

Afslutningsrapport

Fysiologisk og molekylærbiologisk karakterisering af gær i ost

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2005-65

Januar 2005



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet :

Fysiologisk og molekylærbiologisk karakterisering af gær i ost

Projektperiode: 01.01.1999 – 31.05.2004

Projektdeltagere:

KVL

Institut for Fødevarevidenskab (IFV), Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg.C

Professor **Mogens Jakobsen** (projektleder, KVL)

Tlf. 3528 3216

Fax. 3528 3214

Email: moj@kvl.dk

Lektor **Lene Jespersen**, tlf.. 3528 3230

Ph.d.-studerende **Kamilla Munk Petersen**

Forskningsassistent **Nadja Larsen**

Laborant **Bettina Nordbo**

DTU

Biocentrum (BiC), Søtofts Plads, Bygning 221, 2800 Kgs. Lyngby

Lektor **Ole Filtenborg** (delprojektleder, DTU)

Tlf. 4525 2620

Fax. 4588 4922

Forskningsadjunkt **Signe Westall**, tlf. 4525 2729

Arla Foods amba, Innovationscenter Brabrand, Rørdrumvej 2, 8220 Brabrand

Teamleder **Søren Lillevang**

Finansiering:

Mejeribrugets ForskningsFond og Direktoratet for FødevareErhverv (FØTEK III)

RESUMÉ

Det var projektets overordnede formål at udvikle metoder til differentiering af gær fra ost og ostemejerier samt at gennemføre fysiologiske og molekylærbiologiske undersøgelser af de teknologiske egenskaber for gær, specielt *Debaryomyces hansenii*, som er vigtige for ostemodning.

Følgende genotypiske metoder blev afprøvet: Intergenic Transcribed Spacer (ITS)-PCR, mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (mtDNA RFLP), og puls felt gel elektroforese (PFGE). Endvidere blev den fænotypiske metode Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) vurderet.

Resultaterne viste, at ITS-PCR er velegnet til differentiering af gær på artsniveau. Artsspecifikke PCR-produkter blev observeret for de undersøgte gærarter *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Kluyveromyces lactis*, og *Yarrowia lipolytica*.

MtDNA RFLP under anvendelse af restriktionsenzymene *HaeIII* og *HpaII* viste, at 20 stammer af *D. hansenii* kunne opdeles i 14 forskellige grupper, hvilket bekræfter metodens anvendelighed til adskillelse af *D. hansenii* på stammeniveau.

Ved anvendelse af PFGE for 56 stammer af *D. hansenii* blev antallet og størrelsen på de kromosomale bånd beregnet og størrelsen af det totale genom estimeret. Antallet af kromosomer varierede fra 5 til 10, med 6 kromosomer i de fleste stammer og tilhørende genomer på mellem 9,4 og 12,6 Mbp. PFGE gjorde det muligt at differentiere mellem alle de undersøgte *D. hansenii* stammer og demonstrerede således den bedste differentiering på stammeniveau. FTIR var egnet til differentiering på artsniveau, men mindre egnet til stammedifferentiering end de molekylærbiologiske metoder.

Debaryomyces hansenii viste sig at være den dominerende gær gennem modningsforløbet for Danbo ost, mens andre arter blev detekteret i lavere koncentrationer og kun i den tidlige fase af ostemodningen. Ved mtDNA RFLP blev der påvist en markant mikrobiel succession blandt *D. hansenii* stammer, således at kun én stamme var tilstede på osteoverfladen efter 3 dages modning. Denne stamme har ikke tidligere været isoleret. Det blev vist at den mikrobielle succession skyldes stammevariationer i væksthastighed og udnyttelse af laktat ved forskellige pH-værdier og NaCl-koncentrationer. Den dominerende stamme af *D. hansenii* var bedre tilpasset til forholdene ved overflademodning og udkonkurrerede de øvrige stammer af *D. hansenii*. Endvidere blev det vist at tilsætning af galaktose i et laktatholdigt miljø medførte hurtigere vækst og laktat udnyttelse med den største virkning opnået ved 0.02 % (w/v) galaktose. Denne sammenhæng kan muligvis anvendes i osteproduktion for at fremme modningsprocessen.

Genekspressionsstudier af laktat metabolisme udført på laktatpermease (*jen1*) og laktatdehydrogenase (*cyb2*) i *D. hansenii* stammer viste overensstemmelse mellem genekspressionsmønstre og væksthastighed so laktatnedbrydning, dvs. de bedst voksende stammer viste tidligere stigning i ekspressionsniveauer af *jen1* og *cyb2*. Sammenhængen mellem ekspressionsprofiler og laktatnedbrydning forventes at kunne anvendes til at identificere nye gær som starterkulturer til ost.

SUMMARY

The overall task of this project was to develop molecular biology based typing methods for yeast isolated from cheese and cheese processing environments and to perform physiological and molecular biological studies of the technological properties of yeasts, especially *Debaryomyces hansenii*, important for cheese ripening.

The genotypic methods included Intergenic Transcribed Spacer (ITS)-PCR, mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (mtDNA RFLP), and pulse-field gel electrophoresis (PFGE). Further, a phenotypic method Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) was evaluated. It was found that ITS-PCR method could distinguish between the investigated species *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Kluyveromyces lactis*, and *Yarrowia lipolytica*. MtDNA RFLP using restriction enzymes *HaeIII* and *HpaII* was tested on 20 strains of *D. hansenii*. The strains were divided into 14 groups according to their restriction profiles, which proved the usefulness of the method for typing of *D. hansenii* at subspecies level. With the PFGE technique applied on 56 isolates of *D. hansenii* the number and the size of chromosomal bands and the size of total genome were determined. The number of chromosomal bands varied from five to ten with the most common number being six chromosomes and the corresponding genome sizes between 9.4 and 12.6 Mbp. PFGE made it possible to differentiate between all the investigated species, thus demonstrating the highest discriminative power for strain typing of *D. hansenii*. FTIR was found to be applicable for differentiation of yeast species, however, less effective for strain typing. ITS-PCR and FTIR are considered applicable in control laboratories of larger dairies.

Debaryomyces hansenii appeared to be the dominant yeast species throughout the ripening period of Danbo cheese, whereas other arts were detected in minor concentrations during the early stages of cheese ripening. As showed by mtDNA RFLP, a microbial succession among the strains of *D. hansenii* took place during cheese ripening so that only one strain was detected after 3 days of ripening. That strain has not been isolated earlier. It was established that the microbial succession was caused by the differences between the strains in their ability to grow on lactate at different pH values and NaCl concentrations. The dominant strain of *D. hansenii* was found to be best adapted to the conditions of surface ripening and consequently, replaced the other strains. Furthermore, it was shown that the addition of galactose in the lactate containing environments accelerated growth and lactate assimilation of the dominant strain with the largest effect achieved at 0.02 % (w/v) of galactose.

