

# Afslutningsrapport

Interaktioner mellem den termofile og mesofile starterkultur  
og *Penicillium roqueforti*

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1999-25

*Juli 1999*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til MFF

for projektet

**Interaktioner mellem den termofile og mesofile  
starterkultur og *Penicillium roqueforti***

Af

Tine Kronborg Hansen

Mogens Jakobsen

Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet,  
Levnedsmiddelmikrobiologi,  
Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole,  
Frederiksberg

## ”Interaktioner mellem den termofile og mesofile starterkultur og *Penicillium roqueforti*”

### Projektleder

Professor Mogens Jakobsen  
KVL, Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet  
Rolighedsvej 30  
1958 Frederiksberg C

### Medarbejdere

Mejeriingeniør, Ph.D.-studerende Tine Kronborg Hansen  
Laborant Marianne Schou  
Laborant Heidi Rasmussen  
Levnedsmiddeltekniker Per Kristensen

### Resumé

Projektet er bygget om omkring mikrobielle interaktioner i Danablu. I projektet er det valgt primært at koncentrere sig om positive interaktioner og om disse interaktioners effekt på *Penicillium roqueforti*.

Der blev indsamlet mere end 80 stammer af *P. roqueforti* som alle er rendyrket og deres sekundære metabolitprofil er bestemt ved hjælp af HPLC og TLC.

For fire udvalgte stammer af *P. roqueforti* blev NaCl og vandaktivitetens indvirkning på spiring, mycelievækst og sporulering af *P. roqueforti* undersøgt. Undersøgelserne viste at spiringen forløb hurtigst når vandaktiviteten i mediet var 0.99, og at mikromiljøet som konidierne dannes i har indflydelse på de dannede konidiers spiringsforløb, idet konidier dannet ved lavere vandaktivitet (0.96-0.92) spirer hurtigst. For de undersøgte stammer af *P. roqueforti* var gældende, at væksthastigheden ved  $a_w$  0.92 i mediet blev reduceret med mere end 75% i forhold til væksthastigheden ved  $a_w$  0.98. Endvidere blev det observeret at der opstår et optimum for dannelsen af konidier ved  $a_w$  0.96.

Der er screenet 20 stammer af *P. roqueforti* mod 15 stammer fra den primære starterkultur på laboratoriemælk og osteagar. De fundne interaktioner var tydeligvis substrat afhængige. Der blev observeret 183 positive interaktioner på osteagar mod 22 på laboratoriesubstrat. De fundne interaktioner var stamme specifikke for såvel *P. roqueforti* som for stammer fra den primære starterkultur.

Undersøgelser af miljøfaktorernes indflydelse på interaktionerne viste at effekten af interaktionerne var tiltagende ved stigende koncentrationer af NaCl.

Der blev observeret en synergistisk effekt ved nedbrydningen af kasein mellem flere stammer fra den primære starterkultur og *P. roqueforti*. Denne effekt kom mest til udtryk for ved de kombinationer af mælkesyrebakterierne og *P. roqueforti*, hvor *P. roqueforti* havde lav proteolytisk aktivitet.

Der blev udført aminosyreanalyser på osteagar, hvor *P. roqueforti* og stammer fra den primære starterkultur var podet enkeltvis og i kombination. Analyserne indikerer at specielt arginin og leucin spiller en rolle i interaktionerne mellem den primære starterkultur og *P. roqueforti*.

Der er observeret positive interaktioner mellem en stamme af *Sacch. cerevisiae* og 10 stammer af *P. roqueforti*. Endvidere blev der fundet negative interaktioner mellem hele celler af *Yarrowia lipolytica* og hele samt knuste celler af *Kluyveromyces lactis*.

Kun *Y. lipolytica* og *Sacch. cerevisiae* kunne nedbryde kasein. *Y. lipolytica* har høj proteolytisk aktivitet og er i stand til at nedbryde alle kaseinkomponenter mens *Sacch. cerevisiae* primært nedbryder  $\beta$ -kaseinet og en smule af  $\alpha_{s1}$ -kasein. Den synergistiske effekt mellem de to gær stammer og *P. roqueforti* ved nedbrydningen af kasein sås tydeligst for stammer af *P. roqueforti* med lav proteolytisk aktivitet.

På baggrund af de fundne resultater vil der blive udarbejdet et katalog indeholdende en beskrivelse af de indsamlede *P. roqueforti* stammer samt oplysninger om interaktioner med stammer fra den primære starterkultur og gær, *P. roqueforti*'s teknologiske egenskaber herunder proteolytisk samt lipolytisk aktivitet, aromadannelse, effekt af miljøfaktorer på disse, produktion af sekundære metabolitter, vækst ved forskellige pH,  $a_w$ , salt og temperaturer.

## **Abstract**

The project is based on microbial interactions in Danablu. The aim of the project is to study positive interactions between strains from the lactic starter culture and *Penicillium roqueforti*, and how these interactions influence on the development of *P. roqueforti*. More than 80 strains of *P. roqueforti* has been collected and purified. The secondary metabolites of the strains were determined by HPLC and TLC.

Four strains of *P. roqueforti* were chosen and the effect of NaCl and water activity on germination, mycelia growth and sporulation of *P. roqueforti* was examined in laboratory media. The investigations showed that the germination rate was fastest when the water activity was 0.99. The microenvironment where the conidia were produced affected the germination, as the most rapid germination was observed for conidia produced at the lowest water activity (0.96-0.92). The growth rate of the four strains of *P. roqueforti* examined was reduced by more than 75% when the water activity in the media was 0.92 compared to  $a_w$  0.98. An optimum for sporulation was seen when the water activity was 0.96.

Twenty strains of *P. roqueforti* and 15 strains from the lactic acid starter culture were screened in a laboratory medium and in cheese agar. The interactions were highly affected by the media used. Positive interactions were found 183 times in cheese agar and 22 times in laboratory medium. The observed interactions were strain specific for *P. roqueforti* as well as the lactic acid starter culture. The interactions increased with increasing NaCl concentrations in the media.

A synergistic effect was found between strains from the primary starter culture and *P. roqueforti* in the degradation of casein. The proteolytic interaction was most pronounced for the combinations of lactic acid bacteria and *P. roqueforti*, where the strain of *P. roqueforti* had of low proteolytic activity.

