

Psykrotrofa och termoresistenta bakterier i mjölk och deras påverkan på kvalitén

Psychrotrophic and thermoresistant bacteria in milk and their effect on quality

Louise Rolander



Psykrotrofa och termoresistenta bakterier i mjölk och deras påverkan på kvalitén

Psychrotrophic and thermoresistant bacteria in milk and their effect on quality

Louise Rolander

Handledare: Anders Andrén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap

Examinator: Lena Dimberg, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i livsmedelsvetenskap

Kurskod: EX0669

Program/utbildning: Agronom - livsmedel

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2012

Omslagsbild: Louise Rolander

Serietitel: nr: Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap, nr:348

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: mjölk, produktförstörande bakterier, termoresistenta bakterier, psykrotrofa bakterier, sporbildare, bakteriella enzymer

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och lantbruksvetenskap
Institutionen för livsmedelsvetenskap

Sammanfattning

Produktförstörande bakterier i mjölk försämrar kvalitén och förkortar dess hållbarhetstid. Det är därför både för mejeriindustrin och för konsumenten önskvärt att mängden produktförstörande bakterier i mjölken är låg. Syftet med denna översikt är att sammanställa litteratur som behandlar vilka produktförstörande bakterier som finns i obehandlad och pastöriserad konsumtionsmjölk och mjölkprodukter, vilka problem de orsakar samt hur deras förekomst kan förebyggas. Fokus har lagts på termoresistenta samt psykrotrofa, köldtoleranta, bakterier.

Försämring av mjölkprodukters kvalitet, så som lukt och smak, kan bero på bakteriekontamination i något av processtegen före pastörisering, exempelvis genom jordiga kospenar på mjölgården, eller genom återkontamination på mejeriet. Termoresistenta bakterier kan orsaka lukt- och smakfel i den pastöriserade mjölken eftersom de överlever den värmebehandling som de utsätts för på mejeriet. De flesta psykrotrofa bakterier däremot dör vid pastörisering. Dock kan de innan pastörisering bilda värmeresistenta enzymer som förblir aktiva även efter pastörisering och därför kan de orsaka försämring av kvalitén. Det finns också sporbildande psykrotrofa bakterier vars sporer kan utvecklas till vegetativa celler vid pastöriseringen och som därefter kan tillväxa i kylskåpstemperaturer. Enzymer som utsöndrats av psykrotrofer kan orsaka proteolys och lipolys av protein respektive fett som finns i mjölk. Detta kan ge upphov till peptider och fettsyror med bittra respektive härska smaker. Bakterierna och enzymerna kan också påverka mjölkens sammansättning vilket i sin tur kan minska utbytet vid exempelvis osttillverkning.

För att förhindra och minska närvaron av dessa produktförstörande bakterier i mjölken kan olika tekniker användas. Termisering (60-65 °C, 10 s) kan avdöda psykrotrofa bakterier på gårdsnivå innan de hunnit bilda stora mängder enzymer. Sporer aktiveras av denna behandling men kan därefter avdödas vid pastörisering. Genom att sänka temperaturen då mjölken lagras samt förändra gassammansättningen i mjölk tanken kan hållbarhetstiden förbättras avsevärt. Mikrofiltrering är ett annat alternativ som kan användas för att skilja av bakterierna från mjölken. Mjölken får då passera ett filter där bakterierna fastnar i membranet och mjölken släpps igenom. Genom att kombinera dessa strategier samt iakttä god hygien genom hela produktionskedjan kan bakteriehalten i mjölken minska och därmed hållbarhetstiden förlängas

Nyckelord: mjölk, produktförstörande bakterier, termoresistenta bakterier, psykrotrofa bakterier, sporbildare, bakteriella enzymer

Abstract

Presence of spoilage bacteria in milk can cause defects in the milk and shorten its shelf life. Therefore it is important, both for the dairy industries point of view and for the consumer, to keep the bacteria count low. The purpose of this literature review is to compile part of the literature about spoilage bacteria, common spoilage flora in milk, what problems they cause and how they can be prevented. In this review the psychrotrophic and thermo resistant bacteria are discussed.

The spoilage bacteria can enter the milk in any stage of the milk processing: at the farm or at the dairy industry. Thermo resistant bacteria can cause problems in the pasteurized milk since they survive the heat treatment that is applied at the dairy plant. *Bacillus* for example, are spore formers and therefore survive pasteurization. The spores are activated by the heat treatment and since some strains of *Bacillus* also can grow in low temperature they can be present and grow in pasteurized milk. Other psychrotrophic, cold tolerant, bacteria however does not survive pasteurization. Even though the bacteria are killed in the pasteurization, they can produce heat resistant enzymes that can spoil the pasteurized milk. *Pseudomonas* for example has these properties. The enzymes that are produced can cause lipolysis or proteolysis of the fat and proteins, respectively. The peptides and fatty acids that are released in the process can cause putrid respectively rancid off-flavour. They can also alter the milk composition which may decrease the yield in cheese making.

Different techniques can be used to prevent and decrease the amount of spoilage bacteria in milk. Thermisation (60-65 °C, 10 s) can kill psychrotrophs at the farm before they start to produce enzymes. The endospores are activated by the heat treatment and can then be killed in the pasteurization step. By lowering the storage temperature of the milk and change the gas composition in the tank, the keeping time of the milk can increase. Bactofugation and microfiltration is other alternative that can be used to separate endospores and bacteria from milk. By combining these strategies and keep a good hygiene at the farm and at the dairy plant, the bacteria amount in the milk can decrease and the keeping time can be prolonged.

Keywords: milk, spoilage bacteria, thermo resistant bacteria, psychrotrophic bacteria, spore formers, bacterial enzymes

Innehållsförteckning

1	Inledning	7
1.1	Bakgrund.....	7
1.2	Syfte.....	8
2	Metod	9
3	Produktförstörande bakterier	10
3.1	Termoresistenta bakterier.....	10
3.1.1	Termoresistenta bakterier – vilka är de?.....	11
3.1.2	Källor till termoresistenta bakterier i mjölk.....	11
3.1.3	Hur förstör bakterierna konsumtionsmjölk och andra mjölkprodukter?	11
3.1.4	Hur kan kontamination av termoresistenta bakterier förhindras?	12
3.2	Psykrotrofa bakterier	12
3.2.1	Psykrotrofa bakterier – vilka är de?	12
3.2.2	Källor till psykrotrofa bakterier i mjölk	13
3.2.3	Hur förstör psykrotrofa bakterier konsumtionsmjölk och mjölkprodukter?	16
3.2.4	Hur kan kontamination av psykrotrofer och dess enzymer förhindras?.....	19
4	Diskussion	23
	Tack	24
	Referenser	25

1 Inledning

1.1 Bakgrund

Produktförstörande bakterier i mjölk försämrar kvalitén och förkortar dess hållbarhetstid genom att förändra mjölkens sammansättning samt lukt och smak. Det är därför, både för mejeriindustrin och för konsumenten, önskvärt att mängden produktförstörande bakterier i mjölken är låg. Hållbarhetstiden för mjölk är av ekonomisk betydelse för mejerierna eftersom möjlighet till längre tids lagring i affären minskar svinn, något som även gynnar miljön. Mjölk med förlängd hållbarhetstid, så kallad UHT-mjölk *ultra high temperature*, ökar i popularitet och ställer andra krav på kontroll av mjölk kvaliteten.

