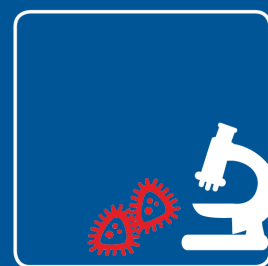


Lene Jespersen:

InBrine – Betydning af saltlagens mikrobiologi for ostekvalitet

InBrine - Influence of brine microbiota on flavour
development and inhibition of spoilage moulds on
Danish cheeses



Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

Dansk: InBrine – Betydning af saltlagens mikrobiologi for ostekvalitet

English: InBrine - Influence of brine microbiota on flavour development and inhibition of spoilage moulds on Danish cheeses

2. Projektleder

Lene Jespersen

Institut for Fødevarevidenskab, Mikrobiologi og Fermentering, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, +45 29354733, lj@food.ku.dk

3. Øvrige medarbejdere

Nils Arneborg, Institut for Fødevarevidenskab, Mikrobiologi og Fermentering, +45 35333266, na@food.ku.dk

Mikael Agerlin Petersen, Institut for Fødevarevidenskab, Design and Consumer Behavior, +45 35333243, map@food.ku.dk

Pernille Greve Johansen, Institut for Fødevarevidenskab, Mikrobiologi og Fermentering, +45 35320271, pernillejohansen@food.ku.dk

Chuchu Huang, Institut for Fødevarevidenskab, Mikrobiologi og Fermentering, ph.d.-studerende 2018-2021

Ling Zhang, Institut for Fødevarevidenskab, Mikrobiologi og Fermentering, ph.d.-studerende 2018-2021

Agnete Harboe, Institut for Fødevarevidenskab, Mikrobiologi og Fermentering, forskningsassistent 2017-2018

4. Finansieringskilder

Mælkeafgiftsfonden og egenfinansiering fra de deltagende parter.

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF-finansiering: 1. september 2017 – 31. december 2019

Evt. revideret: 1. september 2017 - 30. juni 2022

6. Projektresumé

Dansk:

Projektets hovedformål var at kortlægge og identificere saltlagens komplette mikrobiota og anvende denne til at optimere smagsudvikling og hæmme skimmelvækst på overflademodnede danske oste.

Adskillige halotolerante og halofile bakterier og gær er identificeret fra danske saltlager, og mejeriernes saltlage-mikrobiota adskilte sig fra hinanden, hvilket indikerer, at der på hvert mejeri findes en specifik saltlage-mikrobiota. Disse omfatter bakterier (f.eks. *Tetragenococcus muriaticus* og *Psychrobacter celer*, samt *Lactococcus lactis* og *Staphylococcus equorum*) og gær (f.eks. *Debaryomyces hansenii*, *Sterigmatomyces halophilus* og *Yamadazyma triangularis*). Sammenhænge mellem håndtering af saltlagerne på mejerierne og deres mikrobielle sammensætning blev fundet. Der blev blandt andet ikke fundet gær i saltlager fra mejeriet, der anvender mikrofiltrering; heller ikke gær, der har en positiv betydning for overflademodning af osten. Ud af de syv gærarter, som er isoleret fra saltlagerne, er alle, bortset fra *Candida intermedia*, i stand til at vokse under forhold, der minder om saltlagers (dvs. pH 5-6, 23 % (w/v) NaCl, 16 °C). Isolater af *S. equorum*, *D. hansenii* og *Y. triangularis* viste sig i stand til at vokse på ostemedier ved 16°C. Aminsyreoptag og produktionen af associerede aromakomponenter for de to gær *D. hansenii* og *Y. triangularis* blev påvirket af temperaturen og var afhængig af gærarten og stammen. F.eks. adskiller aromaprofilerne for *D. hansenii*-stammerne sig væsentligt fra *Y. triangularis*-stammerne. *D. hansenii* producerer især aldehyder, som giver en malt-/nøddeagtig smag samt højere alkoholer, som giver frugtig og rose smag. Stammer af *D. hansenii* kan hæmme især spiringen af skimmelsporer fra skimmelsvampe, der ofte isoleres på danske mejerier (*Cladosporium inversicolor*, *Cladosporium sinuosum*, *Fusarium avenaceum*, *Mucor racemosus* og *Penicillium roqueforti*). Der sås en væsentlig forskel på, hvor godt de forskellige arter af skimmelsvampe hæmmes. Særligt *C. inversicolor* og *P. roqueforti* hæmmes kraftigt, mens de andre skimmelararter hæmmes i ringe grad. Med *D. hansenii*-stammer tilsat saltlagen ses i pilotskala-forsøg en hæmning af væksten af *P. roqueforti* og *M. racemosus* på osteoverflader.