Studies on the amino acid composition of the cheese agar inoculated with lactic acid starter cultures, *P. roqueforti* and the two together were carried out. The amino analysis indicated that the lactic acid bacteria stimulated *P. roqueforti* by releasing arginine and leucine.

Positive interactions were found between one strain of *Sacch. cerevisiae* and ten strains and *P. roqueforti*. Negative interactions were observed between *P. roqueforti* and whole cells of *Yarrowia lipolytica* and *P. roqueforti* whole and disrupt cells of *Kluyveromyces lactis*.

Of the yeasts examined only *Y. lipolytica* and *Sacch. cerevisiae* were able to break down

casein. *Y. lipolytica* has a high proteolytic activity and is capable of degrading all the casein components. *Sacch. Cerevisiae* primary break down  $\beta$ -casein but are also able to degrade some of the  $\alpha_{s1}$ -casein. The synergistic effect was most pronounced for strains of *P. roqueforti* with low proteolytic activity.

On the basis of the results achieved a catalogue of *P. roqueforti* strains will be made describing morphological characteristics, important interactions with the lactic acid starter culture and yeast, technological characteristics including proteolytic and lipolytic activity, aroma formation, the influence of the micro environment on these, the production of secondary metabolites, growth at different pH,  $a_w$ , NaCl concentrations and temperatures.

## **1. Formål**

Det har været projektets formål at undersøge de positive interaktioner mellem en række stammer fra den mesofile og termofile starterkultur og et større antal stammer af *P. roqueforti*, under forhold, der imiterer miljøet i Danablu, samt at undersøge effekten af disse interaktioner på *P. roqueforti*'s enzymatiske aktivitet under relevante miljøfaktorer

Desuden har det været formålet, at undersøge interaktioner mellem de mest almindeligt forekomne gær i blåskimmelost og *P. roqueforti*.

I projektet er det valgt primært at koncentrere sig om positive interaktioner og om disse interaktioners effekt på *P. roqueforti*.

## **2. Baggrund**

Danablu, har en lang tradition bag sig i dansk mejeribrug, Danablu har igennem mange år fastholdt sin position som et levnedsmiddel med stor eksportandel og indtjening. Forskningen omkring den sekundære starterkultur, *P. roqueforti*, har ikke stået mål med produktets betydning. Procesforløbet i Danablu er styret af et komplekst samspil af mange faktorer, men kendskabet til disse faktorer og deres virkningsmekanismer er mangelfuldt. Derfor hviler produktionen ofte på et erfaringsgrundlag fremfor eksakt viden, hvilket kan øge risikoen for ukontrollerede modningsforløb, varierende kvalitet og kvalitetsfejl. På grund af manglende karakterisering af stammerne er det også begrænset, hvor mange forskellige stammer der anvendes kommercielt.

Det er den almindelige antagelse at interaktioner mellem den primære starterkultur og *P. roqueforti* har betydning i praksis. Såvel negative som positive interaktioner mellem bakterier og svampe er kendt fra spontan fermenterede produkter. De negative interaktioner skyldes konkurrence om næringsstoffer, dannelse af forbindelser med antimikrobiel effekt, ændring af pH, iltkoncentration og redokspotentiale mens de positive interaktioner formodes at stamme fra de miljøændringer som mælkesyrebakterierne gennem deres biokemiske aktivitet forudsager således at udviklingen af *P. roqueforti* stimuleres.

Under projektets forløb er det blevet kendt, at gær forekommer i høje koncentrationer i blåskimmeloste inklusive Danablu, på trods af at gær ikke tilsættes ostemælken som sekundær starterkultur i Danmark. Fra overflademodnede oste er det kendt, at spontan fremvækst af gær med enzymatisk aktivitet kan fremme modningsforløbet. Den samme effekt

af gæren forventes det at kunne udnytte i Danablu. De mest almindelige gær arter som kunne have betydning for modningen af blåskimmelost, er derfor inddraget i projektet for at undersøge, hvordan disse gær påvirker vækst og sporulering af *P. roqueforti* samt *P. roqueforti*'s enzymatiske aktivitet.

Mikrobielle interaktioner i Danablu er et område som ikke har været genstand for systematisk udforskning. Mere viden på området kan bidrage til yderligere optimering af modningsforløb og ostekvalitet samt eliminering af kvalitetsfejl.

### **3. Resultater**

#### **3.1 Indledende undersøgelser af *Penicillium roqueforti*'s teknologiske egenskaber**

Under projektet blev der indsamlet mere end 80 stammer af *P. roqueforti*. Stammerne blev modtaget fra kommercielle kultursamlinger og mejerier. Endvidere indgik egne isolater fra fransk og dansk blåskimmelost. Alle isolaterne blev rendyrkede. I samarbejde med Projektet "Lipolytisk og proteolytisk aktivitet af *Penicillium roqueforti* samt forudsigelse af modningsforløbet i Danablu" er den sekundære metabolit profil bestemt for 70 stammer ved hjælp af HPLC og/eller TLC. Disse analyser er foretaget på DTU af henholdsvis lektor Jens Friisvad og forskningslektor Flemming Lund.

Tredive stammer blev udvalgt og mikro- samt makromorfologisk beskrevet. Disse stammer blev screenet for deres tolerance overfor stigende salt koncentrationer og deres enzymatiske aktivitet blev bestemt. Under indsamlingen blev metoden til produktion, høst og tørring samt opbevaringen af konidier fra *P. roqueforti* optimeret. I begyndelsen af projektet blev der udviklet og optimeret metoder til analyse af *P. roqueforti* stammernes aromaprofiler i samarbejde med projektet "Lipolytisk og proteolytisk aktivitet af *Penicillium roqueforti* samt forudsigelse af modningsforløbet i Danablu". For udvalgte stammer blev aromaprofilen bestemt.



### 3.2 Miljøforhold i Danablu

For at øge kendskabet til miljøfaktorerne i Danablu blev to typer af Danablu 50+ og 60+ fulgt gennem modningen fra før ostene kom i saltlage til de var fem uger gamle. Der blev taget prøver ud seks steder i hver ost. Vandindholdet (kun fire bestemmelser), pH, vandaktiviteten samt koncentrationen af salt blev målt, således der foreligger resultater fra både en horisontal og vertikal gradient.