Eftersom mjölk är både närings- och energität utgör den en god tillväxtplats för bakterier (Adams & Moss, 2000). Mjölk har dessutom en hög vattenaktivitet samt ett för bakterietillväxt fördelaktigt neutralt pH-värde. Huvudsakligen består mjölk av vatten, fett, protein, kolhydrater, mineraler och vitaminer. Mjölkfettet utgörs till störst del av triglycerider som finns i form av fettklor, omslutna av ett membran bestående av glykoproteiner, lipoproteiner och fosfolipider. För att bakterierna ska kunna utnyttja fett som kol- och energikälla krävs att membranet skadas eller förstörs. Det finns två olika sorters proteiner i mjölk: kaseiner och vassleproteiner. Kaseinerna, vilka finns i störst mängd, finns i form av miceller. Dessa miceller är aggregat av kaseiner som håller ihop med hjälp av bindningar mellan fosfor och kalcium. Ett flertal bakterier kan orsaka nedbrytning av denna proteinstruktur. Vassleproteinerna däremot påverkas inte lika lätt. Laktos, vilket är den huvudsakliga kolhydraten i mjölk, kan vissa bakterier använda som näringskälla (Doyle *et al.*, 2001). Genom att bilda enzymer kan bakterierna bryta ner de olika näringsämnenas strukturer och på så sätt få tillgång till större mängder energi. Mjölken sammansättning förändras även naturligt under lagring, kaseinerna vandrar ut från micellen och blir därmed lättare utsatta för bakterienedbrytning. Obehandlad

mjölk, som kommer direkt från kon, innehåller tillväxtnhibitorer vilket försvårar tillväxten av vissa mikroorganismer. Den effektivaste inhibitorn utgörs av laktoperoxidasystemet, vilket inhiberar de enzym som bakterierna producerat. Laktoperoxidasystemet kan också förstöra strukturen på bakteriemembranet (Doyle *et al.*, 2001).

Pastörisering har länge tillämpats för att minska bakteriehalten i mjölk. Patogena bakterier avdödas effektivt, men pastöriseringen rår inte på termoresistenta bakterier samt sporer som kan finnas i mjölken. Vissa enzymer som produceras av bakterier är värmestabila och överlever därför också pastöriseringen. Således finns det olika orsaker till de lukt- och smakförändringar som sker i mjölken vid lagring. Även bakteriekontamination efter pastörisering av mjölken kan orsaka förstörelse av mjölk.

Nyare studier har haft tillgång till teknik som på ett säkrare sätt kunnat artbestämma bakterier (Eneroth *et al.*, 2000a) än de äldre studier som gjorts på bakterieförekomst i mjölk och kontaminationsvägar. Därmed kan en ny genomgång vara aktuell. Dessutom är det inte väl undersökt hur problem med produktförstörande bakterier kan förebyggas eller hur skadan kan minskas om bakterierna eller produkter av dem redan hamnat i mjölken.

1.2 Syfte

För att kunna förhindra och göra något åt produktförstörande bakterier i mjölk är det viktigt med kunskap om exempelvis hur de hamnar i produkten samt hur skadan kan minimeras om de redan kontaminerat produkten. Denna översikt syftar till att sammanställa nyare litteratur angående vilka produktförstörande bakterier som finns i obehandlad och pastöriserad konsumtionsmjölk och i mjölkprodukter, vilka problem de orsakar samt hur deras förekomst kan förebyggas. Fokus ligger på termoresistenta samt psykrotrofa, köldtoleranda, bakterier och de enzymer som de bildar. De bakterier och enzymer som finns naturligt i mjölken behandlas inte här. Mjölkprodukter kan även förstöras av jäst och mögel, men inte heller detta behandlas i denna uppsats. Några frågeställningar som belyses är:

- Vilka bakterier är vanliga i obehandlad mjölk? Pastöriserad mjölk?
- Hur hamnar de där?
- På vilket sätt bidrar de till att förstöra mjölkprodukter?
- Hur kan man förhindra att de hamnar i mjölken och hur kan de elimineras?

2 Metod

Litteratur söktes i databaserna *Web of knowledge*, *Google scholar* samt SLU-bibliotekets databas Primus. Följande sökord användes i olika kombinationer: *spoilage*, *milk*, *dairy*, *bacteria*, *milk quality*, *shelf life*, *bacterial milk proteases*, *bacterial milk lipases*. Utav de vetenskapliga artiklar, översiktsartiklar samt elektroniska böcker som hittades i sökningen och som var publicerade år 1994-2012 valdes de ut som handlade om psykrotrofa och termoresistenta bakterier i främst konsumtionsmjölk men även i andra mjölkprodukter. Utav dessa artiklar och böcker gjordes sedan en sammanställning vilken följer nedan.

3 Produktförstörande bakterier

En rad olika bakterier är förknippade med försämring av mjölkens kvalitet och förkortande av dess hållbarhetstid. På grund av förmågan att överleva och/eller tillväxa i värme respektive kyla räknas termoresistenta och psykrotrofa bakterier som stora produktförstörare. Vissa bakterier uppvisar båda dessa egenskaper och är därför extra problematiska. Litteraturöversikten inleds med ett avsnitt om termoresistenta bakterier och därefter följer en fördjupning om psykrotrofa bakterier.

3.1 Termoresistenta bakterier

Att en bakterie är termoresistent innebär att den kan överleva en temperaturbehandling på 72 °C i 15 sekunder, dvs. lågpastörisering (Christiansson *et al.*, 2004). De termoresistenta bakterierna överlever värmebehandling men föredrar lägre temperaturer för tillväxt medan termofila bakterier inte bara överlever utan även tillväxer i de höga temperaturerna. Värmetåligheten varierar mellan de olika släkten som termoresistenta bakterier kan tillhöra. Hos vissa bakterier är det förmågan att bilda sporer som gör att de kan överleva värmebehandlingen. Det har visat sig att några av dessa sporbildande bakterier även kan tillväxa i temperaturer ner mot 5 °C. Dessa behandlas därför mer ingående under rubriken psykrotrofer. Bakterier som överlever värme är problematiska vid tillverkningen av mjölkprodukter eftersom de överlever den vanliga lågpastöriseringen som mejerier använder för att avdöda patogena bakterier. Termoresistenta bakterier bidrar därmed stort till totalantalet bakterier i pastöriserad mjölk. Ett lågt totalantal är särskilt viktigt vid tillverkningen av mjölkpulver eftersom det sker en koncentrerings av mjölken vid torkningen. Bakteriehålden blir därför högre per gram i mjölkpulver än i mjölk. Ökade kvalitetskrav på mjölkpulver, i form av lägre totalantal, gör att termoresistenta bakterier i mjölken är viktigt att ta hänsyn till (Svensson *et al.*, 2004). Termoresistenta bakterier har dessutom en förmåga att bilda biofilm på utrustningen i

mejeriet (Burgess *et al.*, 2010), något som gör att de kontinuerligt kan kontaminera mjölken som passerar.

