten stopper, men fordi *Lactococcus* spp. og *Leuconostoc* spp. ikke tåler lavere pH. I oste nås minimum-pH ikke før ostekornene er hældt i form, og på dette tidspunkt er meget af vollen løbet fra. Derfor stopper syrningen og bakterievæksten i faste og halvfaste oste på grund af mangel på næring. I en samsøst (almindelig fast ost) vil pH ikke komme under ca. 5,2. Dette skyldes at ostens stødpudekapacitet er meget større end mælkenes, idet proteiner og fosfat er blevet koncentreret i osten. Bløde oste, som f.eks. camembert og munster, har et minimums pH på omkring 4,5, da disse oste har et højere vandindhold (valleindhold) og indeholder mere vandopløseligt laktose (Nielsen, 2000).

4.2 Fedt

Alt efter kvægrace vil fedtprocenten i mælk variere fra 3,3 % for Holsteiner køer til 5,3 % for Jersey køer. Hvor i laktationen koen er, har stor indflydelse på fedtprocenten. Den kan for eksempel starte på 5 % og falde til 4,2 % i løbet af de to første måneder og så stige til ca. 4,8 % i løbet af de sidste 8 måneder af laktationsperioden (Nielsen, 2001). Fedtet i mælken består hovedsagligt af triglycerider (98-98,5 %) og fosforlipider (0,6-1,0 %), derudover mono- og di-glycerider (0,3-0,4 %) og steroler (0,3-0,4 %). Fedtet findes i mælken som en olie i vand emulsion; en masse små kugler af fedt, der på grund af deres massefylde, vil flyde op til overfladen. Havde det være olie i vand ville olien flyde sammen, med det gør mælkefedtet ikke. Dette skyldes, at der rundt om mælkekuglerne er nogle proteiner og fosforlipider, som danner en fedtkuglemembran, som er hydrofil på overfladen. Denne hydrofile overflade vil binde vand og sammen med membranproteinernes negative ladning isolere fedtkuglerne, og beskytte mælkefedtet (Nielsen, 2001). Pasteurisering ved 72 °C i 15 sekunder har ingen

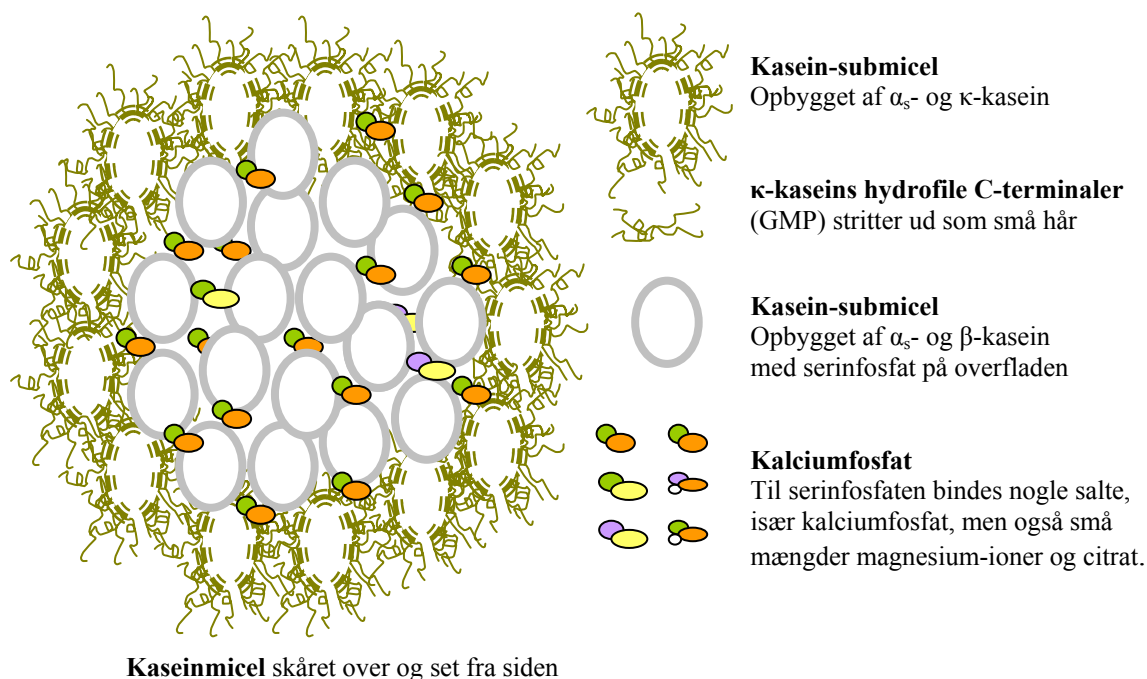
indvirkning på mælkefedtet eller den membran, der er uden om. Ved en kraftigere varmpåvirkning vil proteinerne i fedtkuglemembranen denaturere (Walstra *et al.*, 1999).

4.3 Protein

Mælk består af 3,5 % protein, som kan deles i to hovedgrupper: 75-80 % som kaseinmiceller bestående af α_{s1} , α_{s2} , β og κ -kasein og 20-25% som valleprotein (primært α -lactalbumin og β -lactoglobulin) samt en række enzymer. Sidstnævnte vil blive omtalt i et særskilt afsnit (4.5) (Fox & McSweeney, 1997).

Kasein

Der er 10^{14} - 10^{16} kaseinmiceller pr. ml mælk, og det er kaseinmicellernes evne til at sprede lys, der gør at mælk fremstår hvid. Kaseinmicellerne er meget stabile; de kan tåle 140 °C i 15-20 min. Hvis pH sænkes til 4,6, det isoelektriske punkt, vil micellerne dog aggregere og bundfælde. Kaseinmicellerne består af 15 % κ -kasein og 85 % α_{s1} -, α_{s2} - og β -kasein. Det er endnu ikke helt klarlagt, hvordan micellerne er opbygget, men det er en udbredt opfattelse, at de består af nogle sub-miceller. Disse sub-miceller består af α_s - og β -kasein eller α_s - og κ -kasein, og er holdt sammen af svovlbroer. 2/3 af κ -kaseinet er hydrofobt (N-terminalen), og 1/3 er hydrofilt (C-terminalen - GMP). Det er de sub-miceller, der indeholder κ -kaseinerne, som primært befinder sig i overfladen af kaseinmicellerne, og den hydrofile C-terminal stritter ud, som små hår på micellerne (Figur 4-1)(Fox & Kelly, 2003; Lucey, 2002; Walstra, 1999).



Figur 4-1 Kaseinmicel skåret midt over. På overfladen ses κ -kaseinets C-terminaler som små hår (mod. e. Walstra 1999).

α_{s1} , α_{s2} og β -kasein indeholder en betydelig mængde fosfor i form af serinfosfat, mens κ -kasein har et lavere indhold. Serinfosfaten binder kalcium, som binder uorganisk fosfor, og derved bliver submicellerne holdt sammen. Kaseinet kan på denne måde holde store mængder tungtopløseligt kalcium og fosfor i en kolloid opløsning, hvilket biologisk set har

stor betydning for mælks egenskaber som næring (Fox & Kelly, 2003; Lucey, 2002; Walstra, 1999).

Kaseinmicellerne er i en kemisk ligevægt, og vil blive påvirket af pH og temperatur (Figur 4-5 i afsnittet om salte). Ved højt pH er kaseinmicellerne negativt ladede, og den hydrofile del af κ -kasein (Glyko-makro-peptid = GMP) strækker sig ud fra micellerne - de før omtalte ”hår”. Derved bliver det hydrofile GMP-lag tykkere end ved lavt pH, hvor kaseinmicellerne er mere positivt ladede, hvorfor GMP-laget krøller mere sammen. Ved det isoelektriske punkt er GMP neutralt ladet og micellerne vil aggregere (Walstra *et al.*, 1999).

Serumprotein

Serumprotein findes i opløst form i vollen, og kaldes derfor også valleproteiner, selvom det ikke kun er serumproteiner, der udskilles med vollen. Der vil også være de GMP-ender, som er fjernet fra κ -kaseinet. Serumproteinerne er alle hydrofile og kompakt foldede proteiner, og er, i modsætning til kasein, ikke så modstandsdygtige overfor varme.

Mælk indeholder også to jernbindende proteiner lactoferrin og transferrin. Lactoferrin har en bakteriostatisk effekt i human mælk, men koncentrationerne (20-200 $\mu\text{g/ml}$) i bovin mælk er så lave, at det ikke regnes for at have nogen effekt (Fox & McSweeney, 2003). I Tabel 4-1 ses en oversigt over de fleste proteiner i mælk.

Tabel 4-1 Fordeling af proteiner i mælk (Walstra *et al.*, 1999)

Proteiner		g pr.kg mælk	% af totalt protein	% af totalt protein
Kaseiner	α_{s1} -Kasein	10,0	30,0	78,0
	α_{s2} -Kasein	2,6	7,8	
	β -Kasein	9,3	27,9	
	κ -Kasein	3,3	9,9	
	γ -Kasein	0,8	2,4	
Serumproteiner	β -Lactoglobulin	3,2	9,6	19,5
	α -Lactalbumin	1,2	3,6	
	Serum albumin	0,4	1,2	
	Proteose-peptone	0,8	2,4	
	IgG1, IgG2	0,7	2,1	
	IgA	0,1	0,3	
	IgM	0,1	0,3	
	Enzymer	0,8	2,4	2,4

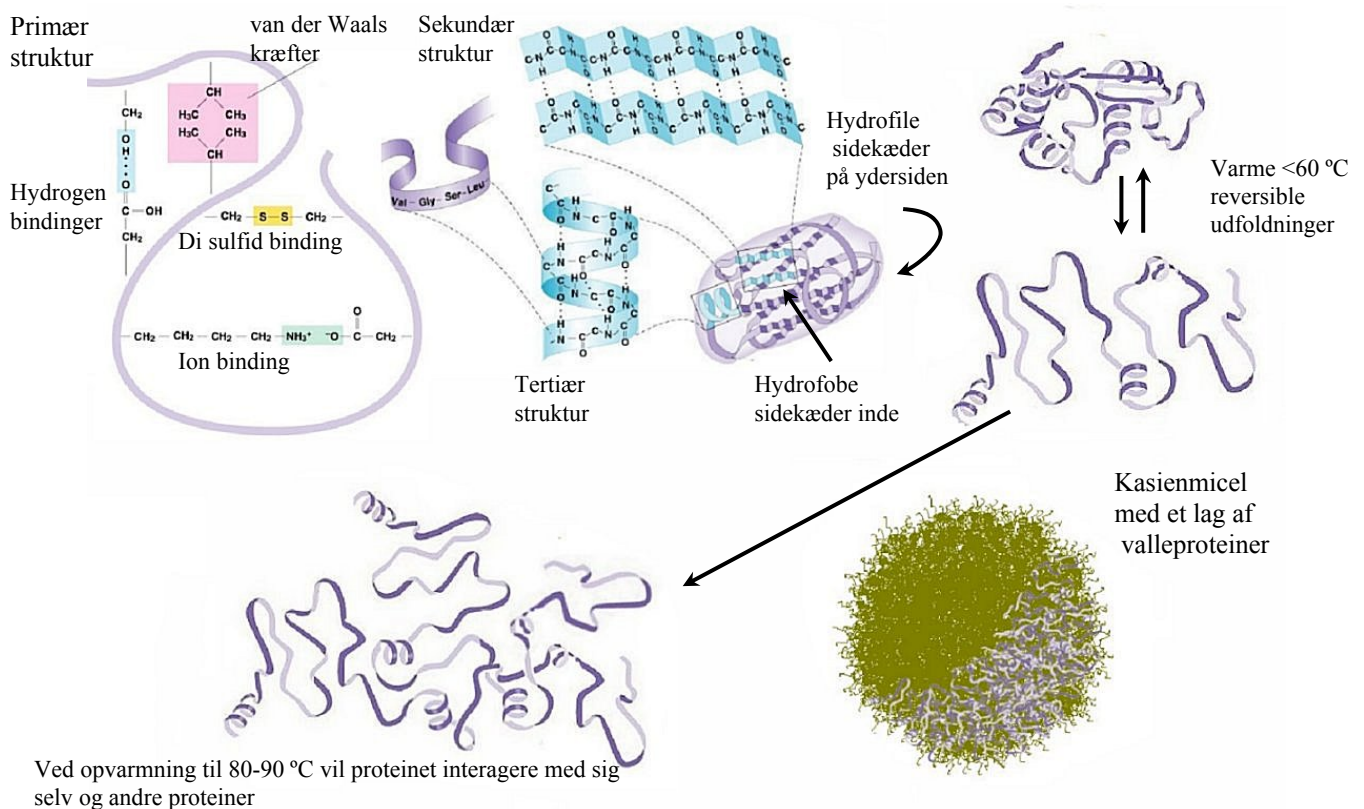
Varmebehandlings indvirkning på proteinerne

Normalt vil protein være foldet i en rumlig struktur, hvor brintbindinger får proteinkæderne til at danne lokale, sekundære strukturer. Hydrofobe bindinger mellem sidekæderne giver en sammenfoldet tertiær struktur. Når proteinerne bliver varmepåvirket vil brintbindingernes styrke falde i takt med den øgede temperatur. Styrken af de hydrofobe bindinger øges op til en temperatur på ca. 60 °C, ved højere temperaturer vil også disse bindinger svækkes. Ved temperaturer under 60 °C vil ændringer i strukturen som regel være reversible. Højere temperaturer (80-90 °C) vil medføre, at proteinerne denaturerer og interagerer med sig selv eller med andre molekyler (aggregerer). Kaseinet indeholder ikke mange sekundære og tertiære strukturer, og er derfor utroligt varmestabil, hvorimod serumproteinerne vil begynde at udfælde ved temperaturer over 65 °C (Singh, 1993).

Således vil omkring 7 % af serumproteinerne denaturere ved en almindelig lavpasteurisering (72 °C i 20 sekunder), 15 % ved 76 °C i 20 sekunder, og 24 % vil denaturere ved 80 °C i 15 sekunder. Der er intet, som viser nogen denaturering ved en termisering på for eksempel 65 °C i 15 sekunder (Lawrence, 1991).

Denaturering af valleproteiner kan også give problemer med varmevekslere, idet aflejring af protein samt calcium- og magnesiumfosfat (mælkesten), kan reducere varmeoverførslen. Disse aflejring giver også grobund for vækst af termofile bakterier, og der kan dannes biofilm (Nielsen, 1999).

Når mælk varmebehandles kraftigere end lavpasteurisering, sker der en formindskelse af løbeevnen, hvilket betyder, at evnen til at koagulere ved hjælp af løbe går langsommere, og koagelet bliver svagere og mere løst. Hvis mælken opvarmes til mere end 90 °C i 10 min er det umuligt at få mælken til at koagulere ved hjælp af løbe. Dette skyldes blandt andet, at opløseligheden af calciumfosfat falder, hvilket får Ca^{2+} koncentrationen til at falde, og den elektriske ladning af kaseinmicellerne til at blive mere negativ. Den øgede elektronegative ladning vil få kaseinmicellerne til at frastøde hinanden og gøre, at kaseinmicellerne ikke aggregerer. Når β -lactoglobulin koagulerer, vil proteinet folde sig ud og aggregerer til κ -kaseinet ved hjælp af blandt andet svovlbroer. På den måde vil kaseinmicellerne blive dækket af et lag af denatureret β -lactoglobulin (Figur 4-2). Varmedenaturering af serumprotein er afhængigt af pH; jo højere pH desto mere protein vil forblive i opløsningen, mens lavere pH vil føre til en øget aggregering. De andre serumproteiner vil indgå i lignende reaktioner med kaseinet eller aggregerer separat (Walstra *et al.*, 1999; Nielsen, 1999; Jelani & Rattray, 1995; Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

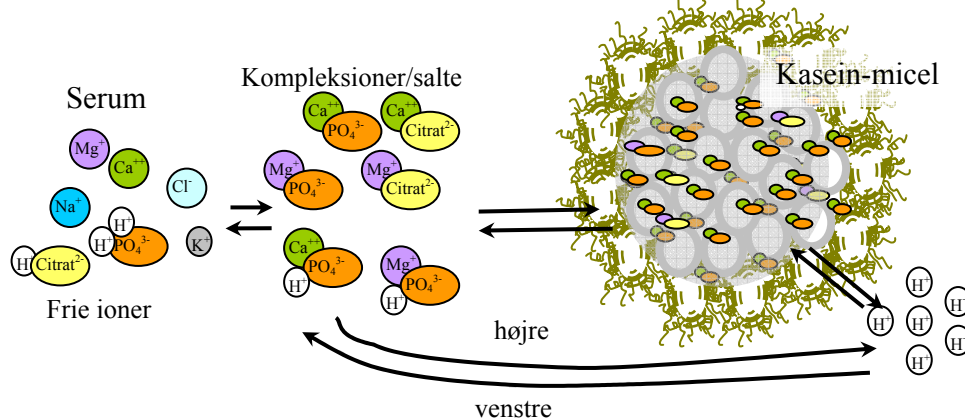


Figur 4-2 Proteins opbygning samt denaturering (Singh, 1993)

Når serumproteinerne binder sig til kaseinmicellerne, giver det i praksis et højere overgangstal, hvilket vil sige, at mere protein bliver bundet i osten og mindre i vallen. Desuden vil der blive bundet mere vand i osten, da serumproteinerne er mere hydrofile end kasein. Alt i alt mere ost af mindre mælk, men til gengæld bliver ostene mindre sammenhængende, får en bitter smag og modnes langsommere. Normalt vil man ikke kunne fremstille halvfast oste (f.eks. danbo) i en ønskelig kvalitet af højpasteuriseret mælk, selv om det vil være ønskeligt på grund af det øgede udbytte. Arla's "lillebror ost" er en undtagelse, da den er fremstillet af højpasteuriseret mælk, hvilket også er årsagen til at den skal spises i svagt modnet tilstand, idet lagring ville medføre nedbrydning af valleproteinerne, og giver osten en bitter smag (Nielsen, 1999).

4.4 Salte

Mælk indeholder en række salte, som består af kalium, natrium, kalcium, fosfat og klorid. Mælkens indhold af flere salte er større end hvad der kan være opløst, hvilket lader sig gøre, idet noget er opløst i serum og andet er bundet i kaseinmicellerne (Figur 4-3)(Nielsen, 2001).



Figur 4-3 Den fysiske fordeling af mælks mineraler og organiske salte (mod. E. Nielsen 2001).

Ligevægten mellem de salte, der er i kaseinmicellerne og dem, der er i serum, bliver påvirket af fysisk-kemiske ændringer. Forskydninger i saltligevægten vil have stor betydning for fremstillingen af ost. Under henvisning til Figur 4-3, vil nogle af disse ligevægte her blive gennemgået:

- Koncentrationen af H^+ ioner vil stige ved syring af mælk og forskyde ligevægten mod venstre. Denne forskydning vil føre til en øget koncentration af frie ioner og en reduktion af Ca^{2+} -ioner, som er bundet i kaseinmicellerne. Som resultat af dette fald, vil micellernes negative ladning stige, og føre til en øget frastødning mellem micellerne. Høj koncentration af Ca^{2+} -ionerne vil give en for fast ost, og lav vil give en sej og blød ost. Enzymernes evne til at få mælken til at koagulere afhænger af pH; for lavt pH vil give hårdere oste og for højt pH vil give bløde seje oste, og derved forstærker H^+ og Ca^{2+} -ionerne hinanden. Ved pH omkring 6; 5,5 og 5 er der henholdsvis 9 %, 24% og 50% opløst Ca^{2+} (Nielsen, 2000).
- Tilsætning af vand vil svare til at fortynde koncentrationen af frie ioner, og for at modvirke dette, vil ligevægten blive forskudt mod venstre. Micellernes saltindhold vil derfor falde (Nielsen, 2001).

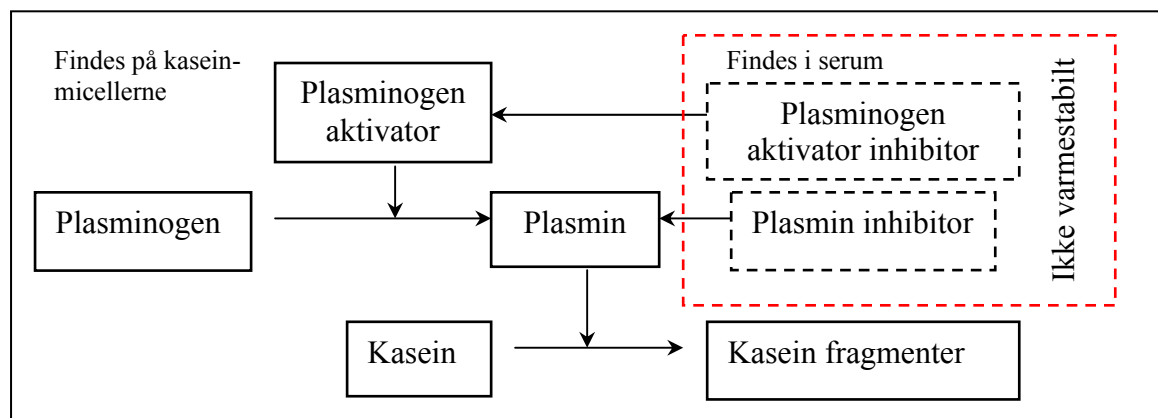
- Ved tilsætning af fosfat eller citrat vil ligevægten blive forskudt mod venstre, og der afgives calcium fra kaseinmicellerne. Da micellerne delvist bliver holdt sammen af disse salte, vil submicellerne løsne sig, og micellerne blive mindre. Da fosfat og citrat kan tilsættes som mere eller mindre sure salte, er det ikke til at forudsige indvirkningen på pH (Nielsen, 2001).
- Hvis mælken afkøles, vil opløseligheden af CaPO_4 stige således at ligevægten bliver forskudt mod venstre, og der afgives CaPO_4 fra kaseinmicellerne. Omvendt gælder det for Ca-citrat, at opløseligheden falder, og mere bliver bundet i micellerne. En afkøling af mælken vil gøre den længere tid om at koagulere ved hjælp af enzymer. Disse virkninger vil formindskes ved en efterfølgende pasteurisering af mælken, men ophæves ikke helt (Nielsen, 2001).
- Ved opvarmning vil opløseligheden af CaPO_4 falde, hvilket vil blive forstærket af, at Ca-citrats opløselighed stiger. Calciumfosfat vil udfælde og pH vil falde. Dette er sammen med denaturering af proteinerne grunden til, at pH falder efter pasteurisering (Nielsen, 2001).

4.5 Enzymer i mælken

I mælk er der to grupper enzymer; de naturligt forekommende, og de der er dannet af mikroorganismer.

Plasmin

Plasmin er et af de naturligt forekommende proteaser, som findes både som plasmin og som et forstadium hertil kaldet plasminogen. Plasminogen omdannes til plasmin ved hjælp af en plasminogen aktivator, som bliver inhiberet af en plasminogen aktivator inhibitor. Der findes også en inhibitor, som inhiberer plasmin. Inhibitorerne findes i serum, mens plasmin, plasminogen og plasminogen aktivatoren findes på kaseinerne (Figur 4-4)(Nielsen, 2002).



Figur 4-4 Plasmin i mælk findes hovedsagligt som plasminogen, der aktiveres af en plasminogen aktivator. Processen holdes tilbage af plasminogen aktivator inhibitor og plasmin inhibitor (mod. e. Nielsen 2002). — Varmestabile - - - Inaktiveres ved pasteurisering

Plasmin nedbryder α_{s1} - , α_{s2} - og β -kasein, mens det kun har lille eller ingen påvirkning på α -lactalbumin og β -lactoglobulin. κ -kasein bliver ikke nedbrudt af plasmin (Bastian & Brown, 1996). Plasmins optimum ligger ved pH 7,5 og 37 °C, men der er registeret

plasminaktivitet ved pH 5,2 (Bastian & Brown, 1996). Mælk indeholder 0,07-0,15 µg/ml plasmin og 0,7-2,4 µg/ml plasminogen (Chen, Daniel & Coolbear, 2003). I tilfælde af mastitis (yverbetændelse) vil niveauet af plasmin og plasminogen stige. Hvis antallet af somatiske celler stiger – udtryk for mastitis - fra 250.000 til 1.000.000, vil koncentration af plasmin og plasminogen blive ca. fordoblet. Selv efter kørerne er blevet raske, vil plasmin niveauet ikke falde til før mastitis niveau, hvilket måske er forklaringen på, at plasmin niveauet er højere, jo ældre dyret er (Bastian & Brown, 1996). Ved at tilsætte mælk fra køer med mastitis til et osteproduktion med mælk af god kvalitet, var et af resultateterne, at ostene fik et højere vandindhold (O'Farrell *et al.*, 2002).

I frisk mælk findes det meste af plasminen på plasminogen form, men ved en varmebehandling bliver de to inhibitorer nedbrudt (Figur 4-4), og plasmin aktiviteten stiger (Nielsen, 2002). Så selv om mellem 10 og 17 % af plasminen vil denaturere ved en varmebehandling på 72 °C i 15 sekunder, så vil aktiviteten stige med 30-40 %. Først ved en kraftig varmebehandling, 120 °C i 15 min, vil alt plasmin være denatureret (Bastian & Brown, 1996) Den øgede plasminaktivitet kan forårsage en bitter smag (Bastian & Brown, 1996; O'Farrell *et al.*, 2002).

Plasmins indvirkning på ostefremstilling er endnu ikke helt klarlagt, men det menes at have en stor betydning for schweizeroste, hvor den høje temperatur ved eftervarmebehandlingen af ostemassen inaktiverer alle tilsatte løbezymer som varmeresistent enzym vil plasmin derfor kunne spille en dominerende rolle (Bastian & Brown, 1996).

Plasmin er et alkalisk enzym men et pH optimum omkring 7,5, hvilket er grunden til, at der i camembert oste er fundet højere aktivitet under overfladen end inden i midten af ostene (Bastian & Brown, 1996).

Cathepsin D

Et andet enzym som er naturligt forekommende i mælk er cathepsin D, som er en sur aspartyl protease med et optimum ved omkring pH 4 og 37 °C. Cathepsin D hydrolyserer kasein ligesom chymosin (løbe), og bliver ikke inaktiveret ved pasteurisering. Effekten af cathepsin D vil blive overskygget af effekten af løbe, men ikke i produkter hvor der ikke er tilsat løbe, eller hvor løben er inaktiveret ved varmebehandling. Dette gælder for eksempel for kvark og schweizeroste (Grappin *et al.*, ; Hurley *et al.*, 2000).

Lipaser

Lipase kan både være et naturligt forekommende enzym og være dannet af mikroorganismer. Mælk indeholder mellem 10 og 20 nmol lipoprotein lipase (LPL) pr. liter, som hydrolyserer fedtsyre i 1. og 3. position fra triglycerider. Denne koncentration er nok til at gøre mælk harsk i løbet af 10 sekunder. Det sker dog ikke, idet lipoprotein lipasen hovedsagligt er bundet i kaseinmicellerne, og fordi fedtet i mælken er beskyttet af en proteinmembran (Walstra *et al.*, 1999). Normalt vil der kun ske en begrænset lipolyse i cheddar samt i de fleste hollandske og schweiziske ostetyper (gouda og emmentaler), især når ostene er unge. Selvom denne beskudne lipolyse er ønskelig, kan den hurtigt give ostene en ubehagelig smag. I gamle oste af disse typer har der været en del lipolytisk aktivitet, men her er indflydelsen på smagen balanceret med andre smagskomponenter f.eks. fra proteolyse (Walstra, Noomen & Geurts, 1993). Hollandske oste (gouda typen) fremstillet af rå mælk viste en øget mængde lipase i osten i forhold til oste fremstillet af pasteuriseret mælk, og dette selvom mælken var aseptisk malket og kun indeholdt en ubetydelig mængde lipolytiske

bakterier. Den lipolytiske aktivitet er højere i skimmeloste; hvor kun 2 % af triglyceriderne i gouda eller cheddar er hydrolyseret, er mellem 5 og 20 % hydrolyseret i en skimmelost. Den høje pH i skimmelostene gives som en mulig årsag til, at disse oste ikke smager harskt (Reps, 1993; Gripon, 1993). I en camembert er lipolysen altid størst lige under overfladen af osten, hvilket skyldes *Penicillium camemberti* på ostens overflade, som danner et lipolytisk enzym, og at pH i den ydre del af osten er højere end i midten. *Brevibacterium lines* - den bakterie, der benyttes som overfladebakterie til rødkitoste af munstertypen - danner også lipolytiske enzymer .

Løbe

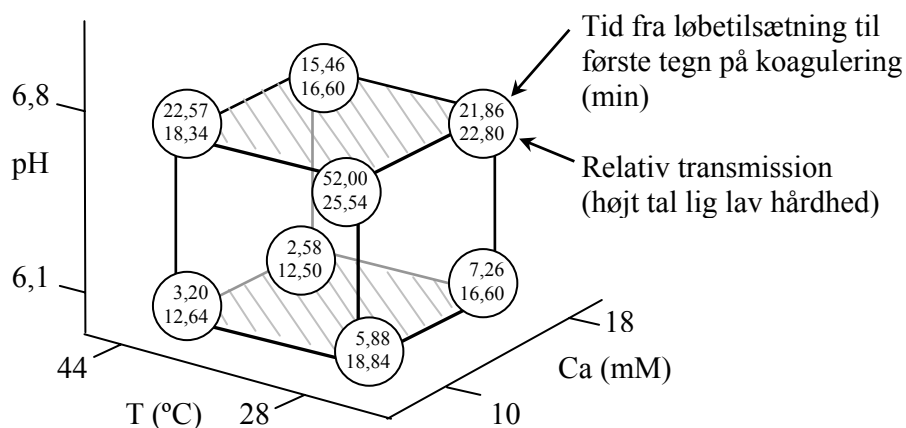
En række enzymer kan få kaseinpartiklerne til at polymerisere, men det mest benyttede er chymosin, som stammer fra kalvemaver og bedre er kendt som løbe. Den øgede osteproduktion i verden har medført, at brugen af alternative enzymer fra planter og bakterier er blevet mere udbredt (Walstra *et al.*, 1999).

Når løben tilsættes sker der to reaktioner; en primær, hvor der fraspaltes et hydrofilt makropeptid (GMP) fra κ -kaseinet (C-terminal), og en sekundær, hvor der sker en aggregering af de dannede hydrofobe para- κ -kaseiner. Disse reaktioner afhænger af enzymmængde, temperatur og pH (Hyldig, 1993). pH har stor betydning for hvor specifik Chymosin er; ved pH 6,7 er det kun κ -kasein, der bliver hydrolyseret, mens chymosin ved lavere pH vil blive mindre specifik (Hyldig, 1993). Normalt vil kaseinmicellerne have en negativ ladning ved mælks naturlige pH (6,6-6,7), hvilket gør, at micellerne frastøder hinanden. Men når GMP forlader micellerne, har para- κ -kasein kun en svagt negativ overskudladning, og derfor kan micellerne ved hjælp af Ca^{2+} aggregerer. Ved lav pH vil det negative overskud være endnu mindre og aggregeringen foregår hurtigere (Walstra *et al.*, 1999).

Mælk kan koagulere blandt andet ved hjælp af syre eller løbeenzymer. Ved syrekoagulering sænkes pH oftest ved hjælp af bakterier. Proteolytiske enzymer fra bakterierne spiller givet også en rolle, idet de klipper i κ -kaseinet (afsnit 4.3). Den primære årsag til den fysiske ændring er, at kasein bliver uopløseligt ved isoelektrisk pH (Hyldig, 1993). Hvis syrekoaguleringen sker ved 30 °C og uden omrøring, vil den gel, der dannes minde om en løbedannet gel, dog er den noget kortere og mere fast. Oftest vil man kombinere løbe og bakterier, og benytte en starterkultur til at katalysere løbekoaguleringen. Lavere pH giver en hurtigere geldannelse, hvilket har flere årsager; chymosins øgede aktivitet samt ændringen i kaseinmicellernes ladning og struktur (afsnit 4.4). Ved lavt pH vil noget af chymosinet også hæmmes, da det bliver absorberet på parakaseinet og derved indgår i osten. Denne absorption vil stige ved lavere pH, men ved mælks naturlige pH (6,7) er absorptionen dog begrænset (Walstra *et al.*, 1999).

pH har også betydning for, hvor meget chymosin der bliver tilbageholdt i osten. Sænkes pH fra 6,30 til 6,05 ved slutrøringen forbliver der dobbelt så meget chymosin i osten (Nielsen, 2000). Ikke kun chymosinindholdet påvirkes af pH, også løbehastigheden og dermed konsistensen forandrer sig som følge af pH ændringen. Ved ren syrekoagulering bliver osten kort og hård, modsat ved høj pH, hvor konsistensen bliver blød og lang. På Figur 4-5 ses hvordan temperatur, pH og calcium indvirker på løbehastighed og konsistens (Walstra *et al.*, 1999). Chymosin bliver varmeaktiveret. Når f.eks. en gouda ost eftervarmes til 38°C bliver der kun genfundet 11 % af løbeaktiviteten i osten. I emmentaler, parmesan og andre italienske

oste som eftervarmes til over 50 °C, sker der en fuldstændig eller næsten fuldstændig inaktivering af løbeenzymet (Nielsen, 2000).



Figur 4-5 Temperatur, pH og calciumkoncentrations indvirkning på løbeokoagulationstid og på hårdheden af koagulatet. Det øverste tal i cirklerne udtrykker tiden (min) fra løben er tilsat til det første tegn på koagulering, og det nederste tal udtrykker hårdheden målt som % af den relative transmission (højere tal repræsenterer lav hårdhed) (mode e. Najera, de Renobales & Barron 2003)

4.6

5 Mikroorganismer i ost

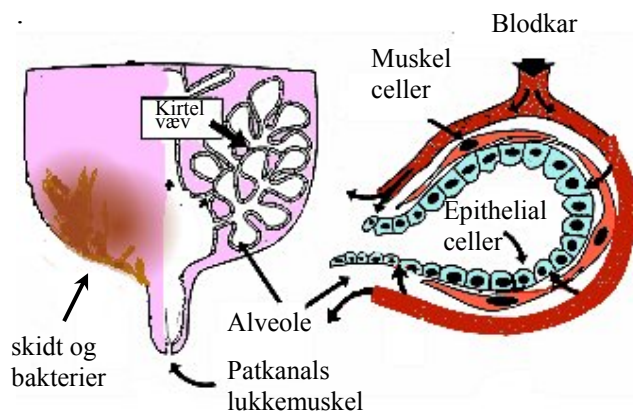
Når mælk bliver varmebehandlet sker der en reduktion i antallet af mikroorganismer, hvilket teoretisk set kunne give en forskel mellem oste produceret af varmebehandlet og af ikke-varmebehandlet mælk. Derfor vil der i følgende afsnit blive fokuseret på de organismer, der er i rå mælk, samt deres egenskaber og følger for osteproduktionen.

5.1 Mælkens mikrobielle sammensætning

Mælk er fra naturen side et godt medium for vækst. Dens indhold af proteiner, mineraler, fedt og masser af laktose er al den næring, der skal til for at holde en organisme i gang, og således er mælk også et godt vækstmedium for mikroorganismer. Mælken vil øjeblikkeligt blive vært for diverse mikroorganismer, nogen gange allerede før mælken forlader dyret.

Mælken produceres i alveolerne og vil fra et sundt og rask dyr være stort set steril, men allerede inden mælken er klar til at forlade pat-kanalen, vil den være kontamineret med en række bakterier. Antallet af bakterier fra en aseptisk malkning af en rask ko vil normalt være under 100 CFU pr. ml (Walstra *et al.*, 1999).

Under malkningen overføres bakterier fra huden på patterne til mælken. Disse bakterier stammer fra køernes fæces, støv og jord, og selvom rengøring af patterne vil fjerne nogle af bakterierne, vil det ikke være muligt at gøre patterne og huden omkring patterne sterile. Staldtype og årstid har stor indvirkning på, hvor mange bakterier der sidder på yveret, men også fodertype spiller en afgørende rolle. Blandt nogle af de bakterier, der via patterne kan blive overført til mælken, kan nævnes coliforme bakterier, fækale streptokokker, andre tarmbakterier, bakteriesporer, gær og skimmel, samt en række forskellige mælkesyrebakterier (Walstra *et al.*, 1999).



Figur 5-1 På yveret vil der sidde coliforme bakterier, fækale streptokokker, andre tarmbakterier, bakteriesporer, gær og skimmel, som vil blive overført til mælken ved malkning. (mod. e. Schroeder, 1997).

Antallet af bakterier vil variere fra ko til ko; lige efter malkningen kan der være fra næsten ingen til 15.000 CFU pr. ml mælk. Nogle af disse bakterier vil være patogene, andre vil give mælken en uønsket smag, hvorfor man vil prøve at undgå, at de i for stort antal ender i mælken. Der vil dog også være mælkesyrebakterier, som bidrager med positive egenskaber i form af bedre smag (Walstra *et al.*, 1999).

En ko besidder en række forsvarsmekanismer mod bakterier: fysisk afvisning ved hjælp af lukkemusklen i spidsen af patterne, biokemisk afvisning ved bakteriostatisk og bakteriocide

stoffer i keratinlaget af mælkekanalen og i selve mælken, samt den mekaniske rensning ved trykket af mælken under malkningen (Figur 5-1). Derfor er betændelse i yveret (mastitis) sjældent hos kødkvæg, mens højt-ydende malkekvæg vil være disponeret for mastitis, som skyldes mange års ensidige avl for høj mælkeydelse (Walstra *et al.*, 1999).

Når en ko har mastitis vil der være patogene bakterier i yveret og disse overføres i stort antal til mælken. Nogle af disse patogene bakterier er f.eks. *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli* (Walstra *et al.*, 1999).

Hvis køerne har infektioner andre steder end i yveret, kan nogle patogene bakterier blive overført til mælken via blodet. Blandt disse bakterier kan nævnes *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus* og en række vira. Det er derfor af stor betydning, at køerne, der benyttes som malkekvæg, er sunde og raske (Walstra *et al.*, 1999).

Malkeudstyret vil være en hyppig årsag til bakterier i mælken. Hvis udstyret ikke bliver gjort ordentligt rent mellem hver malkning, vil der kunne dannes en biofilm af bakterier, som derved overføres til mælken ved næste malkning. En biofilm vil nemt kunne dannes, hvis malkeudstyret er slidt, har revner eller blindgyder (Walstra *et al.*, 1999).