Resultaterne fra osteanalyserne viser, at der i de første uger er meget stor forskel på pH, NaCl% og  $a_w$  i ostenes yderkant og centrum, men der blev observeret en langsomt udligning. Denne udligning nåede dog ikke, at blive total i løbet af de fem uger analyserne varede. Resultaterne fra pH,  $a_w$  og NaCl-målingerne er vist i Figur I.

### 3.3 Spiring, vækst og sporulering *Penicillium roqueforti*.

Vækstforløbet for *P. roqueforti* kan deles op i tre faser: En spiringsfase, en vækstfase og en sporuleringsfase. Alle tre faser har betydning for den færdige osts kvalitet.

#### **Spiringsfasen.**

Spiringsfasen forløber i tre stadier. Først en opsvulmning af konidien, dernæst udvikling af en ”germ tube” og sidst udvikles germ tuben til en hyfe (del af mycelium).

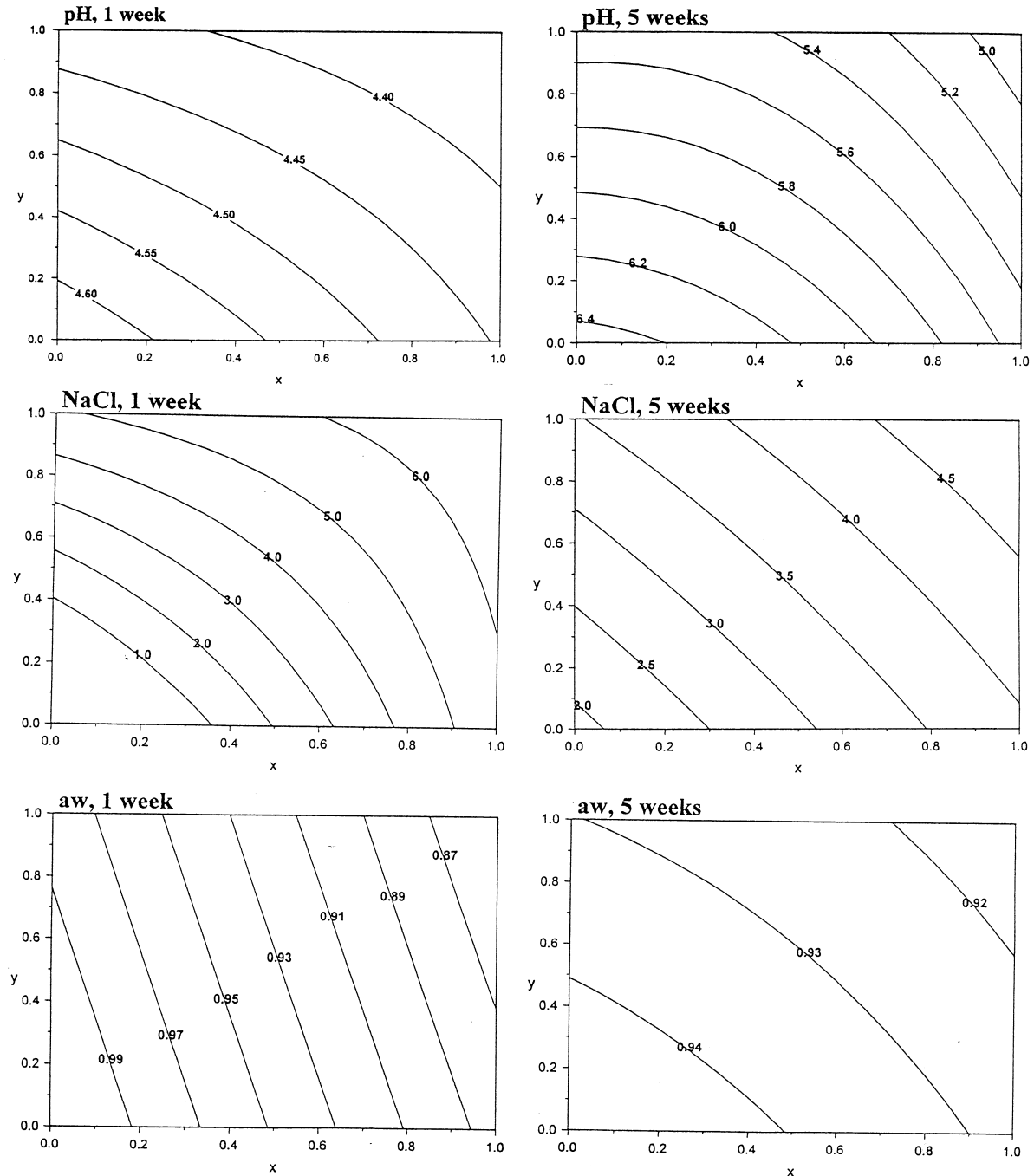
Spiringen af konidier har betydning for *P. roqueforti*'s fortsatte udvikling i osten. De spirende konidier menes at have lavere enzymatisk aktivitet end væstmyceliet og de hvilende konidier.

#### **Vækstfasen.**

Vækstfasen og myceliedannelsen bidrager til kulturens udbredelse i osten og betragtet som biomasse udgør myceliet den største del af *P. roqueforti* i osten. Vækstmyceliet har både proteolytisk og lipolytisk aktivitet. Proteolysen har betydning for ostens konsistens, vandbindingsevne og aromadannelse. Lipolysen har især betydning for aromadannelsen i osten.

### Sporuleringsfasen.

Dannelsen af konidier giver ostemassen den karakteristiske blågrønne farve og det mosaikagtige mønster. Dannelsen af konidier er yderligere vigtig, da der derved sker en spredning af nye konidier i ostemassen, hvilket har betydning for udviklingen af *P. roqueforti* i ostemassen. Konidierne menes at have både proteolytisk og lipolytisk aktivitet.