3.1.1 Termoresistenta bakterier – vilka är de?

Termoresistenta bakterier kan finnas inom många olika släkten. I en undersökning där Svensson *et al.* (2004) provtog obehandlad mjölk från 93 leverantörer, isolerades 421 olika bakteriestammar. Mjölken visade sig innehålla *Micrococcus* och *Kocuria* (17 %), sporbildande *Bacillus*-arter (12 %) samt *Microbacterium* eller *Cellulomonas* spp (71 %). Bacillusarterna som hittades mest frekvent var *Bacillus licheniformis* och *Bacillus pumilus*. Burgess *et al.* (2010) menar i sin översiktsartikel att totalantalet termoresistenta bakterier i obehandlad mjölk generellt är lågt, men utav de som finns är *Bacillus*-arterna vanliga. I pastöriserade och vidare processade mjölkprodukter utgör termoresistenta bakterier ofta en större del av bakterieflooran. Burgess *et al.* (2010) fann att *Anoxybacillus flavithermus* samt *Geobacillus* spp var vanliga i pastöriserad mjölk. Dessa bakterier växer dock inte i temperaturer lägre än 30 °C.

3.1.2 Källor till termoresistenta bakterier i mjölk

Termoresistenta bakterier kan kontaminera mjölken på gården exempelvis genom jord eller träck. Även biofilm som bildats i mjölkkningsutrustning, mjölkkningsanläggning eller mjölkttank kan vara en tillväxtplats för termoresistenta bakterier. Detta kan vara en följd av att diskningrutinerna inte är optimala, exempelvis har för låg diskningstemperatur eller felaktig dosering av diskmedel används (Christiansson *et al.*, 2004). Burgess *et al.* (2010) konstaterade att det också kan bero på för långa produktionscykler på mejeriet, otillräcklig rengöring mellan produktionscykler eller att ingredienser som tillförs produkten innehåller termoresistenta bakterier.

3.1.3 Hur förstör bakterierna konsumtionsmjölk och mjölkprodukter?

Just förmågan att överleva pastöriseringstemperaturer gör att termoresistenta bakterier kan ställa till problem för mejeriindustrin. Dock är de i praktiken ingen vanlig orsak till försämring av mjölkens sensoriska egenskaper eftersom dessa bakterier kräver temperaturer över 30 °C för att växa (Burgess *et al.*, 2010). Mjölken förvaras i kyla och därmed har de termoresistenta bakterierna inte möjlighet att tillväxa, med undantag för de som även är psykrotrofa. Vissa termoresistenta bakterier kan dock bilda syror som gör mjölken sur. Dessutom är de möjliga produktförstörare eftersom bakterierna kan bilda värmetåligena enzymer så som lipaser och

proteaser vilka kan leda till lukt- och smakfel i den slutliga produkten (Burgess *et al.*, 2010).

3.1.4 Hur kan kontamination av termoresistenta bakterier förhindras?

För att minska mängden termoresistenta bakterier i mjölk är det viktigt med rengöringsrutiner som fungerar. Genom att förkorta produktionscyklerna på mejeriet och därmed rengöra oftare med effektiva desinfektionsmedel kan termoresistenta bakterier och dess biofilm kontrolleras. Om de diskningsrutiner som Svensk mjölk föreslår följs elimineras största delen av de termoresistenta bakterierna. Dock kan svåråtkomliga svackor i mjölkkningsutrustningen härbärgera mjölkrester som kan vara svåra att bli av med. Det gäller att dosera diskmedel rätt samt att följa rekommenderade anvisningar (Svensson *et al.*, 2004). Även en sänkning av temperaturen i olika processer har visat sig minska mängden termoresistenta bakterier i mjölkprodukterna (Burgess *et al.*, 2010).

3.2 Psykrotrofa bakterier

Psykrotrofa, köldtoleranta bakterier kan tillväxa vid temperaturer under 5 °C oavsett temperaturoptimum (Eddy, 1960). Förmågan att tillväxa i kylskåpstemperatur gör att psykrotrofa bakterier lätt selekteras då mjölken kyls 1-2 dagar på gården innan transport till mejeriet sker. Psykrotroforna förekommer därför ofta i obehandlad mjölk och de bidrar också ofta till försämring av mjölkens kvalitet samt förkortande av hållbarhetstiden.

På mejeriet pastöriseras mjölken (ca 72 °C, 15 s) vilket gör att majoriteten av psykrotroforna avdödas (Shah, 1994). Även om psykrotroforna dör vid pastörisering överlever de värmeresistenta enzymerna som psykrotrofa bakterier kan bilda. Efter pastöriseringen kyls mjölken åter tills dess konsumtion sker. Under kyl-lagringen kan dessa enzymer fortsätta vara aktiva i mjölken och bidra till kvalitets-sänkning genom exempelvis utveckling av lukt- och smakfel.

3.2.1 Psykrotrofa bakterier – vilka är de?

Mjölken kan innehålla en rad olika psykrotrofa bakterier, både gramnegativa och grampositiva. Vissa är vanligare än andra och vilka bakterier som finns i mjölken beror bland annat på årstid (Teh *et al.*, 2011) och i vilken världsdel mjölken produceras i. I den obehandlade mjölken som kommer direkt från kon dominerar bakteriefloran av gramnegativer. Pastöriserad mjölk däremot kan innehålla både grampositiva och gramnegativa bakterier (Ternström *et al.*, 1993).

Gramnegativa bakterier är vanliga i obehandlad mjölk

Gramnegativa bakterier är vanligt förekommande och spelar en stor roll i förstörelsen av obehandlad mjölk (Ternström *et al.*, 1993). I en undersökning som gjorts på svensk och norsk mjölk kunde gramnegativa bakterier isoleras från samtliga prover tagna i silotankar på tre olika mejerier. Den dominerande gramnegativen var *Pseudomonas* som fanns i alla prover (Eneroth *et al.*, 1998). I en senare undersökning med molekylärbiologiska identifieringsmetoder visade Eneroth *et al.* (2000a) att så mycket som 77 % av de psykrotrofer som fanns i obehandlad mjölk (då den lagrats vid 7 °C tills 10^6 - 10^7 cfu/ml uppnåtts) var *Pseudomonas*. Huvudsakligen var det *Pseudomonas fluorescens* som kunde identifieras från proverna. I en studie av Ternström *et al.* (1993) var även *P. fragi*, *P. putida* samt *P. lundensis* vanligt förekommande.