Udstyret i mejeriet kan ligeledes kontaminere mælken. I lukkede systemer vil bakterier primært stamme fra tidligere produktioner, mens der i et åbent system med manuel behandling også kan komme bakterier fra miljøet omkring udstyret. Selvom de ansatte i mejeriet har en god hygiejne og benytter desinficerende midler, vil det ikke kunne undgås, at der overføres bakterier fra de ansatte og deres redskaber til mælken (Walstra *et al.*, 1999).

Normalt vil mælken blive pasteuriseret inden den laves til ost, men selv efter en normal pasteurisering (72°C i 15 sekunder), vil der findes bakterier i mælken, som primært stammer fra en efterkontaminering i produktionsanlægget. I en undersøgelse blev der fundet *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* spp. *Lactobacillus* spp. *Escherichia coli* og *Enterobacteriaceae* i den del af produktionsanlægget, som lå efter pasteuriseringen (Walstra *et al.*, 1999).

5.2 Starterkulturer

Oprindeligt blev den mælk, man brugte til smør og ost, syrnede spontant ved at stille et fad på en bjælke under loftet. Kort tid efter opdagelsen af bakteriers betydning ved syring af mælk, begyndte man at sælge kulturer til at tilsætte mælken. Således var der i 1891 (året efter Storchs beretning om bakterier i smør) fire fabrikker, der tilbød mejerierne syreproducerende kulturer. De blev sendt ud som flydende medier klar til at tilsætte mælken. Men de skiftende temperaturer under transporten kunne være ødelæggende for kulturen, og derfor begyndte fabrikkerne at fremstille tørrede kulturer, som var nemmere at transportere (Knudsen, 1931).

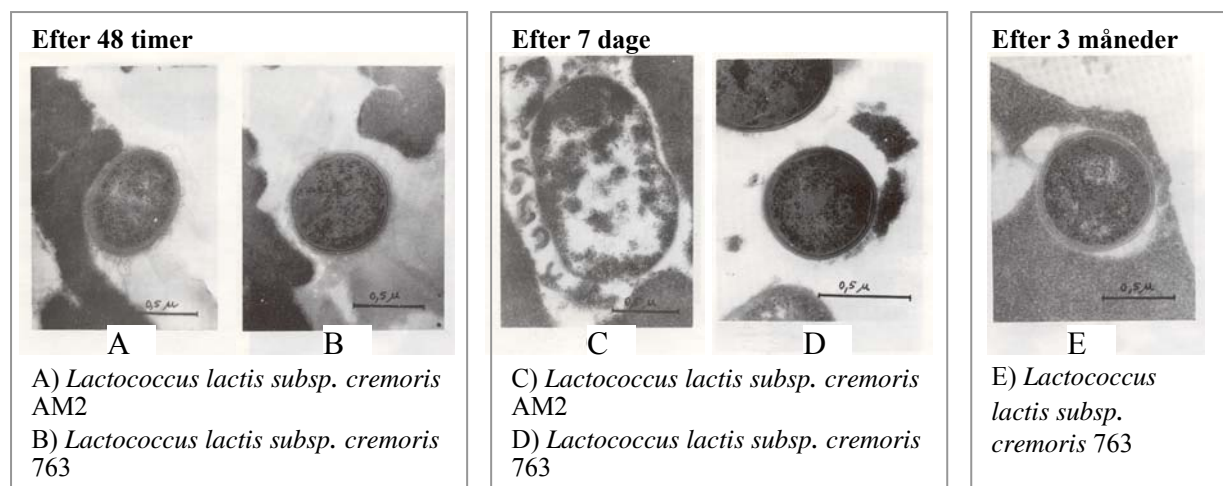
I dag er der stadig nogle, der benytter gårdsdagens valle som starterkultur. Dette kaldes for Back-slopping og benyttes især til fremstilling af traditionelle oste. I nogle lande er det et lovkrav, at det kun er tilladt at forny starterkulturen et vist antal gange om året. Dette er en del af nogle restriktioner, som skal beskytte nogle ostenavne, hvorfor disse oste skal fremstilles på en speciel traditionel måde og kun i bestemte regioner. Den dag i dag bliver der i Frankrig og Italien dagligt leveret flydende medier med starterkultur, klar til at tilsætte dagens produktion (Vogensen, 2003; Pedersen, 2003).

De fleste starterkulturer leveres dog som frysetørret, frysetørret koncentreret og frossen koncentreret starterkultur. Disse kulturer skal behandles lidt forskelligt; de koncentrerede – både frossen og frysetørret - kan hældes direkte i ostemælken, men kan også, som de ikke-koncentrerede, opformerer inden. Fordelene ved at hælde kulturen direkte i ostemælken er, at det er hurtigt, at risiko for bakteriofag angreb er mindre, og at man ikke risikerer at sænke pH for hurtigt. Ulempen er en forlænget nølefase, hvilket kan resultere i en forlænget syring, og manglende kontrol af starterkulturen før osteproduktionen (Cogan *et al.*, 1996).

En bakteriofag er en virus der angriber bakterierne ved at trænge ind i bakterierne og reproducere sig selv for derefter at ødelægge værtscellerne. Derved vil et bakteriofag angreb kunne resultere i en mangelfuld syring, især hvis starterkulturen ikke indeholder ret mange forskellige stammer. En fag vil som regel kun angribe nogle få stammer indenfor den samme subspecies, dog findes der undtagelser, som f.eks. både kan angribe *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* og *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Cogan *et al.*, 1996).

Starterkulturens levedygtighed i osten gennem modningen afhænger af, hvilke stammer der er benyttet. De stammer, der når en høj densitet i ostemassen, har vist et højere potentiale for at danne bitre oste. En anden vigtig faktor er bakteriecellernes evne til at autolyser. Nogle stammer vil lysere kort efter drab, mens andre vil forblive intakte (Figur 5-2). Dette har stor betydning, da lysning af cellerne vil frigive endoenzymer, som vil nedbryde proteinerne til små peptidstykker, og derved gøre osten bitter.

Der vil dog også blive frigivet en række næringsstoffer, som vil give næring til nogle af de bakterier, som ikke er en del af starterkulturen (medfølgefloraen). Derved vil starterkulturen være indirekte årsag til de smagskomponenter, som vil blive dannet af ”non starter lacticacidbacteria” –NSLAB (Crow *et al.*, 1995).



Figur 5-2 A, B, C, D og E Forskellen mellem stammer af *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 og 763 i deres evne til at forblive intakte efter 2, 7 og 91 dage. På billede C kan ses hvordan AM2 er lysret efter 7 dage, mens 763 stadig er intakt efter 3 måneder (billede E) (Vogensen 2003)

De frysetørrede kulturer er noget dyrere end de frosne kulturer, men de frosne har en begrænset holdbarhed, især hvis de ikke opbevares ved den rigtige temperatur. Chr. Hansen skriver på produktbladet til deres kultur (F-DVS *Lactococcus diacetylactis* MB-1) (Anonym 2001) at denne kultur har en holdbarhed på et år ved -45°C . Hvis en kultur opbevares mellem

-20 og -40°C vil der ske en reduktion i antal og aktiviteten af bakterierne. Dette sker også hvis kulturen bliver delvis optøet under udvejningen af kulturen (Cogan *et al.*, 1996).

Mælkesyrebakterier

En utvetydig definition af mælkesyrebakterier findes ikke, men de kan typisk karakteriseres som gram positive, ikke sporedannede, katalase negative, kokker, kokkoide-stave eller stave, som primært producerer mælkesyre ved fermentering af kulhydrater. Mælkesyrebakterierne er vidt udbredt i naturen, og kan findes på planter – døde som levende, i jorden, i fæces og på dyr (Axelsson, 2001).

Mælkesyrebakterier opdeles efter om de er kokker eller stave, og herefter er der traditionelt set på, hvordan bakterierne fermenterer forskellige kulhydrater. De homofermentative danner kun mælkesyre, mens de heterofermentative danner en række sekundære metaboliter, for eksempel forskellige organiske syrer, alkoholer og kuldioxid, som bliver dannet udover mælkesyre.

I denne rapport vil de mest udbredte arter, som forekommer i mælk og mælkeprodukter, blive gennemgået.

Lactococcus

Lactococcus blev første gang isoleret af J. Lister i 1873. Dengang blev den kaldt for *Bacterium lactis* fordi den syrnede mælk. I 1890 fandt bl.a. Storch ud af, at syrning af fløde til smørfremstilling skyldtes den naturlige tilstedeværelse af bakterier. Det lykkedes ham at isolere nogle af disse mælkesyrebakterier, for derefter at tilsætte dem som renkulturer. Han iagttog, at nogle bakterier gav en ren, behagelig og mildt syrlig smag, mens andre var, hvad han kaldte, kilde til smøraromaen (Storch, 1890). En af disse bakterier kaldte han for *Bacterium cremoris*, den kom dog senere til at hedde *Streptococcus cremoris* ligesom *Bacterium lactis* blev til *Streptococcus lactis*. DNA studier af *Sc. cremoris* og *Sc. lactis* har vist, at de er meget tæt på hinanden, og de blev derfor slået sammen til *Sc. lactis*. De blev så til *Sc. lactis* ssp. *cremoris* og *Sc. lactis* ssp. *lactis*, og til sidst blev det slået fast, at de var så langt fra de øvrige *Streptococcus*, at de er til *Lactococcus* (Fox, Cogan & McSweeney, 2000). Der var i 1936 fundet en variant, som havde fået navnet *Sc. lactis* Ssp. *diacetyllactis*, fordi den kunne danne diacetyl fra citrat. Senere har det vist sig, at der kun var et plasmid til forskel fra *Sc. lactis* ssp. *Lactis*, og den fik navnet *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*, (biovar for biovariant). Dette er dog ikke anerkendt, og hvis det skal være korrekt, skal forkortelsen cit⁺ benyttes som indikation på, at bakterien er citrat forgærende, og bakterierne vil så hedde *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cit⁺. I denne opgave vil den mindre korrekte betegnelse biovar. *diacetyllactis* dog blive benyttet (Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Leuconostoc

Leuconostoc er cellemorfologisk mere linseformet end rund. Den er heterofermentativ og omdanner sukker til lige dele laktat, ethanol og CO₂, samt en lille del acetat. Den laktat, der bliver dannet, er hovedsagligt på D-form (Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Enterococcus

Oprindeligt hørte *Enterococcus* til de fækale streptokokker, og som navnet antyder, findes disse bakterier i tarmen hos mennesker (*Enterococcus faecalis*) og dyr (*Enterococcus*

faecium). *Enterococcus* benyttes ikke meget som starterkultur, men er dog fundet i en række traditionelle sydeuropæiske oste .

Pediococcus

Pediococcus benyttes som starterkultur til fermenterede pølser, og er som sådan ikke interessant i mælkeprodukter. Den kan dog have betydning som en del af den sekundære flora i oste (NSLAB). Karakteristisk for *Pediococcus* er, at den danner en blanding af D- og L-laktat (Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Lactobacillus

Disse stavformede mælkesyrebakterier er opdelt i tre grupper, alt efter om de er obligat homofermentative (Gr. I), fakultativ heterofermentative (Gr. II) eller obligat heterofermentative (Gr. III). Det, der adskiller disse tre grupper er, hvorvidt bakterien har enzymerne aldolase og phosphoketolase (Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Gruppe I har aldolase men ikke phosphoketolase, og kan derfor ikke fermentere pentose eller gluconat. Disse bakterier fermenterer hexose udelukkende ved hjælp af glukosevejen (the glycolytic pathway) til D- og/eller L-laktat. Til denne gruppe hører alle de termofile *Lactobacillus*, som findes i starterkulturer (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* og *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*)(Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Gruppe II har aldolase og phosphoketolase, og kan derfor fermentere hexose både homofermentativt til laktat, pentose og gluconat, og heterofermentativt til laktat og acetat. Ved tilstedeværelsen af glukose vil produktionen af phosphoketolase dog blive hæmmet. I denne gruppe findes mange NSLAB som findes i modne oste (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* og *Lactobacillus curvatus*)(Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Gruppe III har phosphoketolase men ikke aldolase, og fermenterer derfor sukker til lige dele laktat, ethanol og CO₂ samt en lille del acetat. Denne gruppe har ikke bare samme fermenteringsmønster som *Leuconostoc*, de er også kokkoide stave og kan derfor let forveksles med *Leuconostoc* (Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Typer af starterkulturer

Der findes primært to typer starterkulturer; mesofile og termofile, som har temperaturoptimum omkring henholdsvis 26°C og 42°C. De mesofile typer stammer fra Nordeuropa, mens de termofile traditionelt mest benyttes i Sydeuropa .

Mesofile starterkulturer

De mesofile typer starterkulturer består af forskellige *Lactococcus* spp. og *Leuconostoc* spp. Blandinger af de forskellige stammer opdeles i fire typer; L, DL, D og O. Alle L og D kulturer betegnes aromadannere, da de udover O kulturen indeholder en eller anden form for cit⁺ mælkesyrebakterier (Citrat forgærende). O kulturen, der også kaldes syrevækker, indeholder derimod kun cit⁻ laktokokker. Dens primære formål er at sænke pH. L står for *Leuconostoc* (L kulturer) og indeholder cit⁺ *Leuconostoc*, hvis formål er at danne CO₂, diacetyl og acetat. D står for *Streptococcus diacetylactis*, som er det gamle navn for cit⁺ laktokokker. DL indeholder både *Leuconostoc* og cit⁺ laktokokker (Tabel 5-1) (Fox, Cogan & McSweeney, 2000).

Tabel 5-1 Oversigt over de forskellige mesofile starterkulturer (Cogan *et al.*, 1996; Walstra *et al.*, 1999)

	Mesofile starterkulturer			
	Aromadannere			Syrevækker
	L	DL	D	O
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	5-10 %	5-10 %	5-10 %	5-10 %
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	80-90 %	60-80 %	70-85 %	90-95 %
* <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> Cit ⁺		10-20 %	10-20 %	
<i>Leuconostoc lactis</i>				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	}5-10 %	}5-10 %		

* også kaldt *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Starterkulturerne sælges enten som mix eller som definerede stammer. Et mix indeholder et ukendt antal stammer indenfor de angivne arter. Der er for eksempel fundet 113 forskellige isolater i en velkendt mix-DL-kultur ved navn Flora Danica. Flora Danica giver en sikkerhed mod fager ved sin mangfoldighed, da der altid vil være nogle stammer, der ikke bliver angrebet (Beresford *et al.*, 2001).

En defineret starterkultur indeholder nogle få kendte og veldokumenterede stammer, hvor de enkelte stammers egenskaber er veldokumenterede. De definerede kulturer er valgt så de er sårbare overfor forskellige typer fager, og kan kombineres med en rotation mellem forskellige definerede kulturer. En stor fordel ved de definerede kulturer er en meget ensartet syring, hvilket gør det nemmere at styre osteproduktion (Cogan, 1995).

Væksten af de forskellige arter i en mix kultur, afhænger af syringstemperatur og den mængde, der tilsættes mælken. I Tabel 5-2 ses i hvilket retning ændringer sker, afhængigt af, om en forkultur inkuberes ved 18 eller 22°C.

Tabel 5-2 Fordelingen af *Lactococcus* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc cremoris* i en DL starterkultur ved forskellige temperaturer og mængder af inokulum

Inkubations temperatur	Inokulation procent	<i>Lc. diacetylactis</i>	<i>Leu. cremoris</i>	Diacetyl og acetoin efter 24 h	CO ₂ Produktion
22 °C	0,5 %	Forøgelse	Reduktion	Mere	Hurtig
	↑	↑	↑	↑	↑
19 °C	1,0 %			midtimellem	midtimellem
	↓	↓	↓	↓	↓
18 °C	2,0 %	Reduktion	Forøgelse	Mindre	Langsomt

Da vækstbetingelserne er de samme for *Lc. lactis* ssp. *lactis* og *Lc. lactis* ssp. *cremoris* er det væksthastigheden (μ_{\max}), der afgør, hvilken bakterie, der kommer til at dominere. I tilfælde med *Lc. lactis* ssp. *lactis* og *Lc. lactis* ssp. *cremoris* er det, under normal osteproduktion, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, der dominerer, hvilket er vist i flere studier. Grunden til, at *Lc. lactis* ssp. *lactis* ikke helt bliver udkonkurreret, kunne være dens evne til at bruge arginin som supplerende energikilde. Aromabakterierne udgør mellem 5 og 30 % af starterkulturen afhængig af, hvilken type, der er tale om, men variationen inden for den enkelte type vil være begrænset under konstante fysisk-kemiske forhold (Cogan, 1995; Crow *et al.*, 1993).

Termofile starterkulturer

Termofile starterkulturer indeholder *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* og *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*. Disse starterkulturer benyttes til hårdere oste, såsom emmentaler, gruyère, comté, parmigiano reggiano, grana padano, men også til bløde oste som taleggio, crescenza og mozzarella (Figur 2-2). Nogle af disse oste bliver eftervarmet (50-55 °C) efter skæring. Starterkulturen danner ikke syre ved disse høje temperaturer, men bliver heller ikke inaktiveret permanent, så når temperaturen igen falder, vil der atter blive dannet syre. Taleggio har eksempelvis et pH-fald til 4,6 på 6 timer. Dette ville normalt give problemer med at styre løben, men da denne ost bliver eftervarmet vil løben blive inaktiveret (Pedersen, 2003).

Andre mælkesyrebakterier

Mælkesyrebakterier, som ikke kommer fra starterkulturen, kaldes – som tidligere nævnt – for medfølgeflora eller NSLAB ”Non Starter Lactic Acid Bacteria”. Disse bakterier stammer fra en kontaminering eller er blevet tilsat sammen med starterkulturen. Den rå mælk vil altid indeholde mælkesyrebakterier, og derfor er det, som før beskrevet, muligt at fremstille råmælksoste uden at tilsætte starterkultur. Den pasteuriserede mælk skulle være fri for mælkesyrebakterier, men der vil være mælkesyrebakterier, der overlever pasteuriseringen og desuden vil mælken ret hurtigt blive mere eller mindre kontamineret med bakterier fra produktionsudstyr eller personale. En undersøgelse viste, at mesofile mælkesyrebakterier blev reduceret med 6 log enheder ved en pasteurisering, dog med undtagelse af *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, som kun blev reduceret med 3,5 log enheder. Thermofile bakterier overlever pasteurisering bedre, for eksempel blev der kun dræbt 4 ud af 60 *Lactobacillus* spp., isoleret fra schweiziske oste, efter en varmebehandling på 71°C i 18 sekunder (Grappin & Beuvier, 1997). Antallet af bakterier i den pasteuriserede mælk vil være i ret lavt antal i starten, sikkert mindre end 10³ CFU pr. g, men de gror til omkring 10⁸ CFU pr. g under modningen af ostene. I de fleste hårde, faste og halvfaste oste vil NSLAB oftest efter et par uger være domineret af mesofile homofermentative *Lactobacillus*. Disse vil oftest klare sig dårligt i konkurrence med starterkulturen i ostemælken, men når al laktosen er opbrugt vil de blomstre op efter at starterkulturen dør. Der er rigeligt med aminosyrer, små peptider og kvælstofforbindelser, men præcis hvor de får energien fra, er stadigt ikke helt klarlagt. Noget kommer fra nedbrydning af aminosyrer, for eksempel har *Lactobacillus casei* et enzym (dehydratase), som producerer pyruvat fra aminosyren serin i anarobt miljø (Crow, Curry & Hayes, 2001). Udviklingen af NSLAB afhænger også af sammensætningen af starterkulturen; i cheddar oste benyttes der ikke citrat fermenterende bakterier, hvilket gør at bakterier som f.eks. *Lc. diacetylactis* og *Leuconostoc* spp. ikke forgærer citraten og denne kan i stedet forgæres af eventuelle NSLAB (Martley & Crow, 1993). En cheddarost, hvor der blev tilsat et lavt antal *Lactobacillus plantarum* og *Lb. casei* spp. *pseudoplantarum* blev vurderet til at have en højere kvalitet end de oste, der ikke var tilsat NSLAB. Derimod blev der kun observeret små ændringer i nedbrydning af protein, mens der i en anden undersøgelse blev fundet et højt niveau af frie aminosyrer i oste, hvor der var tilsat *Lb. casei*, *Lb. plantatarum*, *Lactobacillus acidophilus* og *Lactobacillus helveticus*. Samme undersøgelse viste, at de oste, hvor der var tilsat *Lb. helveticus*, udmærkede sig positivt sensorisk (Shakeel, Fox & McSweeney, 2000).

Der vil være et højere niveau og en større diversitet af NSLAB i oste fremstillet af rå mælk, hvilket gives som årsag til, at disse oste ofte udvikler en mere intens smag. Man er derfor begyndt at tilsætte den pasteuriserede ostemælk lidt NSLAB sammen med den almindelige starterkultur. Denne kultur betegnes ”Finisher”, da den vil dominere til sidst i modningen.

Til en cheddar fremstillet af pasteuriseret mælk, blev der tilsat 1 % rå mælk, hvorved der ikke alene blev fundet et signifikant højere niveau NSLAB, men også en mere frugtagtig og skarp aroma, hvilket i undersøgelserne blev vurderet som noget positivt (Shakeel, Fox & McSweeney, 2000; Shakeel *et al.*, 2000).

I Irsk cheddar er de mest almindelige NSLAB *Lb. casei*, *Lb. plantarum* og *Lactobacillus curvatus*, mens det i New Zealand er *Lactobacillus paracasei* og *Lactobacillus rhamnosus*, der dominerer (Crow, Curry & Hayes, 2001). Det er svært at sige, hvor mange bakterier, der skal til for at det har indflydelse på ostens smag, men til sammenligning skal der over 10^7 CFU pr. cm^2 til før kylling får en dårlig lugt, og over $5 \cdot 10^7$ CFU pr. cm^2 før der kan mærkes et slimlag (Ayres, 1960). Ved fordærv af kød bliver der frigivet en række svovlforbindelser, som er meget lette at lugte, det er derfor næppe sandsynligt, at bakterier vil kunne detekteres, hvis de forekommer i et antal under 10^7 CFU pr. g. i en ost.

Overfladekultur

Hvis en ost får lov at ligge uberørt under modningen, bliver den overgroet af skimmel på overfladen. Ved vaskning (viskning) af ostene med vand eller saltlage, ændres miljøet, så gær og bakterier kommer til at dominere. Ostene bliver belagt med en overfladekultur (ostekit), som er domineret af *Debaryomyces* og *Rhodotorula* (gær) samt nogle mikrokokker og *Brevibacterium linens*. Podning med kitkultur skete tidligere ved, at de ældste oste blev visket først og de nye oste til sidst. Derved blev mikroorganismene overført til de nye oste. Men også uønskede organismer blev overført på denne måde, især *Listeria monocytogenes* kunne være et problem (Nielsen, 2000). I dag vil der oftest blive brugt renkultur (kit), som indeholder de ønskede stammer. brie og camembert er de to mest kendte bløde oste, som bliver overflade-modnet med skimmel. *Penicillium camemberti* er den mest dominerede, men der tilsættes også tit *Geotrichum candidum*, samt en række gærtyper (*Saccharomyces lactis*, *S. fragilis*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis* *Debaryomyces hansenii*, *Torulopsis candida* med flere) (Gipon, 1999). Rødkitoste som munster, pont-l'Evêque, limburgere og taleggio bliver overfladebehandlet med gær og skimmel som *Candida*, *Debaryomyces* og *Geotrichum*, samt nogle salttolerante *Brevibacterium* spp. hovedsagelig *Brevibacterium linens* og *Brevibacterium casei*, som er de bakterier, der giver disse oste deres karakteristiske røde farve (Nielsen, 2000). Overfladekulturen indvirker også på modningen af ostene, især for bløde oste. Gærsvampene nedbryder mælkesyren til CO_2 og H_2O , og aminosyrer til nogle uorganiske bestanddele, bl.a. ammoniak. Både nedbrydelsen af mælkesyre og dannelsen af ammoniak vil føre til, at pH stiger. pH stigningen gør forholdene bedre for mikrokokker og *Brevibacterium* spp. Disse bakterier danner en række protein- og aminosyrenedbrydende enzymer samt lipaser. Enzymer kan ikke diffundere ind i selve ostemassen, men det kan de lavmolekylære nedbrydningsprodukter som ammoniak, og her vil de præge ostens smag, alt afhængig af dens tykkelse og vandindhold. Fælles for alle bløde oste med overfladekultur er, at der i starten af modningen vil være en pH-gradient, med omkring pH 8 yderst og pH 4,6 i midten. Efter nogle uger vil denne forskel være udlignet og der vil være pH 7 i hele osten. Så længe der er en pH-gradient vil kalcium og fosfat blive trukket ud mod overfladen (idet kalciumfosfat er tungtopløseligt ved pH 7-8, men

letopløseligt ved pH under 5). Omkring 80 % af ostens calcium og 60 % af ostens fosfat vil findes i de yderste ca. 2 mm (Nielsen, 2000). Når pH i osten begynder at stige, øges kaseinets vandbindingsevne og en stigende del af det kapillarbunde vand i osten vil blive kemisk bundet til kasein micellerne. Herved bliver osten mere ensartet og sammenhængende, og den hvidlige, uigennemskinnelige ostemasse bliver mere gennemskinnelig. Hvor osten før var kort og ”knækkende” bliver den smidig. Det er dog en betingelse, at løbeenzymerne har nedbrudt α -kaseinet, da osten ellers vil blive sej og gummiagtig. For at osten kan blive næsten fyldende, kendetegnende for en fuldmoden camembert, brie eller Münster ost, skal der i osten være et højt vandindhold (> 68% VFFO se Tabel 2-1) og en lav calciumkoncentration. Calciumkoncentrationen afhænger af, hvor meget calcium, der er blevet i osten, og hvor meget der er trukket ud til overfladen (Nielsen, 2000).

Andre bakterier

Enterobacteriaceae kan også findes i rå mælk, og vil stamme fra en fækal forurening. Bakterierne i denne gruppe er kendetegnet ved at være gram negative og ikke særlig varmeresistente. De er interessante af to grunde; for det første fordi de i pasteuriseret mælk er tegn på rekontaminering, da de vil dø under en almindelig pasteurisering. For det andet fordi denne gruppe bakterier indeholder flere patogene arter. Fundet af *Enterobacteriaceae* vil derfor indikere, at der kunne være patogene bakterier i osten. Blandt *Enterobacteriaceae* er *Hafnia alvei* særlig interessant, da flere undersøgelser har fundet denne bakterie som værende den mest dominerende blandt *Enterobacteriaceae* i råmælksoste. I valdeteja, en mellemhård gedeost, var *H. alvei* dominerende blandt *Enterobacteriaceae* fra dag 2, og efter 17 dage udgjorde den 100 % ($4,7 \cdot 10^3$ CFU pr. g) af *Enterobacteriaceae*. I det færdige produkt var der 92 % *H. alvei* og 8 % *Escherichia coli* (Alonso-Calleja *et al.*, 2002). I en blød gedeost af camembert typen var *H. alvei* ligeledes dominerende og kom også op på 100 % af *Enterobacteriaceae* (10^7 CFU pr. gram) (Sable *et al.*, 1997). I en blød fåreost, fremstillet af rå mælk, der blev undersøgt efterår, vinter og forår, udgjorde *H. alvei*, henholdsvis 83,9 %, 84,3 % og 87,5 % af ca. 10^7 CFU pr. g. coliforme bakterier da ostene var 35 dage gamle. Det skal dog nævnes, at der i disse oste ikke var brugt starterkultur (Macedo, Malcata & Hogg, 1995).

Tabel 5-3 *Hafnia alvei* i en blød gedeost af camembert typen (Sable *et al.*, 1997)

Dage	Midten		Under overfladen	
	% af gramnegative	Ca. antal	% af gramnegative	Ca. antal
0*			3,2	$1,6 \cdot 10^3$
2	17,9	$8,9 \cdot 10^3$	27,5	$2,5 \cdot 10^5$
15	34,8	$1,4 \cdot 10^4$	94,1	$6,6 \cdot 10^6$
29	77,8	$7,8 \cdot 10^5$	95,7	$9,5 \cdot 10^6$
43	92,4	$6,5 \cdot 10^6$	100	$1,0 \cdot 10^7$

I en undersøgelse af camembert oste fremstillet af rå mælk fra køer, blev der fundet mellem 10^7 - 10^8 CFU pr. g *H. alvei*, og der var en tendens til, at *H. alvei* kunne forhindre vækst af *E. coli* (Andersen, 1982). At *H. alvei* kan hæmme *E. coli* er også vist i bouillon (Duffy, Whiting & Sheridan, 1999).

H. alvei fermenterer laktose, men ikke sorbitol og kan være både proteolytisk og lipolytisk, med et niveau på omkring 10^7 CFU pr g kan den ikke udelukkes fra at have betydning for smag og lugt i råmælksost (Andersen, 1982; Macedo, Malcata & Hogg, 1995; Alonso-Calleja *et al.*, 2002; Sable *et al.*, 1997).

H. alvei og *Serratia proteamaculans* har evnen til at decarboxylere aminosyre til de biogene aminer putrescine og cadaverin. Denne evne til at danne putrescine bliver forstærket 6-15 gange ved tilstedeværelsen af arginin nedbrydende mælkesyrebakterier i kød. Putrescine og cadaverin er blevet foreslået som negative kvalitetsindikatorer for vakuumpakket oksekød (Gram *et al.*, 2002).

5.3 Patogene bakterier i mælk og ost

Franskmænd er dem, der konsumerer mest ost i verden – 24 kg ost pr indbygger i 1997 (Mejeriforeningen, 2004). Mere end 200.000 tons af den ost, der blev produceret i Frankrig i 1997 var fremstillet af rå mælk, hvilket svarer til 20 % af den samlede produktion (de Buyser *et al.*, 2001). Det er derfor interessant at se zoonoserne fra Frankrig, om denne konsumering af råmælksost også afspejler sig i deres osterelaterede sygdomsudbrud.

Mælk og mælkeprodukter udgjorde 6,1 % (175 af 2861) af de registrerede fødevarerelaterede sygdomsudbrud, der var i Frankrig fra 1988 til 1997 (de Buyser *et al.*, 2001).

36 % af 69 rapporterede franske sygdomsudbrud fra mælk og mælkeprodukter, stammede fra råmælksoste (i perioden 1992-1997). Disse 36 % fordelte sig med 24 udbrud af *Staphylococcus aureus* samt et enkelt udbrud af *Salmonella* (de Buyser *et al.*, 2001).

Af de 417 udbrud af *S. aureus* forgiftning, der blev rapporteret i Frankrig mellem 1988-1997, var 24,9 % (104) forårsaget af enten mælk eller mælkeprodukter.

Til sammenligning var der kun 1,8 % (34 af 1889) *Salmonella* udbrud, der var forårsaget af mælkeprodukter. Hvilke patogene bakterier, der forekommer i oste, er forskelligt, afhængigt af hvilke oste der tales om, og varierer også fra land til land. I Frankrig er det største problem *S. aureus*, mens det i England og Wales er *Salmonella*. Også *E. coli* og *Listeria* er set som årsag til osteforårsagede sygdomsudbrud (de Buyser *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus

S. aureus findes på huden af varmblodede dyr, hos mennesker hyppigst i næsen og på huden, og vil tit være årsag til infektioner på huden eller i luftvejene. *S. aureus* er resistent overfor udtørring og vil derfor kunne overleve på produktionsudstyr. Derimod vil den hurtigt bliver udkonkurreret af anden flora, eksempelvis en starterkultur i mælk, hvorfor *S. aureus* sjældent vokser i rå fødevarer. Mælk fra køer med mastitis er dog en undtagelse, hvor endda et højt antal af *S. aureus* kan forekomme. *S. aureus* producerer et enterotoksin, og de humane biotyper producerer hyppigere toksinet end de biotyper, der findes hos fugle og andre dyr.

I mælk hvor der blev fundet *S. aureus* i niveauerne 10^4 , 10^5 og 10^6 CFU pr. g mælk, blev der i de færdige ostene fundet enterotoxin i mængderne 0,5, 1 og 2,5 ng pr. g oste (Vernosy-Rozand *et al.*, 1998) Det er rapporteret, at der skal 1 µg enterotoxin pr. g fødevarer for at give opkastninger, svimmelhed og abdominale kramper (Baird & Lee, 1995). Ved udbrud bliver der dog sjældent fundet vegetative celler i det niveau, men blot toksinet. Dette skyldes, at toksinet stammer fra en kontaminering før pasteuriseringen. D-værdien for *S. aureus* ved varmebehandling i mælk er ved 60, 65, 70 og 75 °C henholdsvis 54, 12, 6 og 1,2 sekunder,

mens toksinet er meget varmeresistent og har en D-værdi på 121°C på 20 minutter (Bergdoll, 1989; ICMSF, 1996; Johnson, Nelson & Johnson, 1990a,b,c).

Salmonella

Salmonella har været involveret i en række fødevarerrelaterede sygdomsudbrud forårsaget af ost. Den er hyppigt fundet i staldmiljøet, hvilket gør den til en potentiel risiko. Den infektiøse dosis er fra 10^2 til 10^6 celler, afhængigt af hvilken serotype og hvilket produkt, der er tale om (D'Aoust, 1989).

Indtagelsen af mælk og mælkeprodukter produceret af rå mælk, bidrager jævnligt til statistikken over levnedsmiddelrelaterede sygdomsudbrud (Bell & Kyriakides, 2002). I osterelaterede udbrud er rapporteret flere forskellige serotyper af *Salmonella*, såsom Typhimurium, Dublin, Paratyphi og Enteritidis (de Buyser *et al.*, 2001). Der er flere eksempler på, at foder har været årsag til salmonellaudbrud forårsaget af mælk og mælkeprodukter (Crump, Griffin & Angulo, 2002).

I 1997 havde Juradistriktet i Frankrig et udbrud af *Salmonella* Typhimurium med 113 syge (dyrkningsverificerede). En case-kontrol undersøgelse pegede på Morbier ost, som er en blød ost lavet af rå mælk – to patienter havde stadig denne ost liggende i køleskabet. Man påviste *S. Typhimurium* i ostene og isolaterne tilhørte samme undertype som hos patienterne (Bager, 2004).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes er et problem i oste af såvel rå- som pasteuriseret mælk, hvor den kommer direkte fra kærne eller fra produktionsanlægget (Johnson, Nelson & Johnson, 1990a). Hovedårsagen er, at *L. monocytogenes* kan vokse under vanskelige vilkår - der er observeret vækst mellem 1-45 °C, ved pH ned til 4,4 og en saltkoncentration på 10 % NaCl, dog ikke samtidigt. Den kan overleve ned til pH 4,2 og ved saltkoncentrationer på op til 30 %. Den kan vokse aerobt eller fakultativt anaerobt (Pitt, Harden & Hull, 1999a). De fleste tilfælde af listeriose ses hos mennesker, der lider af en sekundær immundeficiens, hos gravide, AIDS- eller diabetespatienter og hos børn samt ældre over 60. Normalt sunde og raske kan dog også blive ramt af listeriose, men som regel vil immunforsvaret forhindre det. Ved forsøg med primater, skulle der en dosis på 10^9 *L. monocytogenes* til at dyrene blev syge, ved lavere dosis var der ingen tegn på sygdom. Hos sunde og raske mennesker regnes den infektiøse dosis på over $3 \cdot 10^6$ CFU pr. g. (Farber & Peterkin, 1991; Pitt, Harden & Hull, 1999c). I Danmark er der ca. 40 tilfælde af listeriose om året (anonym, 2003).

Flere forsøg med at inokulere *L. monocytogenes* i bløde oste har vist, at der sker en fysisk opkoncentration under fremstillingen, idet bakterierne bliver fanget i ostemassen. Dette kan give en forøgelse fra 10^2 til $2 \cdot 10^3$ CFU pr. ml. (Morgan *et al.*, 2001). Forsøg med bløde gedeoste viste, at der skete en reduktion i antallet af *L. monocytogenes* under produktion og modning, bakterierne kunne dog genfindes ved et inokulum på 10 CFU pr. ml. Et andet forsøg af Ramsaran (1998) viste, ved inokulation af 10^4 CFU pr. ml, at der var en opkoncentrering til ca. $3 \cdot 10^5$ CFU pr. ml under ostningen, og først 30 dage efter skete der en stigning i antallet af *L. monocytogenes*, dette skete samtidig med at pH steg fra under 5 til 5,5. Dette forsøg viste også, at en nisinproducerende *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* stamme kun havde en lille effekt efter 10 dage, og at der efter 65 dage skete en stigning til samme niveau, som i de oste hvor der ikke var brugt nisinproducerende stammer.

Inaktiveringen af tre stammer *L. monocytogenes* blev undersøgt i sterilmælk og rå mælk (Bradshaw, Peeler & Twedt, 1991). Dette forsøg viste, at ved 68,9 og 71,7 °C skulle den sterile mælk varmes længere tid end den rå mælk før bakterierne ikke blev genfundet, hvilket skyldes, at de varmeskadede *L. monocytogenes* i den rå mælk er inhiberet pga konkurrence fra varmestabile mælkesyrebakterier.

I en model udviklet til at forudsige drabseffekten af *L. monocytogenes* i mælk, kan man se, at der med 95 procents sandsynlighed sker >4 log reduktioner ved 67 °C, >11 log reduktioner ved 69,5 °C og >28 log reduktion er ved 72 °C. Alle med en holdetid på 16 sekunder (Piyasena, Liou & McKellar, 1998; Bradshaw, Peeler & Twedt, 1991).

At der forekommer sygdomsudbrud forårsaget af pasteuriserede produkter skyldes nok nærmere efterkontaminering end fejl i pasteuriseringen (Pitt, Harden & Hull, 1999b).