**Figur I.** PLS contour plots af pH, NaCl og  $a_w$  i Danablu 50+ efter 1 og 5 ugers modning

### **Forskellige miljøfaktorerers indflydelse på spiring, vækst og sporulering af *Penicillium roqueforti*.**

Til belysning af mikromiljøets betydning for udviklingen af *P. roqueforti* med hensyn til spiring, mycelie vækst og sporulering blev påvirkningen af  $a_w$  og NaCl på fire stammer af *P. roqueforti* undersøgt i et laboratiemedium. De valgte NaCl-koncentrationer og den dermed følgende  $a_w$  svarer til de niveauer, som tidligere er fundet ved ovennævnte analyse af Danablu i fem uger. Undersøgelserne viste at NaCl og  $a_w$  har stor indflydelse på spiringen af konidier, mycelievæksten samt dannelsen af konidier.

Spiringsforsøgene viste, at spiringshastigheden var højst på kontrolpladerne ( $a_w$  0.99), og at nølefasen og spiringen blev forlænget ved stigende koncentrationer af NaCl og den dermed faldende  $a_w$ . Det blev observeret en forskel på de anvendte stammers spiringshastighed. Endvidere viste forsøget at de miljøfaktorene, som er tilstede i det medie som konidierne dannes på, har indflydelse på spiringen af disse konidier. Det sås blandt andet ved at de konidier som blev dannet på et medie med en  $a_w$  på 0.92 spirede op til otte timer før de konider som blev dannet ved en  $a_w$  på 0.98. Det skal nævnes at der blev observeret anormal spiring (konidierne dannede mere en een germ tube) af *P. roqueforti*, når konidierne blev dannet i et miljø med en vandaktivitet lavere end 0.94.

Resultaterne fra vækstofforsøgene viste, at væksthastigheden var kraftigt hæmmet af stigende koncentrationer af NaCl. Ved  $a_w$  svarende til 0.92 i mediet var væksthastigheden reduceret med mere end 75% i forhold til væksthastigheden ved  $a_w$  0.98.

Mycelievæksten undertrykkes når vandaktiviteten er tæt på 0.96. Istedet for at danne vækstmycelium danner *P. roqueforti* konidier (sporer) ved denne og lavere  $a_w$ -værdier. Dette var tydeligst at observere i de medier hvor  $a_w$  var justeret med sukre, idet der forekom et tydeligt optimum for sporuleringen ved  $a_w$  0.96 sammenlignet med  $a_w$  0.98 og 0.94. I det medium hvor  $a_w$  var justeret med NaCl var  $a_w$  0.96 ikke sporulerings optimum for alle stammer idet de forskellige stammers salttolerance har betydning, således at der kun dannes flere konidier ved  $a_w$  0.96 set i forhold til 0.98 for de stammer af *P. roqueforti* som har en høj salttolerance.

Selv om nogle stammer af *P. roqueforti* er istand til at vokse ved lavere  $a_w$  og højere

koncentrationer af NaCl end andre, blev alle de undersøgte stammer stimuleret af 2 % NaCl og kraftigt hæmmet af 10 % NaCl (w/v),

Ingen af de gennemførte undersøgelser tyder på at pH værdier mellem 4 og 7 påvirker vækst og sporulering i væsentlig grad.

De overordnede resultater for NaCl koncentrationen og den dermed følgende  $a_w$  betydning for spiring, vækst og sporulering er vist i nedenstående Tabel 1.

**Tabel 1.** NaCl effekt på spiring, vækst og sporulering af *P. roqueforti*.

$a_w$ NaCl % (w/w)	Spiring	Vækst	Sporulering
0.99 0	+++	+++	++
0.98 4	++	+++	+++
0.96 7	+(+)	++	++(+)
0.94 10	+	+	+
0.92 13	(+)	(+)	(+)

Signaturforklaring til tabel:

- +++ god
- ++ mindre god
- + dårlig

#### 4. Mikrobielle interaktioner i Danablu.

Udover de fysiske/kemiske forhold i Danablu bliver *P. roqueforti* også påvirket af det mikrobielle miljø, som findes i osten. Undersøgelser har vist, at der kan ske både et positivt og et negativt samspil mellem den primære starterkultur, der udelukkende består af mælkesyrebakterier og *P. roqueforti* og mellem den naturlige gærflora som findes i osten og *P. roqueforti*.

#### 4.1 Interaktioner mellem den termofile og mesofile starterkultur og *Penicillium roqueforti*.

På baggrund af stammernes karakteristika blev 20 stammer af *P. roqueforti* og 15 stammer fra den primære starterkultur udvalgt til screening for positive interaktioner.

Flere metoder til screening af interaktion mellem stammer af *P. roqueforti* og meso- og termofile starterkulturer blev afprøvet og to metoder ; ”spottest”, hvor 0.2 µl mælkesyrebakterier blev dryppet på plader podet (dybdeudsæd) med *P. roqueforti* og ”enkeltlagsmetoden”, hvor *P. roqueforti* og mælkesyrebakterier blev podet (dybde udsæd) sammen i 20 ml substrat, blev udvalgt og optimeret.

De 20 industrielle stammer af *P. roqueforti* blev indledningsvis screenet for positive interaktioner med *P. roqueforti* og 15 enkelt stammer af *Leuconostoc* ssp., *Lactococcus* ssp., *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus* ssp. fra de indsamlede starterkulturer. Screeningen blev udført som spot-test og enkeltlagsmetoden på henholdsvis laboratoriesubstrater og osteagar. Der blev observeret positive og negative interaktioner. De positive interaktioner viste sig som øget væksthastighed, kraftigere sporulering, tykkere mycelievækst og en mere intens blågrøn farve. De negative interaktioner blev set som hæmning af *P. roqueforti*. Resultaterne er vist i Tabel 2.

**Tabel 2** Interaktioner mellem 20 stammer af *P. roqueforti* og 15 stammer fra den primære starterkultur.

	Positiv interaktion	Negativ interaktion	Ingen interaktion
<b>Laboratoriesubstrat</b>	22	195	83
<b>Osteagar</b>	136	49	115

Der blev observeret store forskelle stammerne imellem idet interaktionerne var stamme specifikke for såvel *P. roqueforti* som stammerne fra den primære starterkultur. På baggrund af disse resultater blev et lille antal stammer valgt ud til mere detaljerede undersøgelser.

Indvirkningen af NaCl, svarende til  $a_w$  0.98, 0.96 og 0.94, pH 5.5 og 6.0 samt temperaturerne 10 °C og 25°C på interaktionerne blev undersøgt på osteagar. Resultaterne vidste at for såvel vækst som sporulering blev virkningen af interaktionerne stærkere ved øget saltkoncentrationer. Der var kun en svag effekt af pH. De fundne interaktioner var lige så

stærke ved 10 som ved 25°C.