Den nye viden omkring saltlagernes mikrobielle sammensætning samt de positive effekter af naturligt forekommende mikroorganismer på smagsudvikling og hæmning af skimmelvækst, vil kunne omsættes til nyttig viden for mejerierne ift. saltlagehåndtering, samt give øget forståelse for de mikrobielle økosystemer, der eksisterer i mejerierne.

English:

The main objective of the project is to map and identify the entire brine microbiota in order to optimize flavour development and inhibition of spoilage moulds on surface ripened Danish cheeses.

The project has generated new knowledge on the positive effects of the inherent microorganisms of cheese brines from different Danish dairies. Several halotolerant and halophilic bacteria and yeasts were identified, and the microbiotas at the different dairies could be separated, indicating that each dairy had a specific brine microbiota. These include bacteria (e.g., *Tetragenococcus muriaticus* and *Psychrobacter celer*, as well as *Lactococcus lactis* and *Staphylococcus equorum*) and yeasts (e.g., *Debaryomyces hansenii*, *Sterigmatomyces halophilus*, and *Yamadazyma triangularis*). Brine-handling procedures at the dairies influenced the microbial composition. Among other things, no yeasts were found in the brines from the dairy that used microfiltration of the brine, not even yeast species being beneficial for surface maturation of cheeses. Among the seven yeast species isolated from the brines, all could grow in conditions mimicking the cheese brines (i.e., pH 5-6, 23% (w/v) NaCl, 16 °C), except *Candida intermedia*. Isolates of *S. equorum*, *D. hansenii*, and *Y. triangularis* were able to grow on cheese model media. Amino acid utilization by *D. hansenii* and *Y. triangularis* as well as their ability to produce associated aroma compounds were species and strain dependent and additionally affected by incubation temperature. The aroma profiles for the *D. hansenii* strains were e.g., different from those obtained for *Y. triangularis*. *D. hansenii* especially produces aldehydes, which are associated with malty/nutty flavors and higher alcohols associated with fruity and rose flavors. Strains of *D. hansenii* inhibited germination of spores of molds often isolated at Danish dairies (*Cladosporium inversicolor*, *Cladosporium sinuosum*,

Fusarium avenaceum, *Mucor racemosus*, and *Penicillium roqueforti*). The different mold species were inhibited markedly different. Especially, *C. inversicolor* and *P. roqueforti* were strongly inhibited, whereas the other mold species were only inhibited to a limited extent. When adding *D. hansenii* to cheese brines in pilot scale trials, *P. roqueforti* and *M. racemosus* growth on cheese model surfaces were inhibited.

The new knowledge on the brine microbiotas together with the positive effects of the naturally occurring microorganisms in terms of flavor development and inhibition of mold growth, could be translated into useful knowledge for the dairies as to brine handling, besides giving increased understanding of the microbial ecosystems existing in the dairies.

7. Projektets formål

Dansk:

Projektets hovedformål var at kortlægge og identificere saltlagens komplette mikrobiota og anvende denne til at optimere smagsudvikling og øge holdbarhed af danske oste. Dette opnås ved dels at optimere den eksisterende mikrobiota i forskellige typer af saltlage og dels ved at give mulighed for udvikling af nye sekundære starterkulturer til optimering af danske osters kvalitet. Projektet vil give ny viden om saltlagens betydning og indføre relevante måleparametre til løbende kontrol af saltlagen. Projektet var opdelt i fem arbejdsopgaver: AP1) kortlægning af saltlagers mikrobielle sammensætning ved hjælp af Illumina sekventering ("BriOmics"), isolering af ikke-kultiverbare mikroorganismer i saltlager samt etablering af en biobank for saltlagekulturer (Cheese Brine Culture Bank (CBCB)) på KU-FOOD; AP2) karakterisering af relevante teknologiske egenskaber for udvalgte mikroorganismer isoleret fra saltlager; AP3) undersøgelse af udvalgte saltlagekulturers betydning for ostens smagsudvikling; AP4) fysiologisk og genetisk afdækning af interaktionsmekanismer, som er relevante for optimal hæmning af uønsket skimmelvækst på osteoverflader og AP5) verificering af resultaterne ved fremstilling af overflademodnede oste i pilotanlæg og/eller under industrielle forhold, herunder opstilling af specifikke kriterier for optimal håndtering af saltlage. Kortlægningen af saltlagens mikrobiota og dens interaktioner på osteoverfladen havde til mål at skabe en ny dybere forståelse for saltningens betydning, muliggøre udvikling af nye potentielle sekundære starterkulturer samt frigøre et endnu uudnyttet potentiale for at øge ostekvaliteten gennem en optimeret smagsudvikling og hæmning af uønsket skimmelvækst.

English:

The main objective of the project was to map and identify the entire microbiota of brines used for salting of cheese and to optimise the brine to improve flavour development and through bio-protection to ensure the shelf life and quality of Danish cheeses. This will be pursued by optimising the existing brine microbiota and to use the obtained knowledge to develop new secondary starter cultures to enhance quality, shelf life and safety of the cheeses. Through the project new knowledge on the importance of the brine will be gained and relevant measures to continuously ensure brine quality will be implemented. The objective was achieved through five work packages: WP1) revealing the entire brine microbiota through Illumina sequencing ("BriOmics"), isolating non-culturable brine microorganisms and establishing a Cheese Brine Culture Bank (CBCB) at KU-FOOD; WP2) characterizing relevant technological properties of selected brine cultures; WP3) studying the impact of selected brine cultures on flavour development; WP4) understanding mechanisms of interactions, at both physiological and genomic levels, in order to ensure optimal inhibition of spoilage moulds on cheese surfaces and WP5) verifying the results by production of surface ripened semi-hard cheeses at pilot and/or industrial scales, including development of specific industrial recommendations for optimal brine handling. Revealing the full potential of the brine microbiota and its interactions on cheese surfaces leads to an increased understanding of the importance of brining; facilitate development of secondary starter cultures, and release an, as yet, unexplored potential for enhancing cheese quality, focusing on flavour development and inhibition of spoilage moulds.

8. Projektets baggrund

Etableringen af en funktionel mikrobiota på osteoverfladen er essentiel for ostens smagsudvikling. På samme vis fungerer den biofilm der dannes af mikrobiotaen på overfladen af oste som en effektiv barriere mod vækst af uønskede skimmelsvampe. Ostens overflademikrobiota stammer delvist fra den benyttede kitkultur, men også saltlagens mikrobiota kan bidrage til overflademikrobiotaen. Ud over den logiske konsekvens af saltning, nemlig at NaCl-indholdet på ostens overflade øges, så ved man meget lidt om, hvordan saltlagens mikrobiota påvirker ostekvaliteten. Tidligere studier i vores laboratorier, hvor vi har brugt molekylære "high throughput" teknologier, indikerede at mikrobiotaen på osteoverflader er delvist domineret af en marin mikroflora, som ikke stammer fra kitkulturen, og som er svære at dyrke på laboratoriemedierne der bliver brugt i dag. Yderligere, findes der kun få anvisninger omkring håndtering af saltlager, og konsekvenserne af f.eks. pasteurisering af saltlagen, øgning af pH eller ændringer i den kemiske sammensætning er stadig ikke fuldt ud forstået.