Gene expression studies of lactate metabolism performed on lactate permease (*jen1*) and lactate dehydrogenase (*cyb2*) showed a relationship between gene expression patterns, growth rate and lactate breakdown in *D. hansenii*, i.e., the earlier increase in expression levels of *jen1* and *cyb2* was observed in the best growing strains. This relationship can be used to identify new yeast starter cultures.

1. BAGGRUND OG FORMÅL

Gær forekommer i en række mejeriprodukter, enten som en del af den ønskede ledsageflora eller som uønskede kontaminanter. Gærs evner til at etablere sig i miljøet vil være afhængige af deres teknologiske egenskaber, der i mange tilfælde vil variere mellem forskellige stammer indenfor samme art. For at kunne kontrollere og følge gær gennem produktionen er det derfor nødvendigt med simple metoder til identifikation af gær på subspecies niveau. Identifikation af gær foregår traditionelt ved beskrivelse af makro- og mikromorfologiske kriterier, bestemmelse af assimilering- og fermenteringsprofiler samt resistens overfor forskellige kemiske forbindelser. Klassisk taksonomisk identifikation af gær er imidlertid meget tidskrævende, forudsætter erfaring og er i mange tilfælde ikke i stand til at differentiere på subspecies niveau. Derfor har der i de seneste år været stor interesse for at udvikle molekylærbiologiske metoder til differentiering af gær. Hovedparten af dette arbejde er udført for *Saccharomyces cerevisiae* og meget lidt er udført for andre gær af relevans for mejeriindustrien, f.eks. *Debaryomyces hansenii*.

For overflademodnede oste har gær en essentiel rolle for ostens modningsforløb og for hindring af vækst af uønskede mikroorganismer. En af gærens funktioner er at nedbryde laktat samt at producere basiske forbindelser og dermed hæve pH hvilket fremmer væksten af vigtige modningsbakterier som *Brevibacterium linens*. Gærs betydning ved overflademodning af ost synes at være kompleks og en række forskellige teknologiske egenskaber har været nævnt som værende af betydning, om end der for de fleste parametre ikke har været udført basale studier.

Det har været projektets overordnede mål at udvikle molekylærbiologiske og fænotypiske metoder til differentiering af gær på artsniveau og stammeniveau for at kunne påvise de gær, som har stærk betydning for ostemodningen. I projektet skulle der iværksættes studier, som kan føre til fysiologisk og molekylærbiologisk beskrivelse af gærs vigtigste teknologiske egenskaber med fokus på gærarten *Debaryomyces hansenii*.

Projektets formål kan sammenfattes i følgende hovedpunkter:

- At udvikle molekylærbiologiske metoder, der på stammeniveau kan differentiere mellem gær af interesse for mejeriindustrien
- At kortlægge hvilke gær samt hvilke stammer af *D. hansenii*, som optræder i Danbo ost under de aktuelle produktionsforhold
- At identificere hvilke produktionsparametre og osteegenskaber, der alene eller i kombination har en afgørende indflydelse på gærvækst i ost
- At afklare den rolle gær har for ostemodning med fokus på studier af laktatmetabolisme og regulering af laktatmetabolisme på genniveau
- At anvende den opnåede nye viden til udvælgelse af bedre starterkulturer og til en bedre forståelse af gærens rolle under overflademodning af ost

2. RESULTATER

2.1. Molekylærbiologiske metoder til identifikation af *Debaryomyces hansenii*

Udvalgte DNA-baserede metoder til typebestemmelse blev videreudviklet og afprøvet på gærisolater indsamlet fra ostemejerier (Durup Mejeri og Hjørring Mejeri). Endvidere indgik stammer fra kultursamlinger på KVL og DTU samt fra Arla Foods. Endelig blev referencestammer fra *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Netherlands) anvendt. Følgende tre metoder indgik i arbejdet.

2.1.1. "Intergenic Transcribed Spacer" (ITS)-PCR

ITS-PCR er baseret på amplifikation af ITS1-5,8S rDNA-ITS2 regionen. Som ses i Tabel 1 blev metoden fundet egnet til differentiering af gær på artsniveau på grundlag af størrelsen af de dannede PCR-produkter. Metoden er robust og forholdsvis nem at håndtere, også i industriens driftskontrol.

TABEL 1. Størrelsen af ITS1-5,8S rDNA-ITS2 regionen for gær species relateret til ost^a

Species	Isolate number	Size, bp
<i>Candida zeylanoides</i>	CBS619, CBS5446, CBS5447, CBS6391, CBS6408	620
<i>D. hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	CBS164, CBS766, CBS767, CBS772, CBS1800	639
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	CBS789, CBS4373, CBS7761, CBS7784, (CBS8417) ^b	639 (607) ^b
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBS683, CBS739, CBS743, CBS845, CBS1065	740
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS400, CBS420, CBS1171, TT56, SC-com	850
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS599, CBS2073, CBS2075, CBS6124, CBS6317	360

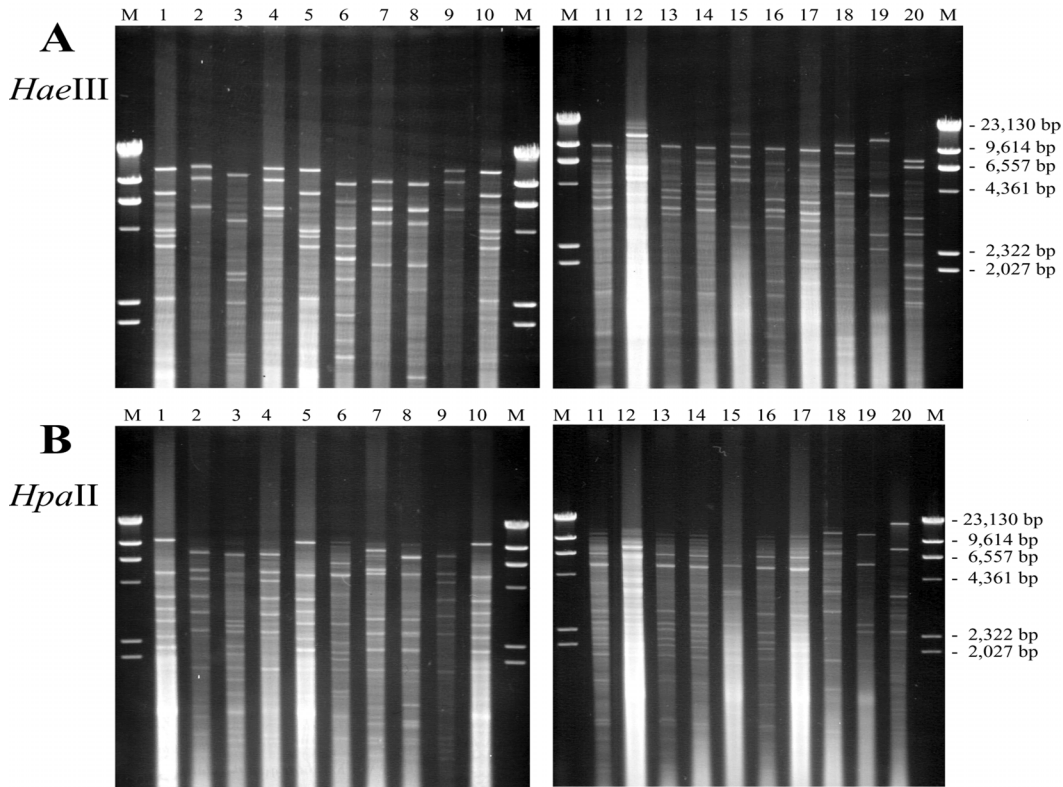
^a Ref.: Petersen K., M., Møller, P. L., and Jespersen, L. 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69:11-24.