Escherichia coli

Escherichia coli er en normal del af tarmfloraen hos mennesker og dyr, og forårsager normalt ikke sygdom, dog findes der flere typer, som er patogene. Antallet af *E. coli* bruges som indikation for, hvor fækal forurenede produkter er. De to grupper, der er mest udbredte i fødevarer, er verotoksin-producerende *E. coli* (VTEC) og enteropatogene *E. coli* (EPEC). EPEC smitter normalt mennesker, men kan også findes hos syge kalve. VTEC smitter også mennesker, men findes primært hos raske køer, geder og får. Den infektiøse dosis er meget lav. For *Escherichia coli* O157:H7 er den 10-100 celler (ICMSF, 1996; Feng, 2001). I et forsøg med cheddar fremstillet af mælk inokuleret med 10³ CFU pr. ml af *E. coli* O157:H7, var der efter 14 dage sket en lille stigning. Efter 60 dage var der sket en 2 log reduktion, men efter 158 dage var det stadig muligt at detektere *E. coli* O157:H7 (Reitsma & Henning, 1996). I et andet forsøg inokuleredes 10⁴ CFU pr. ml *E. coli* O157:H7 i rå- og pasteuriseret mælk til fremstilling af camembert oste. Dette forsøg viste en øget celletæthed efter produktionen, dels på grund af vækst, men formentlig også på grund af indfangelse af bakterierne i ostemassen. Efter 10 dage var antallet af *E. coli* O157:H7 faldet til lidt over det tilsatte i de pasteuriserede oste. I ostene fremstillet af rå mælk var *E. coli* O157:H7 kun faldet til ca. 5•10⁵ CFU pr. g efter 10 dage, og mængden var næsten uændret efter 65 dage (Ramsaran *et al.*, 1998). Disse to forsøg viste, at *E. coli* O157:H7 kan overleve i en osteproduktion, og at den derfor kan være et problem i råmælksoste. I et forsøg, hvor mælken blev tilsat 10⁵ CFU pr. ml af ti forskellige stammer af *E. coli* O157:H7 og derefter varmebehandlet ved 64,5 °C i 16,2 sekunder, blev der ikke genfundet nogle *E. coli* O157:H7 (Johnson, Nelson & Johnson, 1990b).

E. coli O157:H7 blev første gang identificeret i 1982, og i 1999 var over 11 % af alle rapporterede tilfælde i Wales og England relateret til mælkeprodukter (Maher *et al.*, 2001; Piyasena, Liou & McKellar, 1998). I Danmark har antallet af tarminfektioner forårsaget af verotoksinproducerende *E. coli* også været stigende; fra 5 i 1996 til 115 i 2003 (Anonym 2003b). I perioden fra 1997 til 2000 var der i Danmark 168 laboratoriepåviste tilfælde af infektioner med verotoksinproducerende *E. coli*, halvdelen af disse var hos børn under 5 år. *E. coli* O157:H7 blev fundet i 23 % (27 af 115 i 2003) af tilfældene og var dermed den hyppigste fundne serotype. Det vides ikke, hvor mange af disse tilfælde, der skyldes fødevarer (Rønne, 2001; Anonym 2003a).

6 Metoder til undersøgelse af mikroorganismer i ost

Man kan undersøge bakterier i fødevarer ved hjælp af en række forskellige agarer og medier. Generelle medier bliver brugt til at kvantificere antallet af bakterier i en given fødevarer. At mediet er generelt betyder at der ikke sker nogen selektion, og derfor skulle flest mulige bakterier kunne vokse på disse medier. I nogle tilfælde benyttes selektive medier til at forfordle nogle bakterier frem for andre, for derved at kunne påvise bestemte bakterier i levnedsmidlet. Dette kunne være detektion af patogene bakterier såsom *Salmonella* eller *Listeria*, eller en smagegiver såsom *Lactobacillus*. Nogle af disse selektive medier har en form for indikator, som gør det muligt at skelne bakterier fra hinanden. Derved er det muligt at kvantificere tilstedeværelsen af forskellige bakterier på et enkelt medie, hvilket gøres ved at tælle antallet af kolonidannende bakterier CFU (Colony Forming Units). Selvom der benyttes selektive medier er det nødvendigt at identificere bakterierne fænotypisk eller genotypisk. Dette gøres ved at isolere en enkelt bakterie ved renyrkning et par gange. Ved mælkesyrebakterier benyttes fænotypiske træk såsom celle form (kok, oval kok eller stave), gramfarvning eller kaliumhydroxyd, katalase test og gasproduktion. Eventuelt kan forgæringen af forskellige sukkerarter også bruges. Genotypisk identifikation består i at sammenligne DNAet fra de relevante bakterier (afsnit 6.2)

6.1 Medier

I dette afsnit vil nogle af de forskellige mediers selektive egenskaber, samt hvordan nogle af bakterierne identificeres på de enkelte medier, blive beskrevet.

Baird parker Mediet

Baird parker er et selektivt medium for *Staphylococcus aureus*, de fleste andre bakterier bliver undertrykt med de selektive reagenser: aminoeddikesyre, lithium og tellurite. *Staph. aureus* reducerer tellurite og danner nogle gråsorte kolonier. Baird parker agaren indeholder også æggeblomme, som *Staph. aureus* kan nedbryde med dens lipase og derved danne en klar zone (Anonym 2004a).

Eosin metylenblåt agar

Eosin metylenblåt agar kan benyttes til at detektere *E. coli*. Mediet indeholder eosin som inhiberer vækst af gram positive bakterier. Laktose er den eneste kilde til kulhydrat, og methylenblåt gør at de bakterier som forgærer laktosen vil danne lillasorte kolonier. *E. coli* vil danne næsten sorte kolonier med en metallisk overflade. Den mørke farve skyldes at *E. coli* og visse *Citrobacter* er methylrød positiv laktose-fermenterende. Bakterier som *Klebsiella* og *Enterobacter* vil fremstå som et fiskeøj; mørk lilla i midten med en farveløs slimet ring – dette skyldes, at disse bakterier er methylrød negativ laktose-fermenterende. Ikkelaktose fermenterende bakterier såsom *Pseudomonas* vil fremstå med farveløse kolonier (Anonym 2004b).

M17

M17 er et generelt medium til mælkesyrebakterier såsom *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp. og *Enterococcus* spp. (Vogensen, Nilsson & Josephsen, 2002). Disse bakterier er homofermentative og omdanner laktose til mælkesyre, men mange af laktokokkerne tåler ikke et lavt pH f.eks øges selektivitet overfor *Lactobacillus* spp. hvis MRSs pH sænkes fra 6,2 til 5,5, og det er derfor vigtigt, at mediet har gode bufferegenskaber idet

mælkesyrebakterierne danner syre under vækst. I M17 er di-natriumglycerofosfat brugt som buffer, hvilket gør mediet i stand til at opretholde pH over 5,7 efter 24 timer (Anonym 2004c).

MRS agar

MRS agar (De Man, Rogosa, Sharpe) er også et generelt medium til mælkesyrebakterier. Normalt benyttes MRS med pH på 6,2 til de fleste mælkesyrebakterier, men ved at sænke pH til ca. 5,5 kan det gøres selektivt overfor *Lactobacillus* spp., idet de fleste *Lactococcus* spp. ikke vil kunne gro ved så lavt pH. Denne effekt kan forstærkes yderligere ved at hæve inkubationstemperaturen fra 30°C til 37°C (Anonym 2003c; Vogensen, Nilsson & Josephsen, 2002).

Oxford

Listeria monocytogenes kan detekteres på Oxford, hvor der til agaren er tilsat en række forskellige selektive reagenser sammen med et indikatorsystem, som giver en sort zone om *L. monocytogenes* kolonier (Anonym 2004d).

PCA-mælk

PCA-mælk (Plate Count Agar med mælk) er et generelt medie til bestemmelse af det ”totale antal bakterier” i mælken og osten. Derfor burde der gro flest bakterier på dette medie, men der bør tages højde for, at nogle bakterier er for svækkede til at vokse, og at disse bliver udkonkurreret af de andre bakterier. Derfor er det ikke sikkert, at der er tale om en monokultur, blot fordi der kun findes én type bakterier i et antal af 10^8 CFU pr. g. Der kan være en række forskellige bakterier, som findes i niveauer lige under de 10^8 CFU pr. g. og derfor ikke kan ses.

Rogosa

Rogosa minder meget om MRS, men er fra starten fremstillet til at have en pH-værdi på 5,4. Derfor er Rogosa selektiv overfor *Lactobacillus* spp., og opfylder de krav, som selv de mest kræsne *Lactobacillus* spp. stiller (Holzapfel, 1992).

Slanetz and Bartley medium

Slanetz and Bartley medium benyttes til at detektere *enterokokker*, og alle røde kolonier kan regnes for at være *enterokokker* (Anonym 2004e).

Violet Red Bile Agar VRBA

VRBA er et selektivt og indikativt medium til påvisning af coliforme bakterier. Mediet benytter galdesalte og methylviolet til at hæmme vækst af grampositive bakterier. Når en bakterie danner syre fra laktosefermentering vil der ske et farveskift fra violet til mørk violet. VRBA inkuberes ved 37°C og bruges til at detektere coliforme bakterier, som er en gruppe af aerobe og fakultativt anaerobe, gramnegative, ikke-sporedannende stave, og som kan fermentere laktose. Gruppen omfatter hovedsaglig arter inden for *Enterobacteriaceae* for eksempel: *Citrobacter*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella* og *Enterobacter coli* (dog ikke *E. coli* O157:H7). Enkelte ikke-*Enterobacteriaceae* vil også kunne gro – såsom *Yersinia* og *Aeromonas*. Hvis VRBA inkuberes ved 44°C øges selektiviteten, og det er kun den gruppe, som kaldes fækale coliforme bakterier, som vil kunne gro. Denne gruppe indeholder kun *E. coli*, som stammer fra en direkte fækal forurening (Downes & Ito, 2001).

XLD

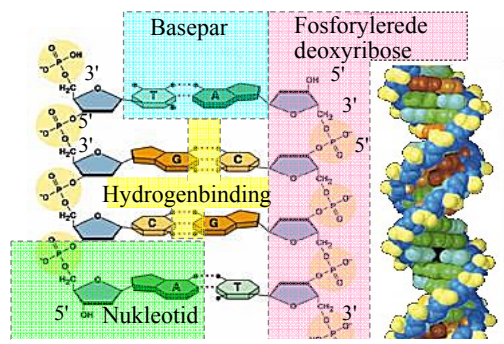
Xylose Lysine Desoxycholate, XLD, agar er oprindeligt fremstillet til at isolere *Shigella*, men har vist sig også at være anvendelig til at detektere *Salmonella*. *Shigella* og *Salmonella* differentieres fra ikke-patogene bakterier ved hjælp af xylose-fermentering, lysin decarboxylering og produktion af hydrogensulfid. De fleste tarmbakterier besidder evnen til hurtigt at fermentere xylose. Undtagelsen er *Shigella*, *Providencia* og *Edwardsiella*, som derfor fremstår med en negativ reaktion på dette medium. *Salmonella* spp. kan skelnes fra de ikke-patogene xylose-fermenterende bakterier, idet *Salmonella* spp. decarboxylerer lysin, hvorved pH hæves til alkalisk niveau, og derved har en reaktion som er lig med *Shigellas*. *Edwardsiella* og *Salmonella* spp. kan skelnes fra *Shigella* ved hjælp af en hydrogensulfid indikator (anonym, 2004).

6.2 Molekylære identifikationsmetoder

Molekylære identifikationsmetoder er måder, hvorpå bakterier kan identificeres på deres arveanlæg. De mest benyttede metoder kaldes restriktionsenzymklipping, elektroforese, RNA:DNA eller DNA:DNA hybridisering, Polymerase Chain Reaction (PCR) og DNA sekvensanalyse. I dette projekt er de to sidstnævnte metoder benyttet, og vil blive gennemgået efter en kort gennemgang af DNA strukturen.

6.2.1 Bakteriers DNA (16s og 23s)

Bakteriers arveanlæg ligger gemt i deres DNA (deoxyribonukleinsyre), som bedst kan illustreres som en stige, hvor siderne er opbygget af to antiparallelle kæder af fosforylerede deoxyribose, knyttet sammen af en fosfatbro mellem kulstof nr. 3 i det ene deoxyribose og nr. 5 i det næste. En DNA-enkeltstreng har en 5'-fosfat-ende og en 3'-hydroxyl-ende, og læses altid fra 5'- til 3'-hydroxyl-ende (Figur 6-1).



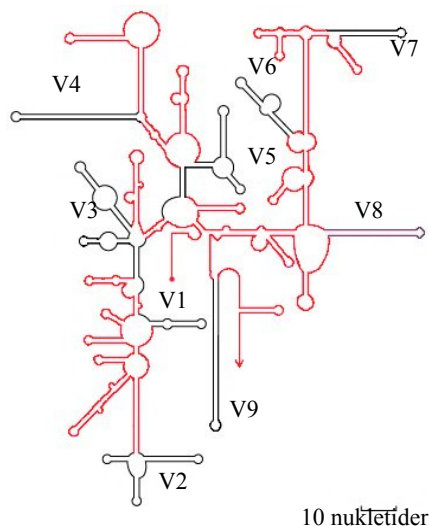
Figur 6-1 DNA molekylets opbygning
(Fajer, 2003)

Hvert trin på ”stigen” er to komplementære baser. Der er fire forskellige baser (nukletider); Adenin (purin base), Thymin (purimidin base), Guanin (purin base) og Cytosin (purimidin base), som forkortes med deres forbogstav. A er komplementær med T, og G med C, hvilket giver fire kombinationer, AT, TA, GC og CG. G og C er bundet sammen af tre hydrogenbindinger, og er derfor stærkere end TA, som kun er bundet sammen med kun to hydrogenbindinger. Hvor stærkt de to kæder af fosforylerede deoxyribose er bundet sammen, afhænger derfor af, hvor mange GC par der er i forhold til TA par. Dette udtrykkes i GC % (Griffiths *et al.*, 1999; Fajer, 2003b).

RNA (Ribonukleinsyre) er opbygget på næsten samme måde som DNA, dog erstattes deoxyribose af ribose og Uracil erstatter Thymin. RNA-strengen er enkeltstrengt, og folder tilbage på sig selv i områder, hvor komplementær baseparring er mulig, hvilket giver en sekundær struktur (Figur 6-2).

RNA er opdelt efter funktion i tre grupper: mRNA (messenger RNA), som er en kopi af det stykke DNA, som koder for protein, tRNA (transfer RNA), som transporterer aminosyrer til ribosom-mRNA-komplekset ved proteinbiosyntesen, og rRNA (ribosomalt RNA).

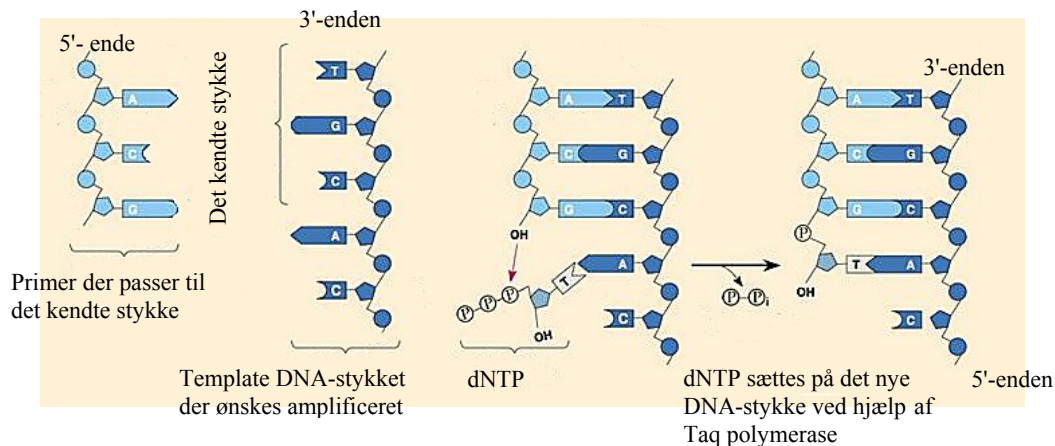
I bakterier findes der tre forskellige slags rRNA: 5S, 16S og 23S, som sammen med ca. 50 proteiner danner ribosomerne. rDNA, som er det DNA, der koder for 5S, 16S og 23S rRNA, er meget konserverede, hvilket vil sige meget ens hos alle bakterier, men det varierer, hvor mange kopier af rDNA, de forskellige bakterier har. På Figur 6-2 ses 16s rRNA fra en bakterie. Størsteparten er konserveret, men der er også 9 variable regioner (V1-V9), som kan benyttes til identificeringen af forskellige bakterier (O'Sullivan, 1999; Vogensen, 2003).



Figur 6-2 Sekundær strukturmodel af prokaryoters 16s rRNA. De regioner som er tegnet med rødt er mest konserverede, mens de ni sorte regioner (V1-V9) er der, hvor det varierer mest. (mod.e. Lodish *et al.*, 1999; O'Sullivan, 1999)

6.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en form for kopiering af DNA, hvor DNA-polymerasen benytter en DNA streng som skabelon (template DNA) til at fremstille det komplementære stykke DNA. Dette forudsætter dog, at der er en startsekvens, der kan bygges videre på. Denne startsekvens kaldes en primer og er ca. 20-30 basepar lang. De byggesten, der benyttes til at danne det nye stykke DNA hedder deoxynucleotridtrifosfat (dNTP), og består af deoxyadenosin trifosfat (dATP), deoxycytidin trifosfat (dCTP), deoxyguanosin trifosfat (dGTP) og deoxythymidin trifosfat (dTTP). Enzymet, der benyttes, er oftest Taq DNA polymerase, som er fra termofile bakterier kaldet *Thermus aquaticus*. Dette polymerase tåler opvarmning til 95°C. Template DNA, primer og dNTP blandes med polymerasen (Figur 6-3). Primeren sætter sig på template DNAet i den ende, hvor der er en fri 3' hydroxyl-ende, og polymerasen vil sætte dNTP på primerens 3' hydroxyl-ende indtil den til sidst danner et fuldt komplementært stykke DNA (Griffiths *et al.*, 1999; Fajer, 2003c).



Figur 6-3 Amplificering af et stykke DNA (Fajer, 2003a)

Selve amplificeringen foregår i tre trin:

Først skal den dobbeltstrengede template DNA, deles i to enkeltstrengede. Dette foregår ved opvarmning af DNAet til ca. 95°C i 30-60 sekunder.

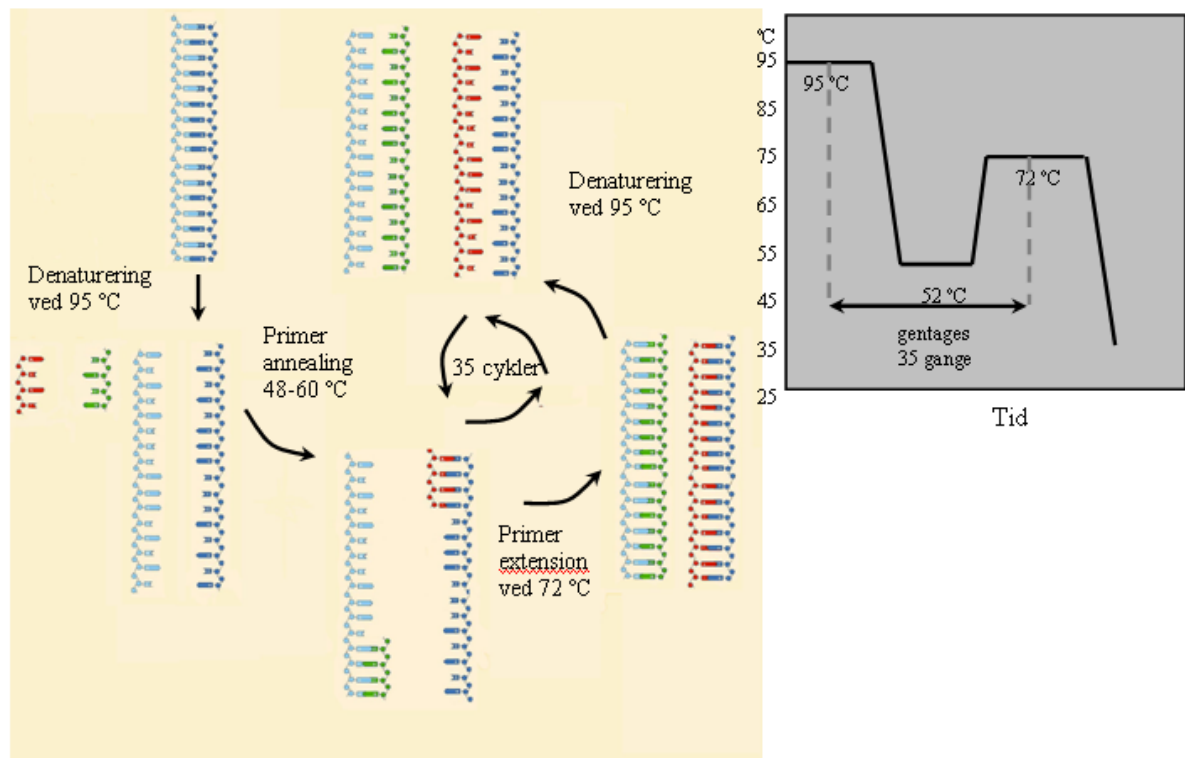
Dernæst skal primerne hæfte sig til template DNA-stykket (primer annealing). Der vil altid blive benyttet to primere, en til hver template DNA-streng. Denne primer annealing foregår ved ca. 60°C i ca. 30 sekunder. Den rette temperatur afhænger af primerne, idet det er den samme temperatur, som vil få primerne til at "smelte" fra dobbeltstrengen. Smeltepunktet (T_m) kan udregnes efter følgende formel:

$$T_m = (\text{antal A+T}) \cdot 2^\circ\text{C} + (\text{antal G+C}) \cdot 4^\circ\text{C}$$

Hvis temperaturen er for høj vil det ikke være muligt for primeren at hæfte sig til template DNAet, men hvis temperaturen er for lav, vil primeren kunne hæfte sig til et stykke DNA, selvom ikke alle basepar passer sammen.

Til sidst bliver primerne forlænget ved hjælp af Taq polymerasen. Denne polymisering foregår ved Taq polymerasens optimum, som er 72°C.

Amplificeringen fortsætter ved at den nye streng deles fra template DNAet ved en ny opvarmning, og derefter kan der hæftes primer til template DNAet og til den nye komplementære DNA (Figur 6-4).

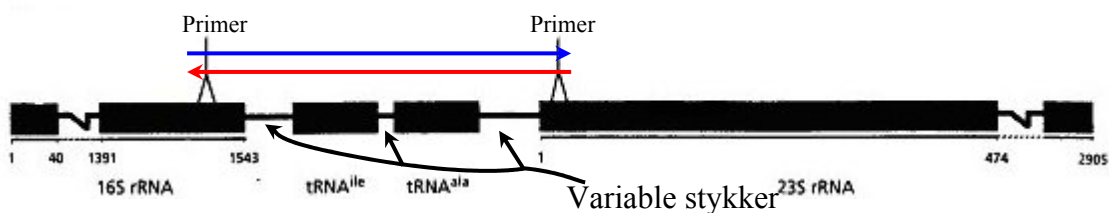


Figur 6-4 Temperaturforløbet i en PCR reaktion.

Hele processen gentages ca. 35 gange, hvilket teoretisk vil give 2^{35} kopier. Men i takt med en øget koncentration af PCR-produkter, vil der også blive en øget konkurrence mellem primere, som binder sig til template DNA og PCR-produkternes genannealing. En øget koncentration af PCR-produkter vil også øge mængden af fejl, som sker ved at primerne binder sig til forkerte sites. For at mindske antallet af fejl kan annealingtemperaturen sættes op efter f.eks. 10 cykler, hvilket vil gøre bindingen mere specifik (Griffiths *et al.*, 1999; Fajer, 2003d).

6.2.3 Internal Transcribed Spacer-PCR (ITS-PCR)

ITS-PCR er en almindelig PCR reaktion, hvor DNA-stykket mellem 16S og 23S regionerne bliver amplificeret. Det specielle ved amplificering af netop dette stykke DNA er, at både 16S og 23S er meget konserverede, så en primer, der hæfter sig i disse regioner, vil kunne benyttes til næsten alle bakterier. Til gengæld er stykket mellem 16S og 23S forskelligt fra bakterie til bakterie (Figur 6-5). Ved at sammenligne længden af stykket imellem 16S og 23S, vil det være muligt at skelne mellem forskellige bakteriestammer. Antallet af rDNA kan variere mellem forskellige bakterier. I *E. coli* er der f.eks. 7, 10 i *Bacillus subtilis* og 9 i *S. aureus*. Længden af DNA-stykket mellem 16S og 23S vil som regel være den samme i alle rDNA operons indenfor samme bakterie. Længden af det variable stykke DNA måles ved gelelektroforese, hvor DNA-stykkerne vandrer mod den positivt ladede pol i en agarose-gel. Størrelsen af stykkerne er afgørende for, hvor langt stykkerne vandrer. I agarose-gelen er der tilsat ethidium bromid, som binder sig til DNA-stykkerne, og fluorescerer ved UV-belysning. Hvor langt DNA-stykkerne er vandret sammenlignes med en markør med kendte standarder. Hvis en bakterie har flere operons med forskellige variable stykker DNA, vil disse optræde som individuelle bånd .

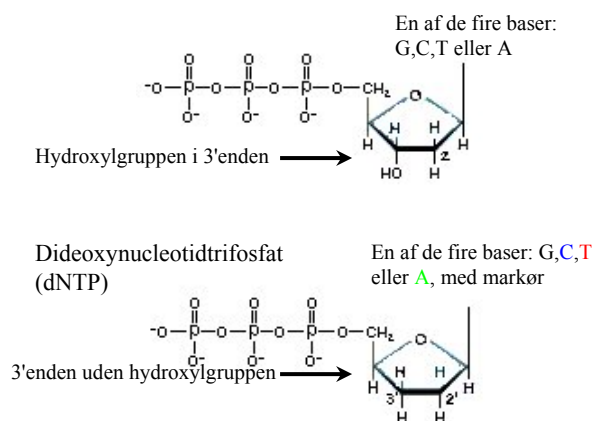


Figur 6-5 16S og 23S i bakterier (mod. e. Gurtler & Stanisich, 1996)

6.2.4 Sekventering

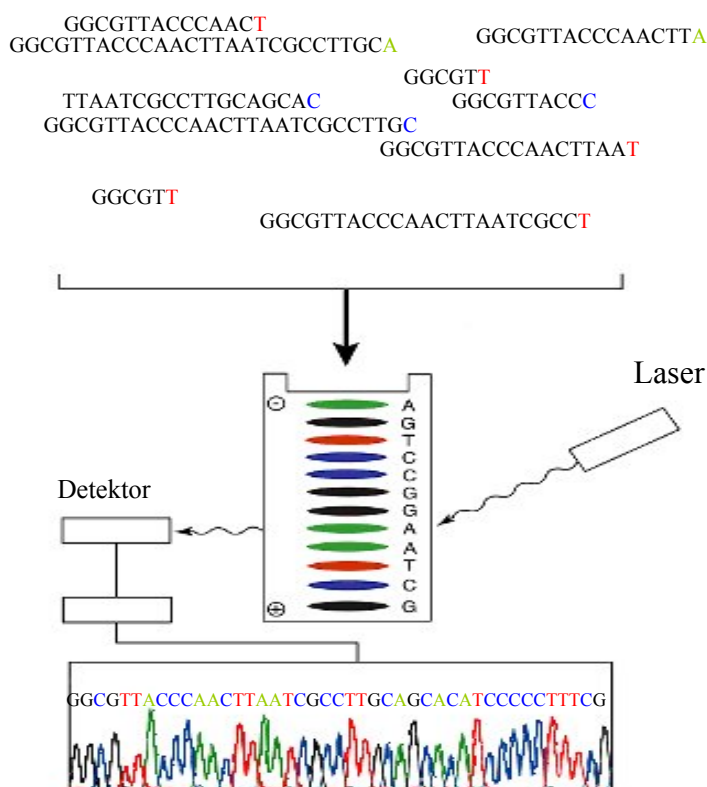
Sekventering er en afkodning af DNA, og er derfor mere præcis end de andre DNA-baserede metoder. Hvor forskellen mellem de amplificerede DNA-fragmenter bestemmes ved sammenligning af smeltepunkt og størrelse, bygger sekventering på PCR amplificering. Udover primer, dNTP og Taq polymerase, er der tilsat nogle

di-deoxy-nucleotid-tri-fofat (ddNTP). ddNTP virker som kæde-terminator, idet den mangler hydroxylgruppe i 3'-enden (Figur 6-6). Når Taq polymerasen får en ddNTP i stedet for en dNTP vil primerforlængelsen stoppe. Resultatet er en række DNA-fragmenter af forskellig længde. Ved hjælp af gelelektroforese i en kapillar bliver disse fragmenter opdelt efter størrelse. For enden af kapilaren er der en laser, der aflæser intensiteten af markørerne i 3'enden. Denne intensitet bliver afbilledet som toppe i et diagram, og hvis processen er lykkedes, vil hver top repræsentere en nukleinsyre. Hvis der har været mere end et template DNA, vil der forekomme dobbelttoppe, og det vil ikke være muligt at læse DNA-strengene.



Figur 6-6 Sekventeringsreaktion er en PCR, tilsat ddNTP. Resultatet er en række DNA fragmenter af forskellig længde med en dideoxynucleotid i enden. Disse fragmenter bliver ordnet efter længde ved hjælp af kapilarelektroforese og en laser kan aflæse hvilken markør der er på dideoxynucleotidet i 3'enden

Template DNA, Primer, dNTP, ddNTP med markør og Taq polymerase



Når DNA strengen er afkodet, kan den sammenlignes med DNAet fra de bakterier der findes i en database på internettet.

7 Materialer og metoder

Til dette projekt er der fremstillet fire specifikke produktioner af små bløde oste af rødkit typen over en etårig periode. Alle ostene blev fremstillet på et gårdmejeri. Gården har en besætning på ca. 130 sortbrogede malkekøer, som om vinteren går i et løsstaldssystem med dybstrøelse. I hver produktion er der fremstillet en batch af rå og pasteuriseret mælk. Produktionen af de to batches blev fremstillet sideløbende af mælk fra samme malkning. Den pasteuriserede type var en ost, som normalt indgik i mejeriets sortiment, mens osten, fremstillet af den rå mælk, var en, som mejeriet gerne ville, men ikke måtte, fremstille, og mejeriet havde derfor kun begrænset erfaring med fremstillingen af denne.

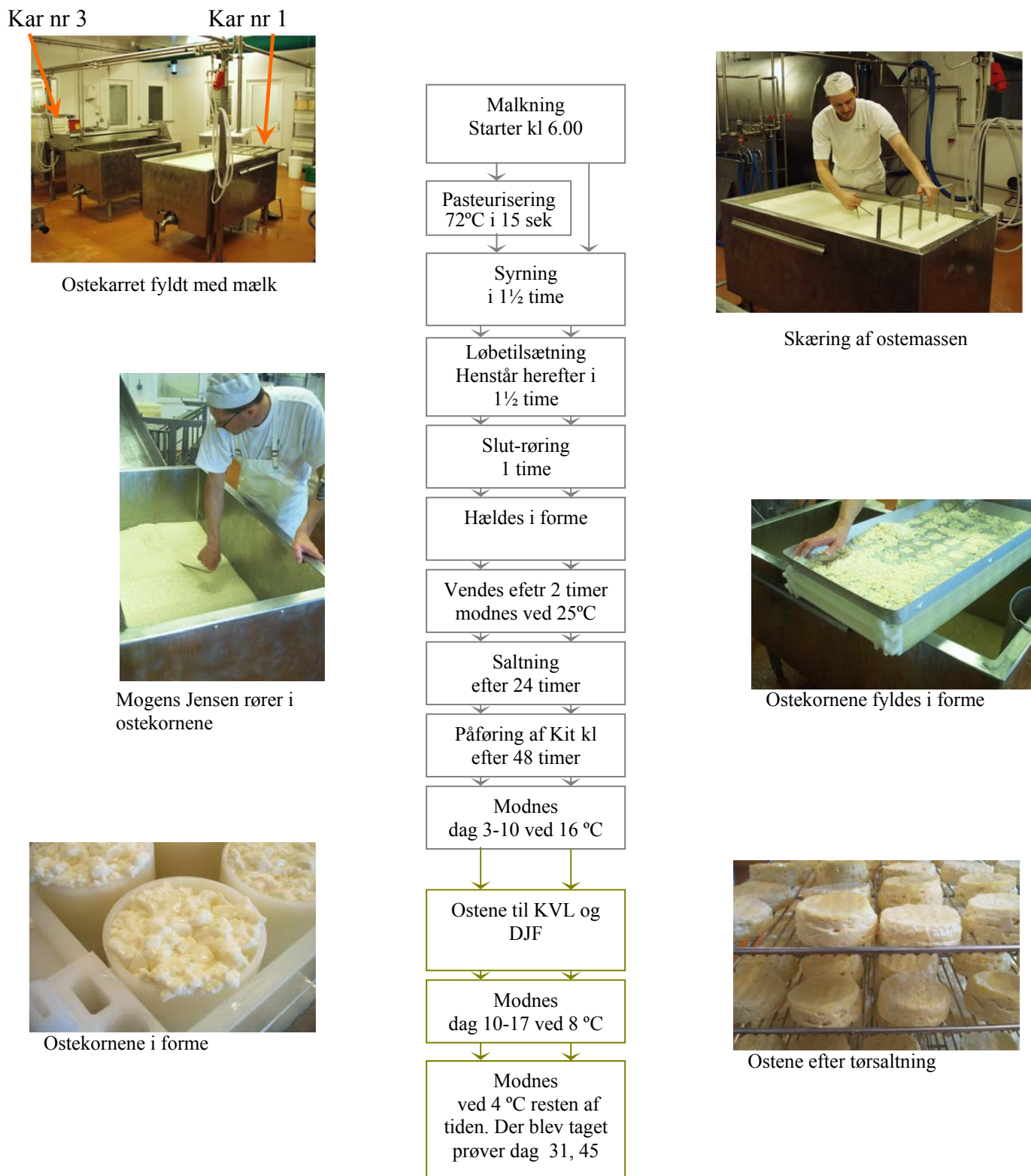
Produktion 1 foregik om efteråret (04/09-02 til 14/10-02), hvor kvæget gik på græs og havde gjort det hele sommeren. Produktion 2 foregik om vinteren (09/12-02 til 22/01-03), hvor kvæget gik inde i stalden og hovedsagligt blev fodret med ensilage. Produktion 3 foregik i forsommeren (22/05-03 til 02/07-03), hvor kvæget lige var kommet på græs. Produktion 4 foregik om efteråret (22/10-03 til 16/12-03), hvor køerne lige var kommet ind i stalden. Når ostene havde modnet i 10 dage, blev de sendt til KVL og DJF. På KVL blev alle de mikrobiologiske forsøg foretaget. På de to første osteproduktioner blev forskellen i NSLAB (primært *Lactobacillus* spp.) undersøgt ved isolering af bakterier fra medierne M17, Rogosa, MRS og PCA. Disse isolater blev sammenlignet ved ITS-PCR (Internal transcribed spacer-Polymerase chain reaction) for at se, hvilken forskel der var i antal og type af *Lactobacillus* sp. mellem ostene af pasteuriseret mælk og den rå mælk. Desuden blev forskellene mellem de fire osteproduktioner mht. antal mælkesyrebakterier og ikke-mælkesyrebakterier undersøgt.

DJF stod for alle aromaanalyser og konsistensmålinger. På mælken målte DJF protein, fedt, celletal, FFA, fedtsyresammensætning, plasmin/plasminogen og lipaseaktivitet. På ostene målte de ved hver prøveudtagning pH, aromaprofil, elektronisk næse, peptidprofil og tekstur. På Steins laboratorier måltes saltindhold, vandindhold i fedtfri ost samt fedtprocent ved hver prøveudtagning. Da DJF ikke har færdigbehandlet alle data, vil kun dele af deres resultater blive brugt i denne rapport.

For at gøre det nemmere at skelne de fire produktioner fra hinanden, bliver de i det følgende illustreret med fire farver; gul for **Produktion 1**, orange for **Produktion 2**, rød for **Produktion 3** og brun for **Produktion 4**.

7.1 Fremstilling af ostene

På Figur 7-1 ses et diagram over produktionen. Mejeriet havde allerede været i gang i nogle timer med den almindelige produktion, idet mælken fra aftenmalkningen var brugt inden fremstillingen af forsøgsostene.



Figur 7-1 flowdiagram over produktion af ostene

Fremstilling af ostene

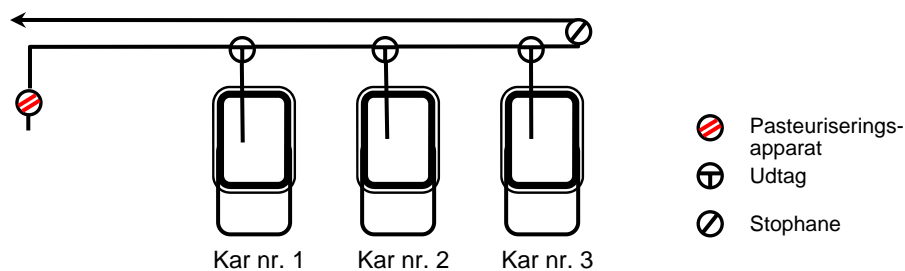
Oversigts tabel over fakta om de fire produktioner Tabel 7-1.