Dyrkning af mikroorganismer isoleret fra saltlager er indtil nu sket ved brug af vækstmedier suppleret med forskellige niveauer af NaCl, f.eks. Plate Count Agar med 5 % (w/v) NaCl (Feligini et al. 2012; Mounier et al. 2006) eller modificeret mælkeagar (Rademaker et al. 2005) til prokaryoter, samt MYGP eller Glucose Chloramphenicol Agar (Mounier et al. 2006; Petersen et al. 2002) til eukaryoter. Ved brug af disse medier har det kun været muligt at isolere få pro- og eukaryoter, f.eks. *Staphylococcus* spp., *Brevibacterium linens*, *Brachybacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Debaryomyces* sp. og *Kluyveromyces* spp. (Mounier et al. 2006; Feligini et al. 2012; Bokulich & Mills 2013). Denne fremgangsmåde overser sandsynligvis flere saltelskende mikroorganismer (Mounier et al. 2008) og er på mange måder en parallel til situationen omkring jordmikrobiotaen, hvor omkring 99% af alle arter ikke kan dyrkes ved brug af de konventionelle laboratorievækstmedier. Nyere studier, der har introduceret molekylære metoder så som Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)-teknikkerne og pyro-/Illumina sequencing, har påvist en langt mere kompleks mikrobiota på ostenes overflader, herunder særligt saltelskende prokaryoter (Gori et al. 2013). Vores resultater indikerer, at ikke-dyrkbare saltelskende bakterier udgør op til 20% af overflademikrobiotaen under modning af Danbo-oste (Ryssel et al. 2015). Dermed indikerer vores forskning, at saltlagerne på de danske mejerier kunne indeholde en endnu uudforsket gruppe af mikroorganismer, som kunne være helt essentielle for ostenes kvalitet. En passende og aktiv saltlage-mikrobiota er vigtig for den indledende udvikling af kitmikrofloraen i rødkitoste. Det er ligeledes et etableret faktum, at mikrobiotaen på ostens overflade har en væsentlig indflydelse på ostens smag (Gori et al. 2013; Rattray & Fox 1999; Sørensen et al. 2011). Imidlertid er det endnu uklart, hvilken rolle de enkelte arter spiller i forhold til smagsudviklingen, og hvilken betydning samspillet mellem arter har på ostes smagsudvikling (Gori et al. 2012). Etablering af en optimal overflademikrobiota er desuden vigtigt for at undgå uønsket skimmelvækst (Gori et al. 2011; Sørensen et al. 2011; Jaeger et al. 2002) og vækst af sygdomsfremkaldende bakterier, f.eks. *Listeria monocytogenes* (Gori et al. 2010), der fra tid til anden kontaminerer ostenes overflade.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Projektet bestod af fem arbejdsopgaver (AP). Specifikke milepæle (M) for hver AP er beskrevet i teksten herunder og i det opdaterede Gantt-kort.

AP1. Identifikation og isolering af saltlagens mikrobiota

Formål: At identificere saltlagens samlede mikrobiota og indsamle nye og relevante mikroorganismer (både pro- og eukaryoter), som ikke før er blevet studeret. Saltlage-prøver blev indsamlet fra danske mejerier og kulturer relevante for de efterfølgende arbejdsopgaver blev valgt sammen med projektets samarbejdspartnere.

Opgave 1.1. Saltlageindsamling: Prøver af saltlager (både traditionelle ikke-pasteuriserede, pasteuriserede og filtrerede og ufiltrerede) blev indsamlet fra danske mejerier, og deres historik blev registreret (f.eks. lagens alder, pH, °Baumé, temperatur og starterkultur tilsat, osv.).

Opgave 1.2 High-throughput sekventering (HTS) af pro- og eukaryoter: DNA blev ekstraheret fra udvalgte saltlage-prøver, hvorefter de undergik high throughput sekventering (HTS) med Illumina-plattformen. For prokaryotiske blev det brugt primere for V1-V3 regionen af 16S rRNA, mens der for eukaryoternes blev brugt primere for internal transcribed spacer (ITS)-regioner. Operationelle taksonomiske enheder (OTUs) blev identificeret og brugt til relative kvantificeringer af mikroorganismene i de forskellige saltlageprøver.