^b PCR-produktets størrelse for en enkelt stamme, CBS8417, er 607 bp.

2.1.2. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (mtDNA RFLP)

En anvendelig metode til adskillelse af *D. hansenii* på stammeniveau viste sig at være Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (mtDNA RFLP). Metoden beror på forskelle i mitokondrie DNA. I Fig. 1 er vist mtDNA RFLP profiler for 20 forskellige *D. hansenii* isolater fra CBS kultursamlingen. Profilerne er opnået ved at isolere mitokondrie DNA og dernæst skære det med restriktionsenzymene *Hae*III og

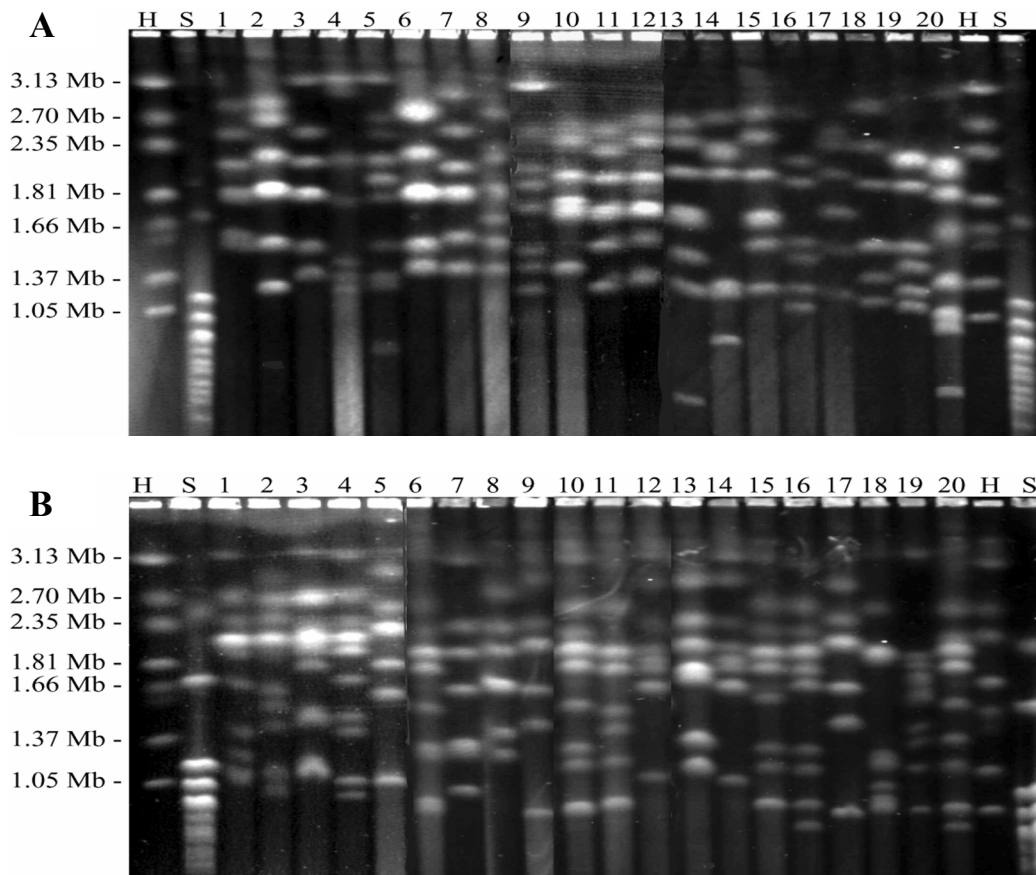
HpaII. De 20 stammer kan opdeles i 14 grupper ved brug af disse enzymer. Modsat ovennævnte ITS-PCR teknik giver mtDNA RFLP metoden mulighed for at adskille mellem stammer af samme art, men den er også mere tidskrævende.



FIGUR 1. MtDNA RFLP profiler for 20 *Debaryomyces hansenii* CBS stammer. Profilerne er opnået ved brug af restriktionsenzymene *HaeIII* (A) og *HpaII* (B) (Ref.: Petersen, K. M., Møller, P. L., and Jespersen, L. 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69:11-24).

2.1.3. Puls felt gel elektroforese (PFGE)

Puls felt gel elektroforese (PFGE) kan anvendes til adskillelse af kromosomer i gær. Metoden er under projektet udviklet for *D. hansenii* (20 laboratoriestammer og 20 mejeriisolater) til bestemmelse af kromosomprofiler som vist i Fig. 2. Antal af kromosomer varierede fra 5 til 10 med seks kromosomer i de fleste stammer. Kromosomantal i typestammen *D. hansenii* var. *hansenii* (CBS767) og *D. hansenii* var. *fabryi* (CBS789) var hhv. 6 og 7. Genomstørrelsen for stammerne varierede mellem 9,4-12,6 Mb. Da hver enkelt stamme havde en meget specifik PFGE profil, var det muligt at differentiere mellem alle stammer. Denne metode har givet de bedste resultater men den er tidskrævende og skønnes ikke at være egnet til anvendelse i industriel driftskontrol.



FIGUR 2. Puls felt elektroforese af 20 *D. hansenii* CBS stammer (A) og 20 *D. hansenii* mejeriisolater (B). Markører: H, *Hansenula wingei*; S, *Saccharomyces cerevisiae* (Ref.: Petersen, K.M. and Jespersen, L. 2004. Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface ripened cheeses. J. Appl. Microbiol. 97: 205-213).

2.1.4. Delkonklusion

ITS-PCR kan benyttes til differentiering på artsniveau for gær med relevans for mejeriindustrien. Endvidere er både mtDNA RFLP og PFGE brugbare til differentiering af *D. hansenii* på stammeniveau. Fordelen med mtDNA RFLP er at den er mindre tidskrævende end PFGE og kun kræver standard apparatur for elektroforese. Imidlertid vil PFGE være den fortrukne metode i situationer hvor adskillelse af *D. hansenii* på stammeniveau er vigtigt.