Tabel 7-1 Beskrivelse af produktionen af de fire Produktioner

Periode Kode	Produktion 1		Produktion 2		Produktion 3		Produktion 4	
	4/9 02 - 14/10 02 U1	P1	9/12 02 - 22/1 03 U2	P2	19/5 03 - 2/7 03 U3	P3	22/10 03 - 16/12 03 U4	P4
Opstaldning	Græs	Græs	Dyb- strøelse	Dyb- strøelse	Græs	Græs	Dyb- strøelse	Dyb- strøelse
Foder	Græs+ ensilage	Græs+ ensilage	Ensilage	Ensilage	Ny græs+ ensilage	Ny græs+ ensilage	Ensilage	Ensilage
Malkning	Ca. 6:00	Ca. 6:00	Ca. 6:00	Ca. 6:00	Ca. 6:00	Ca. 6:00	Ca. 6:00	Ca. 6:00
Pasteurisering (72°C i 15 sek)	Nej	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
Kar nr (Figur 7-2)	1	3	2	3	1	3	2	1
Ostekarret er fyldt	9:40	9:28	7:50	7:45	7:40	7:34	9:36	10:20
Starterkultur (10 g pr. 100 l.)	0:23* 10:03	0:20* 9:40	0:23* 8:13	0:28* 8:15	0:30* 8:10	0:31* 8:05	-0:04* 9:32	-0:05* 10:15
Løbe (30 ml pr. 100 l.)	1:32* 11:35	1:40* 11:20	1:17* 9:30	1:17* 9:32	1:23* 9:33	1:25* 9:30	0:33* 11:05	0:33* 10:48
Skæring (10 mm)	1:31* 13:06	1:27* 12:47	1:45* 11:15	1:45* 11:17	1:32* 11:05	1:40* 11:10	1:26* 12:31	1:28* 13:16
Efterrøring	Hvert 15. min	Hvert 15. min	Hvert 15. min	Hvert 15. min	Hvert 15. min	Hvert 15. min	Hvert 15. min	Hvert 15. min
I forme	1:03* 14:09	1:04* 13:51	0:50* 12:05	0:50* 12:07	1:00* 12:05	0:55* 12:05	1:18* 13:49	1:19* 14:35
Vending	1:06* 15:15	1:16* 15:07	ca 1:15* 13:20	ca 1:10* 13:17	ca 1:05* 13:10	ca 0:59* 13:04	ca 1:00 ca 14:50	ca 1:00 ca 15:30
Størrelse (10 cm diameter)	2 cm høje	2 cm høje	4 cm høje	4 cm høje	4 cm høje	4 cm høje	4 cm høje	4 cm høje
Modning under plastik (25°C)	Over natten	Over natten	Over natten	Over natten	Over natten	Over natten	Over natten	Over natten
Saltning (2 %)	19:55*	20:19*	21:40	21:20*	21:50*	21:56*	24:00*	24:00*
Overfladekultur (1:1000)	24:00*	24:00*	24:00*	24:00*	24:00*	24:00*	24:00*	24:00*
Pakning (Figur 7-3)	Petri skåle	Petri skåle	Høje træ- fustager	Høje træ- fustager	Lave træ- fustager	Lave træ- fustager	Høje træ- fustager	Høje træ- fustager
Modning 16°C dag	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10
Modning 8°C dag	10-17	10-17	10-17	10-17	10-17	10-17	10-17	10-17
Modning 4°C dag	18-slut	18-slut	18-slut	18-slut	18-slut	18-slut	18-slut	18-slut

* tid fra forrige handling

På mejeriet var der 3 ostekar på hver 500 l,



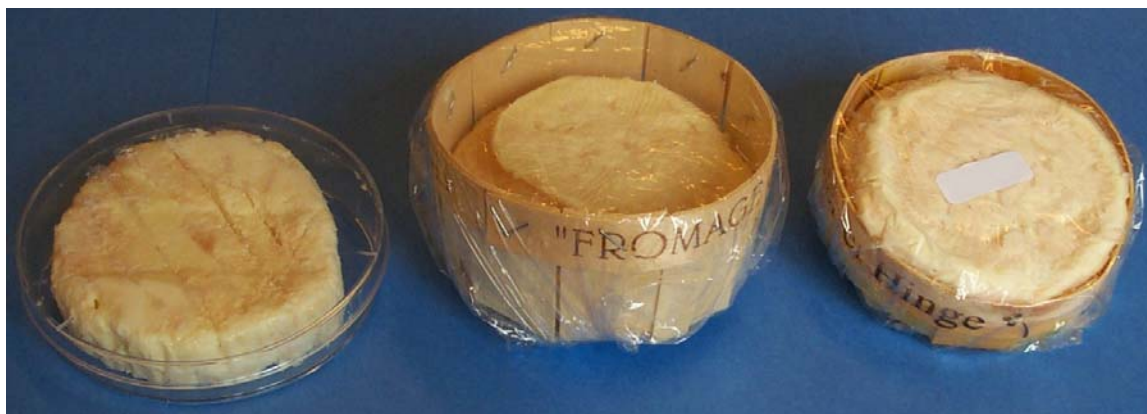
Figur 7-2 Diagram over ostekarrenes placering samt rørføring i mejeriet

Starterkultur: F-DVS *Lactococcus diacetylactis* MB-1,
lot:2403219 i produktion 1-3 og lot:2475914 i produktion 4
Mesophilic Aromatic culture, Chr. Hansen, Danmark.
i frossen pelletform. Skal opbevares ved -45°C,
men blev opbevaret ved -18°C

Kit: OFR 9
Brevibakterier, gær og *Geotrichum candidum*
Danisco Cultor, Danmark.

7.1.1 Pakning og transport af ostene

Ostene blev pakket på mejeriet, men ikke helt ens ved de fire produktioner. I produktion 1 blev ostene til KVL pakket i petriskåle, mens dem til DJF blev pakket i plastikposer. I produktion 2, 3 og 4 blev ostene pakket ens til både KVL og DJF; i træfustager med pergamentpapir i bunden og cellofan over. Dog var de anvendte fustager i produktion 3 lidt lavere end i produktion 2 og 4 (Figur 7-3), og i produktion 4 var der også lagt et stykke pergamentpapir ovenpå ostene, og der blev benyttet film i stedet for cellofan.



Figur 7-3 Foto af de tre indpakningstyper, fra venstre er det første, anden og tredje produktion. Fjerde blev næsten pakket ligesom produktion 2.

Når ostene var færdiglagret ved 16°C efter 10 dage (Figur 7-1), blev de pakket i flamingotransportkasse (med fryseelementer som stadig var frosne ved ankomst) og bragt til KVL og DJF.

7.2 Mikrobiologiske analyser

Under produktionen af ostene blev der udtaget prøver fra mælk og ost til mikrobiologisk analyse. Prøveudtagningstidspunkterne fremgår af tabel 8-2.

Tabel 7-2 oversigt over prøveudtag

	Produktion 1		Produktion 2		Produktion 3		Produktion 4	
	Dato	Dag	Dato	Dag	Dato	Dag	Dato	Dag
Mælk	4/9-02	0*	9/12-02	0*	19/5-03	0	22/10-03	0
Mælk + starterkultur					19/5-03	0	22/10-03	0
Frisk ost	6/9-02	2*	10/12-02	1*	21/5-03	2	24/10-03	2
Ost	16/9-02	12*	19/12-02	10*	28/5-03	9	10/11-03	19
Ost	24/9-02	20*	26/12-02	17*	4/6-03	16	24/11-03	33
Ost	14/10-02	40*	8/1-03	30*	18/6-03	30	5/12-03	44
Ost			15/1-03	37	2/7-03	44	16/12-03	55
Ost			22/1-03	43*				

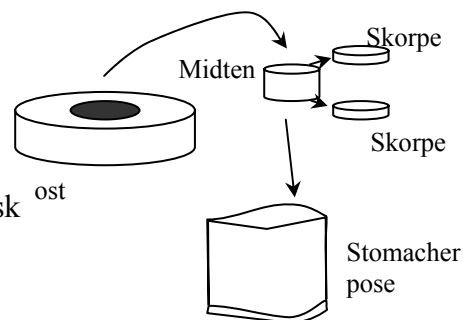
* udtaget af 5-15 isolater, som blev analyseret med ITS-PCR

7.2.1 Prøveudtagning

Prøveudtagning

Ved hvert prøveudtagningstidspunkt blev der tilfældigt udtaget to pasteuriserede og to råmælksoste. I produktion 2 og 3 blev der yderligere udtaget to af hver, som blev frosset ved -20°C . Fra hver ost blev der sterilt udtaget 10 g ost fra midten, dvs. uden skorpe (Figur 7-4). Prøverne blev afvejet i en stomacherpose (Filterbags model 400, Seward, London, England), og dernæst tilsat 90 ml FKP-vand (fysiologisk kogsaltopløsning (0,9%) med 0,1 % pepton). Prøverne blev homogeniseret i en Stomacher (Stomacher 400, Seward, London, England), ved max. hastighed i $2 \cdot 120$ sek. Efter homogenisering blev prøverne fortyndet i tifold op til 10^{-8} med FKP, og der blev foretaget overfladeudsæd med 0,1 ml på de forskellige medier (Tabel 7-3).

I produktion 4 blev disse analyser foretaget af Joan Voss, Lene Gertman og Tina Beck Hansen.



Figur 7-4 Udtagning af prøver

7.2.2 Medier

Forskellige medier

Til detektion af de forskellige typer bakterier blev anvendt forskellige agarer. I Tabel 7-3 ses hvilke samt deres inkubationsvilkår.

Der blev foretaget nogle enkelte justeringer fra produktion til produktion, f.eks. blev MRS's pH sænket fra 6,5 til 5,5, og inkubationstemperaturen hævet fra 30°C til 37°C, begge dele for at gøre mediet mere selektivt overfor *Lactobacillus* spp.

I medierne til at detektere patogene bakterier blev der mellem første og anden produktion tilvalgt medierne Baird Parker og EMB. Temperaturen for VRBA blev hævet fra 37°C til 44°C for at gøre mediet mere selektivt overfor fækale coliforme bakterier, da de coliforme bakterier burde være at finde på EMB.

Tabel 7-3 Forskellige medier og deres inkubationsvilkår i de fire produktioner.

Medier Indholdet kan ses i appendiks F	Produktion 1	Produktion 2	Produktion 3	Produktion 4	Bakterie målgruppe	Temp. °C	Tid, dage	Aerobt	Anaerobt	Indikativ	Selektiv
PCA - mælk	X [#]	X [#]	÷	X	Mesofile bakterier	30	2	√			
M17	X [#]	X [#]	X	X	<i>Lactococcus</i> spp.	30	1	√			
MRS	X [#]	÷	÷	÷	<i>Lactobacillus</i> spp	30	3		√		√
MRS - pH 5,5	÷	X [#]	X	X	<i>Lactobacillus</i> spp	37	3		√		√
Rogosa - HCl	X [#]	X [#]	X	X	<i>Lactobacillus</i> spp	30	5		√		√
Rogosa - eddikesyre	÷	÷	÷	X	<i>Lactobacillus</i> spp	30	5		√		√
VRBA (37°C)	X	÷	÷	X	Coliforme	37	2	√			√
VRBA (44°C)	÷	X	X	X	Fækale coliforme	44	2	√			√
XLD	X	X	X	X	<i>Salmonella</i> spp.	35	2	√		√	√
Slanetz	X	÷	÷	X	<i>Enterococcus</i> spp	35		√			√
Baird Parker (Æggeblomme)	÷	X	X	X	<i>Staphylococcus aureus</i>	35	2	√		√	√
EMB agar	÷	X	X	X	Enterobacteriaceae	35	2	√		√	√
Oxford	X	X	X	X	<i>Listeria</i> spp	35	2	√		√	√

[#] Ved disse prøveudtag blev der udtaget isolater, som blev analyseret med ITS-PCR

7.2.3 Isolering og rendyrkning

I Produktion 1 og 2, blev 5 til 15 kolonier fra hvert af medierne M17, PCA, MRS og Rogosa-HCL, rendyrket to gange på samme type agar, som den stammede fra. Kolonierne blev udtaget tilfældigt, dog blev specielle kolonier valgt. Renkulturene blev frosset ned i eppendorfrør med frysesubstrat (Appendiks F) til ITS-PCR.

7.2.4 ITS-PCR

ITS-PCR blev brugt til at gruppere renkulturene.

Oprensning af DNA

En 24-48 timer gammel kultur blev koncentreret ved centrifugering i 3 min. ved 10.000 rpm. Derefter blev cellerne vasket med TE buffer for at undgå inhiberende stoffer i PCR-reaktionen. Vaskningen foregik ved at genopløse pellet i 1000 µl TE buffer, og centrifugere blandingen endnu engang ved 10.000 rpm 3 min. før pellet blev genopløst i 200 µl TE buffer. Derefter tilsattes ca. 0,4 g glaskugler (106 microns glassbeads, G-4649, Sigma) og blandingen rystedes i 2•45 sek. på en fastprep (fastprep FP120 Savant, Holbrook, USA), hvorved cellerne blev knust. Cellerne blev kølet på is før, mellem og efter rystningerne.

Amplificering og primer

1 µl DNA tilsattes 49 µl ”ITS-amplificering-mix” i et lille eppendorfrør.

Amplificeringen udførtes på en Trio 48 Thermoblock (Biometra, Göttingen, Tyskland) efter programmet gengivet i Tabel 7-4

Primer 16S-1500 Forward (5'-AAG TCC TAA CAA GGT-3') DNA technology, DK
Primer 23S-32 Revers (5'-GCC ARG GCA TGG ACC-3') DNA technology, DK

Tabel 7-4 PCR program til ITS-PCR

PCR program til ITS-PCR				
	Trin	Temperatur	Tid	Gentagelser
Initial denaturering	1	94 °C	5 min.	
Denaturering	2	94 °C	30 sek.	↪ Gentages 9 gange
Annealing	3	48 °C	30 sek.	
Extension	4	72 °C	30 sek.	
Denaturering	5	94 °C	30 sek.	↪ Gentages 9 gange
Annealing	6	55 °C	30 sek.	
Extension	7	72 °C	30 sek.	
Final extension	8	72 °C	7 min.	

Gelelektroforese

Til gelelektroforesen blev brugt en agarosegel (1,5 % agarose Seakem GTG og TAE buffer), som blev smeltet i mikroovn ved 900 W, 2•1 min., hvorefter gelen blev kølet til 50°C og tilsat ethidium bromid (0,5 mg/l). Gelen blev støbt med 2•20 brøndes kamme og størknede i mindst 30 min. I hver side af gelerne blev en markør (GeneRuler 50 bp DNA Ladder Fermentas) påsat. Prøverne blev blandet med loading buffer (10 µl DNA + 2 µl loading buffer) og påsat gelerne. Prøverne vandrede 1 time ved 80 V, hvorefter gelerne blev fotograferet med et polaorid kamera med rødt filter ved UV-belysning.

7.2.5 Sekventering

Oprensning af DNA

Når DNAet blev oprenset fra en renkultur, blev den i afsnit 7.2.4 beskrevne metode benyttet.

Amplificering

2 µl DNA blev tilsat 98 µl ”DGGE-amplificering-mix” i et lille eppendorfrør.

Amplificeringen blev udført på en Trio 48 Thermoblock (Biometra, Göttingen, Tyskland) efter programmet gengivet i Tabel 7-5.

Til sekventeringen blev brugt følgerne primere (DNA Technology, DK):

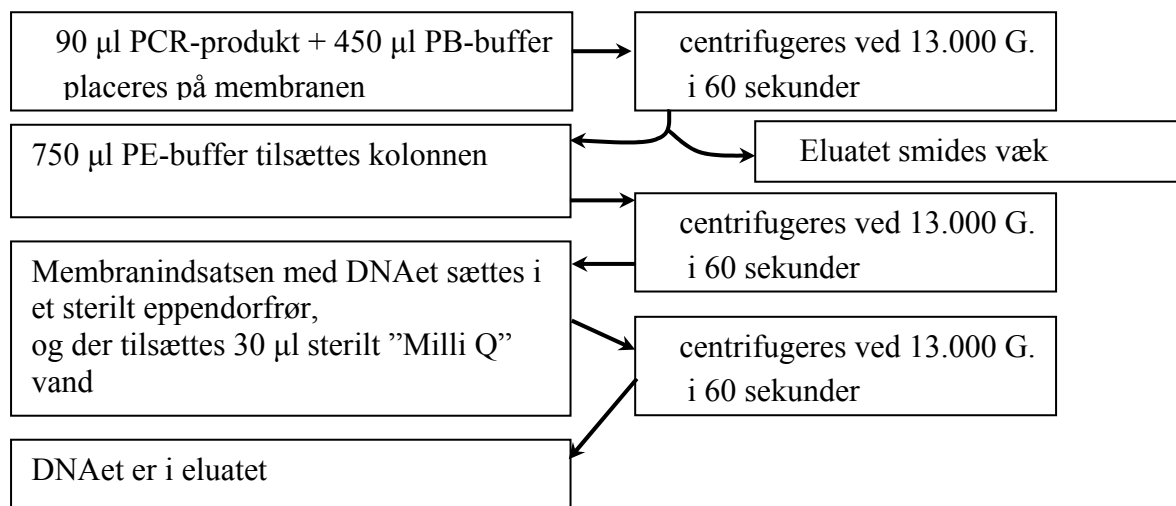
U968gc forward (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG
GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')
L1401 revers (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3')

Tabel 7-5 PCR program til sekventering

PCR program til sekventering				
	Trin	Temperatur	Tid	Gentagelser
Initial denaturering	1	94 °C	3 min.	
Denaturering	2	94 °C	30 sek.	← Gentages 29 gange
Annealing	3	56 °C	30 sek.	
Extension	4	72 °C	30 sek.	
Final extension	5	72 °C	7 min.	

Gelelektroforese

Amplificeringen blev tjekket på en agarose-gel efter samme forskrift som i afsnit 7.2.4
Rensning af DNA med QIAquick[®] kit (QIAGEN GmbH, Tyskland)



Figur 7-5 Diagram over oprensning af DNA

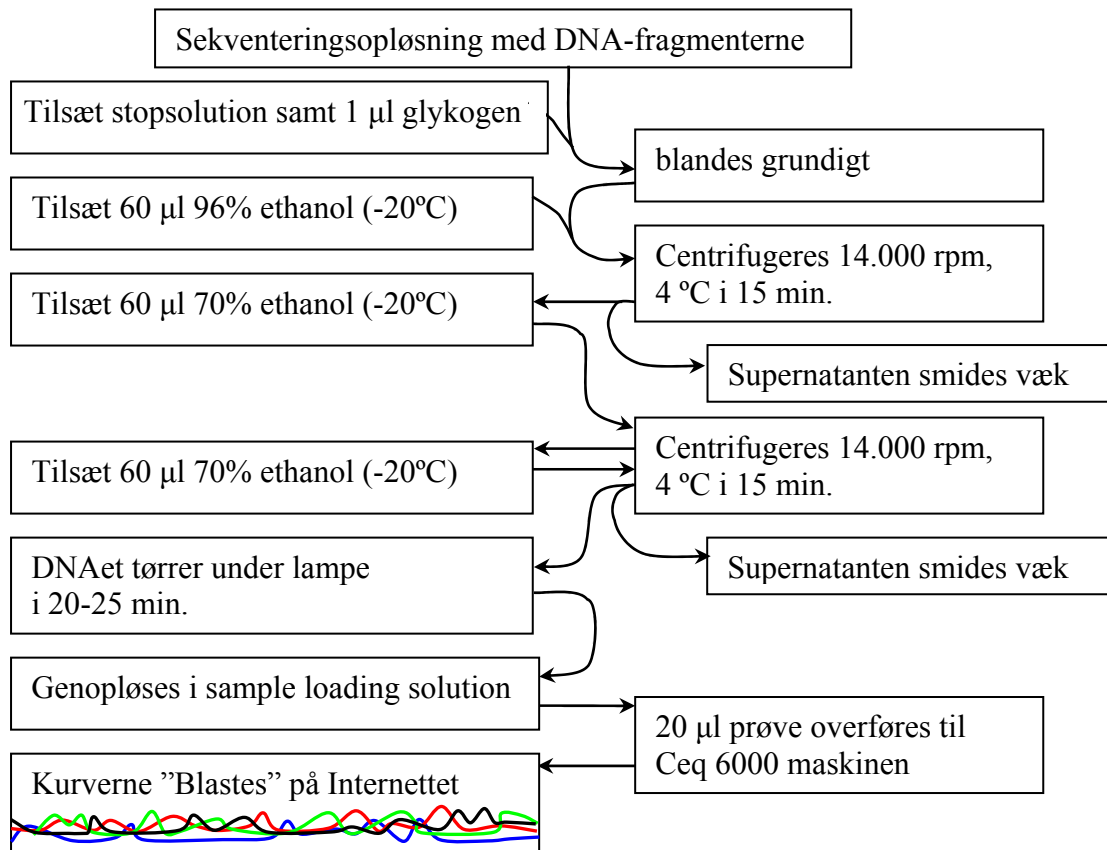
Amplificering

Først amplificering af DNAet til sekventeringen (se ITS-PCR). Ud fra den gelelektroforese, hvor renheden og koncentrationen blev tjekket, vurderes det subjektivt, om der var stærke eller svage bånd. Ud fra denne vurdering blev enten et stærkbåndsmix plus 1 µl DNA eller svagbåndsmix plus 1,5 µl DNA valgt. Til denne amplificering blev en af de to primere, U968gc eller L1401 revers valgt og DNA-fragmenterne blev dannet ud fra programmet i Tabel 7-6.

Tabel 7-6 PCR program til amplificering af sekventeringsopløsning

PCR program	Trin	Temperatur	Tid	Gentagelser
Initial denaturering	1	96 °C	1 sek.	
Denaturering	2	96 °C	20 sek.	↪ Gentages 29 gange
Annealing og extension	4	50 °C	20 sek.	
Final extension	5	60 °C	4 min.	

Ethanol fældning



Når DNA stykkerne var blevet ethanolfældet blev de "Blastet" på Internettet, hvilket vil sige at DNA-koden blev sammenlignet med DNA-stykker fra kendte bakterier.

7.3 Kemiske analyser

Der blev foretaget en række kemiske målinger på ostene. Disse målinger er foretaget under ledelse af Jacob Holm Nielsen på DJF (Danmarks Jordbrugsforskning, Afdelingen for animalske fødevarer), nogle af analyserne er foretaget af Steins laboratorier.

7.3.1 pH

pH blev målt under produktionen og under modningen. Målingerne under produktion blev i første og anden produktion foretaget med et indstiks-pH-meter (Knick pH portamess 751 Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin, Tyskland med en indstiksprobe Hamilton double pore P/N 238'400), i tredje og fjerde produktion blev der benyttet en "Microlog til Excel" til at logge pH. Fra ostene var fyldt i forme (efter 4-5 timer) og til ca. 12 timer efter produktionsstart, blev pH-målingerne foretaget under transporten fra Jylland til KVL. Temperatur- og luftfugtighedsforhold blev forsøgt afstemt med forholdene på mejeriet (ostene blev transporteret i en flamingokasse med varmt vand i bunden), men det er ikke sikkert, at de oste, der blev på mejeriet, og de oste, hvorpå syrningen blev målt, har været igennem nøjagtig samme forløb.

I den første produktion var det Steins, der målte pH under modningen. I produktion 2, 3 og 4 blev målingerne efter 7 dage foretaget af DJF. De oste, hvorpå målingerne blev foretaget, havde været opbevaret på samme måde som de resterende oste på mejeriet.

pH i ostene blev på DJF målt ved hjælp af indstiks-pH-meter. Ved hvert prøveudtag blev pH målt i fem oste.

7.3.2 Vand i fedtfri ost

Mængden af vand i den fedtfri ostemasse blev målt af Steins Laboratorium efter forskrifterne beskrevet i IDF 4A:1982 (Anonym 1982).

7.3.3 Fedt

Mængden af fedt i ostene blev målt af Steins Laboratorium efter Van Guliks metode, som er beskrevet i ISO 3433:1975 (Anonym 1975).

7.3.4 Salt

Saltprocenten blev målt af Steins Laboratorium, efter IDF 88A:1988, og angives i procent salt af totalvægten (Anonym 1988).

7.3.5 D- og L-mælkesyre

I Produktion 1 og 2 blev der af Steins Laboratorium målt D- og L-mælkesyre ved hjælp af Boehringer Mannheims kit.

7.3.6 Sensorisk bedømmelse

I Produktion 1 blev der to gange foretaget en triangel test (Meilgaard, Civille & Carr, 1999). Da det ikke i Danmark er tilladt at fremstille bløde oste af rå mælk, blev testpersonerne gjort opmærksom på at det var forbundet med en risiko for fødevareforgiftning og på eget ansvar at deltage. Første test blev udført da ostene var 19 dage gamle og efter mejeriets oplysning klar til salg. Testen blev foretaget af en lille gruppe (11 personer) bestående af personale og studerende tilknyttet sektion for Fødevaremikrobiologi ved MLI. Anden gang var efter 32 dage hvor ostene var meget modne. Testpanelet bestod af nogle af personerne fra første smagning samt studerende fra kurset "Mikrobiologiske aspekter af levnedsmiddelkonservering og kvalitetssikring" (i alt 18 personer).

Sammen med triangeltestene blev forsøgspersonerne bedt om at beskrive de smagsattributter, som gjorde, at de kunne smage forskel. Forsøgspersonerne blev ikke trænet i at beskrive smag (spørgeskemaet er vellagt som appendiks E).

I Produktion 2, 3 og 4 blev ostene visuelt bedømt. For at beskrive forskellene blev ostene frosset ned, og efter afslutning af forsøget blev alle ostene optøet. Ostene blev skåret over på midten og overfladen blev fotograferet med et kodak digitalkamera. Ostene blev lagt med skærefladen nedad på en HP flatbed scanner.

7.4 Dataanalyse

Der blev udført statistik på udvalgte resultater (SAS Institute, USA)(appendiks H)

7.4.1 Beregning af CFU

Kolonidannende bakterier pr. g (CFU pr. g, Colony Forming Units pr. g), blev beregnet efter følgende formel:

$$CFU = \frac{\sum (\text{antal}_1 + \text{antal}_n)}{\sum (\text{fortyndning}_1 + \text{fortyndning}_n)}$$

$$\text{f.eks. CFU} = \frac{\sum (39 + 7)}{\sum (1 \cdot 10^{-5} + 1 \cdot 10^{-6})} = \frac{46}{1,1 \cdot 10^{-5}} = 4,2 \cdot 10^6$$

7.4.2 PCA analyse

Princippet ved PCA (Principal Component Analysis)(Hotelling, 1933; Wold *e tal.*, 1987) er, at rå data (matrix \mathbf{X}) bliver opdelt i en ”strukturel del” og en ”støjdel”, hvor matrixen \mathbf{X} består af n objekter og p variabel ($n \cdot p$). I PCA modellen bliver matrixen \mathbf{X} opløst til en score matrix (\mathbf{T}) og en loading matrix (\mathbf{P}). residualerne bliver samlet i en matrix (\mathbf{E}) som har samme dimension som matrixen (\mathbf{X}).

Dette giver formelen:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \approx \text{”strukturel del”} + \text{”støjdel”}$$

Ved hjælp af PCA bliver de store variationer – som indeholder mest information – i matrixen \mathbf{X} beskrevet. Den første PC (Principal Component) beskriver de største variationer i data og den anden PC de næststørste osv.

Hvis scores og loadings plottes i samme diagram (Bi-plot), så vil objekterne ligge tæt ved de variable, hvor de har en høj score, og langt fra de variable hvor de har en lav score. Bi-plottet kan på denne måde bidrage til forståelse af forskellene mellem objekterne (Engelsen & Nørgaard, 1996; Wold *e tal.*, 1987).

8 Resultater og deldiskussion

8.1 Symboler og koder

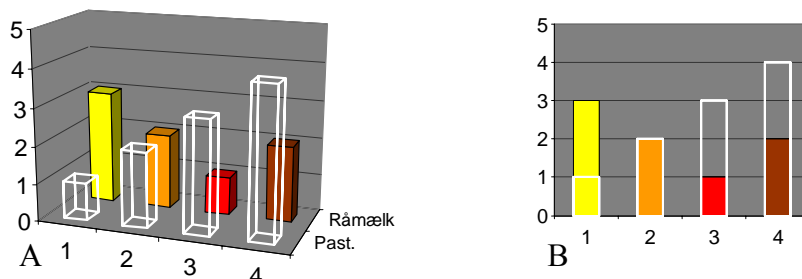
For at gøre resultaterne nemmere at læse, er der i dette afsnit benyttet samme farvekoder som tidligere og desuden en række forkortelser.

forsøg nr.	farve	forkortelser pasteuriseret	linier pasteuriseret	forkortelser rå mælk	linier rå mælk
1	gul	P1	U1	=====
2	orange	P2	U2	=====
3	rød	P3	U3	=====
4	brun	P4	U4	=====

I søjlediagrammerne er prøverne fra den rå mælk farvede og med sort kant, mens prøverne fra den pasteuriserede mælk er i forgrunden, uden farve og med hvid kant. På Figur 8-1 ses hvordan værdierne i Tabel 8-1 ville se ud i et 3D diagram, samt hvordan de ser ud i denne rapport.

Tabel 8-1 tal til eksemplet i figur 8-1

Produktion	1	2	3	4
Pasteuriseret	3	2	1	2
Rå mælk	1	2	3	4



Figur 8-1 Eksempel på et søjlediagram over tallene i tabel 9-1 som de ville se ud i et 3d diagram (A) og som de vil se ud i denne rapport (B)

8.2 Første produktion

Forsøg 1 foregik om efteråret (04/09 02 til 14/10 02), og mælken til denne produktion kom fra køer, der havde gået ude hele sommeren. Mejeriet havde afsluttet den daglige produktion, da fremstillingen af forsøgsostene blev påbegyndt, hvilket vil sige, at osteriet allerede havde været i gang i 4-5 timer. Mejeriet og ostekarrene blev rengjort og overhældt med desinficerende middel inden produktionen af forsøgsostene. Den hygiejniske standard blev vurderet som rimelig, dog blev egenkontrolprogrammet ikke fuldt med hensyn til skift af tøj og fodtøj mellem gård- og mejerimiljø.

Ostene, der blev fremstillet i forsøg 1, blev halveret inden saltning. De blev kun ca. 2 cm høje for at ligne dem, som osteriet normalt fremstiller. Ostene, især de pasteuriserede, blev meget hurtigt modne og fyldende i midten.

8.2.1 Sensorisk bedømmelse

Triangeltestene i første produktion viste et signifikansniveau på henholdsvis 70 og 90% (Tabel 8-2), hvilket er højt, når det tages i betragtning, at der kun var henholdsvis 11 og 18 testpersoner. I en triangeltest ville 33% ramme rigtigt, hvis alle gættede

Tabel 8-2 Resultater fra de to triangeltests i første produktion

Forsøg	Ostens alder	Antal testpersoner	Rigtige besvarelser	Signifikansniveau
1	19 dage	11	5 (45%)	70 %
2	dage	18	10 (56%)	90 %

Testpersonerne blev også stillet spørgsmål om smagsattributter. Svarene var meget blandede, men råmælksostene blev dog fundet mindre ammoniakede i smagen end de pasteuriserede oste.

8.2.2 Kemiske data – første produktion

I den rå mælk og den pasteuriserede mælk var der samme mængde protein og fedt, hvilket også var forventet. Der var lidt mere vand i fedtfri ost (VFFO) i den pasteuriserede ost (Tabel 8-3) Tilsvarende er blevet observeret i flere undersøgelser, dog aldrig statistisk signifikant (Grappin & Beuvier, 1997).

Der blev fundet forskellige niveauer af D- og L-mælkesyre, desværre kendes usikkerheden ikke, så det vides ikke, om forskellen mellem råmælksoste og pasteuriserede oste var signifikant eller tilfældig.

Den tilsatte mængde salt skulle være ca. 2 % af ostens vægt. Begge oste var på ca. 1,8 %, hvilket altså var lidt i underkanten.

Tabel 8-3 Kemiske data fra første produktion

	Dag	Rå	Past	Note
Protein (%)	0	3,5	3,5	Mælk
Fedt (%)	0	3,79	3,83	Mælk
	7	26,1	25,7	Frisk ost
	57	31,5	29,3	Meget moden ost
Vand (%)	7	50,2	48,6	Frisk ost
	57	42,1	47,3	Meget moden ost
Vand i fedtfri ost (%)	7	67,9	65,5	Frisk ost
	57	61,5	66,9	Meget moden ost
D-mælkesyre (%)	57	0,01	0,01	Meget moden ost
L-mælkesyre (%)	57	0,03	0,06	Meget moden ost
Salt (%)	7	1,8	1,8	Frisk ost

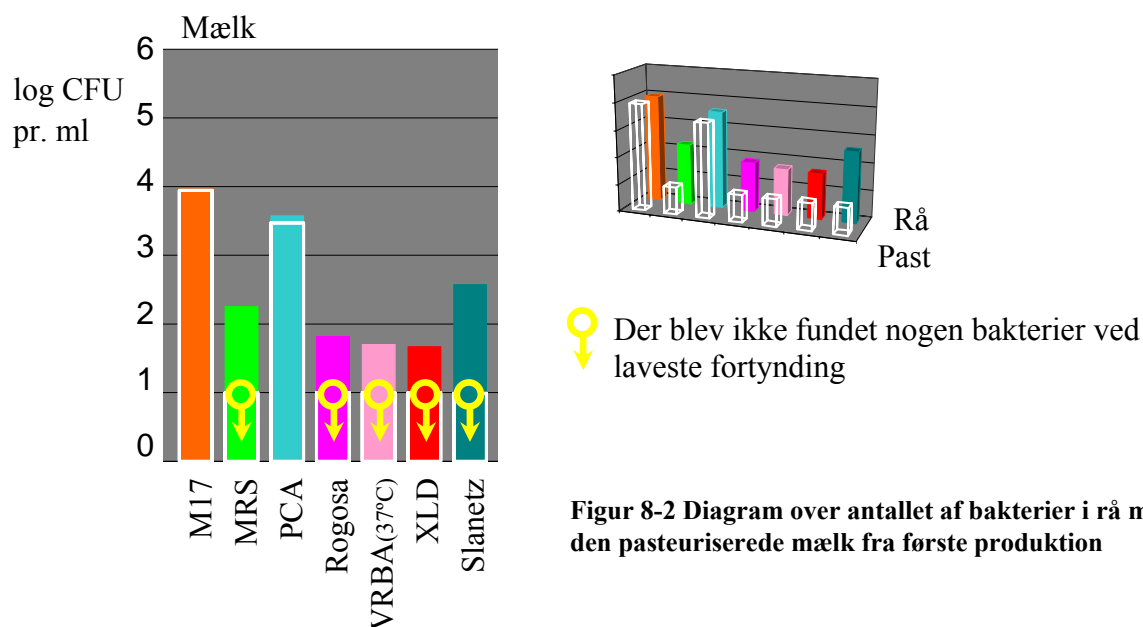
Efter 24 timer var ingen af ostene kommet under pH 5 (Tabel 8-4). Ifølge databladet fra Chr. Hansen A/S (Appendiks E) kommer starterkulturen i mælk under pH 5 efter max 17 timer. Efter 48 timer var begge oste under pH 5 og efter 8 dage var pH igen på vej op, og nåede ca. 6,7 efter 27 dage. Der var ikke så stor en forskel på de to typer oste, dog var råmælksostene lidt højere i pH efter 16 dage, hvilket passer godt med at de også blev fundet mere modne.

Tabel 8-4 pH målinger fra første produktion. Målingerne blev foretaget af undertegnede, DJF* og Steins*.

Tid fra start	Rå		Pasteuriseret		Note
	pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	
0:00 Timer	6,63	31,2	6,54	31,5	Mælk
2:07 Timer	6,56	29,6	6,57	29,4	Løbetilsætning
3:38 Timer	6,58	28,4	6,55	28,0	Skæring
4:41 Timer	6,52	27,9	6,50	27,7	Ostemassen i form
24:00 Timer	5,19	Ca 20	5,30	Ca 20	Frisk ost
48:00 Timer	4,92	Ca 20	4,98	Ca 20	Frisk ost
8 Dage*	5,28 ± 0,02	16→8	5,55 ± 0,04	16→8	Frisk ost
16 Dage*	6,27 ± 0,29	8→4	5,98 ± 0,06	8→4	Spiseklar
27 Dage*	6,73 ± 0,42	Ca 4	6,67 ± 0,21	Ca 4	Meget moden ost

8.2.3 Mikroorganismer i mælken – første produktion

I mælken fra første produktion blev der ikke fundet ret høje niveauer af bakterier, i Figur 8-2 ses, at det højeste niveau er på M17, hvor der blev fundet 10^4 CFU pr. ml. Antallet af *Enterobacteriaceae*, som blev fundet på VRBA og XLD er under 10^2 CFU pr. ml. for den rå mælk og det var ikke muligt at finde nogle bakterier på VRBA og XLD fra den pasteuriserede mælk. Dette tages som udtryk for, at pasteuriseringen har reduceret det i forvejen kendte antal bakterier. På Slanetz (kort for Slanetz & Bartley medium) blev der fundet under 10^3 CFU pr. ml. i den råmælk og ingen i den pasteuriserede mælk, så *Enterokokkerne* er blevet inaktiveret ved pasteuriseringen. Det var kun muligt at finde bakterier fra den pasteuriserede mælk på medierne M17 og PCA, hvilket kan skyldes en forurening med mælkesyrebakterier eller mikrokokker. Nogle mikrokokker vil kunne overleve pasteuriseringen, men det er bemærkelsesværdigt, var er det samme antal i den rå mælk som i den pasteuriserede mælk. Der burde også være *Lactobacillus* spp. der kunne overleve pasteuriseringen, men det var ikke muligt at finde nogle bakterier på MRS eller Rogosa fra den pasteuriserede mælk.



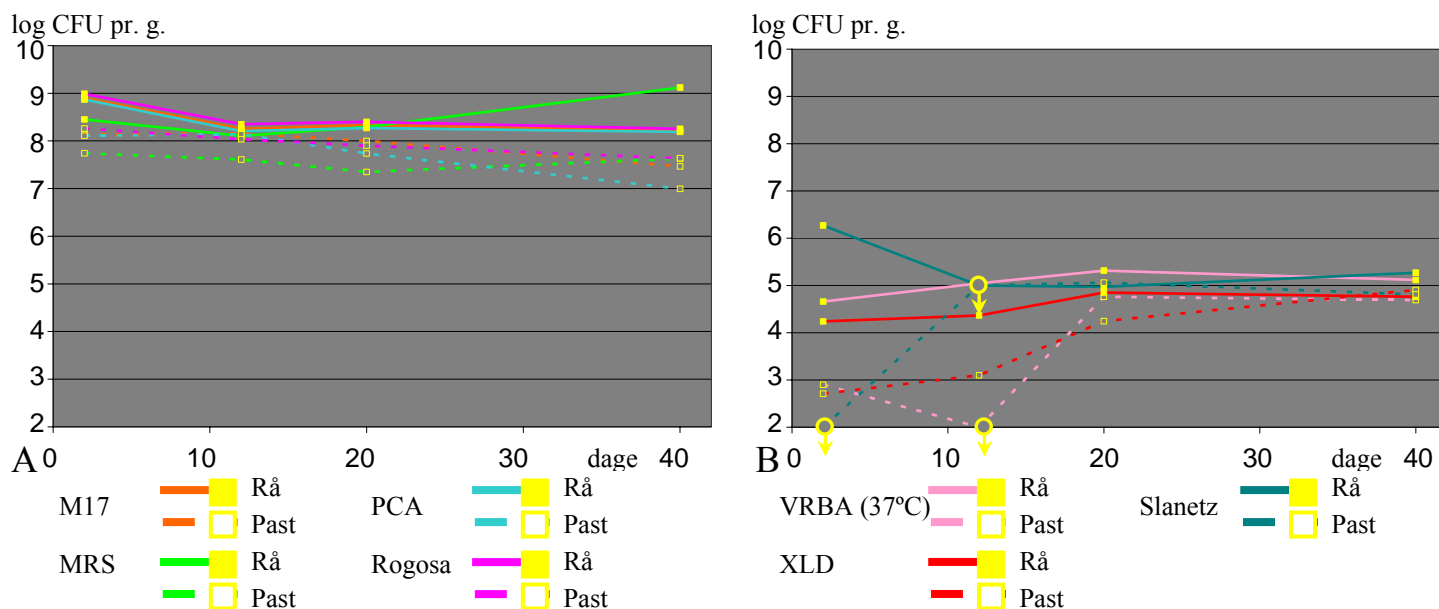
Figur 8-2 Diagram over antallet af bakterier i rå mælk og i den pasteuriserede mælk fra første produktion

8.2.4 Mikroorganismer i ostene – første produktion

M17 er en ikke-selektiv agar, hvorpå der hovedsagligt kan gro mælkesyrebakterier. MRS og Rogosa-HCL var tænkt til at påvise eventuelle *Lactobacillus* spp, men da starterkulturen (*Lactococcus*) var meget dominerende, er den det eneste, der ses på disse to agarer. Dette til trods for, at disse medier inkuberedes anaerobt og i tre dage, modsat M17 der inkuberedes aerobt og kun i et døgn. PCA var tænkt som en generel agar til at vise eventuelle skift i bakteriesammensætningen i løbet af ostens levetid. Også denne viser kun starterkulturen.