### **Proteolytisk interaktion mellem den primære starterkultur og *Penicillium roqueforti***

Under screeningsforsøgene var det meget tydelig at osteagaren blev mere nedbrudt på pladerne med positive interaktioner sammenlignet med plader uden eller med negativ interaktion. Det blev derfor undersøgt, om der var et samspil mellem den primære starterkultur og *P. roqueforti* i nedbrydningen af kasein. Nedbrydningen af kasein blev undersøgt ved hjælp af Kapillar Electroforese (CE) samt spektrofotometriske målinger. Mælkesyrebakterier har begrænset og for nogen stammer ingen målbar proteolytisk aktivitet sammenlignet med de fleste stammer af *P. roqueforti*. Alligevel kunne der ved hjælp af CE-profilerne observeres en effekt af interaktionerne på nedbrydningen af kasein. Den synergistiske effekt kunne ses ved at kaseinet blev hurtigere nedbrudt og at der blev dannet en række ekstra peptider. Ændringerne i nedbrydningsprofilen kan have direkte indflydelse på ostens kvalitet, idet kasein komponenterne og nedbrydningen af disse har indflydelse på ostens tekstur, konsistens, vandbindingsevne og aroma.

Effekten af interaktionerne på nedbrydningen af kasein var tydeligst for stammerne af *P. roqueforti* med lav proteolytisk aktivitet. For nogle kombinationer af mælkesyrebakterier og *P. roqueforti* stammer var der ingen effekt på kasein nedbrydningen at se overhovedet.

### **Aminosyreanalyse**

Der blev udført aminosyreanalyser på osteagar, hvor *P. roqueforti* og stammer fra den primære starterkultur var podet enkeltvis og i kombination på osteagar. Aminosyreanalyser af osteagaren indikerede at den positive effekt på vækst og sporulering stammer fra aminosyrer, der frigives af mælkesyrebakterierne under nedbrydningen af kaseinet og derefter forbruges af *P. roqueforti*. Især leucin og arginin synes at have betydning.

### **Lipolyse**

Der er udført indledende screeningsforsøg, for at undersøge mælkesyrebakteriernes indflydelse på *P. roqueforti*'s esterase aktivitet. Screeningen blev udført ved hjælp af agar diffusions metoden. Fra den primære starterkultur indgik *Lactococcus* spp. *Lactobacillus* spp *Leuconostoc* spp og *Streptococcus thermophilus*. Der blev ikke påvist esterase aktivitet på tributyrinagar for nogle af de undersøgte stammer fra den primære starterkultur. På trods af at mælkesyrebakterierne ikke viste esterase aktivitet, indikerede interaktionsforsøg hvor *P.*

*roqueforti* blev testet sammen med mælkesyrebakterierne, at tilstedeværelsen af mælkesyrebakterierne fremmede de undersøgte stammer af *P. roqueforti*'s esterase aktivitet.

#### 4.2 Interaktioner mellem *Penicillium roqueforti* og gær

Gær er isoleret i højt antal fra udenlandske såvel som danske blåskimmeloste. I Danablu er det *Debaromyces hansenii*/*Candida famata* som dominerer gærfloraen, men også *Kluveromyces maxianus* var. *lactis.*, *Yarrowia lipolytica* og *Saccharomyces spp.* forekommer. I projektet blev fire forskellige gær arter screenet for interaktion med 10 stammer af *P. roqueforti*. Screeningen blev udført i laboratoriesubstrat såvel som i modelsystemer der imitere miljøforholdene i Danablu. Screeningerne blev foretaget ved hjælp af enkeltlagsmetoden samt spottesten. Gærstammerne blev inoculeret som levende celler, supernatant og celle frit ekstrakt. Der var forskel på de forskellige gærarters påvirkning af *P. roqueforti*'s vækst og sporulering mens alle de undersøgte stammer af *P. roqueforti* reagerede ens overfor de enkelte gær arter. Resultaterne fra screeningsforsøget er samlet i Tabel 3.

**Tabel 3.** Oversigt over interaktioner mellem fire gær arter og *P. roqueforti*.

	Hele celler	Supernatant	Cellefrit ekstrakt
<i>D. hansenii</i> (DK og F)	-	-	-
<i>Sacch. cerevisiae</i>	+	-	-
<i>K. lactis</i>	÷	-	÷
<i>Y.lipolytica</i>	÷	-	-

+) positiv interaktion      ÷) negativ interaktion      -) Ingen interaktion

Der var ikke forskel på screenings resultaterne med hensyn til de anvendte medier.

Der var ingen effekt af de to stammer af *D. hansenii* på vækst og sporulering af *P. roqueforti*. Hele celler af *Sacch. cerevisiae* fremmede vækst og sporulering af de 10 undersøgte *P. roqueforti* stammer mens der ingen effekt var af supernatant eller de knuste celler (celle frit ekstrakt). *K. lactis* og *Y. lipolytica* var begge istand til at hæmme vækst og sporulering af *P. roqueforti*. Hæmning af *P. roqueforti* sker både for hele celler og cellefrit ekstrakt for *K. lactis*, hvilket indiker at den negative effekt skyldes andet end konkurrence om næringsstoffer. Virkningen af *K. lactis* var ens for alle de undersøgte stammer af *P. roqueforti* og den var aftagende med stigende koncentration af NaCl i mediet. Hele celler af *Y. lipolytica*

hæmmede *P. roqueforti*. For *Y. lipolytica* var dens hæmmende effekt stærkest overfor de langsomt voksende stammer af *P. roqueforti* og den negative interaktion skyldes ifølge de viste resultater konkurrence om næringsstoffer.

### **Gærs betydning for lipolytisk og proteolytisk aktivitet**

Gærenes lipolytiske aktivitet blev målt på tributyrin ved hjælp af agar diffusion metoden.

Alle de ovennævnte gær var istand til at hydrolysere tributyrin ved 10 °C og 30 °C

*Yarrowia lipolytica* havde den højeste esterase aktivitet, fulgt af *D. hansenii*, *K. lactis* og *Sacch. cerevisiae*. Den enkelte gærs esterase aktivitet, var uafhængig af om når den var opformet på PDA eller på osteagar.