Det finns även andra psykrotrofa bakterier i den obehandlade mjölken, om än inte i lika stor mängd. *Enterobacteriaceae* och *Aeromonas*-liknande bakterier kunde isoleras från 14 % respektive 9 % av de obehandlade mjölkproverna (Eneroth *et al.*, 2000a). *Aeromonas* optimala tillväxttemperatur är 28 °C men det finns stammar som kan tillväxa i temperaturer ner till 5 °C. Ternström *et al.* (1993) fann även *Acinetobacter* spp i 5-10 % av mjölkproverna.

Grampositiva bakterier är vanliga i pastöriserad mjölk

Eftersom de flesta gramnegativa bakterierna dör vid pastörisering utgör de grampositiva bakterierna en större del av bakteriefloran i pastöriserad mjölk. Ternström *et al.* (1993) har visat att 20-50 % av pastöriserad mjölk kan förstöras av grampositiva bakterier. I USA har det uppskattats att 25 % av all pastöriserad mjölk och grädde får försämrade hållbarhetstid på grund av psykrotrofa sporbildande bakterier (Sørhag & Stepaniak, 1997). Eftersom *Bacillus* spp sporer är värmeresistenta dominerar de och kan utgöra hela 83 % av grampositiverna i pastöriserad mjölk (Ternström *et al.*, 1993). Vissa arter har även förmågan att tillväxa vid låga temperaturer (Andersson *et al.*, 1995). Vanligt förekommande i mjölk är *Bacillus cereus*, *B. polymyxa* samt *B. licheniformis* (Ternström *et al.*, 1993; Crielly *et al.*, 1994).

3.2.2 Källor till psykrotrofa bakterier i mjölk

Det finns många olika källor till psykrotrofa bakterier i mjölk. Mjölken kan kontamineras med bakterier på gårdsnivå, via jord, foder, vatten eller via luften i stallen. Även tankbilen som transporterar mjölken till mejeriet är en möjlig ingångsväg och inte minst tillväxtplats för psykrotrofa bakterier. På mejeriet finns en risk för att mjölken återkontamineras med psykrotrofa bakterier efter pastörisering.

Kontamination av obehandlad mjölk

Jord innehåller naturligt stora mängder bakterier, särskilt sporbildande grampositiva bakterier. *Bacillus cereus* till exempel bildar sporer som ofta återfinns i jord (Christiansson *et al.*, 1999). Vid framställning av ensilage för foder till kor kan jord blandas in i ensilaget och därmed även sporer. Crielly *et al.* (1994) isolerade till exempel *Bacillus licheniformis* från ensilage och annat foder. Te Giffel *et al.* (2002) har visat att det ensilage kon får som foder kan innehålla inte bara sporer från *Bacillus* utan även från *Clostridium*. Sporerna kan överleva kons tarmmiljö och därför även finnas i träck. Vissa psykrotrofa stammar tillhör dessutom normalfloran i tarmarna varför de förekommer i träck (Doyle *et al.*, 2001). Om kons juver inte är rent utan smutsigt av jord eller träck kan det därför vara en möjlig smittväg för psykrotrofa bakterier. I svenska undersökningar har fodret (ex gräs, ensilage, hö och koncentrat) inte visat sig innehålla några stora mängder av *Bacillus cereus*. Inte heller i träck kunde *B. cereus* påvisas i några stora mängder (Christiansson *et al.*, 1999). Däremot visade Christiansson *et al.* (1999) att spenarnas renlighet och hygien i kostallet påverkade sporhalten i mjölken.

På sommaren går korna på bete vilket gör att de lättare kommer i kontakt med jord och därigenom psykrotrofa bakterier. Vädret under betessäsongen verkar spela en avgörande roll för sporhalten i mjölken. Vid fuktigt och regnigt väder äter korna mer jord och större mängder jord fastnar också på kons spenar. Därför ökade sporhalten under dessa dagar. Dagar med varmt och torrt väder var sporhalten i mjölken lägre (Christiansson *et al.*, 1999).

Luften i stallet kan också innehålla bakterier. Christiansson *et al.* (1999) kunde dock inte hitta några sporer i luften och menade att den mängd luft som fanns i mjölkkningsutrustningen troligtvis inte utgjorde någon kontaminationsrisk.

Bakterier som väl hamnat i mjölken transporteras genom mjölkkningsutrustningen och hamnar slutligen tillsammans med mjölken i mjölktanken på gården. Vissa psykrotrofa bakterier, exempelvis *Pseudomonas fluorescens*, har förmågan att fästa på rostfritt stål och där bilda biofilm. Detta slemmiga hölje som bildas på insidans ytor är svårt att diska bort och därför kan biofilmen vara en kontinuerlig källa till psykrotrofa bakterier i mjölk. Från biofilmen kan bakterierna utsöndra värmeresistenta enzymer till den mjölk som passerar på väg till mjölktanken (Teh *et al.*, 2011). Biofilm i utrustningen kan vara en följd av otillräcklig rengöring samt att bakterier fastnat i någon springa eller annat ställe som är svårt att rengöra. Enligt Teh *et al.* (2011) kan detta vara en tidigare underrapporterad källa till psykrotrofa enzymer i mjölken.

Vattnet som används vid rengöring av mjölkkningsutrustningen kan också vara kontaminerat med psykrotrofa bakterier som därigenom överförs till mjölken. Till exempel kan *Aeromonas* förekomma i vatten (Doyle *et al.*, 2001). Dock konstaterade Christiansson *et al.* (1999) att problem med sporer i vattnet i Sverige inte är en viktig kontaminationsväg för psykrotrofa bakterier mer än på någon enstaka gård. I Sverige har vi dessutom generellt god kvalitet på vattnet som används varför det inte är att betrakta som någon stor smittokälla.

Transport av mjölk från gård till mejeri kan också innebära risk för bakteriekontamination. Vattnet som används vid rengöring kan innehålla bakterier, men även otillräcklig rengöring av tankbilen kan orsaka bakteriekontamination.

Pastöriserad mjölk kan återkontamineras på mejeriet

Vid pastörisering avdödas, som tidigare nämnts, de gramnegativa psykrotrofa bakterierna som kan finnas i obehandlad mjölk. Däremot kan de värmeresistenta enzymerna som utsöndrats före pastöriseringen finnas kvar i mjölken och påverka dess lukt och smak. Bakteriella sporer kan även aktiveras av värmen som mjölken utsätts för under pastöriseringen. De utvecklas då till vegetativa celler och kan därefter tillväxa i mjölken. Den viktigaste källan till ny tillförsel av bakterier till mjölken är dock återkontamination.