2.2. Fænotypiske metoder til identifikation af *D. hansenii*

2.2.1. Fourier Transformeret Infrarød Spektroskopi (FTIR)

Med det formål at sammenligne de nævnte molekylærbiologiske identifikationsmetoder med en lovende ny fænotypisk identifikationsmetode blev gærisolaterne analyseret med Fourier Transformeret Infrarød Spektroskopi (FTIR). Dette arbejde blev udført hos Arla Foods a.m.b.a., Innovationscenter Brabrand. Det viste sig, at gærfloraen i den rå mælk inkluderede *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida sake* og *Candida zeylanoides*. Isolater fra mejeriets 12 saltkar bestod primært af *Debaryomyces hansenii* og *Rhodotorula glutinis*. Gærpopulationerne på overfladen af ostene bestod hovedsagligt af *Debaryomyces hansenii*. FTIR inddelte 20 isolater af *D. hansenii* i 10 grupper, hvilket er dårligere end differentiering med mtDNA RFLP og PFGE.

2.2.2. Delkonklusion

FTIR kan anvendes i mejeriindustrien til adskillelse af gær på artsniveau. Sammenlignet med molekylærbiologiske metoder giver den dårligere adskillelse af *Debaryomyces hansenii* på stammeniveau. Desuden kræver FTIR store investeringer i apparatur, men metoden er robust og skønnes anvendelig i mejeriindustriens driftskontrol.

2.3. Gærforekomst under produktion og modning af ost

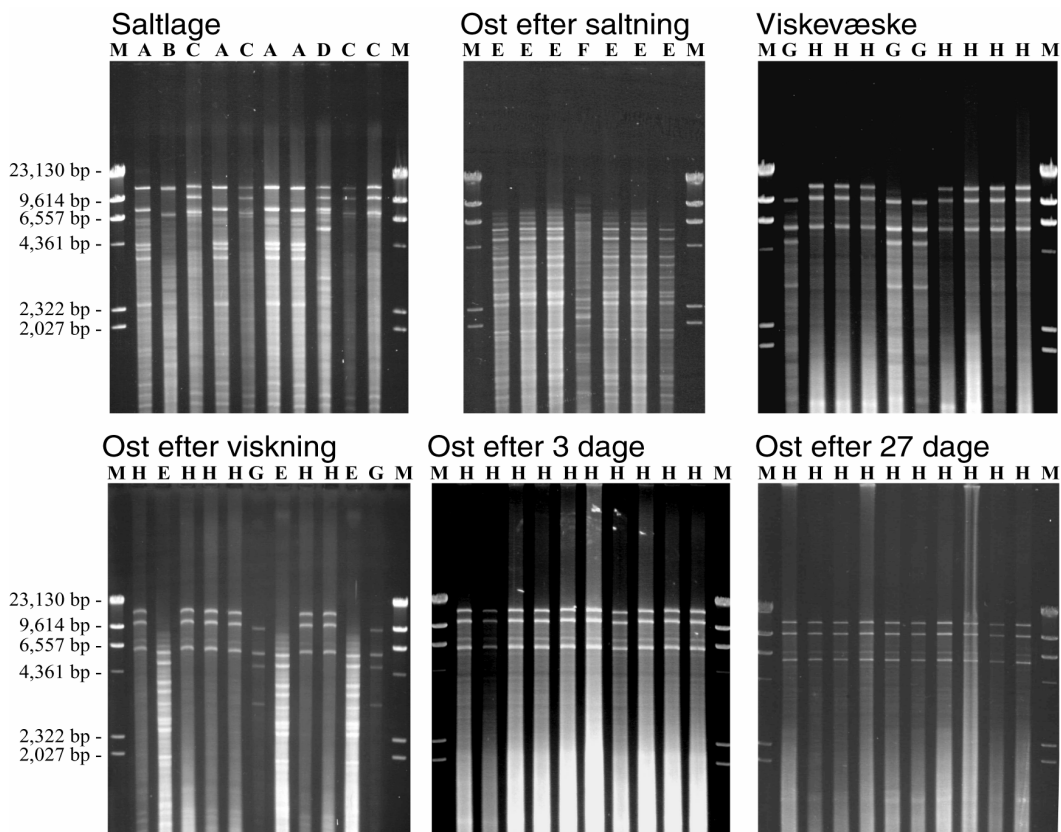
Forekomsten af gær blev fulgt med mtDNA RFLP løbende under produktion og lagring af Danbo ost på Durup Mejeri som vist i Tabel 1. Efter viskning af ostene ses en stigning i koncentrationen af *D. hansenii*, der efter 3 dage er den eneste påviste gærart på overfladen. De øvrige fundne gærarter fra produktionsomgivelserne som bestod primært af forskellige *Rhodotorula*- og *Trichosporon*-arter blev identificeret ved fænotypning. De optrådte tilfældigt og i lave koncentrationer uden forventet betydning for ostekvaliteten.

TABEL 2. Gær CFU og identifikation under ostemodning ^c

Prøve	Gær CFU	Species
Saltlage	^a 6.7 x 10 ²	88 % <i>D. hansenii</i>
Ost efter saltning	^b 1.4 x 10 ³	44 % <i>D. hansenii</i>
Viskevæske	^a 4.7 x 10 ⁵	100 % <i>D. hansenii</i>
Ost efter inokulering	^b 1.4 x 10 ⁶	80 % <i>D. hansenii</i>
Ost 1 dag	^b 2.3 x 10 ⁵	85 % <i>D. hansenii</i>
Ost 3 dage	^b 4.8 x 10 ⁶	100 % <i>D. hansenii</i>
Ost 4 dage før/efter reinokulering	^b 8.1 x 10 ⁶ / ^b 5.9 x 10 ⁶	100 % <i>D. hansenii</i>
Ost 5 dage	^b 6.6 x 10 ⁶	100 % <i>D. hansenii</i>
Ost 28 dage	^b 2.0 x 10 ⁵	100 % <i>D. hansenii</i>

^aCFU/ml, ^bCFU/cm², ^c Ref.: Petersen, K. M., Westall, S., and Jespersen, L. 2001. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of danish surface-ripened cheeses. J. Dairy Sci. 85: 478-486.

Debaryomyces hansenii isolater fra hele osteproduktionsforløb blev analyseret ved mtDNA RFLP. Genbrugskit tilsat en starterkultur af *D. hansenii* blev benyttet til viskningen. Som det fremgår af Fig. 3, kunne fire forskellige stammer af *D. hansenii* (profiler A, B, C, og D) detekteres på overfladen af osten i starten af modningsforløbet ("saltlage"). I viskevæsken blev der detekteret to stammer, hvor den ene (profil G) svarede til den tilsatte starterkultur. Efter ca. tre dage blev starterkulturen udkonkurreret af en anden stamme (profil H). Dominansen af denne stamme blev konfirmeret ved undersøgelse af yderligere 16 produktioner af ost fra samme mejeri. Fjorten ud af de 16 produktioner bestod udelukkende af *D. hansenii* profil H, mens de andre to produktioner ud over den dominerende stamme indeholdt *D. hansenii* med profil G (20 %).