Den proteolytiske aktivitet af gærene blev undersøgt ved hjælp af agar diffusion på kasein agar og ved hjælp af kapillar elektroforese og HPLC, hvor gærenes nedbrydning af de forskellige kasein varianter kan ses direkte.

Det var kun den undersøgte stamme af *Y. lipolytica* som viste proteolytisk aktivitet ved brug af agar diffusion på kasein agar, mens kasein nedbrydningen undersøgt ved hjælp af CE og HPLC viste, at *Sacch. cerevisiae* ligeledes havde proteolytisk aktivitet. Følsomheden på de to metoder er meget forskellig, idet alle kasein komponenterne skal være nedbrudt før at en proteolytisk aktivitet kan aflæses ved agar diffusion, mens det på kasein profilerne fra CE og HPLC er muligt at se nedbrydningen af de enkelte kasein komponenter.

CE og HPLC profilerne viste at *Y. lipolytica* er istand til at nedbryde alle kasein komponenter og har en høj proteolytisk aktivitet, mens *Sacch. cerevisiae* primært nedbryder  $\beta$ -kasein komponenterne samt lidt af  $\alpha_{s1}$ -kasein og dermed samlet har en lavere proteolytisk aktivitet.

### **Proteolytisk interaktion mellem gær og *Penicillium roqueforti***

Den proteolytiske interaktion mellem gær og *P. roqueforti* blev undersøgt ved at lade *Y. lipolytica* og *Sacch. cerevisiae* vokse sammen med stammer af *P. roqueforti* med forskellig proteolytisk aktivitet.

Nedbrydningsprofilen for proteolytisk interaktion mellem *Sacch. cerevisiae* og *P. roqueforti* er domineret af *P. roqueforti*, men nedbrydningsprofilen adskiller sig fra *P. roqueforti*'s nedbrydningsprofil ved at grupperingen af peptiderne er ændret og antallet af dem er højere.

For den proteolytiske interaktion mellem *Y. lipolytica* og *P. roqueforti* er *Y. lipolytica* nedbrydning af kasein dominerende i CE-profilen ved interaktion med en lav eller middel



proteolytisk stamme af *P. roqueforti*. Kun stammer af *P. roqueforti* med høj proteolytisk aktivitet vil dominere i samspillet med *Y. lipolytica*. Alle kasein komponenter nedbrydes meget hurtigt når både *P. roqueforti* og *Y. lipolytica* er tilstede i mediet. Hvor *Sacch. cerevisiae* kan bidrage til modningen med sin moderate proteolytiske aktivitet kan *Y. lipolytica* meget hurtigt komme til at dominere nedbrydningen af kasein og dermed i høj grad præge den færdige osts aroma, vandbindingsevne, konsistens og tekstur. Det er derfor vigtigt at kende de teknologiske egenskaber af den anvendte stamme af *P. roqueforti* og den ønskede gær stamme, således at de to mikroorganismer supplere hinanden bedst muligt under modningen af osten, således at modningsforløbet kan kontrolleres.

### **Sammenligning af flere stammer af *Saccharomyces cerevisiae***

Der blev inddraget yderligere fire stammer af *Sacch. cerevisiae* i projektet. De fire gær isolater stammer fra spontant fermenterede majs fra Ghana, en undergær fra KVL's gærsamling og to isolater fra blåskimmelost. Ingen af de fire stammer fremmede vækst eller sporulering af *P. roqueforti*. De fire stammers proteolytiske aktivitet blev undersøgt ved hjælp af CE. Ingen af de fire stammer kunne nedbryde kasein.

Taxonomien indenfor *Sacch. cerevisiae* er ændret meget gennem de seneste år. Taxonomien er nu domineret af genotypiske bestemmelser. For at kende det korrekte slægtsforhold af osteisolaterne blev de fem *Sacch. cerevisiae* som er anvendt til forsøg i projektet, grundigt fæno- og genotypisk bestemt. Både de fæno- og genotypiske bestemmelser viste, at osteisolaterne tilhørte *Sacch. cerevisiae*. Det samme gælder for isolatet fra Ghana, mens undergæren tilhører arten *Sacch. pastorianus*.

## **5. Mejeriforsøg**

Der blev udført mejeriforsøg med udvalgte starterkulturer på Grenå Mejeri. Forsøgene blev udført i fuld skala, hvilket vil sige i 16.000 tons tanke. Der blev ialt lavet 12 tanke. Der blev anvendt 2 stammer af *P. roqueforti*; en stamme med høj proteolytisk aktivitet og en stamme med lav proteolytisk aktivitet. For hver stamme af *P. roqueforti* blev der produceret 2 kontroltanke med mejeriet egen starterkultur og *P. roqueforti*, 2 tanke med 50% af mejeriets starterkultur og 50% KVL starter (en starterkultur sammensat af stammer fra interaktionsforsøgene), og 2 tanke med 100% KVL starter og *P. roqueforti*. For hver tank blev der udtaget 4 oste til mikrobiologiske, kemiske, fysiske og enzymatiske analyser. Der blev udtaget prøver fra osten indre og fra ostens ydre.

De fleste resultater er under udarbejdelse, da resultatbehandlingen er forsinket på grund af orlov, men nedenstående tendenser er fundet.

#### Reologiske målinger

Der er målt reologiske forskelle på forsøgs og kontrol ostene efter 8 ugers modning. Forskellene kan observeres for begge stammer af *P. roqueforti* og kan bedst korreleres med ostens hårdhed. Der er yderligere målt tydelige forskelle, som kun kan tilskrives de to forskellige stammer af *P. roqueforti*.

#### Sensoriske målinger

Der er lavet profiler af ostene efter 8 uger modning. De anvendte dommere har ikke fundet større forskelle på ostenes kvalitet. Bedømmelses kriterierne har ikke været optimalt opstillet og den sensoriske analyse vil derfor ikke blive vægtet særligt højt, når der skal laves en samlet vudering af starterkultuyrens indflydelse på modningen og kvaliteten af Danablu.