En sporbildande bakterie som överlever pastöriseringstemperaturer och därför kan finnas i pastöriserad mjölk är *Bacillus* (Te Giffel *et al.*, 2002). Då sporer utvecklas till vegetativa celler har de liten konkurrens eftersom de flesta andra bakterier avdödas i den pastöriserade mjölken. Christiansson *et al.* (1999) menar dock att den största orsaken till närvaro av *Bacillus cereus* i mjölken är återkontamination efter pastörisering. Återkontamination kan ske om inte tillräcklig hygien iaktas eller om rengöringen av mejeriutrustningen är otillräcklig. I produktionen av konsumtionsmjölk är det förpackningsmaskinen som ofta är platsen för återkontamination. Eneroth *et al.* (2001) fann i en studie större mängder *B. cereus* i konsumentförpackningarna än i mjölken före förpackningsmaskinen. De *B. cereus* som fanns i mjölkförpackningarna tillhörde dessutom en annan typ än de *B. cereus* som fanns i den obehandlede mjölken, något som tyder på att de *B. cereus* som fanns i den förpackade mjölken snarare har kontaminerat mjölken i förpackningsmaskinen, än följt med från den obehandlede mjölken och överlevt pastöriseringen. Det har även visat sig att *Bacillus* har egenskaper som gör att de kan fastna på ytor i mejeriutrustningen och bilda biofilm. Där kan de föröka sig, producera enzymer samt åter bilda sporer (Andersson *et al.*, 1995). Detta kan exempelvis ske i förpackningsmaskinen (Eneroth *et al.* 2001). Dock är alla undersökningar inte en-

tydiga, Crielly *et al.* (1994) kunde till exempel inte finna att *B. cereus* kontaminerade mjölken efter pastöriseringen.

Även de gramnegativa bakterierna kan kontaminera mjölken i förpackningsmaskinen. Eneroth *et al.* (1998) har visat att 40 % av mjölkförpackningarna som gick ut till konsumenten innehöll arter från gramnegativa *Pseudomonas* spp, trots att dessa borde ha avdödats vid pastöriseringen. Vid provtagning precis före förpackningsmaskinen innehöll endast 4 % av proverna *Pseudomonas* spp. Samma resultat visades för gramnegativa bakterier generellt, men även *Aeromonas* och *Enterobacteriaceae* verkade kunna återkontaminera mjölken vid förpackningsmaskinen. I en senare publicerad artikel visade det sig att avloppsvattnet i botten av maskinen samt kondensvatten i munstycket där paketen fylldes på med mjölk, innehöll psykrotrofa bakterier varför de var troliga kontaminationsvägar (Eneroth *et al.*, 2000a).

Luften i mejerilokalen är en annan möjlig källa till bakterier. Eneroth *et al.* (2000a) visade att luften i de undersökta mejerierna innehöll stora mängder bakterier och eftersom luft sugts in i förpackningarna vid förpackningstillfället är det att betrakta som en möjlig kontaminationsväg. Genom användning av molekylärbio-logiska identifieringsmetoder fann Eneroth *et al.* (2000a) att de bakterier som fanns i luften kring förpackningsmaskinen var identiska med dem som sedan kunde isoleras från mjölkförpackningen.

3.2.3 Hur förstör psykrotrofa bakterier konsumtionsmjölk och andra mjölkprodukter?

Psykrotrofa bakterier kan påverka mjölkprodukters kvalitet både vad gäller mjölkens sammansättning, men också dess lukt och smak. I *Tabell 1* visas de effekter som de psykrotrofa bakteriernas enzymer kan ha på olika mjölkprodukter. Ofta uppstår dessa effekter inte förrän bakterietalet i obehandlad och lågpastöriserad mjölk uppnår 10^7 cfu/ml (Walstra *et al.*, 1999).

Tabell 1. Bakteriella enzymers (proteaser och lipaser) effekter på konsumtionsmjölk och ost.

Produkt	Proteaser	Lipaser
Konsumtionsmjölk	Koagulering ¹	Härsken smak ¹
	Bitter smak ²	Smörsmak ⁴
	Brunfärgning ³	
	Fruktig och ruttan smak ³	
Ost	Lägre utbyte ¹	Härsken smak ¹ Inhibering av starterkulturer ¹

¹ Champagne *et al.* (1994)

² Sørhag & Stepaniak (1997)

³ Shah (1994)

⁴ Deeth (2006)

Proteaser bryter ner kaseinet

Olika bakterier producerar olika typer av proteaser. Generellt verkar proteaserna genom att bryta ner proteinerna i mjölken till mindre peptider. De av mjölkens proteiner som är mest mottagliga för denna proteolys är β -kaseinerna och κ -kaseinerna. Det är dessa som normalt håller ihop kaseinernas micellstruktur. Proteaser, som exempelvis kan bildas av *Pseudomonas*, kan bryta ner κ -kaseinet. Micellerna blir då instabila, kaseinerna aggregerar och mjölken koagulerar (Shah, 1994).

De peptider som frigörs vid proteolys kan också ge upphov till en bitter smak på mjölken. Om proteolysen pågår under en längre period kan den också orsaka smakfel så som fruktig eller ruttan smak. Proteasaktiviteten kan även leda till fria aminosyror som vid upphettning av mjölken kan ge upphov till brunfärgning (Shah, 1994).

I mjölk som ska användas till ost kan närvaro av proteaser leda till att ostutbytet minskar (Shah, 1994). Detta beror på att proteaserna bryter ner delar av β -kaseinet vilket gör att de skiljs av tillsammans med vasslen istället för att hamna i ostfraktionen (Doyle *et al.*, 2001). Dock sker det, även utan bakteriell påverkan, naturligt en minskning av kaseinmängden under mjölklagring. β -kaseinet vandrar ut ur micellen under kylning och utsätts då för diverse nedbrytande enzymer. Närvaro av bakteriella proteaser minskar dock β -kaseinmängden ytterligare. Även de sporbildande bakterierna kan ställa till problem vid osttillverkning. *Clostridium tyrobutyricum* kan till exempel orsaka smörsyrajäsnings genom att omvandla mjölksyra till smörsyra, koldioxid och vätgas. Ostens smak påverkas negativt och vätgasen leder till att osten jäser upp och texturen försämras (Heyndrickx *et al.*, 2010). Ostarna blir därmed oätliga.

Proteasaktiviteten kan inte minskas av värmebehandling så som pastörisering. Den värme som skulle krävas för att minska aktiviteten skulle också försämra mjölkens kvalitet. (Chen *et al.*, 2003).

Lipaser frigör fettsyror

Bakteriella lipaser kan produceras av till exempel *Pseudomonas*, främst *Pseudomonas fluorescens* och *P. fragi*, men även av *Enterobacteriaceae*. Lipaserna kan skilja sig åt beroende på vilken bakterie som tillverkat dem, exempelvis kan de föredra olika längd på fettsyra kedjor eller olika positioner i fettsyramolekylen. I stort verkar lipaserna genom att katalysera hydrolysen av triglyceriderna, det vanligaste fett i mjölk. I denna reaktion, även kallad lipolys, bildas fria fettsyror samt mono-, diglycerider och glycerol (Chen *et al.*, 2003). Dessa fria fettsyror kan ge upphov till oönskade smakförändringar i mjölken. Särskilt korta och medellånga fettsyror bidrar till härskna eller smörsmaker (Deeth, 2006). Även ketoner och aldehyder kan bildas och bidra till lukt- och smakförändringar (Doyle *et al.*, 2001). Lipolys kan också resultera i att fett flyter och flockar sig, särskilt om mjölken tillsätts till varma drycker.