I ostene var antallet af mælkesyrebakterier stort set konstant på alle medier (Figur 8-3 A), flere blev fundet i råmælksostene end i ostene af pasteuriseret mælk.

På medierne til de patogene bakterier var det kun fra den friske råmælksost, at det på Slanetz var muligt at finde over 10^6 CFU pr. g. (Figur 8-3 B). Først efter 20 dage blev der fundet over 10^4 CFU pr. g i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk. Efter 40 dage var begge ostetyper på ca. 10^5 CFU pr. g., hvilket ikke skulle give anledning til smagsændringer.



Figur 8-3 A og B Diagrammer over antallet af bakterier i ostene fremstillet af rå og pasteuriseret mælk fra første produktion. A viser medierne beregnet til mælkesyrebakterier og B viser medierne til de patogene bakterier.

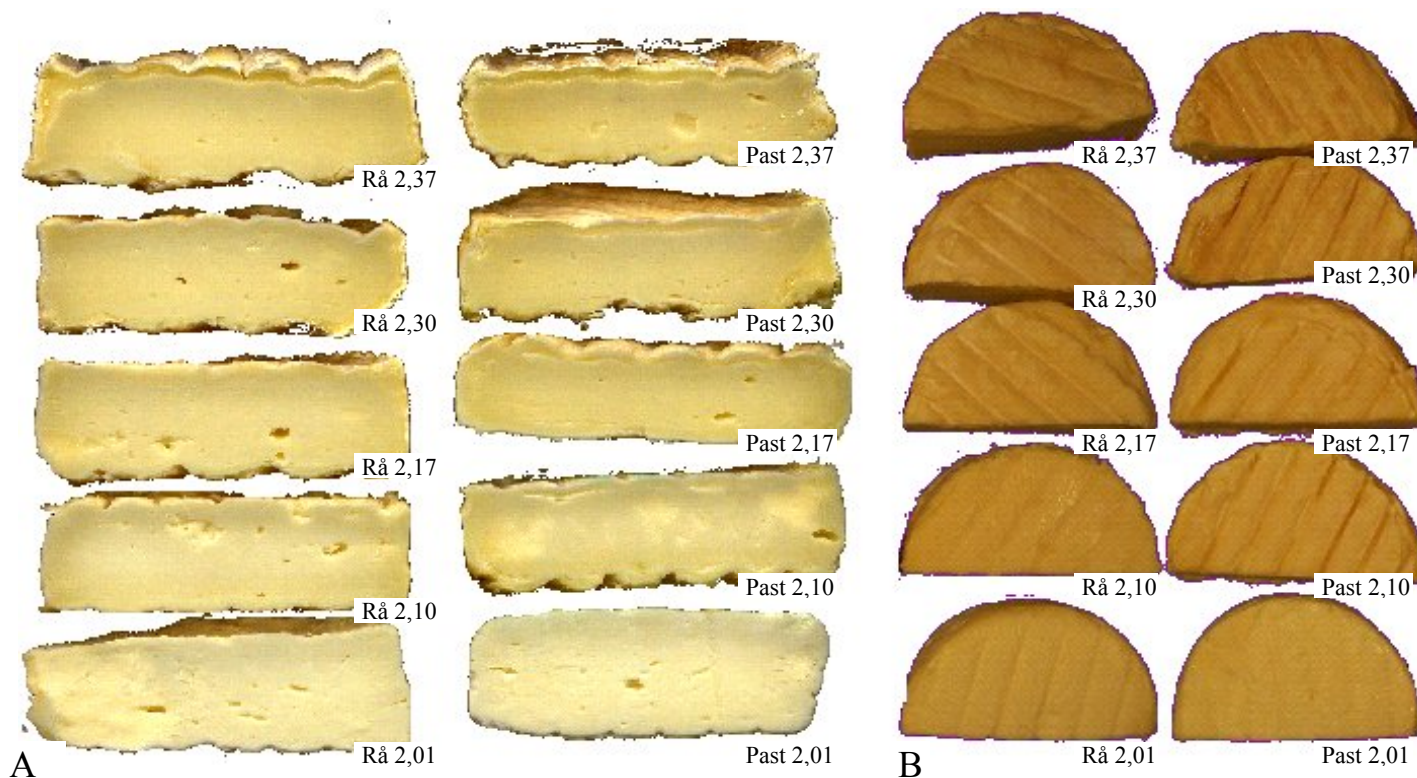
8.3 Anden produktion

Produktion nummer to foregik i december (09/12 02 til 22/01 03), hvor kjerne var inde i stalden og fik ensilage som foder. Modsat forsøg 1 og 3 var undertegnede ikke med ved fremstillingen af disse oste, men Tina Beck Hansen og Majbrit Wigø Dahl fra KVL var tilstede. Den generelle hygiejne var meget mangelfuld, og både dyr og staldmiljø var synligt beskidt, hvilket er svært at undgå om vinteren, når dyrene går tæt sammen inde i stalden.

I en undersøgelse, hvor rå mælk fra en række gårde i Camembert regionen blev observeret i en 6 måneders periode, blev der kun fundet *Listeria monocytogenes* om vinteren (Desmasures, Bazin & Gueguen, 1997). En anden undersøgelse, som fulgte fire gårde i to år viste, at to af gårdene havde et signifikant lavere antal mælkesyrebakterier i mælken om sommeren, som ikke kunne forklares med klimatiske forhold (Desmasures & Gueguen, 1997).

I mejeriet var der travlt med at fremstille oste til julehandlen, og de havde været i gang 5-6 timer før forsøgsostene blev fremstillet. Også hygiejnen i mejeriet led under juletravlheden, og var ikke på samme niveau som i første forsøg. Ostene blev ikke flækket som i forsøg 1, og var derfor 4-5 cm høje. Dette skyldtes, at især DJF havde haft problemer med de flade oste fra første runde. For at gøre vilkårene på KVL og DJF mere ens, blev alle ostene i forsøg 2 pakket i træfustager.

I anden produktion blev der fundet mange *Staphylococcus aureus* suspekter bakterier i de pasteuriserede oste, og det var derfor ikke forsvarligt at lade folk smage på disse oste. I stedet for triangeltests blev ostene visuelt bedømt, scannet (Figur 8-4A) og fotograferet (Figur 8-4B).



Figur 8-4 A og B. På planche A ses snitfladen af ostene, nederst de to hvide friske oste. Tallet efter kommaet er antal dage efter produktionen. Allerede efter 10 dage kan det ses, at den pasteuriserede ost er mere "flydende" end den, fremstillet af råmælk. Det er svært at se på planche B, men også på overfladen fik de pasteuriserede oste hurtigere et mere "gammel-oste-udseende".

Modningen var markant hurtigere i de pasteuriserede oste end i ostene fremstillet af den rå mælk. Hvor den hårdere kerne i midten hurtigt forsvandt i de pasteuriserede oste, forblev kernen fast i råmælksostene til efter 30 dage. Det er svært at se på Figur 8-4A, men på råmælksostene *Rå 2,10* og *Rå 2,30* kan skimtes en lys kerne og desuden er hullerne ikke ligeså udflydende, som i de pasteuriserede oste.

8.3.1 Kemiske data – anden produktion

Protein-indholdet var det samme både i den rå mælk og i den pasteuriserede mælk (Tabel 8-5), derimod var antallet af friefedtsyrer det dobbelte i den rå mælk. Det har ikke været muligt at finde en logisk forklaring på dette, ligesom det heller ikke vides, hvor længe mælken stod før den blev analyseret.

I ostene der var 44 dage gamle – hvilket vil være over sidste salgsdag – blev der fundet mere D-mælkesyre i råmælksostene (Tabel 8-5), dog er standardafvigelsen så stor, at denne forskel ikke er signifikant. Men et større indhold af D-mælkesyre vil være tegn på en øget aktivitet af eksempelvis *Leuconostoc* spp. eller *Lactobacillus* spp., hvilket stemmer med tesen om øget diversitet i råmælksostene.

De meget modne oste (41 dage) havde et lidt højere indhold af VFFO i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk end i råmælksostene (Tabel 8-5), hvilket er ligesom Grappin & Beuvier (1997) beskriver.

Selvom der skulle være 2 % salt i ostene, blev der i anden produktion kun fundet 0,43 og 0,15% i henholdsvis råmælksostene og ostene fremstillet af pasteuriseret mælk. Dette lave saltindhold kan have flere årsager: Man kan have glemte at salte ostene, ostene er blevet for høje til at salten kan diffundere ind i ostene eller den overskydende salt er blevet skyllet væk ved tilsættelse af overfladekulturen.. Dette vil have afgørende betydning for overfladekulturens udvikling (afsnit 5,2), samt for hæmningen af patogene bakterier.

Tabel 8-5 Kemiske data fra anden produktion. Målingerne blev foretaget af DJF og Steins. Tallet i tabellen er beregnet som gennemsnit af målinger fra fem oste, og hvor det er muligt er der givet en standardafvigelse.

	Dag	Rå	Past	Note
Protein (%)	0	3,2	3,2	Mælk
Friefedtsyre (mg/g fedt)	0	5,8	3,2	Mælk
Fedt (%)	0	4,2	4,0	Mælk
	3	29,4 ± 0,4	28,3 ± 0,2	Frisk ost
	41	30,6 ± 0,6	30,3 ± 0,8	Meget moden ost
D-mælkesyre (%)	41	0,29 ± 0,15	0,08 ± 0,06	Meget moden ost
L-mælkesyre (%)	41	0,06 ± 0,09	0,01 ± 0,00	Meget moden ost
Vand (%)	3	46,8 ± 0,8	47,3 ± 0,9	Frisk ost
	41	47,9 ± 1,1	48,7 ± 1,3	Meget moden ost
Vand i fedtfri ost (%)	3	66,4 ± 0,8	65,9 ± 1,1	Frisk ost
	41	69,0 ± 1,1	69,8 ± 1,1	Meget moden ost
Salt (%)	3	0,43 ± 0,24	0,15 ± 0,00	Frisk ost
	41	0,66 ± 0,12	0,25 ± 0,09	Meget moden ost

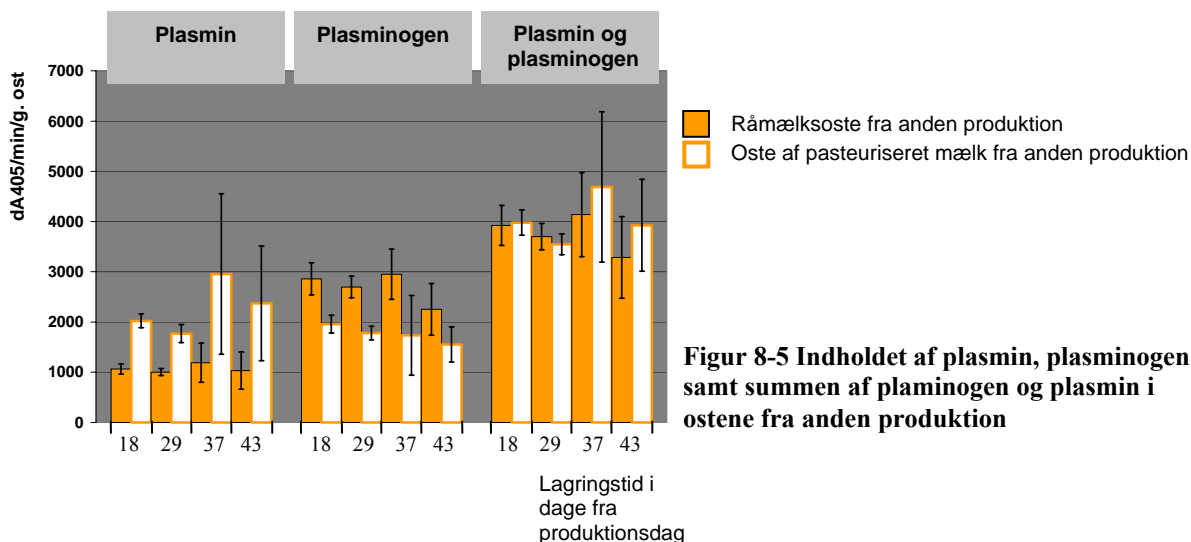
Syrningen foregik meget langsomt i anden produktion (Tabel 8-6), og ostene fremstillet af den pasteuriserede mælk kom ikke under pH 5. Først efter 51 timer nåede ostene et minimum på 5,24, hvorfor må denne produktion må betragtes som fejlsyrnet.

Råmælksostene var længere tid om at komme op i pH end ostene fremstillet af pasteuriseret mælk, hvilket svarer til, hvad der blev bemærket med hensyn til modning, idet ostene fremstillet af pasteuriseret mælk blev hurtigere bløde end råmælksostene.

Tabel 8-6 pH målinger fra første produktion. Målingerne blev foretaget af Tina Beck Hansen[#], Majbrit Wigø Dahl[#] fra KVL og DJF*.

Tid fra start	Rå		Pasteuriseret		Note
	pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	
0:00 Timer [#]	6,59	32,4	6,58	32,8	Mælk
2:07 Timer [#]	6,56	28,9	6,57	29,4	Løbetilsætning
3:38 Timer [#]	6,56	28,1	6,54	28,5	Skæring
4:41 Timer [#]	6,54	26,0	6,51	26,4	Ostemassen i form
24:00 Timer [#]	5,45	Ca 20	5,93	Ca 20	Frisk ost
48:00 Timer [#]	4,93	Ca 20	5,43	Ca 20	Frisk ost
18 Dage*	5,3 ± 0,2	16→8	5,6 ± 0,1	16→8	Frisk ost
29 Dage*	5,8 ± 0,2	8→4	6,3 ± 0,3	8→4	Spiseklar
37 Dage*	6,1 ± 0,1	Ca 4	6,9 ± 0,1	Ca 4	Moden ost
43 Dage*	7,2 ± 0,3	Ca 4	6,6 ± 0,2	Ca 4	Meget moden ost

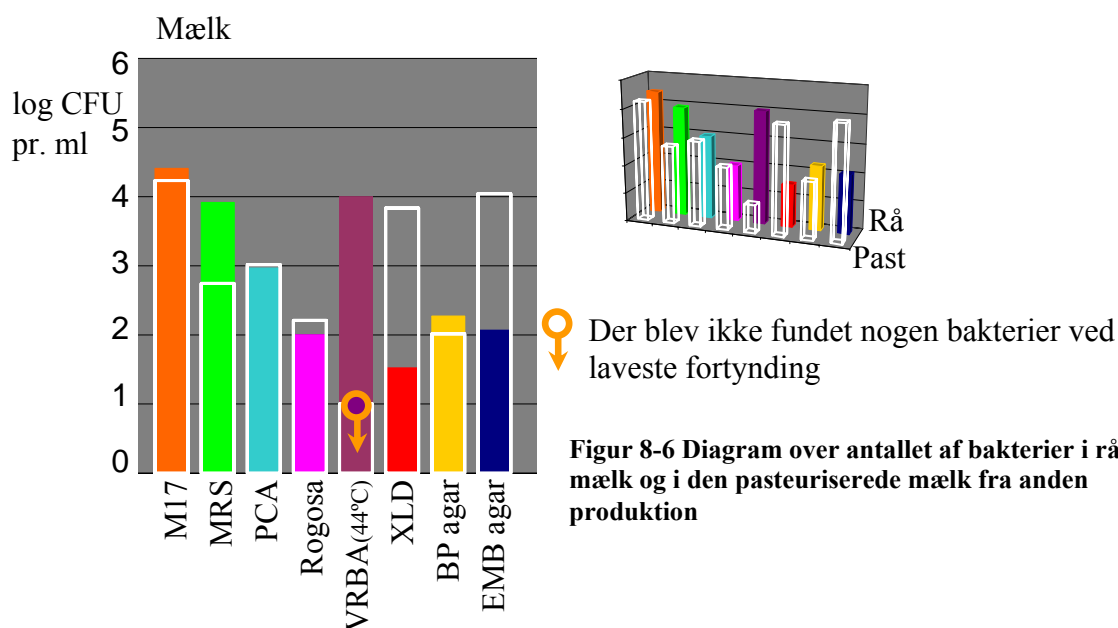
I anden produktion var der et højere plasminniveau i de pasteuriserede oste (Figur 8-5). Niveaue af plasminogen var højere i råmælksostene, men hvis mængden af plasmin og plasminogen lægges sammen, var niveaue det samme i de to typer oste. Dette resultat stemmer godt overens med teorien om, at den inhibitor, som hindrer aktivatoren i at omdanne plasminogen til plasmin, bliver ødelagt under pasteuriseringen (Grappin & Beuviel, 1997).



Figur 8-5 Indholdet af plasmin, plasminogen samt summen af plasminogen og plasmin i ostene fra anden produktion

8.3.2 Mikroorganismer i mælken – anden produktion

I anden produktion var antallet af mælkesyrebakterier på M17 det samme i den rå mælk som i den pasteuriserede mælk (Figur 8-6). I den rå mælk blev der fundet 10^4 CFU pr. ml. af fæcale coliforme på VRBA ved 44°C. På samme agar blev der ikke fundet nogen bakterier i prøverne fra den pasteuriserede mælk. På Baird Parker mediet blev der fundet ca. 10^2 CFU pr. ml. både i den rå mælk og i den pasteuriserede mælk. På medierne XLD og EMB blev der fundet ca. 10^4 CFU pr. ml. i den pasteuriserede mælk, mens der i den rå mælk blev fundet 10^2 CFU pr. ml. En så høj koncentration af *Enterobacteriaceae* bør ikke kunne forekomme i pasteuriseret mælk, hvilket tyder på en kontaminering efter pasteuriseringen. At mælken var pasteuriseret blev eftervist med en negativ fosfatasetest.

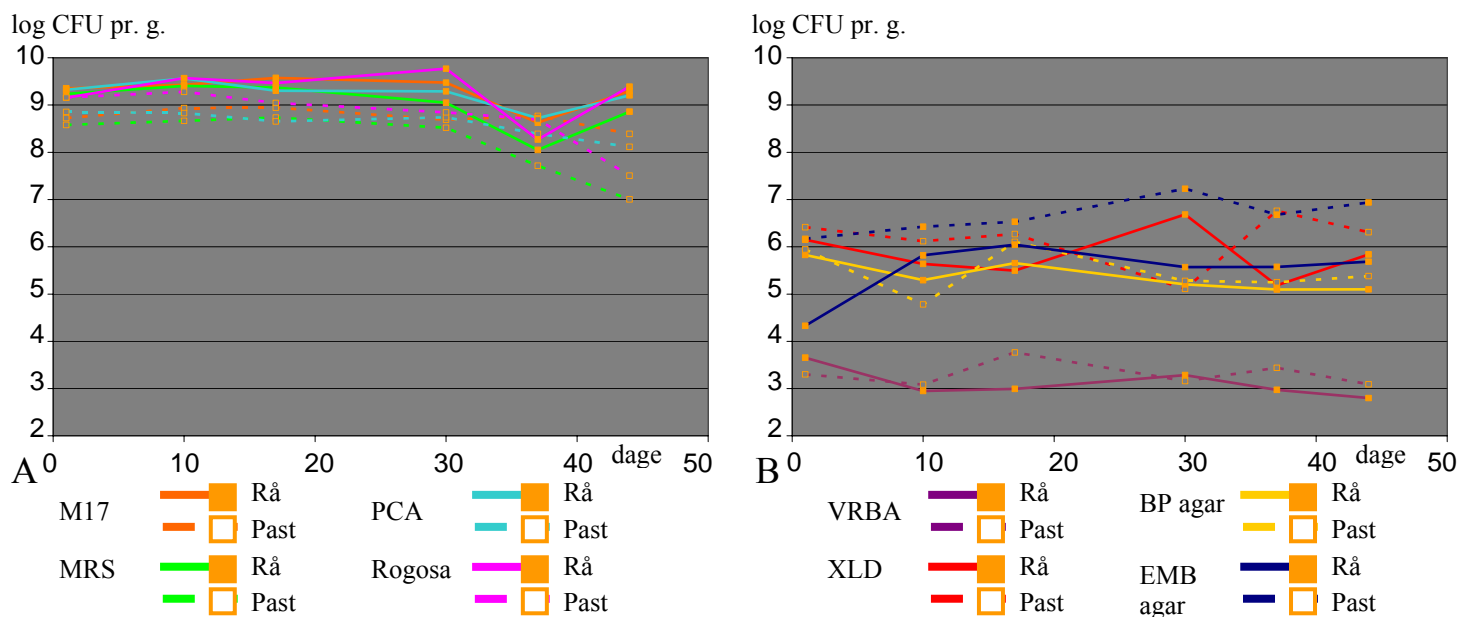


Figur 8-6 Diagram over antallet af bakterier i rå mælk og i den pasteuriserede mælk fra anden produktion

8.3.3 Mikroorganismer i ostene – anden produktion

Antallet af mælkesyre bakterier var omkring 10^9 CFU pr. g. gennem hele modningsperioden (Figur 8-7 A), lidt højere i råmælksostene og lidt lavere i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk. Det er derfor ikke sandsynligt, at det skyldes for lille tilsætning af mælkesyrebakterier, at syrningen gik langsomt.

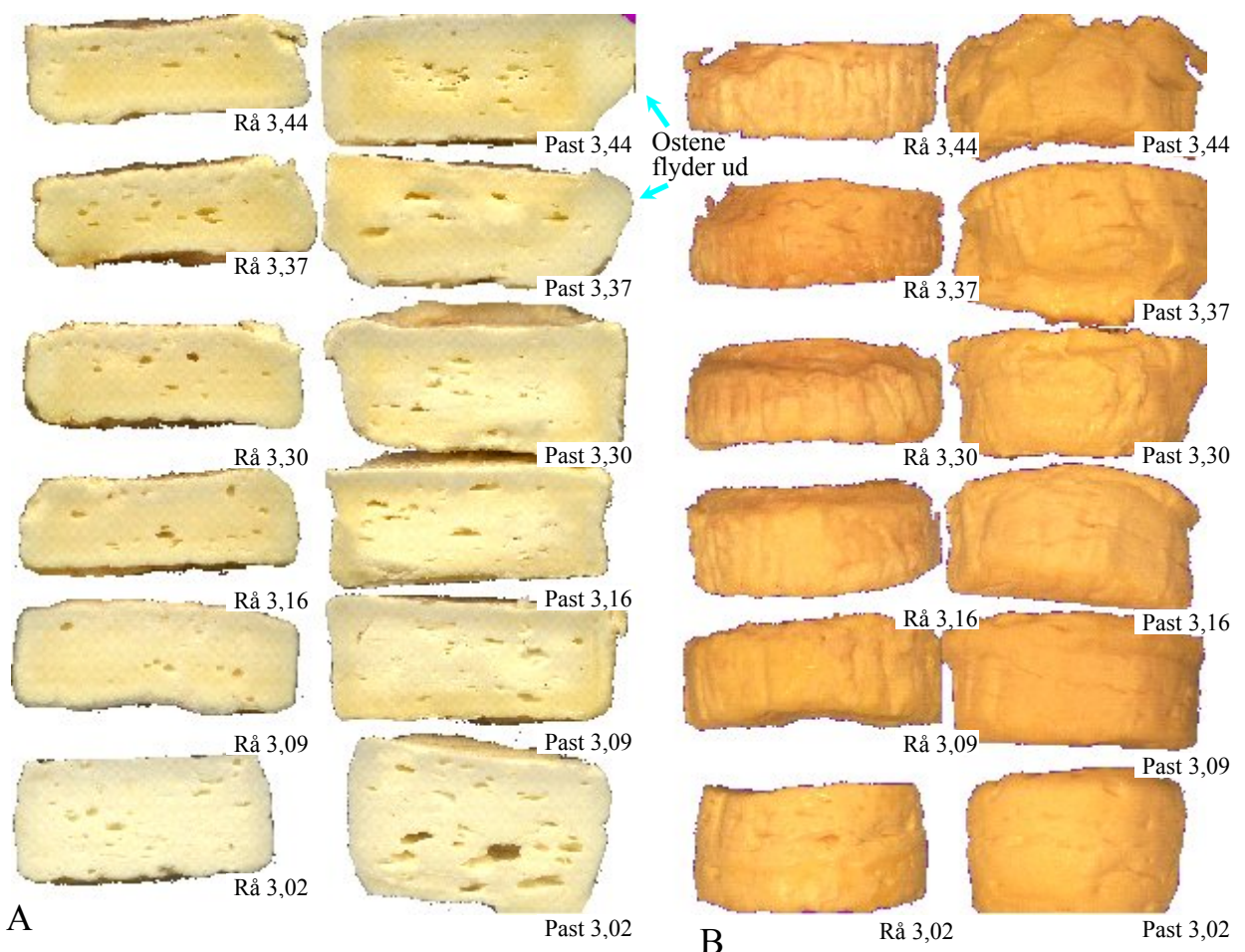
Både råmælksostene og ostene fremstillet af pasteuriseret mælk var på medierne XLD og Baird Parker oppe på 10^6 CFU pr. g. allerede i de friske oste (2 dage). Dette høje antal bakterier må skyldes den langsomme syring, eller omvendt kan det høje antal *Enterobacteriaceae* have været skyld i den langsomme syring. Ved niveauer på 10^6 CFU pr. g. og derover kan det ikke udelukkes, at disse bakterier kan give smag til ostene.



Figur 8-7 A og B Diagrammer over antallet af bakterier i ostene fremstillet af rå og pasteuriseret mælk fra anden produktion. A viser medierne beregnet til mælkesyrebakterier og B viser medierne til de patogene bakterier.

8.4 Tredje produktion

Tredje produktion foregik om foråret (22/05 03 til 02/07 03), kørerne var lige kommet på græs, og mejeri og staldmiljø virkede synligt rent og pænt. Ostene blev ligesom i anden produktion pakket i træfustager med pergamentpapir, men der blev anvendt nogle fustager, som var lavere end dem fra anden og fjerde produktion. Konsekvensen heraf var, at cellofanen kom i berøring med ostene. Modningsmønsteret var ligesom i første produktion; ostene fremstillet af rå mælk modnede hurtigere end ostene fremstillet af pasteuriseret mælk (Figur 8-8). Der blev ikke foretaget triangeltest af denne produktion, men flere personer smagte på ostene. Smagen kunne bedst beskrives som meget uren for begge ostetyper, men ikke som en stærk, overmodnet ost. De virkede i mundfylde, som om de ikke var færdigmodnede, smagen var meget kraftig, men udefinerbar.



Figur 8-8 A og B På planche A ses snitfladen af ostene, nederst de to hvide friske oste. Tallet efter kommaet er antal dage efter produktionen. Den hvide umodne kerne kan i ostene fremstillet af den pasteuriserede mælk ses helt frem til 37 dage efter produktionen. I råmælksostene var kernen væk efter 16 dage, men råmælksostene var også lidt mindre end ostene fremstillet af pasteuriseret mælk. Planche B viser ostene set fra siden.

Ostene fra tredje produktion var meget lang tid om at blive bløde i midten. I de oste, der var fremstillet af pasteuriseret mælk var der stadig en hård kerne efter 44 dage (Past 3,44 på Figur 8-8A), hvorimod kernen var næsten væk i råmælksostene efter 16 dage (Rå 3,16 på Figur 8-8A). Til trods for den hårde kerne var ostene fremstillet af pasteuriseret mælk meget flydende efter 37 dage (turkise pile på Figur 8-8A).

8.4.1 Kemiske data – tredje produktion

I tredje produktion var der næsten lige meget protein i den rå mælk og i den pasteuriserede mælk (Tabel 8-7), men der var 20% mere fedt i den rå mælk. Det, at der var mindre fedt og protein (dog kun lidt) i den pasteuriserede mælk kunne give en mistanke om, at den pasteuriserede mælk var fortyndet med vand, men i såfald skulle forholdet være mellem fedt og protein var det samme i de to typer mælk. Fedtindholdet bliver normalt justeret med fløde, men i denne produktion må der være sket en fejl, hvilket vil have stor indflydelse på ostene. Efter 9 dage bliver der målt mindre fedt i råmælksostene, men da alt fedtet bliver i ostemassen kan dette kun ske ved at der er fremstillet mere ost.

Den rå mælk: $100 \text{ L mælk med } 4,2 \% \text{ fedt} = 4,2 \text{ kg fedt} \rightarrow$
 $4,2 \text{ kg fedt} / 0,27 \text{ (27,1\% fedt i ostene efter 9 dage)} = 15,5 \text{ kg ost}$

Past. mælk: $100 \text{ L mælk med } 3,5 \% \text{ fedt} = 3,5 \text{ kg fedt} \rightarrow$
 $3,5 \text{ kg fedt} / 0,31 \text{ (31,4\% fedt i ostene efter 9 dage)} = 11,1 \text{ kg ost}$

Men da der var næsten samme mængde protein i de to typer mælk, vil der procentvis være mindre protein og mere vand i råmælksostene. Derfor er VFFO også højere i råmælksostene, hvilket vil have betydning for modning og givetvis også for væksten af bakterier, da et øget vandindhold vil medføre højere vandaktivitet.

Tabel 8-7 Kemiske data fra tredje produktion. Målingerne er foretaget af DJF og Steins. Tallet i tabellen er beregnet som gennemsnit af målinger fra fem oste, og hvor det er muligt er der givet en standardafvigelse.

	Dag	Rå	Past	Note
Protein (%)	0	3,4	3,3	Mælk
Fri fedtsyre (mg/g fedt)	0	8,5	4,3	Mælk
Fedt (%)	0	4,2	3,5	Mælk
	9	27,1 ± 0,7	31,4 ± 0,5	Frisk ost
	45	29,2 ± 0,9	32,3 ± 0,9	Meget moden ost
Vand (%)	9	49,2 ± 0,3	42,5 ± 0,8	Frisk ost
	45	46,9 ± 1,4	42,5 ± 1,3	Meget moden ost
Vand i fedtfri ost (%)	9	67,5 ± 0,2	61,9 ± 0,8	Frisk ost
	45	66,3 ± 1,4	62,8 ± 1,1	Meget moden ost
Salt (%)	9	0,41 ± 0,09	0,33 ± 0,12	Frisk ost
	45	0,35 ± 0,16	0,24 ± 0,07	Meget moden ost

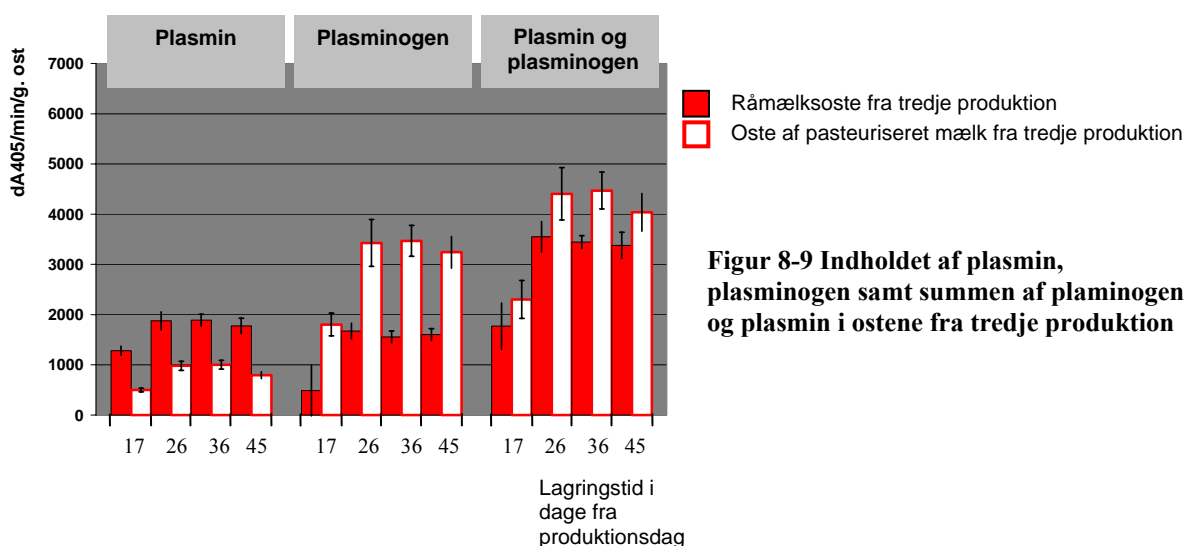
Saltindholdet var mellem 0,33 og 0,41 %, hvilket ligesom i anden produktion er langt fra de 2% salt som var den ønskede mængde.

Syrningen foregik meget langsomt i tredje produktion, og ostene fremstillet af pasteuriseret mælk havde først deres minimum efter 25 dage (tabel 8-8). Forklaringen på dette skal nok findes i antallet af mælkesyrebakterier (afsnit 8.4.3). Råmælksostene var hurtigst til at stige i pH, hvilket passer godt med, at også disse oste blev først modne.

Tabel 8-8 pH målinger fra tredje produktion. Målingerne blev foretaget af undertegnede og DJF*.

Tid fra start	Rå		Pasteuriseret		Note
	pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	
0:00 Timer	6,63	32,0	6,64	31,9	Mælk
2:07 Timer	6,62	30,6	6,64	29,7	Løbetilsætning
3:38 Timer	6,59	29,9	6,57	28,9	Skæring
4:41 Timer	6,53	26,0	6,48	26,4	Ostemassen i form
24:00 Timer	5,49	Ca 20	5,29	Ca 20	Frisk ost
48:00 Timer	5,38	Ca 20	5,17	Ca 20	Frisk ost
16 Dage*	5,47 ± 0,10	16→8	4,92 ± 0,01	16→8	Frisk ost
25 Dage*	5,81 ± 0,19	8→4	4,70 ± 0,28	8→4	Spiseklar
35 Dage*	6,16 ± 0,41	Ca 4	5,14 ± 0,05	Ca 4	Moden ost
44 Dage*	6,39 ± 0,12	Ca 4	5,56 ± 0,12	Ca 4	Meget moden ost

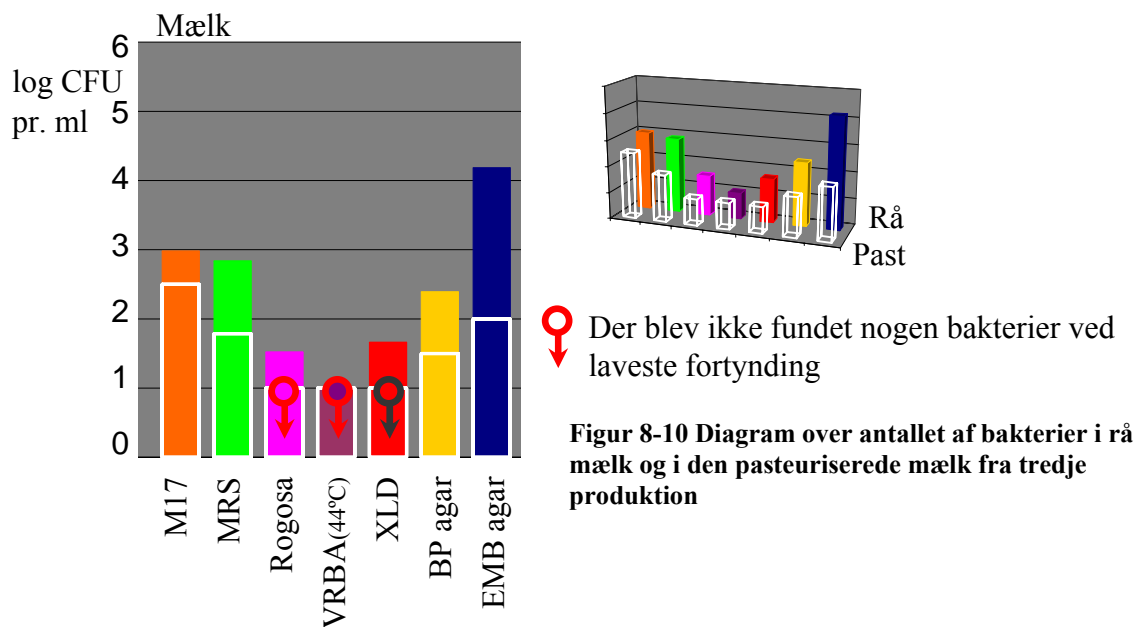
I tredje produktion (Figur 8-9) var plasminaktiviteten højere i råmælksostene, hvilket var modsat det forventede. Lægges mængden af plasmin og plasminogen sammen er indholdet højere i den pasteuriserede mælk end i den rå mælk, hvilket udelukker eventuelle spekulationer om at det lave plasminindhold kunne skyldes, at der var tilsat vand til mælken – som ellers blev anført som årsagen til det lavere proteinindhold i den pasteuriserede mælk i dette forsøg (Figur 8-9). Det har ikke været muligt at finde årsagen til den øgede plasminaktivitet i råmælksostene.