FIGUR 3. Mikrobiel succession af *D. hansenii* bestemt vha. mtDNA RFLP under modning af Danbo ost (Ref.: Petersen, K. M., Westall, S., and Jespersen, L. 2001. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of danish surface-ripened cheeses. J. Dairy Sci. 85: 478-486).

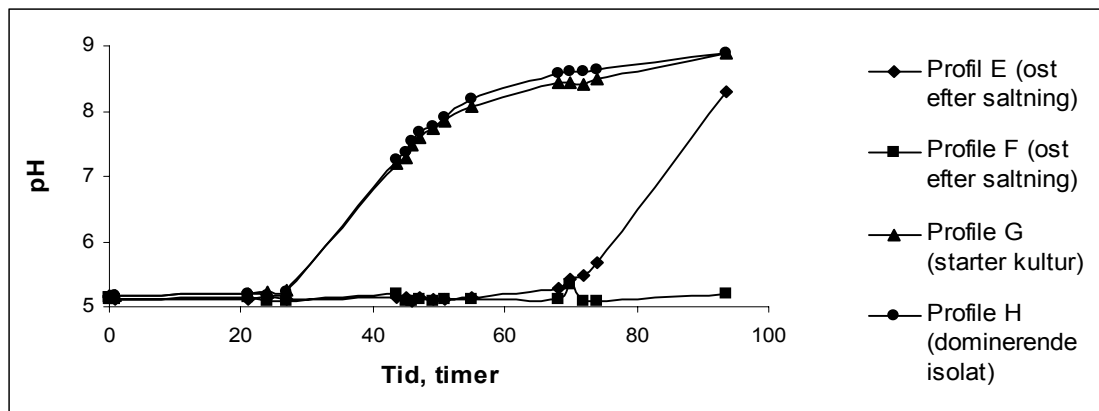
Delkonklusion

En særlig stamme af *D. hansenii* viste sig at dominere overfladmodning af Danbo ost. Den pågældende stamme, som ikke tidligere har været beskrevet, udkonkurrerede den tilsatte startekultur af *D. hansenii*.

2.4. Fysiologisk karakterisering af *D. hansenii*

2.4.1. Vækst på laktat som eneste kulstofkilde

Fire stammer af *D. hansenii* (profiler E, F, G, og H, mtDNA RFLP) isoleret under ostemodningen fra et mejeri blev undersøgt for vækst i medie med laktat som eneste kulstofkilde. Vækst er estimeret ved måling af pH. Målinger af pH som funktion af tiden er vist i Figur 4.



FIGUR 4. Vækst af *D. hansenii* isolater fra ostproduktion i 1 % (w/v) laktat målt som ændring i pH (Ref.: Petersen, K. M., Westall, S., and Jespersen, L. 2001. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of danish surface-ripened cheeses. J. Dairy Sci. 85: 478-486).

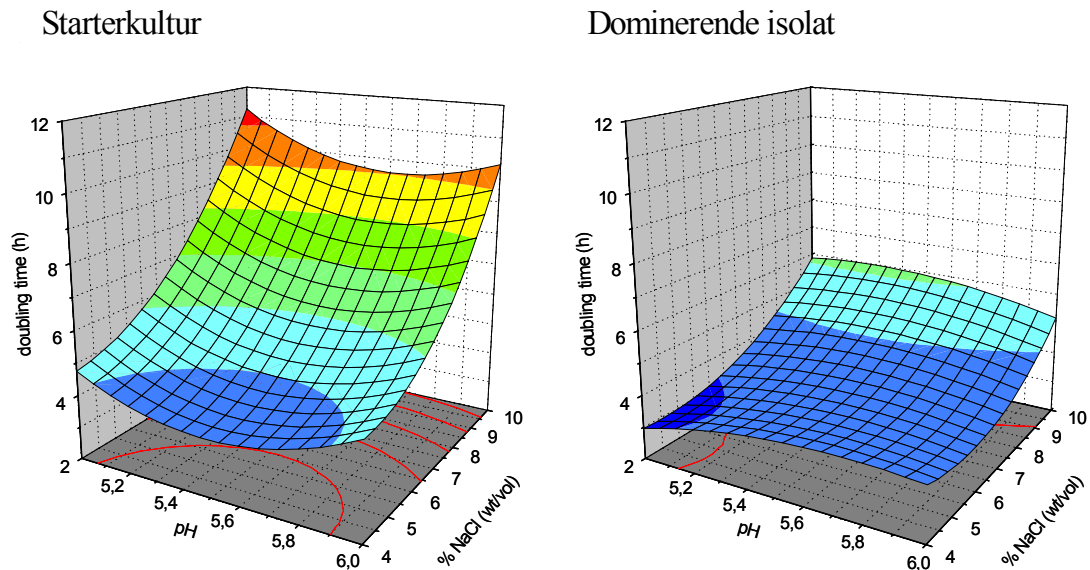
Den dominerende stamme efter viskning (profil H) og starterkulturen (profil G) voksede hurtigst og viste den samme stigning i pH. Vækst af stammerne isoleret umiddelbart efter saltning (profil F og E) var langsommere. Stammen "F" var ikke i stand til at vokse på laktat, mens stammen "E" havde en lang nølefasen i henhold til gennemførte pH-målinger..

2.4.2. Indflydelse af pH, salt og temperatur på væksten

Væksten af den tilsatte startekultur (profil G) og den dominerende stamme (profil H) af *D. hansenii* på glukose og laktat blev yderligere undersøgt i fuldt faktorforsøg på 3 niveauer tæt på de faktiske niveauer på ostens overflade dvs., under forskellige pH (4,8-5,6), temperatur (16,6-23,3°C) og saltkoncentrationer (8,3-16,7 % (w/w) NaCl). Fordoblingstiden som funktion af pH og saltkoncentration under vækst på et laktatholdigt medie er vist i Figur 5.

Den dominerende stamme (profil H) var langt mindre følsom end startekulturen (profil G) overfor høje saltkoncentrationer ved overfladevækst på laktatholdigt medie. Samme resultat blev opnået under vækst på glukose (ikke vist). Temperatur (ikke vist) og pH havde en mindre effekt på gærvæksten. Forsøgene viste at saltningen havde afgørende betydning for forekomst og vækst af gær på osteoverfladen. Saltningen forårsager en

seleksion blandt de forekommende gær, således at kun den mest saltresistente stamme vokser frem på osteoverfladen.