Lipaserna som finns i mjölken har inte bara bakteriellt ursprung. De lipaser som finns naturligt i mjölken inaktiveras vid pastörisering och i den opastöriserade mjölken skyddar mjölkfettets membran fett från att bli nedbrutet av dem. För att de mjölkegna lipaserna ska kunna verka krävs att membranet skadas, till exempel genom en kraftig omrörning. Bakterier, mestadels *B. cereus*, kan också producera fosfolipas C samt lecitinaser vilka bryter ner fettmembranet och gör fett tillgängligt för mjölkegna och bakteriella lipaser att verka (Heyndrickx *et al.*, 2010). Fosfolipaserna är ofta värmestabila och kan bildas, inte bara av *Bacillus* arter, utan även av *Pseudomonads*, särskilt *P. fluorescens* samt *Alcaligenes* och *Acinetobacter* (Deeth & FitzGerald, 1994). De kan produceras och även vara aktiva i kylskåpstemperatur. De bakteriella lipaserna är också värmestabila med ett D-värde, den tid det tar att minska populationen med 90 %, på 48-437 sekunder i 140°C (Doyle *et al.*, 2001).

De fettsyror som frigörs vid lipolys kan inhibera starterkulturer och därmed orsaka problem vid produktionen av olika fermenterade mjölkprodukter. Enzym från bakterierna kan också inhibera starterkulturens förmåga att producera diacetyl, en viktig del i smakutvecklingen av filmjölk och smör (Shah, 1994).

Eftersom flera av lipaserna överlever pastörisering, till och med UHT-behandling (140 °C, 3 s), kan de verka i produkter gjorda för långlagring, exempelvis UHT-mjölk, ost, smör och mjölkpulver (Deeth, 2006). En annan anledning

till att främst produkter med lång hållbarhet påverkas är att lipolys tar tid. I kortlagrade produkter hinner ofta proteaserna verka före och förstöra produkten.

3.2.4 Hur kan kontamination av psykrotrofer och dess enzymer förhindras?

A och O i förebyggande arbete mot psykrotrofer är att hålla en god hygien med tillfredställande rengöring i alla led av produktionen, från mjölkningsutrustningen på gården till tanken i transportfordonet och utrustningen på mejeriet (Shah, 1994; Sørhag & Stepaniak, 1997). Genom att även hålla mjölken kyld hela denna kedja samt minimera lagringstiden före processning på mejeriet kan mängden psykrotrofer i mjölken minska. Viktigt är också att använda effektiva metoder för att döda eller avlägsna bakterierna (Sørhag & Stepaniak, 1997; Doyle *et al.*, 2001).

På gården

Det går att påverka innehållet av psykrotrofa bakterier i mjölken redan på gårdsnivå. Genom att hålla god hygien och rengöra eller desinfektera spenarna samt juvret på korna före mjölkning kan förekomsten av psykrotrofa bakterier i mjölken minska (Cempírková, 2007). Möjlighet för korna att gå på bete har visat sig ge renare spenar och därigenom minskad bakteriekontamination av mjölken (Cempírková, 2007). Regniga dagar fastnar dock mer jord på juvret varför också mjölken lättare kontamineras med sporer. Dessutom är sporinnehållet i jorden större då marken är fuktig än om den är torr (Christiansson *et al.*, 1999). Ett sätt att minska sporhalten i mjölken skulle därför vara att låta korna gå inne i stallet regniga dagar och släppa ut dem på bete soliga dagar. Mjölken kan även, som tidigare nämnts, bli kontaminerad av bäddmaterialet i stallet samt det ensilage korna får som foder då de vistas inomhus. Det är således svårt att helt undvika att mjölk blir kontaminerat av sporer (Andersson *et al.*, 1995; Te Giffel *et al.*, 2002; Carlin, 2011). Genom att ha kontroll över ensileringsprocessen kan sportillväxt eventuellt förebyggas eller minimeras (Te Giffel *et al.*, 2002). Även god hygien i kostallet kan minska sporhalten i mjölken visade Christiansson *et al.* (1999). Låga mängder kommer troligtvis även i fortsättningen att överföras till mjölken varför det är viktigt att senare i processen ha verktyg för att minimera sporinnehållet i mjölken.

Laktoperoxidassystemet

För att behålla mjölk kvalitén vid lagring i gårdens mjölk tank kan det naturligt förekommande laktoperoxidassystemet aktiveras. Systemet förhindrar bakterietillväxt och är beroende av tre beståndsdelar: laktoperoxidas, tiocyanat (SCN^-) samt väteperoxid (H_2O_2). I obehandlad mjölk är tillgången på laktoperoxidas stor. Där-

emot krävs en ökning av mängden tiocyanat för att få ett effektivt system. Genom att tillsätta raps, kål eller klöver till kons foder kan halten tiocyanat ökas i mjölken (Champagne *et al.*, 1994). Även väteperoxid innebär en begränsande faktor i laktoperoxidssystemet varför tillsats av väteperoxid kemiskt eller genom att tillförel av *Lactobacillus* krävs (Shah, 1994). Systemet påverkar gramnegativa bakterier, exempelvis *koliformer* och *Pseudomonas*, genom att skada bakteriernas innermembran. Cellens beståndsdelar läcker därmed ut och celldöden är ett faktum. På så sätt minskas bakterimängden och mjölkens kvalité består. Överflödiga mängder av tiocyanat och väteperoxid avlägsnas vid pastörisering (Champagne *et al.*, 1994).

Förändring av gassammansättning

Ett annat sätt att förlänga hållbarheten på den obehandlade mjölken i gårdens mjölk tank är att förändra sammansättningen av gasatmosfären i tanken. Det har gjorts ett antal studier på olika gassammansättnings effekter på bakteriehalt i mjölken (Dechemi *et al.*, 2005; Werner & Hotchkiss, 2006). Tillsats av CO₂ är ett kostnadseffektivt alternativ som främst minskar halten av gramnegativa psykrotrofer, ex *Pseudomonas*, i mjölken. Effekten på sporer och mjölksyrabakterier är däremot låg (Werner & Hotchkiss, 2006). Ju lägre lagringstemperatur desto effektivare sänker koldioxiden bakteriemängden i mjölken (Shah, 1994). Koldioxiden verkar inhiberande på bakterietillväxten bland annat genom att minska syretillgången och sänka pH-värdet. Om koldioxid tillsätts till en slutna behållare bildas HCO₃⁻, en molekyl med antimikrobiella egenskaper (Champagne *et al.*, 1994). Tillsats av koldioxid i transportfordonets mjölk tank skulle öka möjligheten att transportera mjölken längre sträckor utan försämring av kvalitén. Det finns metoder för att sedan avlägsna koldioxiden från mjölken, till exempel genom värme- och vakuumenteknologi (Champagne *et al.*, 1994). Tillsats av koldioxid kan dock ge mjölken en sur smak varför koldioxidförvarad mjölk snarare bör användas till vidareförädling än som konsumtionsmjölk (Shah, 1994).