Figur 8-9 Indholdet af plasmin, plasminogen samt summen af plasminogen og plasmin i ostene fra tredje produktion

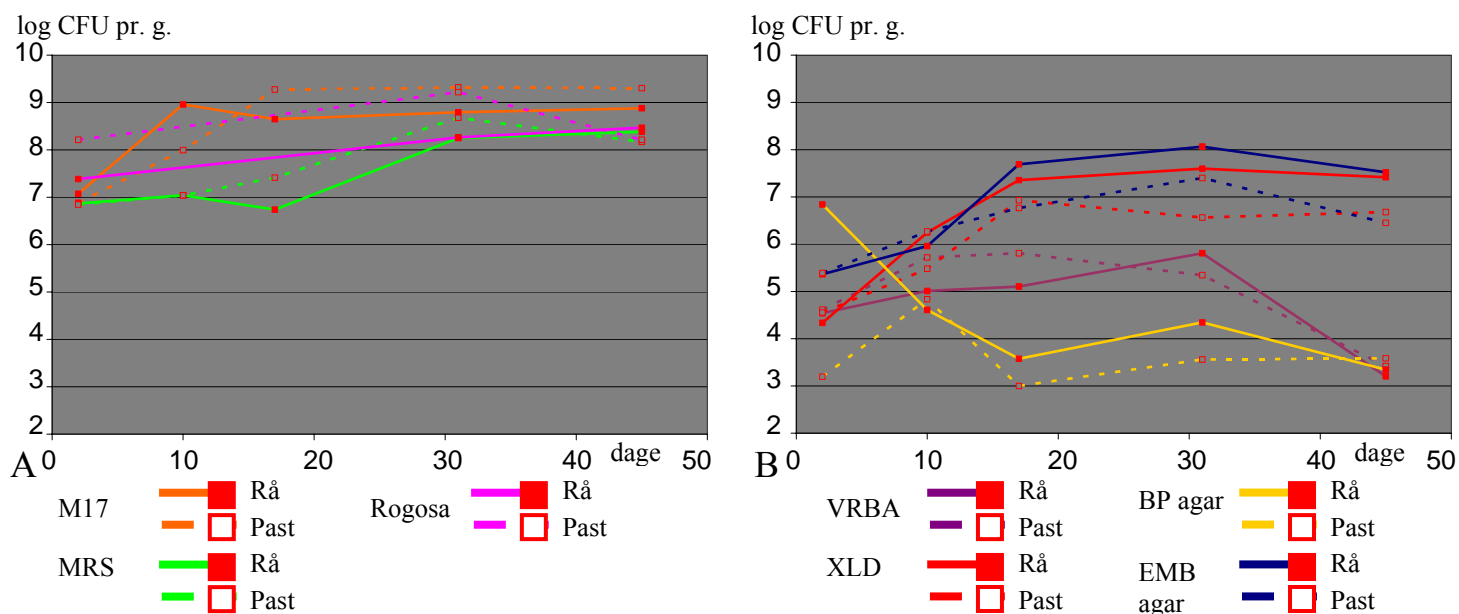
8.4.2 Mikroorganismer i mælken – tredje produktion

Antallet af mælkesyrebakterier i mælken var ikke så højt i tredje produktion (Figur 8-10), men der blev fundet 10^4 CFU pr. ml. på EMB mediet i prøverne fra den rå mælk og 10^2 CFU pr. ml. i den pasteuriserede mælk.



8.4.3 Mikroorganismer i ostene – tredje produktion

Antallet af mælkesyrebakterier på M17 var ca. 10^7 CFU pr. g. i den friske ost (efter 2 dage), og kom først op på ca. 10^9 CFU pr. g. efter 10 dage for råmælksostene og efter 20 dage for ostene fremstillet af pasteuriseret mælk (Figur 8-11A). Dette var sikkert årsagen til, at antallet af bakterier, der findes på XLD og EMB var støt stigende i de første 20 dage i begge typer oste. Efter 30 dage var antallet af bakterier på disse to medier oppe på ca. 10^8 CFU pr. g. i råmælksostene og 10^7 CFU pr. g. for ostene fremstillet af pasteuriseret mælk (Figur 8-11B). En mulig årsag til den langsomme vækst af mælkesyrebakterierne og den heraf følgende stigning i *Enterobacteriaceae* er, at starterkulturen på mejeriet blev opbevaret ved -18°C , og ikke ved de -45°C som Chr. Hansen A/S foreskriver. Der blev tilsat samme afvejede mængde starterkultur i alle fire produktioner, men det er tvivlsomt, om den var lige aktiv. Den starterkultur, som blev brugt, var af typen ”frosset-koncentreret”. Ved første produktion var kartonen halvt fyldt, ved tredje var den næsten tom. Starterkulturen var ude af fryseren i ca. 10 min. hver gang, der blev afvejet kultur. Da den samme kultur blev anvendt til mange af de oste mejeriet fremstillede, kan kulturen altså jævnligt have været udsat for temperaturbelastning og derved tabt i vitalitet. Dette blev dog ikke tjekket.



Figur 8-11 A og B Diagrammer over antallet af bakterier i ostene fremstillet af rå og pasteuriseret mælk fra tredje produktion. A viser medierne beregnet til mælkesyrebakterier og B viser medierne til de patogene bakterier.

8.5 Fjerde produktion

Den fjerde og sidste produktion foregik om vinteren (22/10 03 til 16/12 03), hvor kørne, ligesom i forsøg 2, stod inde og fik ensilage som foder. Mejeriet var lukket, så der var ingen anden produktion, og der var synligt rent og pænt. Både ostene fremstillet af rå og pasteuriseret mælk havde i produktion nummer 4 en meget ren smag (neutral). Ostene var meget lang tid om at modne, og som det kan ses på Figur 8-12 var der en kerne i begge oste selv efter 44 dage, hvor en ost af denne type, burde have været flydende. Overfladekulturen udviklede ingen farve og mindede mere om et lag hvidskimmel.



Figur 8-12 A og B. A scanninger af snitfladen B Foto af ostene fra fjerde produktion, hvor ostene var meget lang tid om at modne, selv efter 44 dage var den faste kerne stadig tilbage.

8.5.1 Kemiske data – fjerde produktion

Proteinindholdet var lidt højere i den rå mælk end i den pasteuriserede mælk (Tabel 8-9), hvilket må skyldes iblanding af lidt vand i den pasteuriserede mælk. VFFO var lidt højere i den pasteuriserede mælk (ligesom i første produktion).

Saltindholdet var også i denne produktion under halvdelen af de 2% som var ønsket.

Tabel 8-9 Kemiske data fra fjerde produktion. Målingerne blev foretaget af DJF og Steins.
Tallet i tabellen er beregnet som gennemsnit af målinger fra fem oste, og hvor det er muligt er der givet en standardafvigelse.

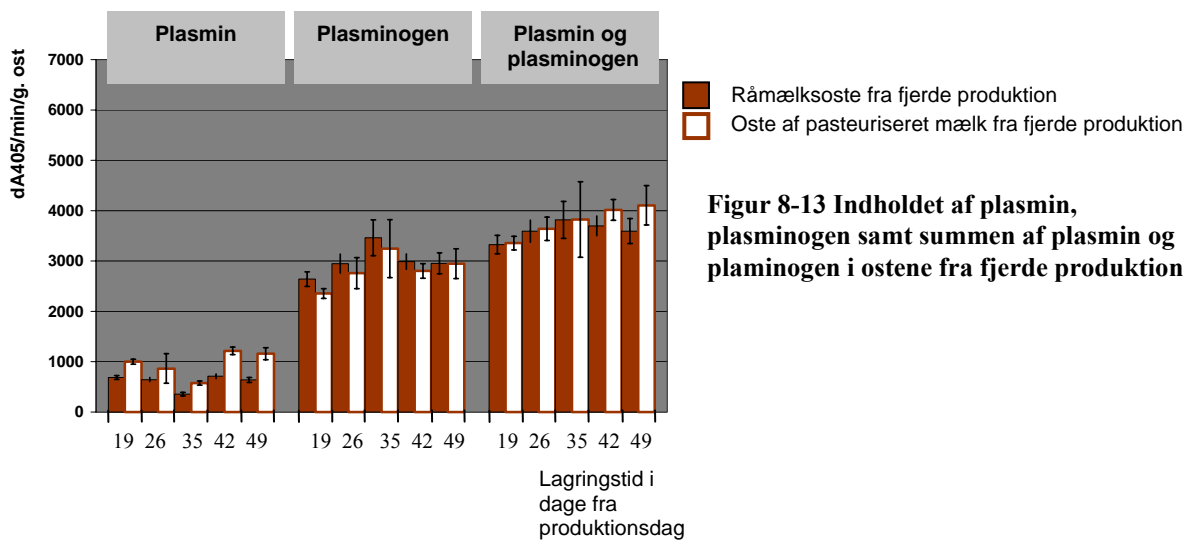
	Dag	Rå	Past	Note
Protein (%)	0	3,5	3,3	Mælk
Fri fedtsyre (mg/g fedt)	0	4,2	5,3	Mælk
Fedt (%)	0	4,1	3,9	Mælk
	7	30,0 ± 0,5	28,6 ± 0,5	Frisk ost
	46	33,6 ± 1,5	31,6 ± 1,5	Meget moden ost
Vand (%)	7	45,1 ± 0,9	46,5 ± 0,8	Frisk ost
	46	42,7 ± 2,6	46,2 ± 2,9	Meget moden ost
Vand i fedtfri ost (%)	7	64,4 ± 0,9	65,3 ± 0,9	Frisk ost
	46	64,3 ± 2,1	67,4 ± 2,8	Meget moden ost
Salt (%)	7	0,80 ± 0,23	0,74 ± 0,08	Frisk ost

Efter 48 timer var pH i begge oste nede på 5,1 (Tabel 8-10). Efter 35 dage var pH ikke over 5,5, hvilket ville være forventet af en skimmelost, men på billederne af ostene ses det, at der ikke var ret meget skimmel på ostene fra fjerde produktion (Figur 8-12). Måske var det årsagen til den langsomme modning.

Tabel 8-10 pH målinger fra fjerde produktion. Målingerne er foretaget af undertegnede og DJF*

Tid fra start	Rå		Pasteuriseret		Note
	pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	
0:00 Timer	6,7	34,4	6,5	33,0	Mælk
1:36 Timer	6,7	31,3	6,5	30,3	Løbe tilsætning
3:04 Timer	6,5	29,0	6,5	29,9	Skæring
4:30 Timer	6,4	28,7	6,4	27,5	Ostemassen i form
24:00 Timer	5,1	22,3	5,4	22,3	Frisk ost
48:00 Timer	5,1	20,0	5,1	20,0	Frisk ost
7 Dage*	4,90 ± 0,11	16,0→8,0	4,90 ± 0,06	16,0→8,0	Frisk ost
14 Dage*	4,90 ± 0,03	8,0→4,0	5,04 ± 0,10	8,0→4,0	Spiseklar
21 Dage*	5,62 ± 0,46	4,0	5,71 ± 0,41	4,0	Moden ost
28 Dage*	5,56 ± 0,46	4,0	5,25 ± 0,14	4,0	Moden ost
35 Dage*	5,43 ± 0,14	4,0	5,44 ± 0,10	4,0	Meget moden ost

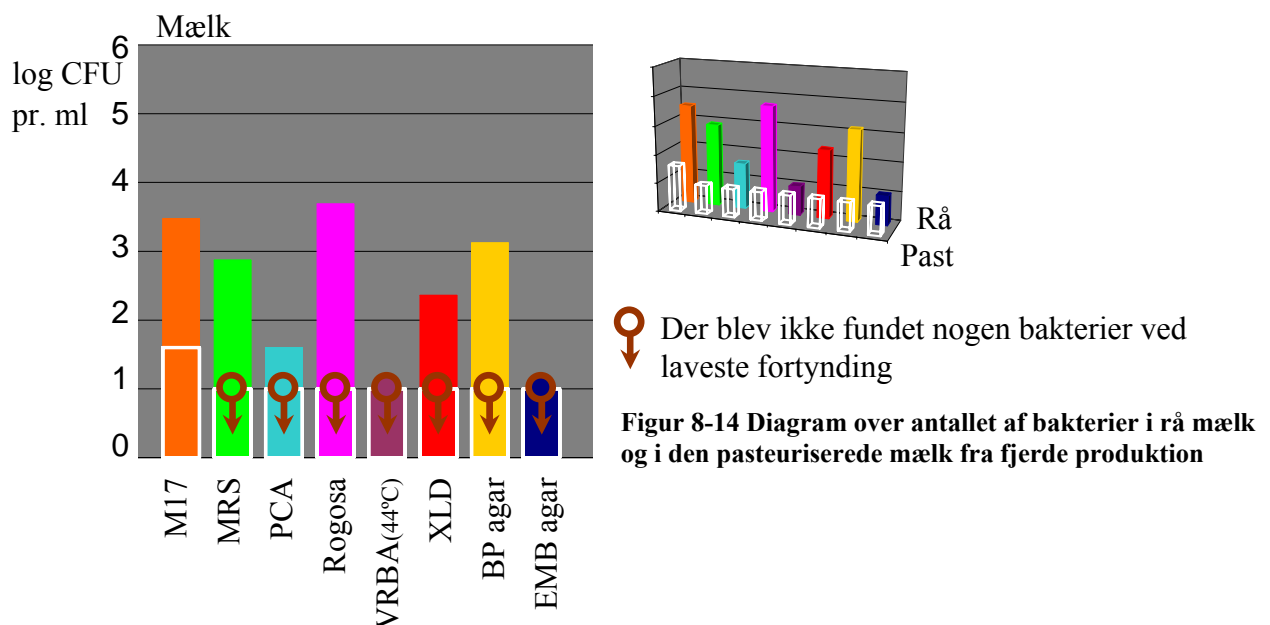
Fjerde produktion viste, ligesom anden, et højere niveau af plasmin i de pasteuriserede oste, men plasminaktiviteten var dog generelt lavere i denne produktion.



Figur 8-13 Indholdet af plasmin, plasminogen samt summen af plasmin og plasminogen i ostene fra fjerde produktion

8.5.2 Mikroorganismer i mælken – fjerde produktion

Den rå mælk fra fjerde produktion havde ca. 10^3 CFU pr. ml. af mælkesyrebakterier, 10^2 CFU pr. ml. af *Enterobacteriaceae* og 10^3 CFU pr. ml. på Baird Parker (Figur 8-14). I den pasteuriserede mælk blev der kun fundet få mælkesyrebakterier på M17, derudover var det ikke muligt at finde nogle bakterier. At der ikke er sket en efter-kontaminering i denne produktion kan skyldes, at der ikke var nogen anden produktion på mejeriet før og under denne produktion.

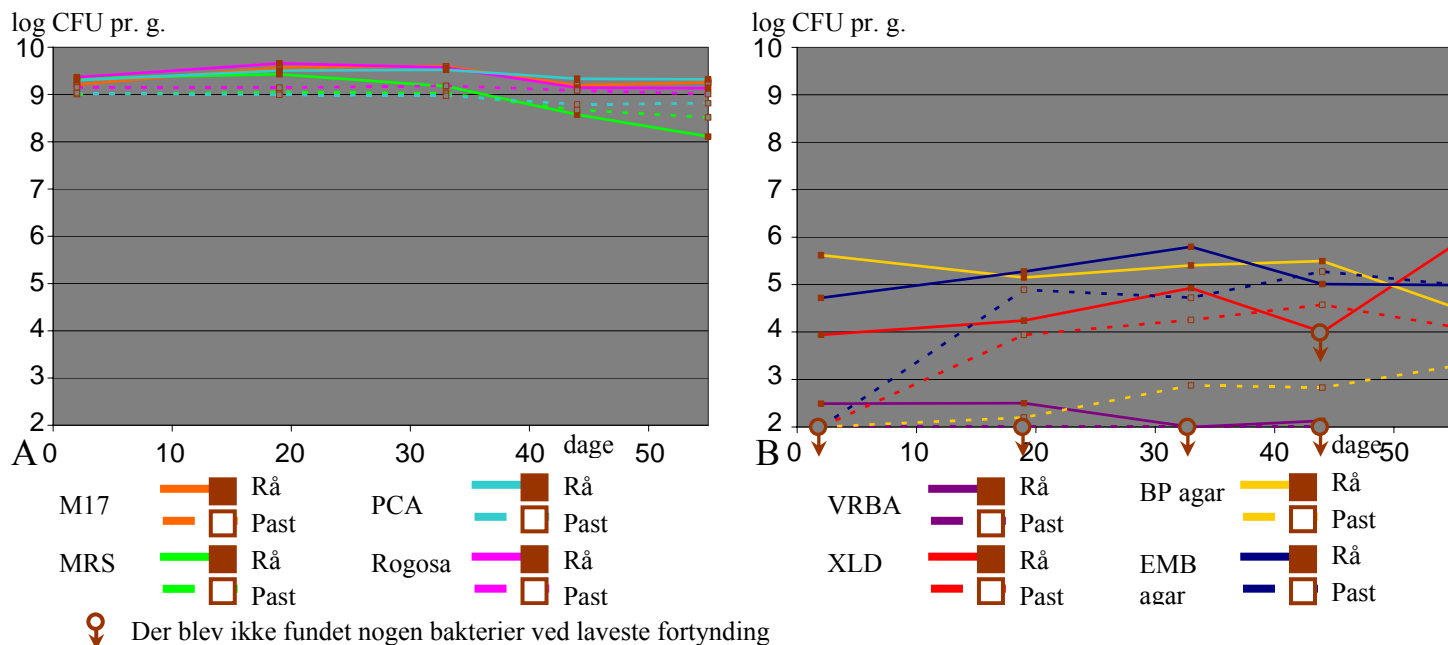


Der blev ikke fundet nogen bakterier ved laveste fortynding

Figur 8-14 Diagram over antallet af bakterier i rå mælk og i den pasteuriserede mælk fra fjerde produktion

8.5.3 Mikroorganismer i ostene – fjerde produktion

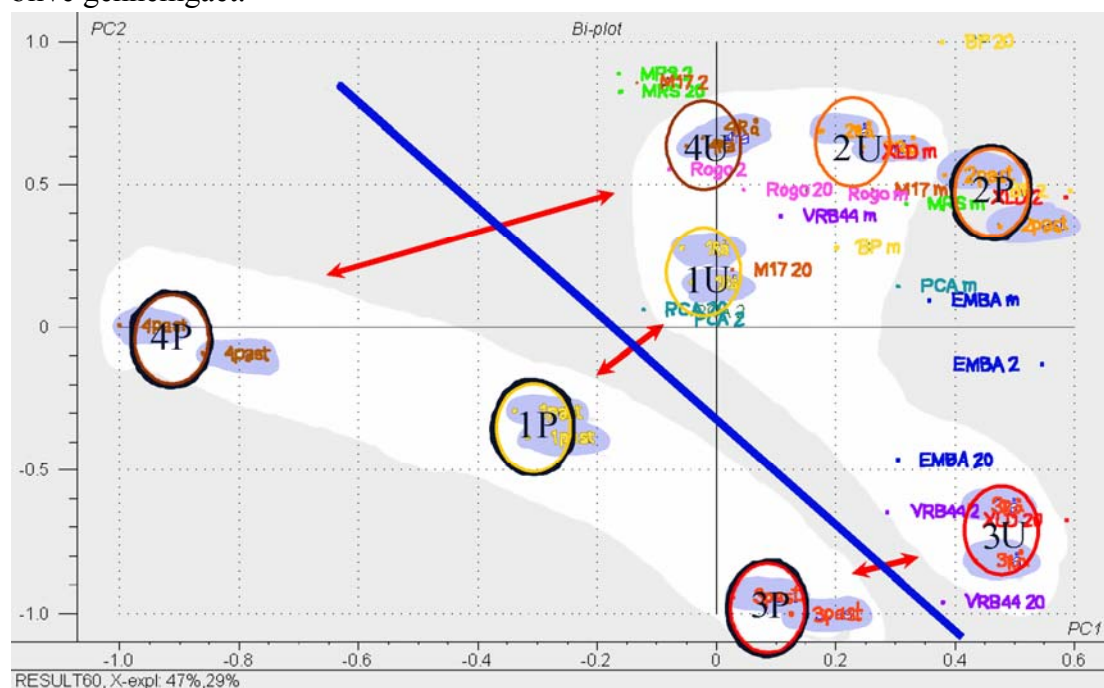
Antallet af mælkesyrebakterier var på ca. 10^9 CFU pr. g. under hele modningen (Figur 8-15A). Selvom der ikke blev fundet nogen bakterier på BP, EMB og XLD i den pasteuriserede mælk, så nåede EMB og XLD medierne op på ca. 10^4 og 10^5 CFU pr. g. efter 20 dage (Figur 8-15B).



Figur 8-15 A og B Diagrammer over antallet af bakterier i ostene fremstillet af rå og pasteuriseret mælk fra fjerde produktion. A viser medierne beregnet til mælkesyrebakterier og B viser medierne til de patogene bakterier.

8.6 Sammenligning af de fire produktioner

For at sammenligne de fire produktioner blev der foretaget en multivariat analyse af bakterietællingerne fra samtlige medier. En PCA-model i Unscrambler[®] gør det muligt at se, om der er sker nogle grupperinger på tværs af medier, mælketype, staldforhold, foder eller produktionsgang. Af bi-plottet over scores og loadings ses nogle opdelinger. Til denne model er benyttet bakterietællingerne fra mælken og ostene efter 2, 20 og 44 dage på medierne M17, MRS, Rogosa-HCL, PCA, BP, EMB, XLD og VRBA44. Figur 8-16 viser, at ostene fremstillet af pasteuriseret mælk og ostene fremstillet af rå mælk ligger i et mønster over for hinanden, dette gælder dog ikke for anden produktion som ligger samlet oppe ved råmælksostene øverst i højre hjørne. Dette kan måske forklares med, at der i denne produktion var sket en fejl syrning. I det følgende afsnit vil nogle af medierne og mønstrene blive gennemgået.

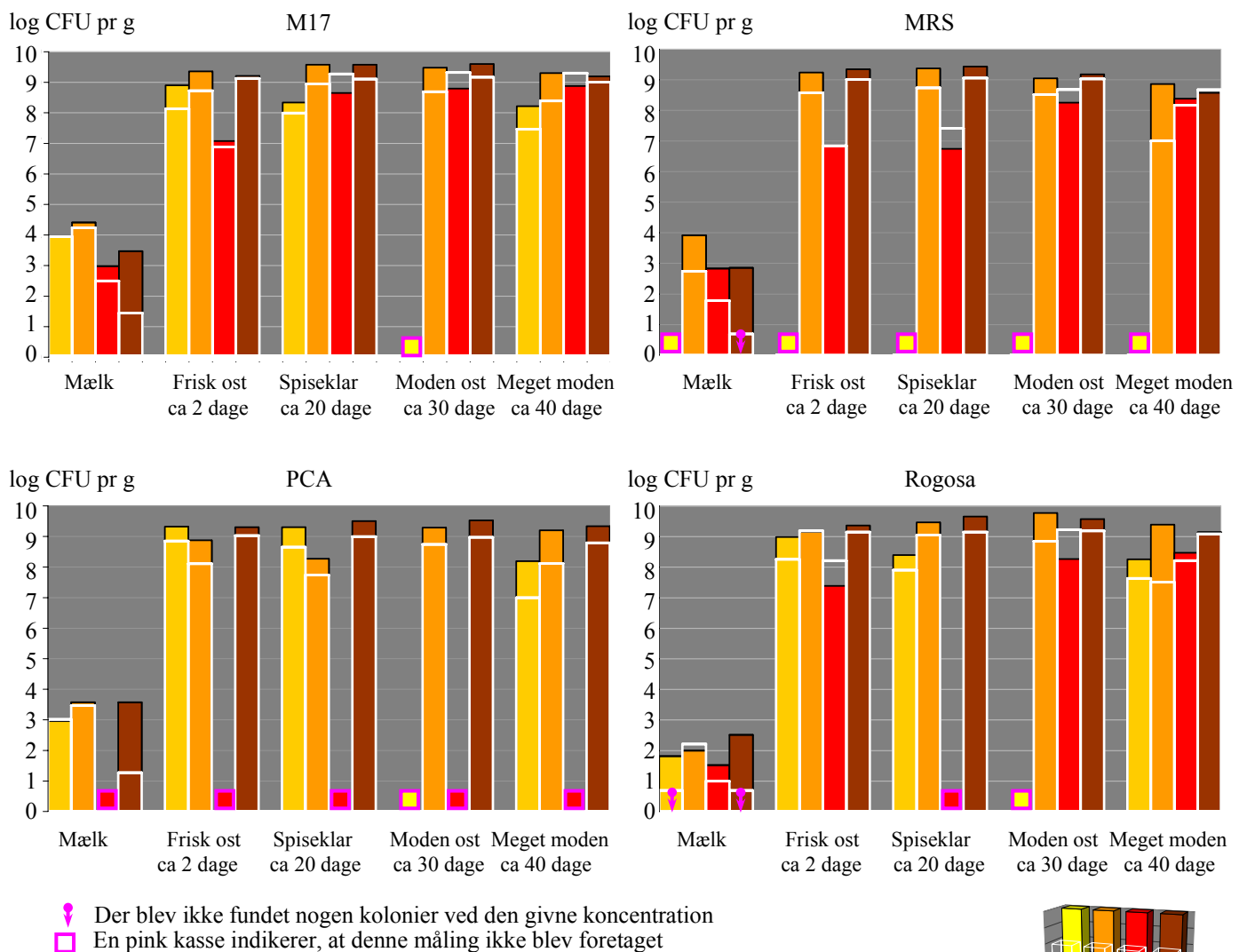


Figur 8-16 Bi-plot fra en PCA-analyse (Principal Component Analysis) af bakterietællingerne på alle medier fra de fire produktioner. Der er sket en gruppering efter om der er brugt pasteuriseret mælk eller rå mælk – med undtagelse af anden produktion.

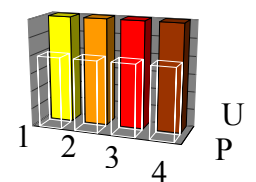
Produktion 1, 3 og 4 ligger forskudt på begge sider af den blå streg på figuren, mens produktion 2 ligger uden for dette mønster. Hvad der eventuelt er skyld i dette mønster, og hvorfor forsøg 2 ligger udenfor, kan man finde indikationer på ved at se, hvor de forskellige medier er placeret i forhold til prøverne. Medierne til mælkesyrebakterier ligger oppe i højre hjørne, og medierne til de patogene bakterier ligger også til højre, men lidt længere nede. Anden og tredje produktion ligger til højre i plottet, anden ligger højt, hvilket skyldes mange mælkesyrebakterier men også mange bakterier på XLD, EMBA og BP. Tredje ligger nede pga. lavt antal mælkesyrebakterier og til højre fordi der var mange bakterier på XLD, EMBA og VRBA især til sidst i modningen. Produktionerne 1 og 4 ligger længere til venstre - prøverne fra den pasteuriserede mælk mere end prøverne fra den rå mælk. 1P og 4P var også de prøver, der havde det laveste antal bakterier og den reneste smag. Der er længere mellem 4U og 4P end i de andre produktioner, hvilket passer med, at der var stor forskel på de to batcher i fjerde produktion.

8.6.1 Mælkesyrebakterier

Prøverne fra mælken er udtaget før starterkulturen blev tilsat, og det kunne forventes, at råmælksprøverne ville have et højere indhold af mælkesyrebakterier end prøverne fra den pasteuriserede mælk. Dette var tilfældet i tredje og fjerde produktion, men ikke for prøverne fra første og anden, som desuden havde et generelt højere antal mælkesyrebakterier end de andre. Det, at mælkesyrebakterieniveauet var det samme i den rå mælk som i pasteuriseret mælk i første og anden produktion, kan skyldes to ting, 1) at den pasteuriserede mælk ikke var blevet pasteuriseret ordentligt eller var blevet iblandet efter pasteuriseringen (dette blev dog senere modbevist ved en negativ fosfatsetest), eller 2) at den pasteuriserede mælk var blevet kontamineret med mælkerester fra en tidligere produktion, enten i rørene eller i ostekarret. Sidstnævnte kunne godt være tilfældet, idet den pasteuriserede mælk og den rå mælk ligger på samme niveau, som er højere end den rå mælk fra tredje og fjerde produktion. Det er også værd at bemærke, at forskellen mellem rå mælk og pasteuriseret mælk var størst i den fjerde produktion, hvor der ikke foregik anden produktion, som kunne give anledning til kontaminering af forsøgs-mælken og -ostene.



Figur 8-17 Antallet af bakterier på M17, Rogosa, PCA og MRS.



Fra prøverne fra mælken til prøverne fra den friske ost ses en kraftig stigning i antallet af mælkesyre bakterier – op til ca. 10^6 CFU pr. g - som følge af tilsætning af mælkesyre bakterier i form af starterkultur. Dette antal stiger dels på grund af vækst, men også på grund af en koncentring ved valle afløb, hvor størstedelen af bakterierne bliver fanget i ostemassen. Denne koncentring svarer cirka til en stigning på 2 log-enheder (Morgan *et al.*, 2001). I tredje produktion kom antallet af bakterier i den friske ost op på ca. 10^7 CFU pr. g, hvilket var ca. 1-2 log-enheder lavere, end i de øvrige forsøg. Der blev tilsat samme afvejede mængde starterkultur i alle fire produktioner, men det er tvivlsomt, om den var lige aktiv.

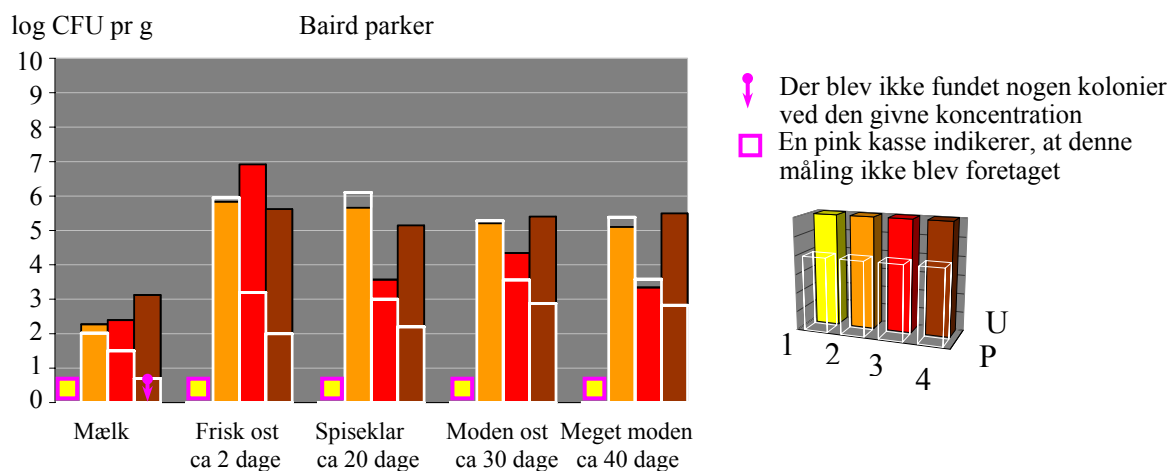
Tredje produktion havde en langsommere syring end de andre forsøg, hvilket eventuelt kan forklares ved den inaktive kultur og dens lavere koncentration. I fjerde produktion blev der benyttet en ny batch, og udviklingen i mælkesyre bakterierne var som i første og anden produktion, hvilket styrker mistanken om en svag starterkultur i tredje produktion.

På alle fire medier blev der fundet statistisk signifikant færre mælkesyre bakterier i de oste, som var fremstillet af pasteuriseret mælk. Den gennemsnitlige forskel (Δ) var for Rogosa-HCl 0,31 CFU pr. g. ($P < 0,02$), M17 0,33 CFU pr. g. ($P < 0,01$), PCA 0,52 CFU pr. g. ($P < 0,01$) og MRS 0,44 CFU pr. g. ($P < 0,01$) (Figur 8-17). Man skulle tro, den ville være højere i osten af den pasteuriserede mælk, idet en række enzymer her er inaktiveret og en masse andre bakterier desuden er blevet neutraliseret af pasteuriseringen. Undersøgelser af cheddar og schweiziske oste har vist, at starterkulturen voksede langsommere i råmælksoste end i oste af pasteuriseret mælk (Beuvier *et al.*, 1997; McSweeney *et al.*, 1993).

Det bør nævnes, at den Rogosa der blev anvendt i dette speciale blev pH-justeret med saltsyre, og ikke med eddikesyre som Oxoid© anbefaler. Dette er givetvis årsagen til, at *Lactococcus* spp. ikke er blevet hæmmet i tilstrækkelig grad. I et forsøg udført af Tina Beck Hansen blev samme prøve inkuberet på agar både med og uden tilsat eddikesyre. Disse viste samme antal af *Lactobacillus* spp. og *Lactococcus* spp., men *Lactococcus* spp. kolonierne var tydeligt mindre på den agar, hvor der var benyttet eddikesyre til pH justeringen. På plader med mange *Lactobacillus* kolonier voksede *Lactococcus* spp. slet ikke frem (Hansen, 2004).

8.6.2 *Staphylococcus aureus*

Baird Parker mediet (BP) er beregnet til at isolere *Staphylococcus aureus*, men det var kun en brøkdæl, som havde den zone, som indikerer, at der var tale om *Staph. aureus*. Hovedparten var andre mikrokokker. BP blev ikke anvendt i første produktion, men i anden, tredje og fjerde produktion, hvor bakterieniveauet i råmælksprøverne var ens i prøverne fra anden og tredje og lidt højere i fjerde produktion. I den pasteuriserede mælk blev der fundet et lavt antal bakterier på denne agar i anden og tredje produktion, mens indholdet i mælken fra fjerde produktion var under detektionsgrænsen (<10 CFU pr. g). Dette resultat taler for, at der er sket en rekontaminering under fremstilling af ostene i produktion 2 og 3, men ikke i 4. I fjerde produktion var der ikke nogen anden produktion på mejeriet, hvilket kan være årsagen til, at mælken ikke blev rekontamineret mellem pasteurisering og ostekar. I prøverne fra de friske oste skete der en vækst i antallet af bakterier, som dels skyldtes vækst, dels en koncentring i ostemassen (Figur 8-18). Denne stigning var størst i råmælksprøverne samt i en enkelt pasteuriseret prøve. Det drejer sig om 2U, 3U og 2P, hvilket er de samme prøver, som havde en langsom syrning (Figur 8-18). Prøverne fra 4U havde samme niveau som de før omtalte, men havde en hurtig syrning, derfor skyldes det høje niveau efter 2 dage, at der var et højere udgangspunkt i den rå mælk. Denne opgave fokuserer ikke på de patogene bakterier, og de bakterier, der blev fundet på BP havde ikke alle en opklarende ring som indikerer, at der er tale om *Staph. aureus*. Det bør dog give anledning til bekymring, at 4 af de 6 prøver efter 2 dage havde et niveau på ca. 10^6 CFU pr. g. på BP.

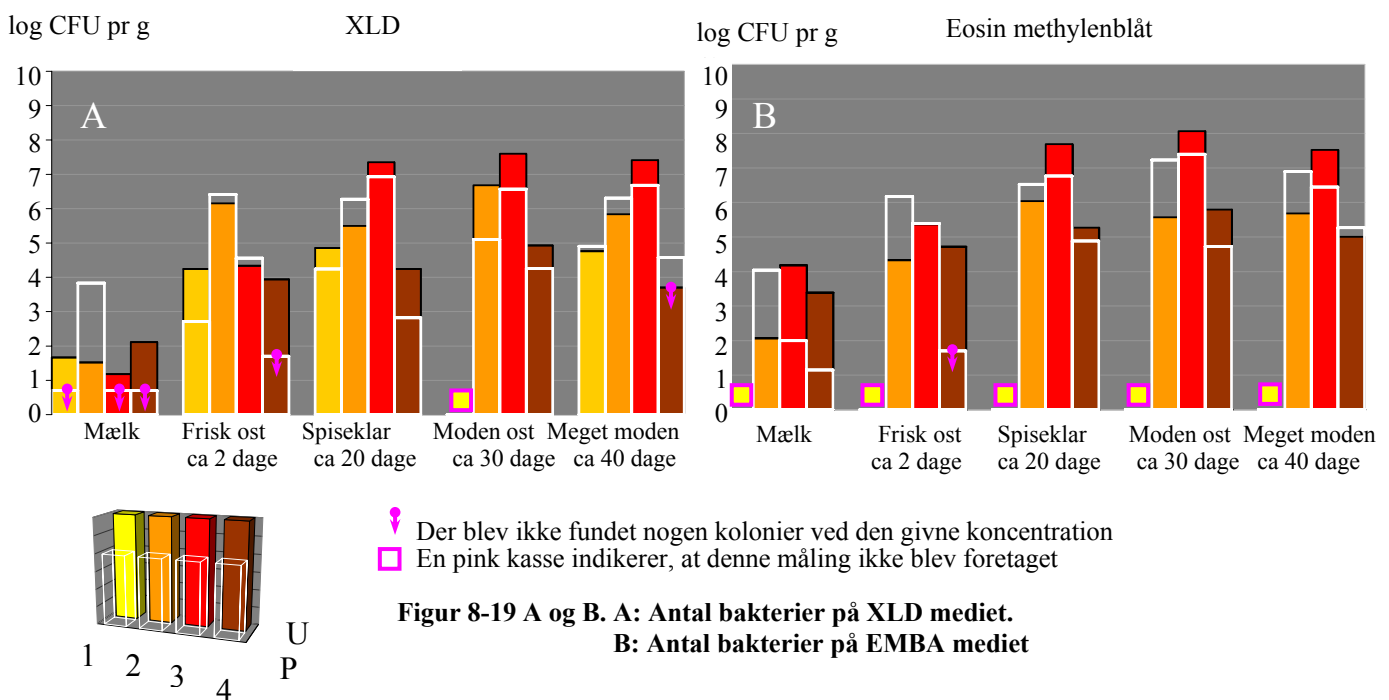


Figur 8-18 Antallet af kolonier på Baird Parker mediet (BP) fra produktion 2, 3 og 4, i 2. produktion kan det ses, at antallet er højere i ostene af pasteuriseret mælk, hvilket giver en mistanke om en efter-kontaminering

8.6.3 *Enterobacteriaceae*

De fire produktionsgange følger tre mønstre;

- 1) I anden produktion var der et meget højt antal på XLD mediet i prøverne fra den pasteuriserede mælk (Figur 8-19A), og i den friske ost (2 dage) var både råmælksostene og ostene fremstillet af pasteuriseret mælk oppe på 10^6 CFU pr. g. Dette tyder på, at begge batcher er blevet kontamineret med *Enterobacteriaceae* under produktionen. Niveaueet på 10^6 CFU pr. g. var konstant gennem hele lagringen.
- 2) I tredje produktion var syrningen langsom, hvilket forårsager en stigning i *Enterobacteriaceae* til 10^7 CFU pr. g. efter 20 dage (Figur 8-19A). Et niveau af *Enterobacteriaceae* på 10^7 CFU pr. g. kan givetvis påvirke den sensoriske kvalitet af ostene og give, hvad nogle kalder, en uren smag. I kød er der fundet tegn på, at vækst af mælkesyre bakterier og *Hafnia alvei* sammen fører til øget produktion af putrescin, som er en biogen amin med en markant lugt (Gram *et al.*, 2002).
- 3) I forsøg 1 og 4 var antallet på XLD omkring 10^4 CFU pr. g. Disse oste havde en hurtig syrning og en begrænset rekontaminering. Det er også i denne sammenhæng værd at bemærke, at der i fjerde produktion ikke foregik anden produktion, og at mælken ikke fik lov at ”forsyrne” uden starterkultur.