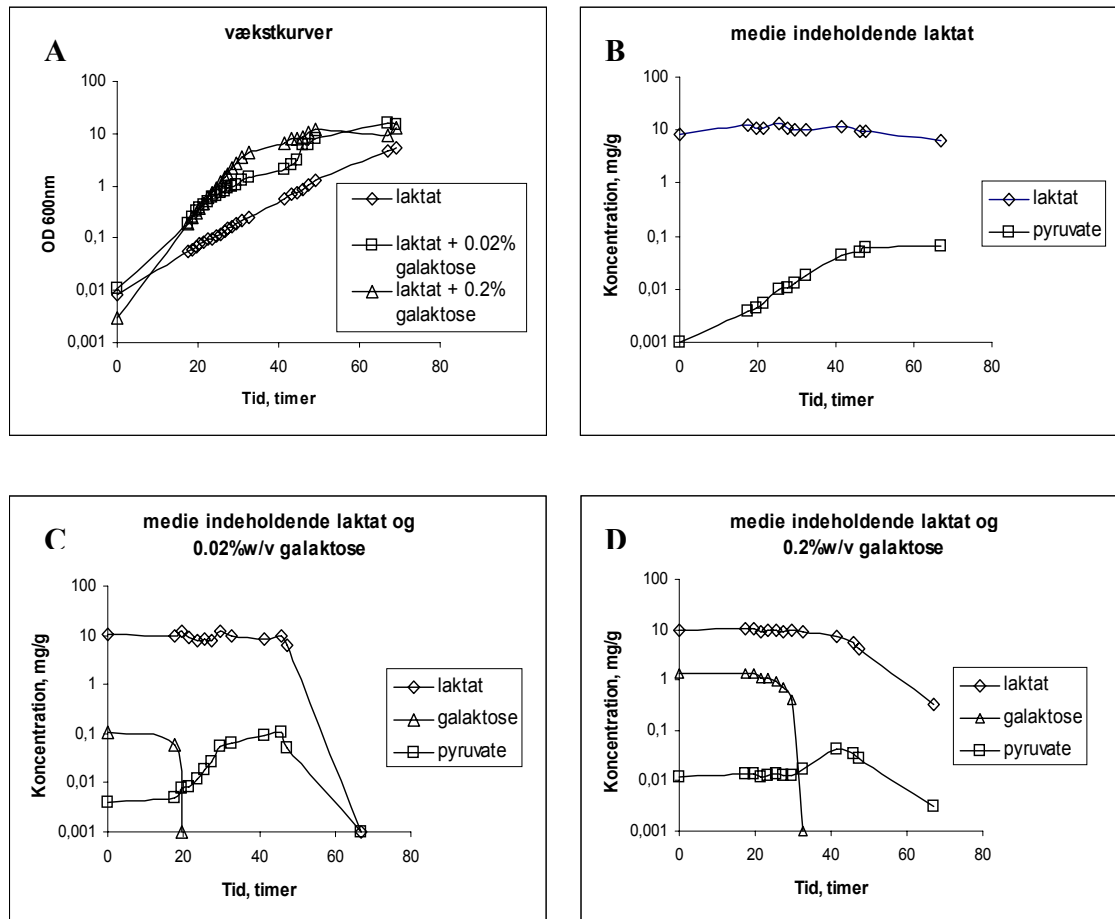
FIGUR 5. Fordoblingstiden for stammer af *D. hansenii*, starterkulturen (profil G, mtDNA RFLP) og den dominerende stamme (profil H, mtDNA RFLP), ved overfladevækst på mediet indeholdende 1 % (w/v) laktat med varierende pH og NaCl koncentrationer (Ref.: Petersen, K. M., Westall, S., and Jespersen, L. 2001. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of danish surface-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.* 85: 478-486).

2.4.3. Indflydelse af galaktose på vækst og laktatnedbrydning

Analysen foretaget på Arla Foods Innovationscenter Brabrand viste, at osteoverfladen indeholdt ca. 0,9 % (w/w) laktat og 0,02 % (w/w) galaktose. Vækstforsøg udført for den dominerende profil H viste at tilstedeværelse af 0,02 % (w/v) galaktose i mediet indeholdende 0,9 % (w/v) laktat resulterede i en kortere nølefasen og en forøgelse af væksthastigheden sammenlignet med substrat uden galaktose (Figur 6, A). Fordoblingstiden ved vækst på ren laktat var 7,4 timer, mens fordoblingstiden ved vækst på laktat tilsat 0,02 % (w/v) galaktose var 4,4 timer i den indledende vækstfase. Den positive effekt af galaktose øgedes med stigende saltkoncentration op til 10 % (w/v) NaCl (ikke vist).

Koncentrationer af laktat, galaktose og pyruvat i mediet blev løbende bestemt vha. HPLC. Figur 6B viser HPLC analyseresultater fra vækst af *D. hansenii* i medie med laktat som den eneste karbonkilde, mens Fig. 6C og Fig. 6D viser HPLC resultater fra vækst i medium som udover laktat indeholder galaktose i koncentrationerne hhv. 0,02% (w/v) og 0,2% (w/v). Tilstedeværelse af galaktose inhiberede laktatnedbrydningen (substratinhibering), hvilket kan ses udefra ændringer i pyruvatindhold (Fig. 6C og 6D). Imidlertid betød kombinationen af hurtigere vækst på galaktose og substratinhibering af laktatmetabolismen, at laktat blev hurtigst nedbrudt i medie med 0,02 % (w/v) galaktose sammenlignet med medier indeholdende ren laktat eller laktat med 0,2 % (w/v) galaktose. Da pH stiger i overfladen af osten under modning, bl.a., som følge af laktatnedbrydning,

må det formodes, at tilstedeværelse af små mængder galaktose i osten også vil fremskynde modningsprocessen.



FIGUR 6. Vækst af *D. hansenii* (stamme H) i Yeast Nitrogen Base (YNB) tilsat 0,9 % (w/v) laktat og varierende mængde af galaktose (A) samt udnyttelse af laktat, galaktose og pyruvate i mediet uden tilsætning af galaktose (B), med 0,02 % (w/v) galaktose (C), og med 0,2 % (w/v) galaktose (D) (Under offentliggørelse).

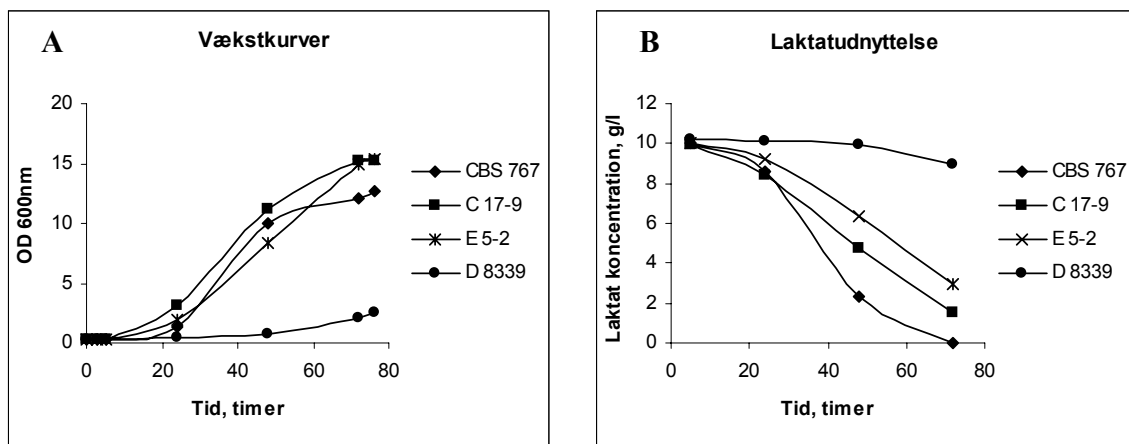
2.4.4. Delkonklusion

Ostemodningen indebærer en mikrobiel succession således at stammen af *D. hansenii* med den dominerende profil H udkonkurrerer de andre *D. hansenii* stammer. Stammen med profil H har højere salt- og pH tolerance samt vokser hurtigt på laktat og derfor tilpasser sig bedst i miljøet på osteoverfladen. Væksthastighed af den særlige stamme af *D. hansenii* kan forøges via tilsætning af små mængder af galaktose til et laktatholdigt medie. Denne sammenhæng kan formodentlig anvendes i osteproduktion for at fremme modningsprocessen.