Även kvävgas kan användas för att inhibera bakterietillväxt i mjölk. Dechemi *et al.* (2005) undersökte vilken effekt gasblandningar med olika proportioner av koldioxid och kvävgas hade på tillväxt av psykrotrofa bakterier och enzymer därav. Den sammansättning som visade sig minska bakterietillväxten mest innehöll 50 % CO₂ och 50 % N₂. Inte bara de psykrotrofa bakteriernas tillväxt minskade utan även aktiviteten av dess proteaser och lipaser minskade. Inhiberingen visade sig vara effektivast vid låga temperaturer, varför förvaring vid 3-4 °C var att föredra framför 7 °C (Dechemi *et al.*, 2005).

Låg temperatur

En välanvänd metod för att förbättra mjölkens hållbarhet och minska bakterietillväxten är att sänka lagringstemperaturen. I en översiktsartikel av Champagne *et al.* (1994) pekas på studier där minskning av bakteriehalten i mjölken och därigenom en förlängd hållbarhet erhöles då lagringstemperaturen sänktes från 6 °C till 2 °C. Till exempel visade Elwell & Barbano (2006) att tillväxthastigheten av flera bakterier minskade vid sänkt temperatur. Champagne *et al.* (1994) konstaterade att hållbarhetstiden även var beroende av den initiala koncentrationen av psykotrofer. Ju högre bakteriehalt mjölken hade initialt, desto sämre effekt hade kylförvaring på tillväxthämning av bakterier. I Sverige gäller att mjölken inom tre timmar efter avslutad mjölkning ska vara nedkyld till 4 °C (Andersson *et al.*, 1998). Därefter förvaras mjölken vid 4 °C, med undantag för under transporten där temperaturen kan vara så hög som 8 °C, något som kan påverka mjölkens hållbarhet (Andersson *et al.*, 1995). Det är lagstadgat inom EU att kylkedjan måste hållas och att vid ankomst till mejeriet får mjölken inte lov att hålla en temperatur som överstiger 10 °C (EG 853/2004).

Baktofugering

Ett sätt att avlägsna sporer, exempelvis *Clostridium tyrobutyricum*, från mjölk är att använda sig av en baktofug. Det är en slags centrifug som utnyttjar att sporerna har högre densitet än mjölken. Centrifugalkraften slungar ut sporerna så att de avlägsnas från mjölken. Vegetativa celler däremot har en lägre densitet varför de är svårare att avlägsna genom baktofugering. Ofta är det inte bara sporer som avlägsnas från mjölk. Små mängder av mjölkens kaseiner kan också hamna i spormassan varför mjölk som genomgått baktofugering har ett lägre proteininnehåll. Detta kan förhindras genom att den avlägsnade spormassan genomgår en kraftig sporavdöande värmebehandling och sedan återförs till mjölken. Det finns olika typer av baktofuger och det pågår hela tiden en utveckling för att förbättra tekniken (Gésan-Guiziu, 2010). Baktofugering kan till exempel användas inom osttillverkning eftersom ett lågt sporinnehåll i mjölken då är önskvärt.

Mikrofiltrering

Mikrofiltrering innebär att mjölken under tryck får passera ett semipermeabelt membran med porer i olika storlekar. Bakterierna avskiljs eftersom de är för stora för att kunna passera membranet (Gésan-Guiziu, 2010). Madaeni *et al.* (2009) visade på en 99,5 % -tig reduktion av spor- och bakteriehalten i obehandlad mjölk då mikrofiltrering användes. Fettkulorna i mjölken är i samma storleksordning

som bakterierna, varför det är viktigt att först skilja av grädden och sedan låta skummjölken passera mikrofiltret (Gésan-Guiziou, 2010). Eftersom endast bakterierna fastnar i membranet förändras inte mjölkens sammansättning varför smaken på mjölken påverkas minimalt. Detta gör tekniken till en fördel jämfört med UHT-behandling som på grund av den höga temperaturen kan ge mjölken en kokt smak. Filtreringstekniken är idag väl etablerad inom mejeriindustrin (Gésan-Guiziou, 2010) och används kommersiellt i exempelvis Kanada och Storbritannien (Elwell & Barbano, 2006).

Hög temperatur

Pastörisering avdödar som tidigare nämnts gramnegativa psykrotrofa bakterier. Dock överlever dess enzymer. Ett sätt att reducera detta problem är att använda sig av termisering. Termisering innebär att mjölken värms före lagring, exempelvis på gården, för att avdöda bakterier och däribland psykrotrofer. Behandlingen som är mildare än pastörisering innebär att mjölken värms till 60-65 °C i 10 s och sedan kyla (Champagne *et al.*, 1994). På så sätt dör de psykrotrofa bakterierna innan de hunnit bilda några stora mängder enzymer, vilka senare kan förstöra mjölken (Shah, 1994). På grampositiva sporer verkar dock inte termisering avdödande utan snarare aktiverande. Sporer av exempelvis *Bacillus* kan aktiveras av värmebehandlingen och utvecklas till vegetativa celler. Fördelen med aktiverade sporer är att dessa sedan kan avdödas vid pastöriseringen (Champagne *et al.*, 1994).

God rengöring viktigt

Som tidigare nämnts är god hygien och rengöring viktigt för att säkerställa god kvalitet på mjölken. Problematiken med återkontamination i förpackningsmaskinen kan minskas genom att undvika att rengöra med vatten under själva produktionen. Det är bättre att göra detta i slutet av dagen eller i slutet av produktionscykeln. Eneroth *et al.* (2000b) såg nämligen att de bakterier som fanns i mjölken efter förpackningsmaskinen kunde komma från avloppsvattnet och kondensvattnet. Under produktionen hamnar mjölkrester där som en följd av produktbyte eller strul. Rengöring kan om det vill sig illa förflytta bakterier från en oren plats till en ren.