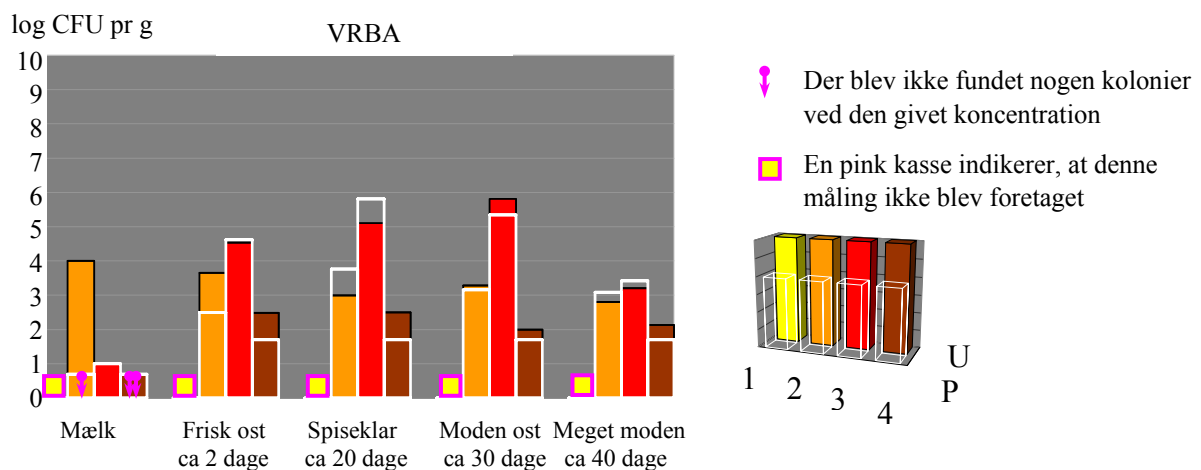
På EMBA var der - ligesom på XLD - i forsøg 2 et højere antal bakterier i den pasteuriserede mælk end i den rå mælk. Dette støtter mistanken om en rekontaminering af den pasteuriserede mælk i forsøg 2 (Figur 8-19B). I forsøg 3 og 4 var der flere bakterier på denne agar i den rå mælk end i den pasteuriserede mælk. Denne forskel var der stadig i den friske ost i forsøg 4, men i forsøg 3 var niveaueet det samme i ostene af rå mælk og pasteuriseret mælk.

På EMBA blev der fundet omkring 10^8 CFU pr. g i ostene fra forsøg 3, lidt lavere for de pasteuriserede oste end råmælksostene. I forsøg 2 nåede ostene af pasteuriseret mælk op på 10^7 CFU pr. g., hvilket sandsynligvis giver smag til ostene.

8.6.4 Fækale coliforme bakterier

De bakterier, der blev fundet på VRBA ved 44°C er de såkaldte fækale coliforme bakterier. Disse bakterier må stamme fra en direkte fækal forurening, da de har svært ved at overleve på produktionsudstyr. De fækale bakterier vil kunne opformere sig i mælken, især under osteproduktionen, hvor temperaturen er over 30°C. Efter 24 timer er pH faldet og ostene saltet, og opbevares ved 16°C i en uge. Ved denne temperatur er det også muligt for de fækale bakterier at formere sig, dog vil de være hæmmet af salt og det lave pH. Efter en uge stilles ostene ved 8°C i endnu en uge, og her vil de fækale coliforme bakterier nærme sig deres temperaturmæssige vækstminimum, og der burde ikke forekomme yderligere vækst.

Der blev ikke foretaget undersøgelser med VRBA ved 44 °C i forsøg 1. I forsøg 2 blev der fundet et relativt højt niveau i den rå mælk, men ingen i prøverne fra den pasteuriserede mælk. Der var færre bakterier i den friske råmælksost (2U) end i den rå mælk. Dette fald kan undre, idet alle de andre prøver stiger på grund af vækst og/eller koncentrering i ostemassen (figur 9-18). I forsøg 3 og 4 blev der fundet lave antal fækale coliforme bakterier i såvel rå mælk som i pasteuriseret mælk. I de friske oste blev der fundet højere niveauer - størst var stigningen i forsøg 3, hvor både oste af rå- og pasteuriseret mælk var oppe på ca. $3 \cdot 10^4$ CFU pr. g. I ostene fra de andre produktioner var antallet af fækale coliforme bakterier lavere i de pasteuriserede oste end i råmælksostene. At væksten var størst i forsøg 3 kan hænge sammen med den langsomme syring, hvorved de fækale coliforme bakterier har haft bedre vækstvilkår.



Figur 8-20 Antal bakterier på VRBA mediet

8.7 Resultater fra ITS- undersøgelser

I første og anden produktion blev der samlet renkulturer fra M17, PCA, Rogosa og MRS.

Formålet var at se om der var en udvikling i antal af mælkesyrebakterier, som kunne være årsag til smagsforandringer i ostene.

Selvom kolonier ser ens ud med hensyn til morfologi, kan der godt være tale om forskellige bakterier. ITS er en hurtig og sikker måde at se om bakterier er de samme.

1.1.1 Første produktion

Figur 8-21 til 8-22, viser resultaterne fra ITS-PCR analyserne.

I figuren er båndmønstret fra de enkelte isolater stillet op ved siden af hinanden sammen med referencen.

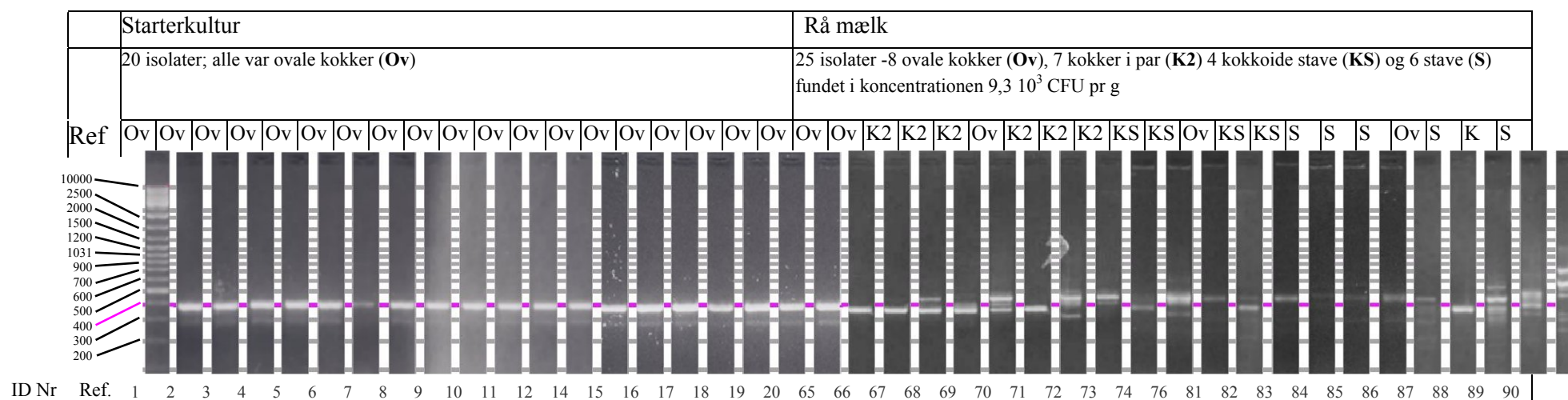
På denne måde er det muligt at sammenligne bånd fra forskellige geler og stadig være sikker på, at DNA-stykker af samme størrelse ligger ud for hinanden.

Figur 8-21 viser, at alle isolater fra starterkulturen er ens med et enkelt bånd på knap 400 kb. Derimod var der flere forskellige båndmønstre i både den pasteuriserede mælk og i råmælken (figur 8-21 og 8-22). Dette er tegn på, at der i disse prøver er flere forskellige bakterier. I råmælken var der ca. en ligelig fordeling af stave, kokker, kokkoide stave og ovale kokker, men i den pasteuriserede mælk, var der hovedsagelig kokker i par. Da antallet af bakterier i råmælken og i den pasteuriserede mælk var så lavt, at de ikke vil have nogle sensorisk betydning, blev de ikke yderligere analyseret. På Figur tabel 8-22 ses, at isolaterne nr. 21, 22 og 23 har to kolonner, hvilket skyldes, at disse isolater er blevet bestemt to gange. Disse dobbeltbestemmelser viser de samme bånd og da de ikke er bestemt på de samme geler, betyder det, at resultaterne er reproducerbare.

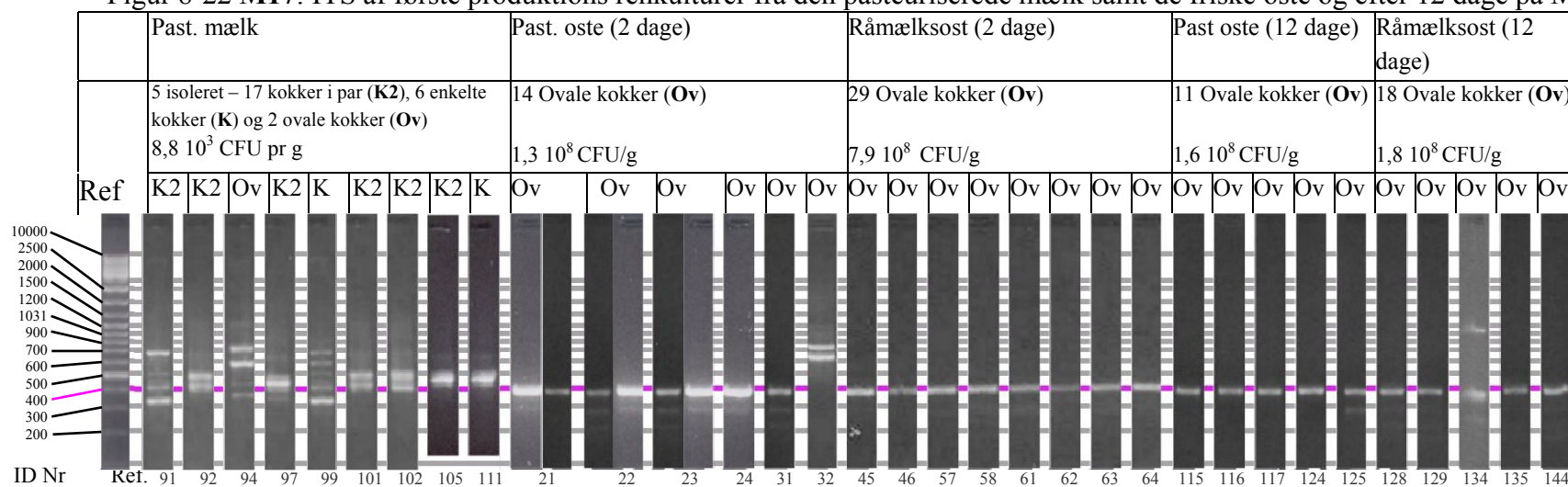
I både ostene fremstillet af pasteuriseret mælk og af råmælk (tabel 8-22 og 8-23) blev der kun fundet bakterier, som lignede dem, der blev fundet i starterkulturen (et bånd på knap 400 kb, som ligner nr. 113 i figur 8-25 som blev sekventeret og bestemt som en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*).

ID 32 (figur 8-22) har en profil, der er anderledes end de andre i samme prøve. Den var dog ovale kokker og lignede de andre prøver, så måske er der tale om en forurening.

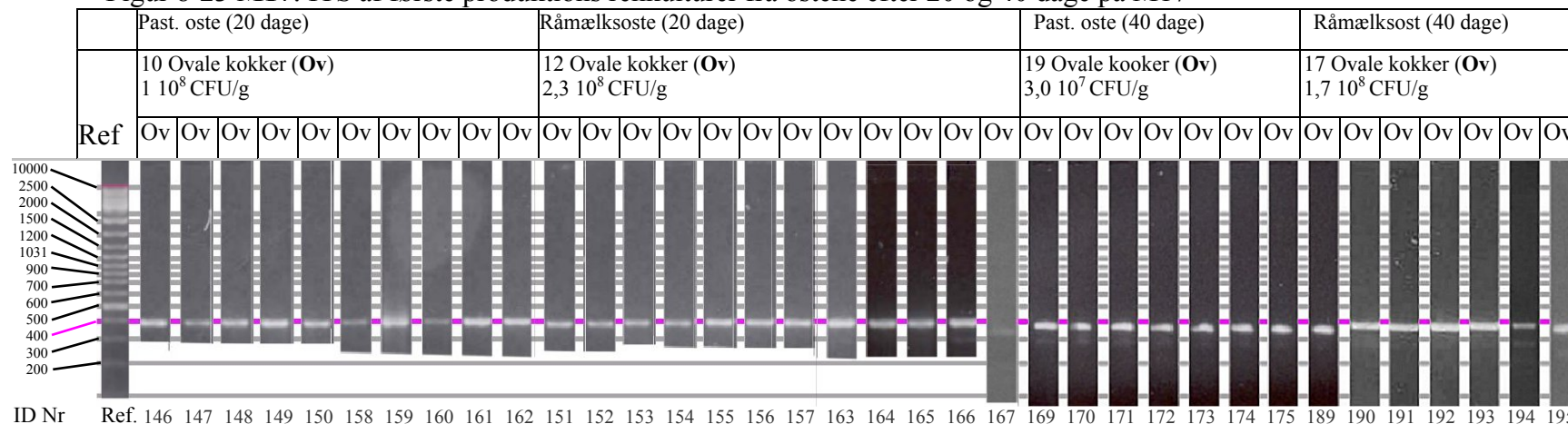
Figur 8-21 M17: ITS af første produktions renkulturer fra starterkultur og råmælk på M17



Figur 8-22 M17: ITS af første produktions renkulturer fra den pasteuriserede mælk samt de friske oste og efter 12 dage på M17



Figur 8-23 M17: ITS af første produktions renkulturer fra ostene efter 20 og 40 dage på M17



ITS mønstret fra PCA mediet (Figur 8-24) er det samme som det, der blev fundet på M17. Alle isolaterne gav et bånd på knap 400 kb.

Fra Rogosa mediet blev der fundet samme bakterier som på M17 og PCA, dog blev der fundet nogle stave fra de 40 dage gamle oste fremstillet af råmælk. Flere kolonier blev sekventeret deriblandt tre isolater fra Rogosa mediet. Isolaterne blev sekventeret og bestemt til at være:

Forklaring til parenteser efter bakterienavnet: ("antal baser som passer"/"antal baser" match %)

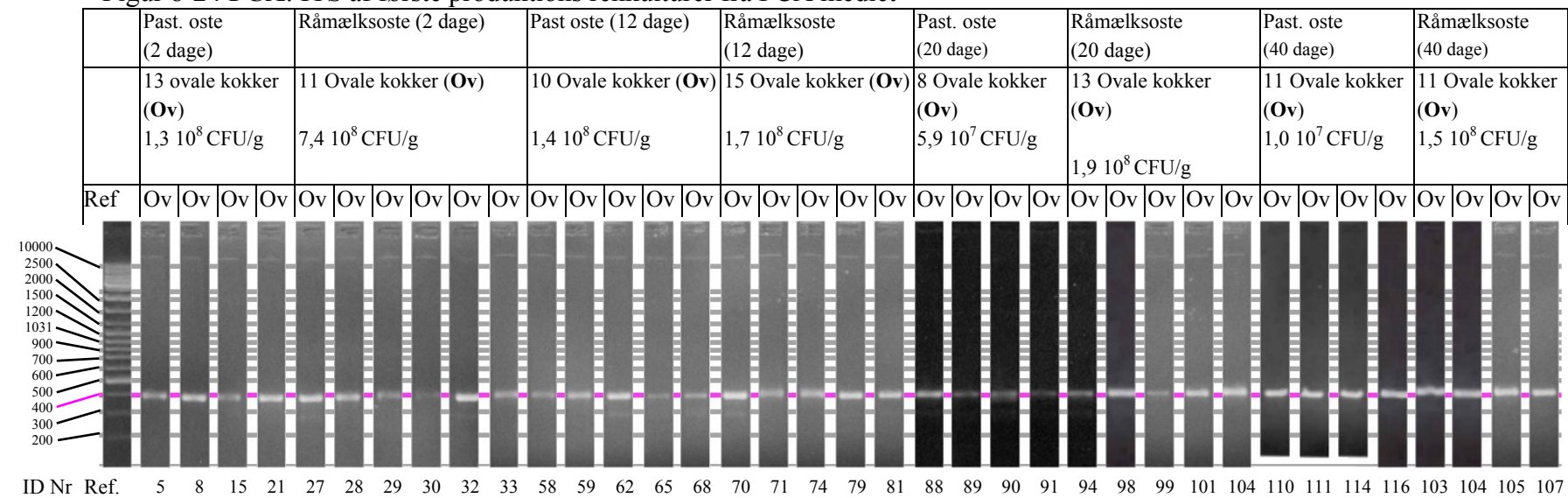
Nr 110 er *Lactobacillus*, enten *casei* (363/367 98%), *paracasei* (363/367 98%) eller *rhamnosus* (363/367 98%), at der er tre bakterier med det helt samme resultat skyldes at det er 16s, som er blevet sekventeret og dette stykke vil være ens hos nærliggende stammer. *Lb. Casei*, *Lb. paracasei* og *Lb. rhamnosus* er meget nært beslægtede og det er ikke muligt at adskille disse ud fra det sekventerede 16sDNA fragment. Disse bakterier vil kunne differentieres ved brug af en anden primer.

Nr 112 blev bestemt til at være *Weissella* (61/63 96%), *Leuconostoc* (60/62 96%) eller *Lactobacillus* (59/61 96%), I denne prøve var der kun et beskedent antal baser (63 bp), som kunne sekventeres og derfor er resultatet meget usikkert.

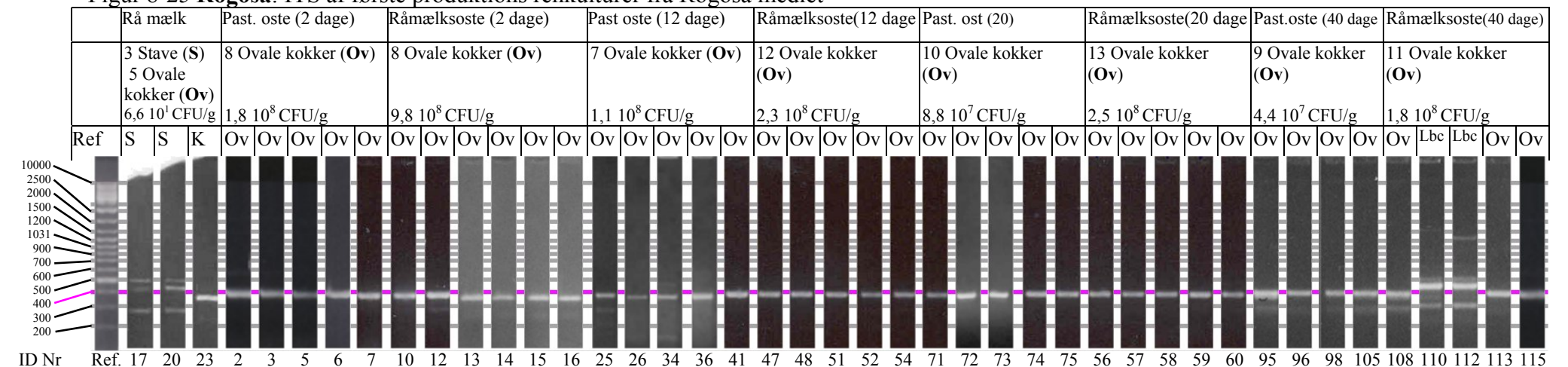
Nr 113 blev bestemt til at være en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (395/407 97%), hvilket også er hvad starterkulturen består af. Om det er en subspecies *lactis* eller *diacetylactis* er uvist, da den eneste forskel er evnen til at danne diacetyl og dette gen er placeret på et plasmid.

Isolaterne fra MRS viste, ligesom M17, PCA, og Rogosa, et ret monotont billede at et enkelt bånd ved knapt 400 kb, dette bånd skønnes at være *Lactococcus* spp. og stammer givetvis fra starterkulturen.

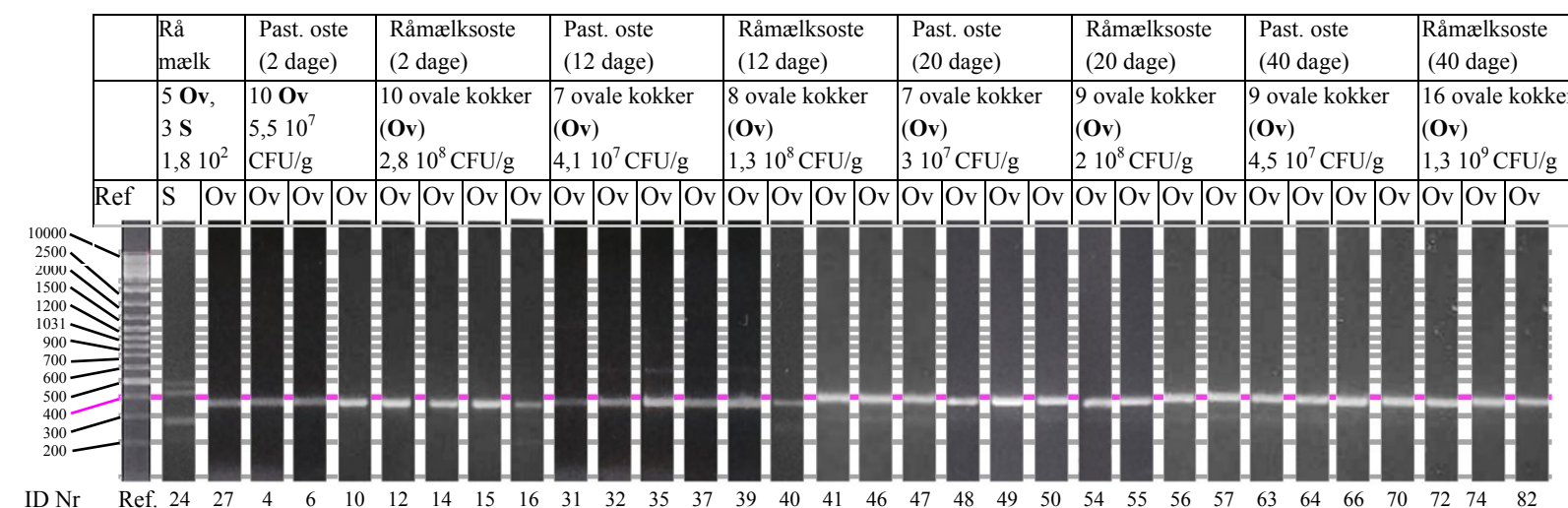
Figur 8-24 PCA: ITS af første produktions renkulturer fra PCA mediet



Figur 8-25 Rogosa: ITS af første produktions renkulturer fra Rogosa mediet



Figur 8-26 MRS: ITS af første produktions renkulturer fra den pasteuriserede mælk samt de friske oste og efter 12, 20 og 40 dage på MRS

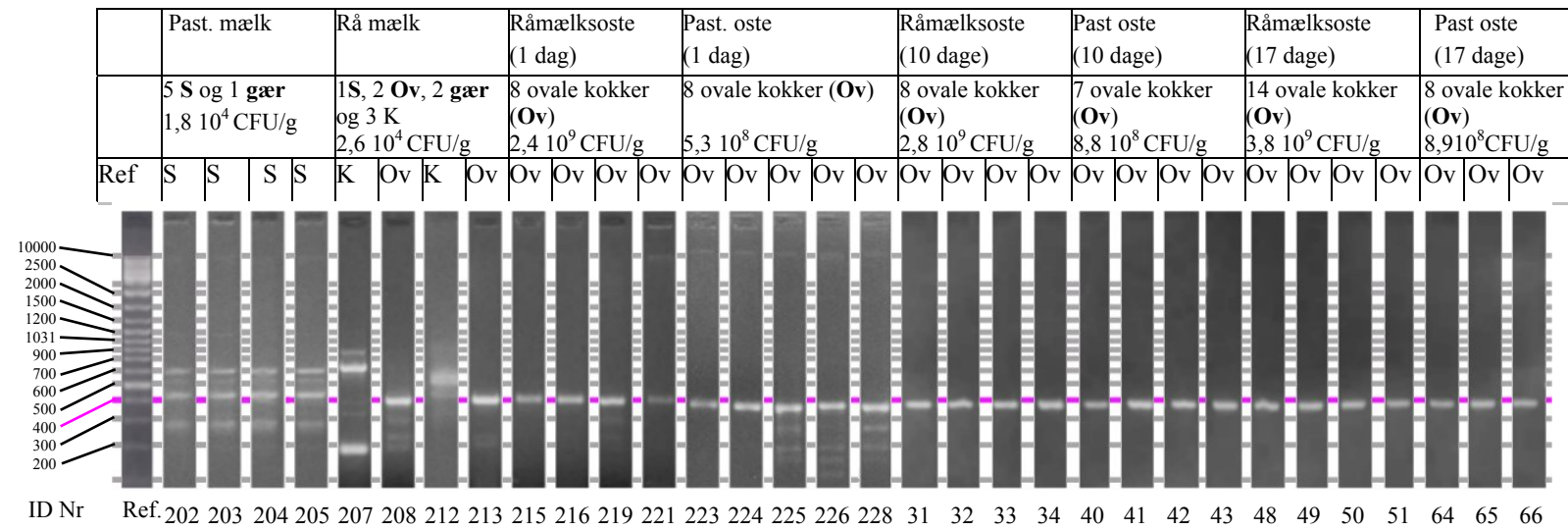


1.1.2 Anden produktion

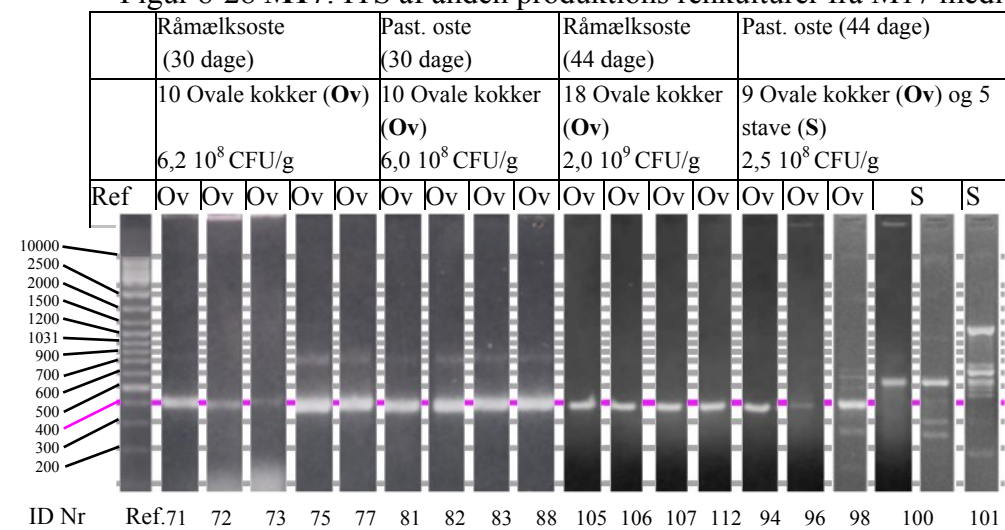
I anden produktion var mønstret det samme som i første produktion; en variation mellem prøverne fra råmælk og fra den pasteuriserede mælk. Men alle renkulturer fra ostene gav et bånd ved knap 400 kb, dog var der nogle enkelte kolonier af stavformede bakterier de i 44 dage gamle oste af pasteuriseret mælk. Disse kolonier blev observeret på M17, PCA og MRS (figur 8-27 til 8-32), men desværre lykkedes det ikke at sekventere kolonierne fra M17 og PCA.

Dette var ikke forventet, da de oste, der var fremstillet af råmælken fra start burde have et højere antal NSLAB og dermed et forspring. På figur 8-27 kan det ses, at netop den pasteuriserede mælk havde et meget højt antal stavformede bakterier på M17 mediet, hvor der i råmælken kun blev fundet enkelte stavformede bakterier og langt flere kokker og ovale kokker. Selvom nogle *Lactobacillus* spp. kan overleve en pasteurisering, er det dog ikke sandsynligt, at de vil være i samme niveau som i råmælk. Det kunne tyde på, at den pasteuriserede mælk er blevet kontamineret med bakterier, eventuelt fra en tidligere produktion. På figur 8-28 kan ses, at der også i de 44 dage gamle oste fremstillet af pasteuriseret mælk var *Lactobacillus* spp., men der ikke blev observeret nogle i de 44 dage gamle råmælksoste.

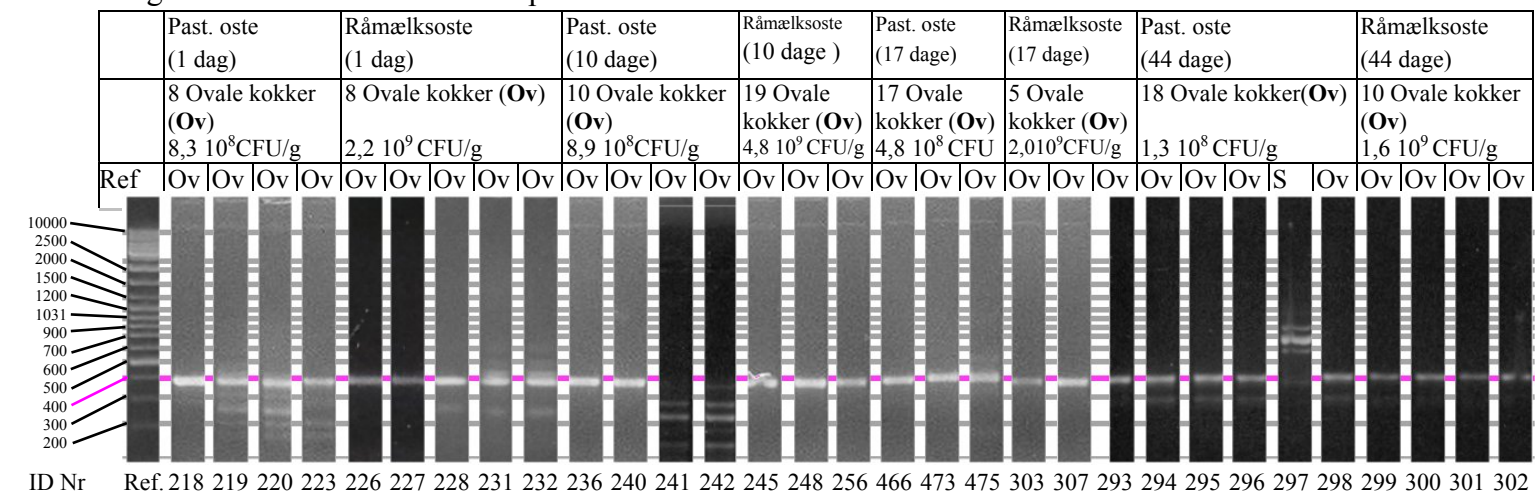
Figur 8-27 M17: ITS af anden produktions renkulturer fra M17 mediet



Figur 8-28 M17: ITS af anden produktions renkulturer fra M17 mediet

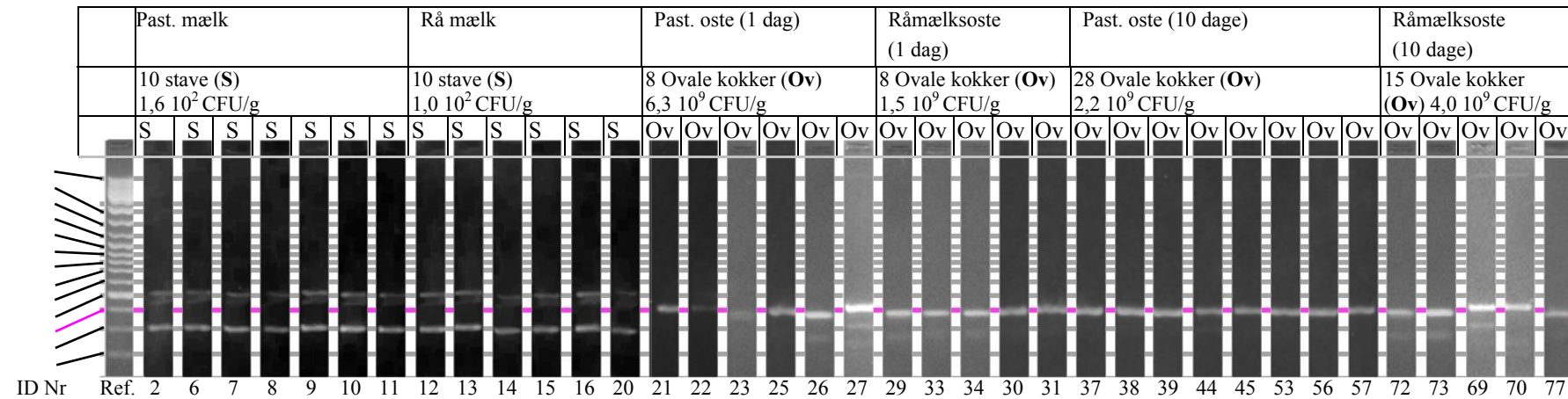


Figur 8-29 PCA: ITS af anden produktions renkulturer fra PCA mediet

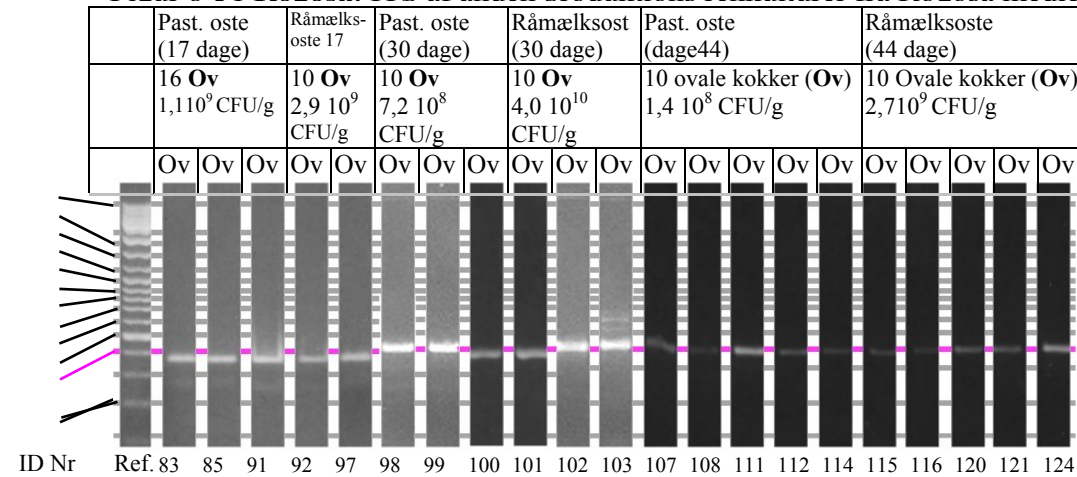


På rogosa mediet (figur 8-30 til 8-31) var der også flere stavformede bakterier i den pasteuriserede mælk, end i råmælken. I den friske ost og indtil ostene var 44 dage gamle, blev der ikke fundet andet end *Lactococcus* suspekter bakterier (ovale kokker med et ITS bånd ved ca 400 kb).

Figur 8-30 **Rogosa**: ITS af anden produktions renkulturer fra Rogosa mediet



Figur 8-31 **Rogosa**: ITS af anden produktions renkulturer fra Rogosa mediet

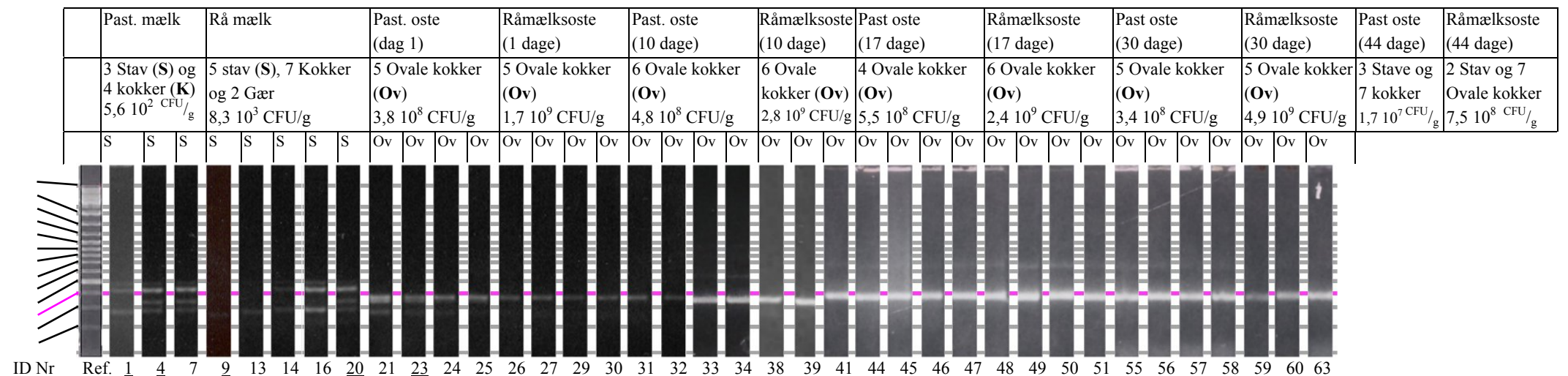


MRS mediet (figur 8-32) blev i anden produktion gjort mere selektivt ved at pH var justeret ned til 5,5 og prøverne blev inkuberet ved 37 °C. Nogle af isolaterne fra mælken blev sekventeret:

- Nr 1. blev bestemt til *Lactobacillus pentosus* (391/395 98%) eller *planarum* (391/395 98%)
- Nr 4. *Lactobacillus pentosus* (389/396 98%) eller *planarum* (389/396 98%)
- Nr 9. *Lactobacillus casei* (223/226 98%), *Lb paracasei* (223/226 98%) eller *Lb rhamnosus* (223/226 98%)
- Nr 20. er *Lactobacillus casei* (389/391 99%)
- Nr. 23 *Lactococcus lactis* (403/419 96%)

Efter 44 dage blev der fundet stavformede bakterier på ostene fremstillet af pasteuriseret mælk, men også på ostene af råmælk. Det lykkedes ikke at rendyrke disse bakterier.