#### Mikrobiologiske analyser

Der er fundet forskelle i antallet af overlevende organismer fra de to primære starterkulturer, idet mælkesyrebakterierne fra KVL starteren overlevede længere i ostene end mejeriets egen starterkultur.

## **6. Konklusion**

NaCl og vandaktivitetens indvirkning på spiring, mycelievækst og sporulering af *P. roqueforti* er blevet undersøgt. Spiringen forløber hurtigst når vandaktiviteten i mediet er 0.99. Mikromiljøet som konidierne dannes i har indflydelse på de dannede konidiers videre spiringsforløb. Ved  $a_w$  svarende til 0.92 var væksthastigheden reduceret med mere end 75% i forhold til væksthastigheden ved  $a_w$  0.98. Ved  $a_w$  0.96 undertrykkes mycelievæksten og der opstår et optimum for dannelsen af konidier. Ved justering af vandaktiviteten med NaCl ses dette optimum kun for stammer med høj salt tolerance.

Der er screenet 300 kombinationer af *P. roqueforti* stammer og stammer fra den primære starterkultur på laboratoriemedie og osteagar. De fundne interaktioner var tydeligvis substrat afhængige. Der blev observeret 183 positive interaktioner på osteagar. De fundne interaktioner var stamme specifikke for såvel *P. roqueforti* som stammer fra den primære starterkultur.

Undersøgelser af miljøfaktoernes indflydelse på interaktionerne viste, at effekten af interaktionerne var tiltagende ved stigende koncentrationer af NaCl. Dette ses ved 10 såvel som ved 25 °C og ved pH 5.5 og 6.

Der blev observeret en synergistisk effekt ved nedbrydningen af kasein mellem flere stammer fra den primære starterkultur og *P. roqueforti*. Denne effekt kom mest til udtryk for ved de kombinationer af mælkesyrebakteriene og *P. roqueforti*, hvor *P. roqueforti* havde lav proteolytisk aktivitet.

Aminosyreanalyserne tyder på at specielt arginin og leucin spiller en rolle i interaktionerne mellem den primære starterkultur og *P. roqueforti*.

De undersøgte stammer fra den primære starterkultur viste ingen lipolytisk aktivitet, men der var en tendens til at tilstedeværelsen af mælkesyrebakterier i mediet fremmede *P. roqueforti*'s lipolytiske aktivitet.

Der er observeret positive interaktioner mellem en stamme af *Sacch. cerevisiae* og 10 stammer af *P. roqueforti*. Endvidere blev der fundet negative interaktioner mellem hele celler af *Y. lipolytica* og hele samt knuste celler af *K. lactis*.

Alle de undersøgte gær kunne hydrolysere tributyrin.

*Y. lipolytica* og *Sacch. cerevisiae* kunne nedbryde kasein. Med hensyn til nedbrydningen af kasein viste CE-profilerne, at der både er kvantitative og kvalitative forskelle mellem *Sacch. cerevisiae* og *Y. lipolytica*. *Y. lipolytica* er meget proteolytisk og i stand til at nedbryde alle kaseinkomponenter. *Sacch. cerevisiae* nedbrød først og fremmest  $\beta$ -kaseinet og en smule af  $\alpha_{s1}$ -kasein.

Den synergistiske effekt mellem de to gær stammer og *P. roqueforti* ved nedbrydningen af kasein sås tydeligst for stammer af *P. roqueforti* med lav proteolytisk aktivitet.

Der blev undersøgt yderligere 4 stammer af *Sacch. cerevisiae*. Ingen af de 4 stammer havde synligt positivt samspil med *P. roqueforti* og CE-profiler for nedbrydning af kasein viste heller intet tegn på proteolytisk aktivitet. Alle *Sacch. cerevisiae* stammer (5 ialt) blev fæno- og genotypiske bestemt og isolaterne fra ost blev alle klassificeret som *Saccharomyces cerevisiae*.

De reologiske og mikrobiologiske analyser viser, at der er målbare forskel på forsøgstene og kontrolstene fra mejeriforsøget. Alle resultater er endnu ikke færdigbehandlet, og der er derfor ingen samlet konklusion på forsøget.

Den nye viden, der er opnået i projektet, vil blive beskrevet i et katalog indeholdende oplysninger om Interaktioner med stammer fra den primære starterkultur og gær, teknologiske egenskaber herunder proteolytisk samt lipolytisk aktivitet, aromadannelse, effekt af miljøfaktorer på disse, produktion af sekundære metabolitter, vækst ved forskellige pH,  $a_w$ ,

salt og temperaturer samt beskrivelser af stammerne. Dette vil kunne give en øget mulighed for kvalitetsoptimering af produktionen, da der er en bedre baggrund for valg af kulturer. Desuden vil oplysningerne kunne danne basis for en mere ensartet kvalitet ved forudsigelse af de enkeltes stammers bidrag til modningen.

## **Publikationer:**

- Kronborg Hansen, T., Dines Larsen, M. & Jakobsen, M. (1996). Anvendelsen af *Penicillium roqueforti* og *Penicillium camemberti* ved ostefremstilling. Forelæsningsnoter til faget ”Fermenterede Levnedsmidler.”
- Jakobsen, M og Hansen, T. (1996) Positive mikrobiologi eller mikrobielle interaktioner i mejeriprodukter. Mælkeritidende. 10, 246-248
- Dines Larsen, M., Kronborg Hansen, T. & Jakobsen, M. (1997). Danablu – verdens bedste ost. Kan den gøres bedre? Mælkeritidende. 19, 499-501
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M. (1997). The possible role of microbial interactions for growth and sporulation of *Pencillium roqueforti* in Danablu. Le Lait 77. 479-488
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M. (1998) Interactions between *Pencillium roqueforti* and yeasts of importance in the production of Danish Blue cheese. In Proceedings of the IDF Symposium: ”Yeasts in the dairy industry – positive and negative aspects.” Eds Jakobsen, M., Narvhus, J. and Viljoen, B.C. Brussels. 50-58.
- Dines Larsen, M., Rotvig Kristiansen, K. and Hansen, T.K. (1998) Proteolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti* for production of Danablu. International Journal of Food Microbiology 43. 215-221.
- Geisen, R., Dines Larsen., M., Hansen T.K., W.H. Holzapfel and Jakobsen. M. (1999) Characterization of *Penicillium roqueforti* Strains used as Cheese Starter Cultures by RAPD Typing. Indsendt til udgivelse i Food Mycology.
- Dines Larsen, M. and Hansen T.K. (1998) Enviromental Conditions in Danablu Proteolytic and Lipolytic Activity of Strains of *Pencillium roqueforti* Ph.D Afhandling af Mette Dines Larsen, KVL, Mejeri og Levnedsmiddelinstituttet, Levnedsmiddelmikrobiologi. Appendix II.
- Hansen, T.K. and Jakobsen (1999) Proteolytic interactions in Danablu. In proceeding of the Cost 95 symposium ”Quality and Microbiology of Traditioneal and Raw Milk Cheeses”. Eds Grappin, R. I tryk.