Opgave 1.3 Isolering af relevante mikroorganismer i saltlagen: Medie-sammensætning og procedurer for vækst af salttolerante og saltelskende pro- og eukaryoter blev udviklet ud fra tidligere benyttede medier til isolering af salttolerante og –elskende mikroorganismer og fra hyper-saltholdige marine- og fødevarer miljøer. De isolerede mikroorganismer blev identificeret vha. Sanger sekventering af V1-V3 regionen af 16S rRNA for prokaryoter og D1/D2 region af 26S rRNA for eukaryoter. Konservering af mikrobiel diversitet var et hovedformål med projektet, hvorfor de isolerede og identificerede organismer bliver opbevaret ved -80°C fryser og danner en ny "Cheese Brine Culture Bank (CBCB)".

- M 1.1. Procedure for ekstraktion af DNA fra saltlagen fastlagt (måned 9).
- M 1.2. Opdateret overblik over alle pro- og eukaryoter i traditionelle (ikke-pasteuriserede) og jævnlige pasteuriserede saltlager etableret (måned 18).
- M 1.3. Procedurer og medier til brug for isolation af relevante mikroorganismer etableret (måned 24).
- M 1.4. Isolater deponeret i Cheese Brine Culture Bank (CBCB) (måned 24).

AP2. Karakterisering af nye mikroorganismer fra saltlagen

Formål: At vurdere og karakterisere væksten af udvalgte pro- og eukaryotiske stammer, herunder at vurdere deres evne til at overkomme toksiske høje saltkoncentrationer.

Opgave 2.1. Vækstkaraktistika hos mikroorganismene fra saltlagen: Vækst af stammer blev undersøgt vha. medier, der blev udviklet og optimeret i Opgave 1.3. *Debaryomyces hansenii* og *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* blev benyttet som salttolerante/saltelskende referencestammer. Klassiske vækstparametre, så som specifik vækstrate, lagfase og morfologi, blev fulgt.

Opgave 2.2. Teknologiske egenskaber hos mikroorganismene fra saltlagen: Saltlagemikroorganismernes evne til at overleve, når de blev udsat for forskellige temperaturer, pH og NaCl-koncentrationer, blev undersøgt.

- M 2.1. Vækstprofiler karakteriseret (måned 18).
- M 2.2. Teknologiske egenskaber karakteriseret (måned 21).
- M 2.3. Unikke saltlage-kulturer udvalgt (måned 24).

AP3. Indvirkning af udvalgte saltlagekulturer på smagen i et ostemodellsystem

Formål: At evaluere udvalgte saltlage-stammer og kombinationer af stammer fra Cheese Brine Culture Bank (CBCB) (etableret i AP1) i forhold til deres sensoriske karakteristika i oste, herunder også kemiske analyser af ostesmag. Fokus var særligt på stammer, der bidrog positivt til smagsindtrykket.

Opgave 3.1. Optimering af propagering af saltlagekulturerne: Propageringsforhold for saltlagekulturer blev etableret for både nye og velkendte arter så som *Debaryomyces hansenii* og *Staphylococcus equorum*. Udvalgte kulturer blev optimeret til vækst på et ostemodellmedium med det mål at kunne vurdere deres påvirkning af ostesmag (Opgave 3.2).

Opgave 3.2. Smagsbidrag fra de udvalgte saltlagestammer: Flygtige forbindelser og andre relevante stoffer, der normalt forbindes med ostesmag, blev identificeret og kvantificeret fra enkeltstammekulturer, der havde vokset på et ostemodellmedium. Produktionen af flygtige stoffer blev screenet vha. dynamisk headspace gaskromatografi (DH-GC-MS). Koncentrationen af frie aminosyrer blev bestemt vha. standardmetoder.

Opgave 3.3. Ostesmag beskrevet fra et kemisk perspektiv: Formålet var at sammenligne resultaterne fra Opgave 3.2 med resultaterne fra Opgave 4.3 for at få et omfattende overblik over smagsdannelsen (herunder også mulige smagsfejl) i oste, i forhold til de benyttede saltlagekulturer og deres mikrobielle interaktioner.

- M 3.1. Saltlagekulturer og ostemodellmedie optimeret (måned 30).
- M 3.2. Smagsprofiler hos specifikke stammer identificeret (måned 42).
- M 3.3. Saltlagekulturernes indflydelse på ostesmagprofiler karakteriseret (måned 54).