Figur 8-32 **MRS**: ITS af anden produktions renkulturer fra MRS mediet



1.1.3 ITS-PCR af patogensuspekterte bakterier

I vores undersøgelser blev anvendt en række selektive agarer beregnet til at finde patogene bakterier. Disse agarer har, som beskrevet i teorien, en række kemiske indikatorer, som gør, at man kan skelne de patogene bakterier fra andre bakterier, som gror på disse agarer. Resultaterne skal bruges til at fremstille en risikovurdering af oste produceret af råmælk. Denne opgave beskæftiger sig ikke med de eventuelle patogene bakterier der måtte være, og agarerne er kun taget med i denne opgave, fordi der blev fundet et stort antal bakterier, som ikke var patogene. Disse bakterier kan måske præge smagen af ostene. Nogle af bakterierne fra et enkelt prøveudtag – anden produktion dag 44 – blevet rendyrket og analyseret på ITS-PCR og nogle af disse er blevet bestemt ved sekventering.

Baird Parker

Baird Parker er beregnet til at søge efter *Staphylococcus aureus*, og en del af de bakterier, der var på disse agarplader havde en opklarende zone, som indikerer tilstedeværelsen af *Staphylococcus aureus*. Der blev undersøgt 5 kolonier fra anden produktion efter 30 dage som blev testet på ITS-PCR. To af disse blev sekventeret, den ene var *Staphylococcus aureus* (389 af 396 **98%**) og den anden, som var en atypisk koloni på denne agar, blev bestemt til at være enten en *Klebsiella* (377/386 **98%**) eller en *Citrobacter* (377/386 **98%**).

Eosin methylenblåt

Til bestemmelse af coliforme bakterier blev der i produktion 2, 3 og 4 brugt EMB. På denne agar kom der tre typer kolonier; Mørke kolonier med en metallisk skinnende overflade – *Escherichia coli*, en høj konveks koloni med lilla midte – *Enterobacter aerogenes* og farveløse kolonier – ikke-lactose fermenterende tarmbakterier. To af kolonierne med metalagtig overflade, som skulle være *E.coli*, blev ved sekventering bestemt til at være; *Hafnia alvei* (388/394 **98%**) - prøve nr. 14, og *Rahnella sp.* (384/392 **97%**) eller *Hafnia alvei* (358/364 **98%**) - prøve nr. 17.

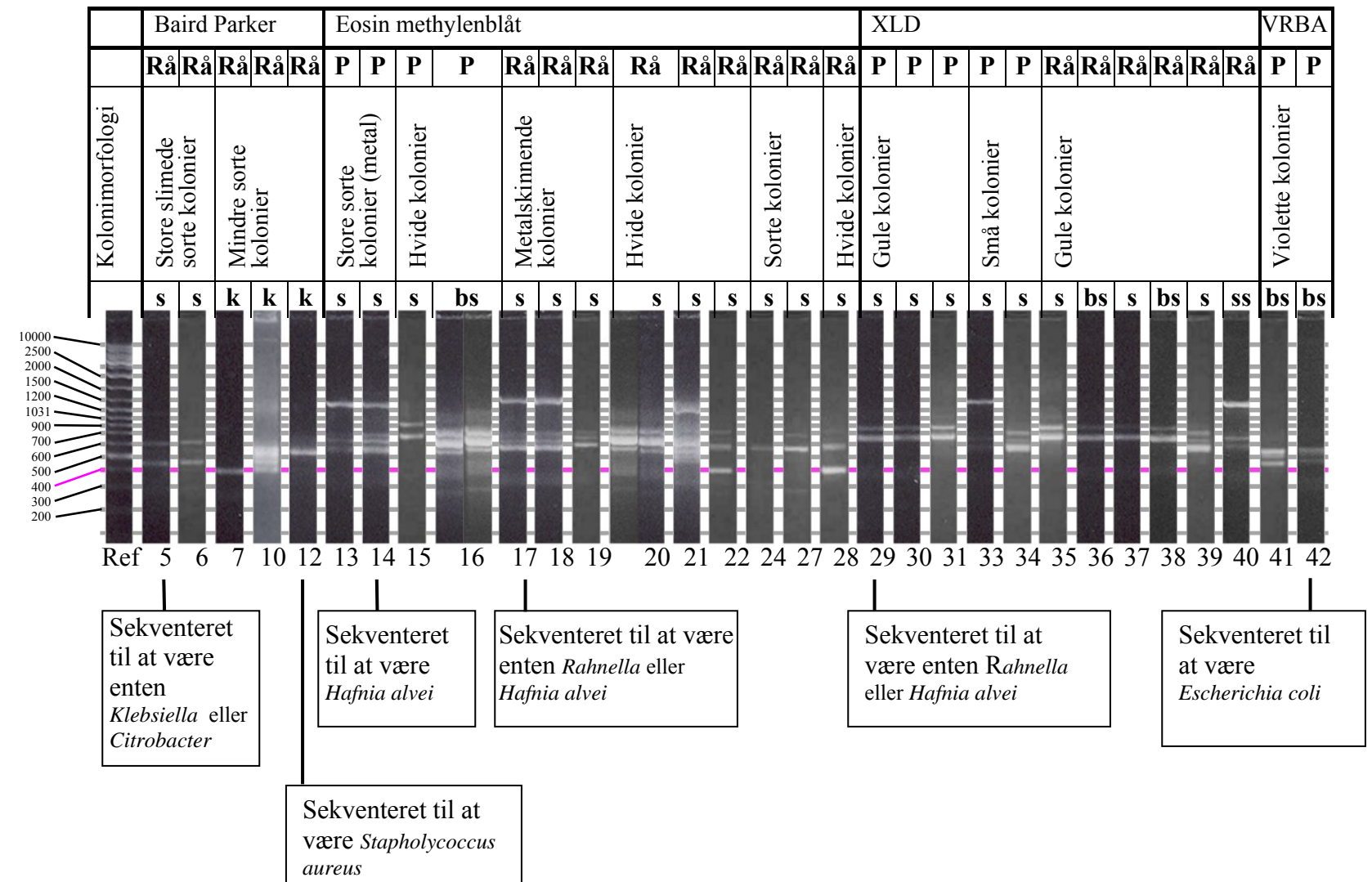
XLD

Salmonella vil på XLD kunne ses som røde kolonier med en sort midte, men der blev kun fundet en i fjerde produktion, i første, anden og tredje produktion var der ingen salmonellasuspekterte kolonier. Alle de kolonier, der blev fundet på XLD var enten gule eller gennemsigtige, og 11 renkulturer fra XLD blev undersøgt med ITS-PCR. Isolaterne fra de gule kolonier gav tre forskellige båndmønstre og en af disse blev ved sekventering bestemt til at være *Rahnella* (384/392 **97%**) eller *Hafnia alvei* (358/364 **98%**) - prøve nr. 29.

VRBA

Ved at inkubere VRBA ved 44°C er det kun fækalecoliforme bakterier - *E. Coli* - der kan gro på dette medie. Fækale coliforme bakterier er indikation på direkte fækal forurening. Kolonierne på VRBA var meget ens, to blev testet med ITS-PCR og viste samme to bånd. En enkel af disse blev ved sekventering bestemt til *E. Coli* (304/314 **96%**) - prøve nr. 42.

Figur 8-33 Isolater fra medierne beregnet til at finde patogene bakterier. Bakterierne er isoleret fra anden produktion dag 44. **Rå** er fra råmælksoste og **P** er fra oste fremstillet af pasteuriseret mælk. Neden under figuren er resultaterne fra sekventeringerne. **s** for stave, **k** for kokker og **bs** for bevægelige stave.



9 Opsamling og diskussion

Ifølge en subjektiv vurdering smagte ostene fra første og fjerde produktion godt, hvorimod ostene fra anden og tredje produktion bedst kan beskrives som uspiselige. Da der ikke blev udført endelige sensoriske undersøgelser, er det svært at sige, hvad der var galt med anden og tredje produktion, men de smagte stærkt og urent, men ikke som en lagret ost vil smage. Noget af den store variation mellem de enkelte produktioner kan forklares som årstidsvariation, idet kærne bliver mere beskidte om vinteren, hvor de går inde i dybstrøelse (Desmaures & Gueguen, 1997). Dette kan forklare det højere antal bakterier i mælken om vinteren (produktion 2 og 4), men ikke det høje antal bakterier, der blev fundet på M17 og XLD i den pasteuriserede mælk fra anden produktion. Formentlig er den pasteuriserede mælk fra anden produktion blevet kontamineret efter pasteuriseringen, hvilket kan være sket på flere måder. Produktionen havde været i gang længe pga. juletravlhed, og mælk kan have ligget i den døde ende af rørsystemet (Figur 7-3), i værste fald 4-5 timer ved ca. 25°C – længe nok til at mælkens bakterier vil blive opformeret. En anden mulighed er direkte kontaminering ned i ostekarret, hvilket er svært at undgå ved åbne ostekar. Risikoen for direkte kontaminering med fækale bakterier må anses for at være større i et gårdmejeri end i et almindeligt mejeri, i det den fysiske afstand mellem køer og mejeri selvsagt er mindre. Om det høje antal bakterier fundet på XLD fra den pasteuriserede mælk er årsagen til, at der skete en fejlstyrning i denne produktion vides ikke, men det er et faktum, at denne batch først kom under pH 5,5 efter 34 timer. Tredje produktion havde det laveste antal bakterier fra mælken på XLD, hvilket gælder både for den rå mælk og den pasteuriserede mælk. Efter 20 dage blev det højeste antal bakterier på XLD fundet i ostene fra netop denne produktion. En mulig forklaring på denne kraftige vækst af coliforme bakterier kan være det lave antal mælkesyrebakterier (10^7 CFU pr g. på M17) der findes efter 2 dage i ostene. Der er tilsat samme mængde starterkultur til alle produktioner, så årsagen hertil må være, at der i denne produktion blev brugt det sidste af en batch 'frosset koncentreret' starterkultur, som må have taget skade ved at blive tøet op og frosset ned igen under udvejningerne til tidligere osteproduktioner. Ostene fra fjerde produktion var dem der smagte bedst, men også dem der havde det højeste antal bakterier i den rå mælk på XLD og Baird parker. På M17 og MRS var der ikke specielt mange mælkesyrebakterier. Der er flere ting, der er værd at bemærke ved denne produktion; 1) Der foregik ikke nogen anden produktion på mejeriet, som kunne interferere med forsøgsproduktionen. 2) Denne produktion fik ikke lov at forsyrne uden starterkultur, og der blev brugt en frisk starterkultur. 3) Produktionen havde den hurtigste styrning.

Pasteurisering har til hovedformål at dræbe patogene bakterier, men derudover sker der nogle ændringer med mælken såsom; drab af bakterier som kunne bidrage positivt til smagen; ændringer i enzymaktivitet; aktivering af plasminogen og inaktivering af lipaser og cathepsin D; denaturering af serumproteiner (Grappin & Beuvier, 1997). Der er i flere undersøgelser blevet observeret mere vand i fedtfri ost i pasteuriserede oste, hvilket dog aldrig har været signifikant (Grappin & Beuvier, 1997). I vores forsøg var der i første og fjerde produktion større indhold af vand i fedtfri ost i den pasteuriserede ost, i anden produktion var der samme indhold og i tredje produktion var indholdet højere i råmælksostene. Sidstnævnte kan dog skyldes det højere fedtindhold i den rå mælk end i den pasteuriserede mælk, men da fedtindholdet var det samme i ostene vil det give mere vand i råmælksostene.

I litteraturen står beskrevet, hvordan pasteurisering har indflydelse på den enzymatiske aktivitet. For eksempel stiger den proteolytiske aktivitet med 30-40% ved 72°C i 15 sekunder, men ved at benytte en pasteuriseringstemperatur på 63°C og en holdetid på 30 min. stiger aktiviteten kun med 8-24% (Noomen, 1975). I vores forsøg blev plasminaktiviteten målt i produktion 2, 3 og 4, og der blev ikke fundet nogen entydigt stigning i plasminaktiviteten i de pasteuriserede oste. Anden produktion havde en kraftig stigning, mens der i tredje produktion blev fundet en højere plasminaktivitet i råmælksostene. I fjerde produktion var der et lidt højere niveau i de pasteuriserede oste. Ligesom forskellene i VFFO var der altså også en meget stor variation i plasminaktiviteten mellem produktionerne.

Undersøgelser af cheddar og schweiziske oste har vist, at starterkulturen voksede langsommere i råmælksoste end i oste af pasteuriseret mælk (Beuvier *et al.*, 1997; McSweeney *et al.*, 1993). *Lactobacillus* spp. er dominerende blandt NSLAB i oste, og de stammer, der findes i råmælksoste er mere heterogene end de stammer, der findes i pasteuriserede oste (McSweeney *et al.*, 1993). Råmælksoste har en større diversitet og indeholder flere forskellige bakterier på både slægts- og artsniveau end pasteuriserede oste (Grappin & Beuvier, 1997). De fleste undersøgelser af NSLAB er lavet med cheddaroste, hvilket skyldes, at de starterkulturer, der benyttes til cheddarfremstilling udelukkende indeholder homofermentative syrningskulturer, som ikke forgærer citrat eller danner aromakomponenter udover mælkesyre (Nielsen 2000). Derfor er der mere næring til NSLAB, og de reststoffer, der dannes, kan nemmere bemærkes. En anden væsentlig forskel mellem cheddaroste og bløde overflademodnede oste er vandindholdet, og dermed laktoseindholdet, som er højere i de bløde oste (Nielsen 2000). Væksten af starterkultur i bløde oste vil derfor stoppe fordi pH bliver for lavt, hvilket burde betyde, at de mere syretolerante *Lactobacillus* spp. ville tage over. Dette var dog ikke hvad der skete i vores undersøgelse, hvilket kan skyldes flere ting; enten var vandindholdet i ostene for lavt til at skabe et laktoseoverskud eller også kom pH for hurtigt op igen til at forfordere *Lactobacillus* spp., hvorved *Lactococcus* forblev dominerende. En anden forklaring på, at *Lactobacillus* spp. ikke spiller samme rolle som i hårde oste, kunne være det øgede antal *Enterobacteriaceae*, der er i bløde oste. I bløde råmælksoste findes flere coliforme bakterier end i andre råmælksoste, hvilket skyldes det høje pH, den korte modning og det høje vandindhold (De Reu *et al.*, 2002).

I vores forsøg blev antallet af *Enterobacteriaceae* fundet på XLD. *Hafnia alvei* var den mest dominerende bakterie i flere undersøgelser af floraen i bløde oste (Sable *et al.*, 1997; Macedo, Malcata & Hogg, 1995; Desmasures, Bazin & Gueguen, 1997; Alonso-Calleja *et al.*, 2002), og i vores forsøg blev flere af bakterierne fra XLD og Eosin methylenblåt bestemt til at være enten *Rahnella* eller *Hafnia alvei*. *Rahnella* er beskrevet i forbindelse med fejlfarvning af hytteost (Davey & Eyles, 1992), og er i stand til at vokse hurtigt i fødevarer ved 7°C (Lindberg *et al.*, 1998). Mælkesyrebakterier og *H. alvei* danner dårlig lugt i vakuumpakket kød (Borch, Kant-muermans & Blixt, 1996), hvilket bl.a. skyldes, at nogle af mælkesyrebakterierne omdanner arginine til ornithine, som er et forstadium til det biogene amin putrescin (Gram *et al.*, 2002). Biogene aminer er normalt uønskede i fødevarer, da de kan give anledning til allergiske reaktioner og forgiftninger. Ikke desto mindre mener Richard, at *H. alvei* kan være en vigtig smagsdanner i camembert (Richard, 1984). Putrescin bliver ikke nævnt som en ønsket smagskomponent, men den er svær at komme udenom. Den har vist sig at være et af de første tegn på fordærv i vakuumpakket kød, og kan derfor bruges som indikator på kødfordærv. Danisco A/S producerede for nogle år siden *Hafnia alvei*, som

kunne benyttes til at give oste fremstillet af pasteuriseret mælk en mere uren smag, som de beskrev som ”smagen af kostald” (Jørgensen, 2004a; Tolstoy, 2004). Denne kultur er som den eneste gram negative bakterie tilladt i fremstillingen af ost i Danmark (Andersen.J, 2004; Jørgensen, 2004b). Kulturen er ikke længere kommercielt tilgængelig på grund af manglende interesse og problemer med kontaminering af andre produktioner på samme anlæg (Jørgensen, 2004c).

10 Konklusion

Dette speciales formål var at undersøge, om der er forskel i udviklingen af mikrobiologiske og enkelte kemiske parametre mellem oste fremstillet af rå mælk og af pasteuriseret mælk.

Der blev fundet statistisk signifikant færre mælkesyrebakterier i de oste, som var fremstillet af pasteuriseret mælk, uden at det dog har været muligt at forklare præcist hvorfor.

Der blev detekteret bakterier på Baird Parker mediet i niveauer på mellem 10^3 - 10^7 CFU pr. g. Der blev generelt detekteret det højeste niveau i prøver fra råmælksostene.

Hvad angår *Enterobacteriaceae* så blev der detekteret mellem 10^3 - 10^7 CFU pr. g. I alle produktionerne blev der til sidst i modningen ikke fundet forskelle på over en log enhed. I produktion 2 og 3 var niveauet af *Enterobacteriaceae* oppe på mellem 10^6 - 10^7 CFU pr. g. og det kan ikke udelukkes, at denne koncentration vil påvirke smagen, især ikke hvis man tager synergieffekten mellem mælkesyrebakterier og *H. alveis* dannelse af det biogene amin putrescin med i betragtning.

Det var ikke i dette projekt muligt at bekræfte tesen om høj plasminaktivitet i oste fremstillet af pasteuriseret mælk, men hvis den store variation mellem de enkelte produktioner tages i betragtning, er det heller ikke muligt at afkræfte tesen.

Med hensyn til øget vandindhold (VFFO) i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk, så var der også her stor variation mellem de fire produktioner. Én produktion havde det samme VFFO indhold i begge oste typer, to produktioner havde et højere VFFO indhold i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk og den sidste havde et højere VFFO indhold i råmælksosten. Sidstnævnte kan muligvis forklares med et højere fedtindhold i den rå mælk, og da ostene havde samme fedtindhold vil det føre til et øget vandindhold.

Et af argumenterne for at fremstille råmælksoste er, at en større diversitet i mælkesyrebakterier giver en mere kompleks smag. Det var i vores forsøg først muligt til sidst i modningen at finde NSLAB (Non Starter Lacticacid bacteria) i niveauer som kunne give anledning til smagsændringer.

De fire produktioner foregik på forskellige tider af året, men årstidsvariationen blev dog overskygget af nogle fejl under produktionen af ostene. I anden produktion må der være sket en efterkontaminering idet der på medierne XLD og EMB blev fundet 10^4 CFU pr. g. i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk. I de friske oste (2 dage gamle) i samme produktion blev der fundet 10^4 CFU pr. g. i både råmælksostene og i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk. I tredje produktion var der ikke mange *Enterobacteriaceae* i mælken, men pga en inaktiv starterkultur kom antallet af bakterier på medierne XLD og EMB op på ca 10^7 CFU pr. g. efter 10 dage i begge typer oste. I første og fjerde produktion foregik ostefremstillingen uden problemer, men de fremstillede oste var forskellige i størrelse og kan derfor ikke sammenlignes.

11 Perspektivering

Denne opgave har ikke set på det sikkerhedsmæssige ved produktionen af råmælksoste, men med det antal *Enterobacteriaceae* der blev fundet i både råmælksoste og i oste fremstillet af pasteuriseret mælk, er det et problem som burde undersøges. Om det høje antal *Enterobacteriaceae* vi fandt i ostene fremstillet af pasteuriseret mælk skyldes produktionen af råmælksoste vides ikke, heller ikke om det overhovedet er muligt at have en råmælksosteproduktion sammen med en produktion af oste fremstillet af pasteuriseret mælk.

Vi fandt først til sidst i modningen et antal NSLAB som kunne være årsag til ændringen i smagen. Yderligere studier af varmebehandlingens indvirkning på de fysiske, kemiske og mikrobiologiske ændringer i mælken vil kunne redegøre for, om en termisering – frem for en pasteurisering - vil kunne tilfredsstille både sensoriske og sikkerhedsmæssige krav.

Ved hjælp af Højfelts NMR (Nuclear magnetic resonance) kunne man undersøge oste fremstillet af mælk som var varmebehandlet ved forskellige temperaturer og holdetider. Sådanne studier kunne måske give en ide om de strukturelle ændringer i proteinerne under varmebehandling (Chaland *et al.*, 2000).

Til de mikrobiologiske analyser kunne DGGE-PCR (Denaturing gradient gel electrophoresis - Polymerase chain reaction) med stor fordel benyttes. Hvor DNA fragmenterne ved en almindelig gelelektroforese inddeles efter størrelse, foregår grupperingen i en PCR-DGGE efter smeltepunkt. Dette gør det muligt at have DNA fra flere bakterier i samme prøve og differentiere dem ved deres smeltepunktet. Derfor benyttes denne metode til at undersøge komplekse bakteriemiljøer, hvor en rendyrkning ikke er mulig, f.eks. når det gælder tarmbakterier, vandmiljø og jordbakterier (Øvreås *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 2001; Muyzer & Smalla, 1998; Heilig *et al.*, 2002). Metoden vinder også udbredelse inden for levnedsmidler, især indenfor spontant fermenteret produkter men også oste (Coppola *et al.*, 2001; Ercolini *et al.*, 2001; Ercolini *et al.*, 2002; Randazzo *et al.*, 2002).

Vores studier viste høje koncentrationer af *Enterobacteriaceae*, deriblandt *Hafnia alvei* som danner putrescin - især ved tilstedeværelsen af mælkesyrebakterier. *H. alvei* har før været nævnt som mulig kilde til ”staldsmag”, men der findes ingen litteratur på dette område, eller studier i, om denne bakterie kunne tilføre oste fremstillet af pasteuriseret mælk det, som nogen synes de mangler smagsmæssigt. Fødevaredirektoratet har givet grønt lys for brugen af denne bakterie som tilsætning ved osteproduktion, så vejen er banet for brug af *Enterobacteriaceae*.

12 Forkortelsesliste

Δ	gennemsnitlige forskel
μ _{max}	væksthastigheden
BP	Baird parker ”Mediet”
CFU	Colony Forming Units / kolonidannende bakterier
Cit+	citrat forgærende
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMB	Eosin MetylenBlåt (agar)
EPEC	Enteropatoogene <i>E. coli</i>
GMP	Glyko-Makro-Peptid - κ-kaseinets hydrofile makropeptid
ITS-PCR	Internal Transcribed Spacer- Polymerase Chain Reaction
Koagel	Udfældet kasein
Lc	<i>Lactococcus</i>
LPL	LipoProtein Lipase
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe-medium
MRS	De Man, Rogosa, Sharpe ”agar”
NMKL	Nordisk Metodik Komité for Levnedsmidler
NMR	Nuclear magnetic resonance
NSLAB	Non Starter Lactic Acid Bacteria / Medfølgeflora
PCA	Plate Count Agar
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
rDNA	Ribosomalt Deoxyribo Nuklein Acid
RNA	Ribonukleinsyre
rRNA	Ribosomalt ribonukleinsyre
Sc	<i>Streptococcus</i>
Spp	flertal af sp (uspecifik species)
SS-broer	Sulfidbinding i proteiner
Ssp	Subspecies
TSA	Trypton Soy Agar
TSB	Trypton Soy Bouillon
VFFO	Vand i FedtFri Ost
VRBA	Violet Rød Bile Agar
VTEC	Verotoksin-producerende <i>E. coli</i>
XLD	Xylose Lysine Desoxycholate

13 Litteraturliste

- Anonym (1975) Determination of fat content, Van Gulik method. *ISO 3433:1975*
- Anonym (1982) Determination of the total solids content (reference method). *The International Dairy Federation 4A:1984*
- Anonym (1988) Determination of chloride content, potentiometric titration method. *The International Dairy Federation 88A:1988*
- Anonym (2001) F-DVS *Lactococcus diacetylactis* MB-1 ,Product Information. *Chr.Hansen A/S EN-MB-1-PI-1101*,
- Anonym (2003a) mave-tarm.dk. <http://www.mave-tarm.dk/graphics/html/Udbrudmonitor/Siderne/historisk.htm>
- Anonym (2003b) mave-tarm.dk. <http://www.mave-tarm.dk/graphics/html/Udbrudmonitor/Siderne/historisk.htm>
- Anonym (2003c) MRS AGAR (DE MAN, ROGOSA, SHARPE). *Oxoid, CM0361*
- Anonym (2004a) Baird parker agar.
- Anonym (2004b) Eosin Methylene blå agar.
- Anonym (2004c) **M17 AGAR**.
- Anonym (2004d) Oxford.
- Anonym (2004e) Slanetz and Bartley Medium.
- Alonso-Calleja, C, R. Capita, J. Carballo, A. Bernardo & M. L. Garcia-Lopez (2002) Changes in the Enterobacteriaceae populations throughout manufacturing and ripening of Valdeteja cheese. *Milchwissenschaft-Milk Science International* **57**, 522
- Andersen, H M (1982) Den gram negative flora i rå mælk og udvirkningen under fabrikation og modning af traditionel Fransk bamembert. *Hovedopgave ved KVL, Kbh, Danmark*
- Andersen.J (2004) Telefonsamtale med Jens Kirk Andersen fra Fødevaredirektoratet.
- anonym (2003)
http://www.foedevaredirektoratet.dk/Foedevare/Mikrobiologiske_forureninger/Listeria/Forside.htm
- anonym (2004) XLD.
- Axelsson, L (2001) Classification and Physiology. **2**, Ed. Salminen, S and Von Wright, A. 1
- Ayres, J C (1960) The relationship of organisms of the genus *pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *Journal of Bacteriology* **23**, 471
- Bager, F (2004) *Zoonosenyt*

- Baird, R & W. Lee (1995) Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **26**, 15
- Bastian, E D & R. J. Brown (1996) Plasmin in milk and dairy products: An update. *International Dairy Journal* **6**, 435
- Bell, C & A. Kyriakides (2002) Salmonella - A practical approach to the organism and its control in foods. *Blackwell Science, London*.
- Beresford, T P, N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan & T. M. Cogan (2001) Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* **11**, 259
- Beuvier, E, K. Berthaud, S. Cegarra, A. Dasen, S. Pochet, S. Buchin & G. Duboz (1997) Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal* **7**, 311
- Borch, E, M. Kant-muermans & Y. Blixt (1996) **Bacterial spoilage of meat and cured meat products. Int. J. Food Microbiol.** 103- 120. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 103
- Bradshaw, J G, J. T. Peeler & R. M. Twedt (1991) Thermal resistance of *Listeria* spp. in milk. *Journal of Food Protection* **54**, 12
- Chen, L, R. M. Daniel & T. Coolbear (2003) Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* **13**, 255
- Cogan, T M (1995) Flavor Production by Dairy Starter Cultures. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, S49
- Cogan, T M, G. F. Fitzgerald, c. Hill, V. Monnet, S. Cordon, J. C. Gripon, G. K. Y. Limosowtin, I. B. Powel, E. Parente, D. Desmazeaud, H. Neve, W. E. Sandine & S. E. Gilliland (1996) Dairy starter cultures. *VCH Publishers, Cambridge*.
- Coppola, S, G. Blaiotta, D. Ercolini & G. Moschetti (2001) Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 414
- Crow, V, T. Coolbear, P. K. Gopal, F. G. Martley, L. L. McKey & H. Riepe (1995) The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal* **5**, 855
- Crow, V, T. Coolbear, R. Holland, G. Pritchard & F. G. Martley (1993) Starters as finishers: Starter properties relevant to cheese ripening. *International Dairy Journal* **3**, 423
- Crow, V, B. Curry & M. Hayes (2001) The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal* **11**, 275
- Crump, J A, P. M. Griffin & F. J. Angulo (2002) Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clinical Infectious Diseases* **35**, 859
- D'Aoust, J-Y (1989) *Salmonella*. Ed. Doyle, M. P.

- Davey, J & M. Eyles (1992) Discoloration of cottage cheese caused by *Rahnella aquatilis* in the presence of glucono delta-lactone. *Australian Journal of Dairy Technology* **47**, 62
- de Buyser, M L, B. Dufour, M. Maire & V. Lafarge (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* **67**, 1
- De Reu, K, W. Debeuckelaere, N. Botteldoorn, J. De Block & L. Herman (2002) Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *Journal of Food Safety* **22**, 183
- Desmaures, N, F. Bazin & M. Gueguen (1997) Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 53
- Desmaures, N & M. Gueguen (1997) Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *Journal of Dairy Research* **64**, 271
- Downes, F & K. Ito (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of food. **4**,
- Duffy, G, R. C. Whiting & J. J. Sheridan (1999) The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157 : H7. *Food Microbiology* **16**, 299
- Ercolini, D, G. Blaiotta, G. Moschetti & S. Coppola (2002) Evaluation of PCR-DGGE analysis for molecular typing of cheeses. *Annals of Microbiology* **52**, 81
- Ercolini, D, G. Moschetti, G. Blaiotta & S. Coppola (2001) The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: Bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 610
- Fajer, P G (2003a)
- Fajer, P G (2003b)
- Fajer, P G (2003c)
- Fajer, P G (2003d) <http://fajerpc.magnet.fsu.edu/>. 26/2-04
- Farber, J M & P. I. Peterkin (1991) *Listeria-Monocytogenes*, A Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews* **55**, 476
- Feng, P (2001) *Escherichia coli*. Ed. Labbé, R. G. and García, S.
- Fox, P F, T. M. Cogan & P. L. H. McSweeney (2000) Fundamentals of cheese science. *Aspen publication, Maryland*. **1**,
- Fox, P F & A. L. Kelly (2003) Developments in the chemistry and technology of milk proteins - 1. Overview of major milk proteins. *Food Australia* **55**, 104

- Fox, P F & P. L. H. McSweeney (1997) Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. **2**, Ed. Law, B. A. 1
- Fox, P F & P. L. H. McSweeney (1998) Dairy Chemistry and Biochemistry. *Chapman and Hall, London*.
- Fox, P F & P. L. H. McSweeney (2003) Advanced dairy chemistry Vol I og II. *Kluwer Academic, New York*. **3**,
- Gipon, J C (1999) Flavour and texture in soft cheese. **2**, Ed. B.A Law 193
- Gram, L, L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christensen & M. Givskov (2002) Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **78**, 79
- Grappin, R & E. Beuquier (1997) Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal* **7**, 751
- Grappin, R, E. Beuquier, Y. Bouton & S. Pochet Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-type cheeses. *Lait* **79**, 3
- Griffiths, A, J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin & W. M. Gelbart (1999) An introduction to Genetic analysis. *W.H. Freeman, New York*. **7**,
- Gripon, J C (1993) Mould-ripened cheese. **2**, Ed. Fox, P. F.
- Heilig, H G H J, E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. L. Akkermans & W. M. de Vos (2002) Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 114
- Holzappel, W (1992) Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **17**, 113
- Hurley, M J, L. B. Larsen, A. L. Kelly & P. L. H. McSweeney (2000) The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal* **10**, 673
- Hyldeg, G (1993) Teknologiske parametres indflydelse på den enzymatiske reaktion og geldannelse i mælk og UF-retentater. *DSR, København*.
- ICMSF (1996) International Commission on microbiological specifications for food In: Microorganisms in foods 5. **1**,
- Jelan, P & W. Rattray (1995) Thermal denaturation of whey proteins. **2**, Ed. Fox, P. F.
- Johnson, E A, J. H. Nelson & M. Johnson (1990a) Microbiological Safety of Cheese Made from Heat-Treated Milk .2. Microbiology. *Journal of Food Protection* **53**, 519
- Johnson, E A, J. H. Nelson & M. Johnson (1990b) Microbiological Safety of Cheese Made from Heat-Treated Milk .3. Technology, Discussion, Recommendations, Bibliography. *Journal of Food Protection* **53**, 610
- Jørgensen, P (2004a) Preben Jørgensen fra Danisco A/S i Brabrand.

- Jørgensen, P (2004b) Preben Jørgensen fra Danisco A/S i Brabrand.
- Jørgensen, P (2004c) Preben Jørgensen fra Danisco A/S i Brabrand.
- Kloster, H (1980) Mælkestrømmens historie og kvalitet. *DSR, København*. 1,
- Knudsen, S (1931) Starters. *Journal of Dairy Research* **II**, 137
- Kristensen, J M B (1995) Osteteknologi. *Erhvervsskolernes forlag, København*
- Lawrence, R (1991) Incorporation of whey proteins in cheese. 79
- Lawrence, R, T. Thomas & B. Terzaghi (1976) Reviews in the progress of dairy science: Cheese starters. *Journal of Dairy Research* **43**, 141
- Lindberg, A, A. Ljungh, S. Ahrne, S. Lofdahl & G. Moiln (1998) *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 11
- Lodish, H, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore & J. Darnell (1999) *Molecular cekk biology*. 4,
- Lucey, J A (2002) Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science* **85**, 281
- Lund, H P (1891) 22ende beretning fra den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles Laboratorium for landøkonomiske forsøg.
- Macedo, A C, F. X. Malcata & T. A. Hogg (1995) Microbiological Profile in Serra Ewes Cheese During Ripening. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 1
- Maher, M M, K. N. Jordan, M. E. Upton & A. Coffey (2001) Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 201
- Martley, F G & V. L. Crow (1993) Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal* **3**, 461
- McSweeney, P L H, P. F. Fox, J. A. Lucey, K. N. Jordan & T. M. Cogan (1993) Contribution of the indigenous microflora to the maturation of cheddar cheese. *International Dairy Journal* **3**, 613
- Meilgaard, M, B. S. Civille & B. T. Carr (1999) Sensory evaluation techniques. 3,
- Mejeriforeningen (2004) Mejeristatistik.
- Morgan, F, V. Bonnin, M. P. Mallereau & G. Perrin (2001) Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 217
- Muyzer, G & K. Smalla (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **73**, 127

- Najera, A I, M. de Renobales & L. J. R. Barron (2003) Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry* **80**, 345
- Nielsen, E W (1999) Omdannelser i mælk under varmebehandling. *DSR, København*.
- Nielsen, E W (2000) Omdannelser i ost under syring og modning. *DSR, København*.
- Nielsen, E W (2001) Mælkekemi. *DSR, København*. **1**,
- Nielsen, S S (2002) Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6628
- Noomen, A (1975) Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Netherlands milk dairy journal* **29**, 153
- O'Farrell, I P, J. J. Sheehan, M. G. Wilkinson, D. Harrington & A. L. Kelly (2002) Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese. *Lait* **82**, 305
- O'Sullivan, D J (1999) Methods for analysis of the intestinal microflora. **1**, Ed. Tannock, G. W.
- Øvreås, L, L. Forney, F. L. Daae & V. Torsvik (1997) Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3367
- Pedersen, P D (2003) fra Saeco, Italy.
- Pitt, W M, T. J. Harden & R. R. Hull (1999b) *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* **54**, 49
- Pitt, W M, T. J. Harden & R. R. Hull (1999c) *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* **54**, 49
- Pitt, W M, T. J. Harden & R. R. Hull (1999a) *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* **54**, 49
- Piyasena, P, S. Liou & R. C. McKellar (1998) Predictive modelling of inactivation of *Listeria* spp. in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 167
- Ramsaran, H, J. Chen, B. Brunke, A. Hill & M. W. Griffiths (1998) Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 : H7 in soft cheeses. *Journal of Dairy Science* **81**, 1810
- Randazzo, C L, S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M. de Vos & E. E. Vaughan (2002) Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1882

- Rehman, S U, P. L. H. McSweeney, J. M. Banks, E. Y. Brechany, D. D. Muir & P. F. Fox (2000) Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal* **10**, 33
- Reitsma, C J & D. R. Henning (1996) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. *Journal of Food Protection* **59**, 460
- Reps, A (1993) Bacterial surface-ripened cheese. Ed. Fox, P. F.
- Richard, J (1984) Evolution of the Microbial-Flora of the Surface of Camembert Cheese Made from Raw-Milk. *Lait* **64**, 496
- Robinson, R K (2003) Dairy microbiology handbook. xiv, 765 s., ill.,
- Rønne, T (2001) Epi nyt: VEROTOKSINPRODUCERENDE E. COLI 1997-2000. <http://www.ssi.dk/sw1940.asp>
- Sable, S, V. Portrait, V. Gautier, F. Letellier & G. Cottenceau (1997) Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. *Enzyme and Microbial Technology* **21**, 212
- Schroeder, J W (1997) Mastitis Control Programs: Bovine Mastitis and Milking Management. <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/ansci/dairy/as1129w.htm>
- Shakeel, U R, P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (2000) Methods used to study non-starter microorganisms in cheese: a review. *International Journal of Dairy Technology* **53**, 113
- Shakeel, U R, P. L. H. McSweeney, J. M. Banks, E. Y. Brechany, D. D. Muir & P. F. Fox (2000) Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal* **10**, 33
- Singh, H (1993) Heat-induced interactions of proteins in milk.
- Storch, V (1890) Attende Beretning fra den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles Laboratorium for landøkonomiske forsøg -Nogle undersøgelser over flødens syring. *den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles Laboratorium for landøkonomiske forsøg, København*.
- Tolstoy, A (2004) Telefon samtale med Alexander Tolstoy.
- Tornadijo, M E, M. C. Garcia, J. M. Fresno & J. Carballo (2001) Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simon cheese. *Food Microbiology* **18**, 499
- Vernosy-Rozand, C, A. Meyerand, C. Mazuy, M. Delignett-Muller, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre & Y. Richard (1998) Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats milk lactic cheese. *Journal of Dairy Research* **65**, 273
- Vitting, A (1999) Ost af rå mælk? *Mælkeritidende* 228
- Vogensen, F K (2003) Underviser i faget Dairy Microbiology.

Vogensen, F K, L. Nilsson & J. Josephsen (2002) Methods for isolation and identification of lactic acid bacteria. *Department of dairy and food science the royal veterinary and agricultural university, Copenhagen.* **2**,

Walstra, P (1999) Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal* **9**, 189

Walstra, P, T. J. Geurt, A. Noomen, A. Jellema & M. A. J. S. Van Boekel (1999) Dairy Technology. *Marcel Dekker, Inc., New York.* **1**,

Walstra, P, A. Noomen & T. Geurts (1993) Dutch-type varieties. **2**, Ed. Fox, P. F. 39

Walter, J, C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro & W. P. Hammes (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2578

Wouters, J, E. Ayad, J. Hugenholtz & G. Smit (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* **12**, 91