## Præsentationer ved kongresser og konferencer

- Hansen, T.K. Jakobsen, M. The possible role of microbial interactions for growth and sporulation of *Pencillium roqueforti* in Danablu. **Mundtlig** præsentation ved IDF Symposium: Ripening and Quality of Cheeses. Besançon 26.-28. februar 1996.
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M. The influence of microbial interactions for the development of *Pencillium roqueforti* in Danablu. **Mundtlig** præsentation ved Danish Biotechnology Conference, Food Biotechnology, Vejle, Munkebjerg 23.-24. maj 1996.
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M. The role of microbial interactions in the degradation of casein in Danablu. **Mundtlig** præsentation ved Food Micro '96. Technology, safety, stability. Budapest 26.-30. august 1996.
- Hansen, T.K and Jakobsen, M. Interactions between *Pencillium roqueforti* and yeasts of importance in the production of Danish Blue cheese. **Mundtlig** præsentation IDF Symposium: Yeasts in the dairy industry – positive and negative aspects. København 2.-3. september 1996.
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M. Proteolytic interactions in Danablu. **Mundtlig** præsentation ved Cost 95 symposium Quality and Microbiology of Traditioneal and Raw Milk Cheeses. Dijon, Frankrig 30. november – 1. december 1998.
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M. Interaktioner mellem mesofile og termofile starterkulturer og *Pencillium roqueforti*. **Poster** præsenteret ved Mejeriforskningsdag 1995 (KVL).
- Hansen, T. K. and Jakobsen, M. Interaktioner mellem mesofile og termofile starterkulturer og *Pencillium roqueforti*. **Poster** præsenteret ved Levnedsmiddeldkongres 1996 (DTU).
- Hansen, T. K. and Jakobsen, M. The influence of microbial interactions for the development of *Pencillium roqueforti* in Danablu. **Poster** præsenteret ved Danish Biotechnology Conference, Food Biotechnology, Vejle, Munkebjerg 23.-24. maj 1996.
- Hansen, T.K and Jakobsen, M. Positive and negative interactions between yeasts and strains of *Pencillium roqueforti* associated with blue cheese. **Poster** præsenteret ved 18<sup>th</sup> ISSY. Yeast nutrition and natural habitats. Bled, Slovenien, 24.-29. august 1997.
- Clausen, M. F. Ø., Hansen, T. K. and Jakobsen, M. Characterization of yeasts isolated from Mozzarella chesse by patterns of whole cell protein electrophoresis, casein breakdown and release of free fatty acids from butter fat. **Poster** præsenteret ved 18<sup>th</sup> ISSY. Yeast nutrition and natural habitats. Bled, Slovenien, 24.-29. august 1997.

- Hansen, T. K., Larsen, M. D. & Jakobsen, M. Teknologiske egenskaber af *Penicillium roqueforti* stammer anvendt til produktion af Danablu. **Poster** præsenteret ved Mejeriforskningsdag 1997 (Århus Universitet) og ved Levnedsmiddelkongres 1998 (DTU).
- Larsen, M. D., Hansen, T. K. & Jakobsen, M. Nedbrydning af kasein i Danablu. **Poster** præsenteret ved Mejeriforskningsdag 1997 (Århus Universitet) og ved Levnedsmiddelkongres 1998 (DTU).
- Van den Tempel, T., Hansen, T.K., Larsen M.D. and Jakobsen, M. Microbial Interactions in Danablu **Poster** præsenteret ved IDF-kongress Aarhus, september 1998
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M. Proteolytic interactions in Danablu. **Poster** præsenteret ved Cost 95 symposium Quality and Microbiology of Traditional and Raw Milk Cheeses. Dijon, Frankrig 30. november – 1. december 1998.

### **Point-, bachelor- og specialeopgaver udført under projektet:**

- Mette S. Pedersen & Peter Møller (1995). Karakterisering af *Penicillium camemberti*'s proteolytiske og lipolytiske enzymer. Pointopgave (KVL).
- Mette S. Pedersen & Peter Møller (1995). *Penicillium camemberti*. Miljøfaktorers betydning for vækst og dannelsen af proteolytiske og lipolytiske enzymer. Speciale (KVL).
- Farshid Shirzad (1995). Forekomst og betydning af gær i danske hvidskimmeloste. Speciale (KVL)
- Mads Friis Østergaard Clausen (1996) Gær som skadevolder i mozzarella. Speciale (KVL)
- Karin Suhr (1997) Undersøgelse af gær og skimmelsvampe i den zimbabweanske ost "Original Vumba Cheese." Pointopgave (KVL)
- Käthe M. Rasmussen (1997). Interaktioner mellem stammer af *Penicillium* og bestemmelse af fysisk/kemiske parametre til blotlægning af af den mikrobiologiske udvikling i blå/hvidskimmeloste. Bacheloropgave (KVL).
- Flemming Bundesen (1997) Teknologiske egenskaber for gær isoleret fra Danablu. Bacheloropgave (KVL)



- Tanja Gaardlykke Ettrup (1998). Effekt af interaktioner mellem stammer af *Penicillium roqueforti* og mælkesyrebakterier på lipolytisk aktivitet af *Penicillium roqueforti*. Specialopgave (DTU).
- Flemming Bundesen (1999). Rødfavning af gær i Danablu. Pointopgave (KVL)

### **Ph. D. afhandling**

Under udarbejdelse. Forventes afsluttet efterår 1999.

Frederiksberg den 23. juni 1999.

Tine Kronborg Hansen

Mogens Jakobsen