4 Diskussion

Syftet med litteraturoversikten var att sammanställa litteratur om produktförstörande bakterier som finns i mjölk, vilka problem de orsakar samt hur deras förekomst kan förebyggas. För att minska mängden produktförstörande bakterier i mjölken är det viktigt att hygien i alla led av produktionen är god. Genom att undvika att lagra mjölken lång tid innan pastörisering hinner inte så stor mängd enzymer att bildas. Om dessutom återkontaminationen på mejeriet minskar, exempelvis genom en mer aseptisk packning av mjölken, kommer det att vara de sporbildande termoresistenta bakterierna som är avgörande för försämring av mjölk-kvalitén. Eftersom det är svårt att helt undvika sporkontamination är det viktigt med metoder som på mejeriet kan minska sporhalten i mjölken. Ett sätt att göra detta är att kombinera olika strategier så som mikrofiltrering, baktofugering och lågpastörisering. Då kan mjölk med lång hållbarhet och god smak tillverkas. I Sverige är vi vana vid lågpastöriserad mjölk och därför är det en fördel med tekniker som bevarar smakerna jämfört med högtemperaturbehandlad mjölk (UHT-mjölk) som lätt får en kokt smak. Det pågår också forskning om andra metoder för att förlänga hållbarheten på mjölken. Exempelvis kan det vara möjligt att använda mikro vågor, *pulse electric field* och ultravågor för att minska bakterietalet i mjölken (Rodríguez-González *et al.*, 2011).

Ett annat sätt att minska bakterieinnehållet i mjölken är att stimulera mjölkproducenterna att sätta in åtgärder på gårdsnivå. Vissa mejerier i Sverige har exempelvis gjort sporinnehåll i mjölken betalningsgrundande. På så sätt motiveras mjölkproducenten till att producera mjölk med låg sporhalt. Detta skulle kunna användas även för psykrotrofa bakterier.

Tack

Tack till Anders Andrén, Institutionen för livsmedelsvetenskap, SLU, för god handledning.

Referenser

- Adams M. R. & Moss M. O. (2000) *Food Microbiology - Second edition*, Cambridge: The royal Society of Chemistry.
- Andersson A., Rönner U. & Granum P. E. (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?, *International Journal of Food Microbiology* 28:145-155
- Andersson I., Ardö Y., Christiansson A., Johansson G., Lindmark Månsson H., Nyberg L., Pettersson H. E. & Svensson U. (1998) *Mjölkråvaran* Svensk mjölk: Rapport 4953
- Burgess S. A., Lindsay D. & Flint S. H. (2010) Review: Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing, *International Journal of Food Microbiology* 144:215-225
- Carlin F. (2011) Origin of bacterial spores contaminating foods, *Food Microbiology* 28:177-182
- Cempírková R. (2007) Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors, *Czech Journal of Animal Science* 52:387-393
- Champagne C. P., Laing R. R., Roy D. & Mafu A. A. (1994) Psychrotrophs in dairy products: their effect and their control, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34:1-30
- Chen L., Daniel R. M. & Coolbear T. (2003) Review: Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders, *International Dairy Journal* 13:255-275
- Christiansson A., Bertilsson J. & Svensson B. (1999) *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period, *Journal of Dairy Science* 82:305-314
- Christiansson A., Svensson B., Ekelund K., Gyllensvärd M. & Andersson I. (2004) *Förekomst av pastöriseringsöverlevande bakterier i leverantörsmjök – en fältstudie*, Svensk mjölk: Rapport 7031-1
- Crielly E. M., Logan N. A. & Anderton A. (1994) Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products, *Journal of Applied Bacteriology* 77:256-263

- Deeth C. H. (2006) Lipoprotein lipase and lipolysis in milk, *International Dairy Journal* 16:555-562
- Deeth H.C. & FitzGerald C. H. (1994) Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products, Fox P. F (Red.), I: *Advanced Dairy Chemistry, Vol 2: Lipids* USA: Springer - Verlag.
- Dechemi S., Benjelloun H. & Lebeault J.-M. (2005) Effect of modified atmospheres on the growth and extracellular enzyme activities of psychrotrophs in raw milk, *Engineering in Life Sciences* 5:350-356
- Doyle M. P., Beuchat L. R. & Montville T. J. (2001) *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*, USA: American society for microbiology
- Eddy B.P. (1960) The use and meaning of the term ‘psychrophilic’, *Journal of Applied Bacteriology* 23: 189-190
- Elwell M. W. & Barbano D. M. (2006) Use of microfiltration to improve fluid milk quality, *Journal of Dairy Science* 89:E10-E30
- Eneroth Å., Christiansson A., Brendehaug J. & Molin G. (1998) Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora, *International Dairy Journal* 8:829-834
- Eneroth Å., Ahrné S. & Molin G. (2000a) Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), *International Dairy Journal* 10:325-331
- Eneroth Å., Ahrné S. & Molin G. (2000b) Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers, *International Journal of Food Microbiology* 57:99-106
- Eneroth Å., Svensson B., Molin G. & Christiansson A. (2001) Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine, *Journal of Dairy Science* 68:189-196
- Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 853/2004 av den 29 april 2004 om fastställande av särskilda hygienregler för livsmedel av animaliskt ursprung.
- Gésan-Guizieu G. (2010) Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. Griffiths M. W. (Red.), I: *Improving the safety and quality of milk, Vol 1: Milk production and processing*, Storbritannien: Woodhead publishing
- Heyndrickx M., Marchand S., De Jonghe V., Smet K., Coudijzer K. & De Block J. (2010) Understanding and preventing consumer milk microbial spoilage and chemical deterioration, Griffiths M. W. (Red.), I: *Improving the safety and quality of milk, Vol 2: Improving quality in milk products*, Storbritannien: Woodhead publishing
- Madaeni S. S., Yasemi M. & Delpisheh A. (2009) Milk sterilization using membranes, *Journal of Food Process Engineering* 34:1071-1085

- Rodríguez-González O., Walkling-Ribeiro M., Jayaram S. & Griffiths M. W. (2011) Factors affecting the inactivation of the natural microbiota of milk processed by pulsed electric fields and cross-flow microfiltration, *Journal of Dairy Research* 78:270-278
- Shah N.P (1994) Psychrotrophs in milk: a review, *Milchwissenschaft* 49:432-437
- Svensson B., Ekelund K. & Christiansson A. (2004) *Pastöriseringsöverlevande bakterier i leverantörsmjölk*, Svensk mjölk: Rapport 7035-1
- Sørhag T. & Stepaniak L. (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects, *Trends in Food Science & Technology* 8:35-41
- Te Giffel M. C., Wagendorp A., Herrewegh A. & Driehuis F. (2002) Bacterial spores in silage and raw milk, *Antonie van Leeuwenhoek* 81:625-630
- Teh K. H., Flint S., Palmer J., Lindsay D., Andrewes P. & Bremer P. (2011) Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers, *International Dairy Journal* 21:742-747
- Ternström A., Lindberg A.-M. & Molin G. (1993) Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*, *Journal of Applied Bacteriology* 75:25-34
- Walstra P., Geurts T. J., Noomen A., Jellema A. & Van Boekel M. A. J. S. (1999) *Dairy Technology – Principles of Milk Properties and Processes*, New York: Marcel Dekker
- Werner B.G. & Hotchkiss J. H. (2006) Continuous flow nonthermal CO₂ processing: the lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ on total microbial populations and bacterial spores in raw milk, *Journal of Dairy Science* 89:872-88