2.5. Molekylærbiologisk karakterisering af laktatmetabolisme i *D. hansenii*

2.5.1. Laktatassimilering som selektionsfaktor for genekspressionstudier

Der var indsamlet 210 isolater af *D. hansenii* fra seks forskellige mejerier samt et antal af referencestammer fra CBS som blev undersøgt for deres evne til at assimilere laktat. Forsøget blev udført i laboratoriesubstrat med laktat som eneste karbonkilde. Vækst bestemt med spektroskopi, blev anvendt som et udtryk for evnen til at assimilere laktat. Væksthastigheden blev udregnet og benyttet som grupperingsfaktor. Fire stammer blev på det grundlag udvalgt til genekspressionstudier: en hurtigt voksende (C17-9), en middel (E5-2), en langsom (D8339) samt typestammen for *D. hansenii* (CBS767). Vækstkurver af udvalgte stammer på laktat og laktat forbrug under væksten er vist i Figur 7. Figuren viser store forskelle mellem stammerne i deres evne til udnyttelse af laktat.



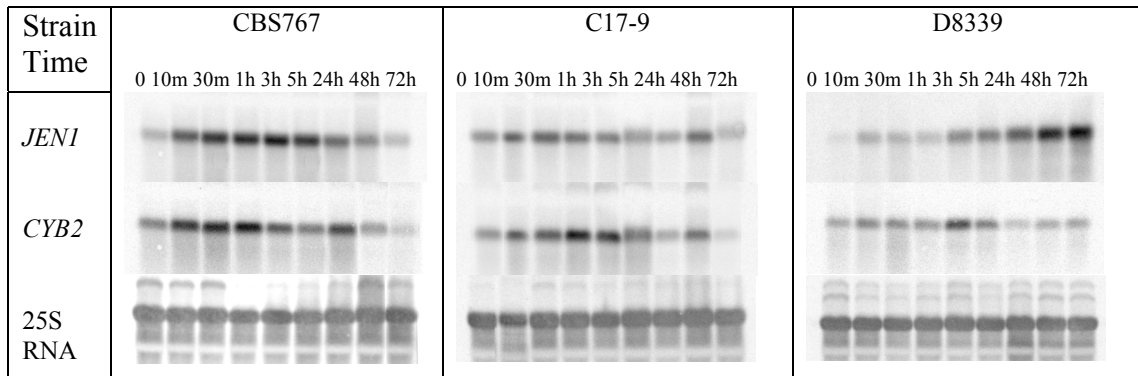
FIGUR 7. Vækst af *D. hansenii* stammer CBS767, C17-9, E5-2 og D8339 i Yeast Nitrogen Base med 1,0 % (w/v) laktat (A) og HPLC bestemmelse af laktat i mediet under væksten (B) (Under offentliggørelse).

2.5.2. Bestemmelse af genekspression ved Northern blotting

Udnyttelse af laktat i *D. hansenii* stammer på genniveau blev karakteriseret vha. Northern blotting. Genet *jen1* koder for laktatpermease, der er en membran protein som er ansvarlig for laktat optagelse i cellen. Genet *cyb2* koder for L-laktathydrogenase, som katalyserer omdannelsen af L-laktat til pyruvat. Udfra sekvenser deponeret i GeneBank blev der designet primere til amplifikation af *cyb2* med henblik på dannelse af prober til Northern blotting. Primere for *jen1* blev designet udefra kendte delvise sekvenser af genet i følgende gærarter: *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia angusta*, *Saccharomyces cerevisiae* samt *Yarrowia lipolytica*. Disse primere blev benyttet til at amplificere ca. 700 bp af genet *jen1* i *D. hansenii*. PCR produkter opnået for *cyb2* og *jen1* benyttedes som prober i Northern blotting.

Ekspressionen af *cyb2* og *jen1* i de udvalgte (afsnit 2.5.1) stammer af *D. hansenii* blev undersøgt under vækst på laktat som den eneste kulstofkilde. Resultaterne fra Northern analyse, som er vist i Figur 8, stemte overens med væksthastigheden og med hastigheden

af laktatnedbrydningen (Fig. 7B). For de stammer som voksede hurtigst (C17-9 og CBS767) var der også en tidlig stigning i ekspressionen af *cyb2* og *jen1*, med maksimum allerede 30 min efter podning. For den langsomt voksende stamme D8339 blev højest ekspression af *cyb2* først observeret 3 timer efter podning, mens *jen1* var kraftigere udtrykt 72 timer efter podning. Ekspressionsforskelle mellem stammerne var mest udpræget for *jen1*. Resultaterne af Northern blotting indikerer at forskelle i ekspressionsmønstre af *cyb2* og *jen1* kan anvendes til udvælgelse af gær til ostemodning.



FIGUR 8. Northern blot analyse af *jen1*, *cyb2* og 25S RNA fra forskellige stammer af *D. hansenii* (CBS767, C17-9 og D8339) under vækst i YNB mediet med 1 % (w/v) laktat som den eneste kulstofkilde (Under offentliggørelse).

2.5.3. Delkonklusion

D. hansenii stammer med forskellige evner til at udnytte laktat og dermed forskellig væksthastighed kan adskilles ifølge genekspressionsprofiler for laktatpermease (*jen1*) og L-laktathydrogenase (*cyb2*). Ekspression af *jen1* og *cyb2* starter tidligere i de hurtigt voksende stammer. Forskel i ekspressionsprofiler kan danne et grundlag for udvikling af en metode til vurdering af stammeaktivitet under ostemodning og udvælgelse af egnede starterkulturer med henblik på hurtig etablering af en stabil mikropopulation på ostens overflade, og dermed et hurtigere modningsforløb.

3. KONKLUSION

I projektet er der blevet udviklet og indkørt molekylærbiologiske metoder til differentiering af gær i ost på arts- og stammeniveau med fokus på *Debaryomyces hansenii*. Metoderne gjorde det muligt at finde frem til en ikke tidligere beskrevet stamme af *D. hansenii* med særlig gode egenskaber som starterkultur. For denne og andre stammer af *D. hansenii* er indflydelsen af forskellige miljøfaktorer på væksthastighed og laktatnedbrydning er blevet kortlagt. Sammenhæng mellem gærvækst og laktatmetabolisme blev endvidere belyst vha. genekspressionstudier. De vigtigste resultater kan punktvis opsummeres som følge:

- Gær i ost kan adskilles på speciesniveau vha. ITS-PCR, mens mtDNA RFLP, FTIR og PFGE er velegnede til differentiering af *D. hansenii* på stammeniveau
- Mikrobiel succession forekommer under ostemodning således at en bestemt stamme af *D. hansenii* udkonkurrerer de øvrige stammer. Den dominerende stamme vokser hurtigst i laktatholdigt medie samt tilpasser sig bedst under varierende pH, temperatur og saltkoncentrationer, svarende til forholdene under overflademodning af ost
- Saltindhold havde største effekt på gærvækst, mens temperatur og pH havde mindre betydning
- Tilsætning af 0,02 % (w/v) galaktose i medie med laktat som den eneste karbonkilde førte til kortere nøglefase samt hurtigere vækst på laktat
- Stammer med forskellige væksthastigheder havde forskellige genekspressionsprofiler af laktatpermease (*jen1*) og laktathydrogenase (*cyb2*). Stigning i ekspressionen af *jen1* og *cyb2* blev observeret tidligere i hurtigt voksede stammer.

Det kan således konkluderes, at det overordnede formål i projektet er opfyldt og de udviklede metoder til genotypning af gær samt opklarede nye fysiologiske og molekylærbiologiske aspekter omkring laktatmetabolisme i *Debaryomyces hansenii* kan anvendes til fordel af mejeriindustrien.

4. PERSPEKTIVERING

De udviklede metoder til differentiering af mejerirelevante gærarter kan anvendes til adskillelse og kontrol af starterkulturer samt til sporing af såvel den ønskede ledsageflora som uønskede kontaminanter gennem produktionskæden. Metoderne er egnede til implementering i større driftslaboratorier.

Endvidere i projektet er der blevet opklaret nye fysiologiske og molekylærbiologiske aspekter omkring *D. hansenii* vækstegenskaber samt laktatmetabolisme i afhængighed af proces tekniske miljøforhold. Kendskab til gærs fysiologiske egenskaber kan konkret udnyttes ved udvælgelse af gærstammer, der som starterkulturer kan indgå i et mere standardiseret ostekit til overflademodning af faste oste. Den opnåede viden kan således anvendes til optimering, styring og forudsigelse af modningsforløbet til sikring bedre og mere ensartet produktkvalitet.

5. RELATIONER TIL ANDRE MEJERIPROJEKTER

Projektet har forbindelse til igangværende projekter på IFV medfinansieret af Mejeribrugets ForskningsFond: ”Karakterisering af protein- og genekspression i *Debaryomyces hansenii* i afhængighed af mikrobielle stressfaktorer relevante for ostemodning ” (01.01.02 – 30.06.05) og ”Karakterisering af adhæsion og vækst af *Debaryomyces hansenii* på faste overflader” (01.12.01 – 31.05.05).

6. SAMARBEJDSPARTNERE

Professor **S. Scherer**, Technische Universität München, Institut für Mikrobiologie, Vöttinger Strasse 45, D-85350, Freising. Tlf.: (08161)713516, Fax: (08161)714512.

7. PUBLIKATIONER

Internationale publikationer

Petersen, K. M., Møller, P. L., and Jespersen, L. 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69:11-24.

Petersen, K. M., Westall, S., and Jespersen, L. 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of danish surface-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.* 85:478-486.

Masoud, W. and Jakobsen, M. 2003. Surface ripened cheeses: The effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. *Int. Dairy J.*, 13:231-237.

Petersen, K. M. and Jespersen, L. 2004. Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface ripened cheeses. *J. Appl. Microbiol.* 97:205-213.

Masoud, W. and Jakobsen, M. 2005. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *Int. Dairy J.* 15:69-77.

Nationale publikationer

Westall, S. and Petersen, K. M. 2001. Gærvækst på overflademodnede oste. *Mælkeritidende*, 114. årgang, 8-10.

Videnskabelige afhandlinger

Petersen, K.M., ph.d. thesis "Genotyping and regulation of lactate metabolism for strains of *Debaryomyces hansenii* related to surface ripened cheeses" (under udarbejdelse).

Præsentationer ved internationale kongresser

Petersen, K. M., Jespersen, L. and Jakobsen, M. 2000. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of surface ripened cheeses. "ISY 2000 - 10th International Symposium on Yeasts: The rising power of yeasts in science and industry" Arnhem, Holland. (Poster)

Petersen, K.M., Gori, K., Jensen, N.M. and Jespersen, L. 2002. Proteomic analysis on the yeast *Debaryomyces hansenii*. Functional Genomics, Munkebjerg, Vejle 23-24 maj 2002. (Poster)

Petersen, K. M., Westall, S., Jespersen, L. and Jakobsen, M. 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of danish surface-ripened cheeses. Food Micro, Lillehammer, Norge, 18-23. august 2002. (Poster)

Petersen, K.M., Jespersen, L. and Jakobsen, M. 2004. Characterisation of the lactate metabolism by gene expression studies of JEN1 and CYB2 in strains of *Debaryomyces hansenii* isolated during the production of Danish surface ripened cheeses. 11th International Congress on Yeasts, August 15-20, Rio de Janeiro, Brazil. (Poster)

Jakobsen, M. 2003. Yeasts in dairy products: interactions and their functional impacts. "ISY 2003 - 23th International Specialized Symposium on Yeasts: Interactions between yeasts and other organisms" 26-29 August, 2003 Budapest, Hungary. (Mundtlig fremlæggelse)

Jakobsen, M. and Jespersen, L. 2004. Novel microorganisms in dairy products. Food Micro 2004. 19th International Symposium. The International Committee on Food Microbiology and Hygiene. September 12-16, Portorož, Slovenia. (Mundtlig fremlæggelse)

8. UNDERVISNING

Ph.d.-studerende:

Kamilla Munk Petersen "Genotyping and regulation of lactate metabolism for strains of *Debaryomyces hansenii* related to surface ripened cheeses" (under udarbejdelse).

Specialestuderende:

Wafa Masoud "The surface microbiota of bacterial surface-ripened cheeses: Identification, growth potential and interaction".

Pia Christiansen "Mikrobielle interaktioner under overflademodning af ost".

Bachelorstuderende:

Stine K. Larsen og Terese Jensen "Intra- og interspecies kommunikation "small talk" mellem *Debaryomyces hansenii* and *Brevibacterium linens*".

Nikolaj Møller-Jensen "Application of PFGE in typing of *Debaryomyces hansenii* strains related to surface ripened cheese".

Pedro Ribeiro "Microbial interactions between *Debaryomyces hansenii* and *Brevibacterium linens* in surface-ripened cheese examined by Fluorescence Ratio Imaging Microscopy (FRIM)".