AP4. Saltlagekulturernes evne til at hæmme skimmel

Formål: At evaluere saltlagemikroorganismernes egenskaber som biobeskyttende kulturer – ud fra et udvalg af pro- og/eller eukaryote saltlagestammer indsamlet og karakteriseret i de tidligere arbejdsplaner. Stammerne blev inkluderet for at få en forståelse af antagonistiske interaktioner mellem bakterier og gær fra saltlage og skimmelkontaminanter.

Opgave 4.1. Interaktionsstudier mellem saltlage-mikroorganismer og uønskede skimmelsvampe; indflydelse på spiring og sporedannelse: Studier blev gennemført ved brug af relevante uønskede danske osteskimmelsvampe-stammer. Effekten af skimmelantagoniske saltlage-stammer på spiring af skimmelsvampene blev studeret med oCelloScope™ Unisensor. Kulturer bestående af flere stammer blev undersøgt over tid for at følge interaktionerne mellem antagonisten (saltlagekulturen) og de uønskede skimmelsvampe. Endelig blev cellefrie supernatanter af skimmelsvampe-antagonister fra saltlagen undersøgt for deres evne til at forhindre spiring af uønskede skimmelsvampe.

Opgave 4.2. Identifikation af inhiberende stoffer, der modvirker uønsket skimmelvækst: Dynamisk headspace gaskromatografi massespektrometri (DH-GC-MS) blev brugt til at verificere potentielle inhibitoriske stoffer i cellefrie supernatanter indsamlet fra enkeltstamme kulturer fra saltlagerne. Kemometrisk analyse kombineret med statistik blev brugt til dybdegående analyse af de inhiberende stoffers natur.

- M 4.1. Indvirkning af udvalgte saltlagestammer på spiring af uønskede skimmelsvampe er undersøgt (måned 39).
- M 4.2. Typen af interaktioner mellem skimmelsvampe og saltlagekulturerne er identificeret (måned 45).
- M 4.3. Inhiberende stoffer produceret af antagonistiske saltlagekulturer er identificeret (måned 54).

AP5. Implementering af relevante saltlagekulturer i mejeriindustrien for at optimere ostekvaliteten

Mål: Den sidste arbejdsplan havde til formål at implementere og validere relevante resultater i pilotskala-forsøg på KU-FOOD, ved at teste særligt udvalgte kombinationer af stammer fra universitetets "Cheese Brine Culture Bank (CBCB)" i saltning af Danbo-oste og få valideret deres bidrag til forlængelse af holdbarhed. Implementering i industriel skala blev desværre umuliggjort pga. COVID-19.

Opgave 5.1. Implementering, propagering og validering af saltlagekulturer i pilotskala (KU-FOOD): Saltningeksperimenter med friske Danbo-oste blev gennemført for at undersøge effekten af saltlage-baserede kulturer på holdbarheden. Propageringsforhold blev optimeret. Evnen til at etablere sig på ostenes overflader blev verificeret. Der blev udtaget prøver af alle ostene igennem inkubationstiden for at validere kulturernes biokonserverende egenskaber.

- M 5.1. Implementering og validering af saltlage-kulturer i pilotskala (måned 63).

Opdateret Gantt-diagram for aktiviteterne på InBrine projektet

| | 2017 | | | | 2018 | | | | 2019 | | | | 2020 | | | | 2021 | | | | 2022 | |
|---|------|----|------|----|------|------|------|------|------|------|----|----|------|------|------|----|------|------|------|----|------|------|
| Kvartal | K1 | K2 | K3 | K4 | K1 | K2 | K3 | K4 | K1 | K2 | K3 | K4 | K1 | K2 | K3 | K4 | K1 | K2 | K3 | K4 | K1 | K2 |
| AP1 Identifikation og isolering | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.1 Saltlage indsamling | | | † | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.2 HTS af saltlage pro- and eukaryoter | | | | | | † | | † | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 Isolering af relevante saltlagemikroorganismer | | | | | | | | † | | | | | | | | | | | | | | |
| AP2 Karakterering af saltlagemikroorganismer | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.1 Vækstkarakteristika hos saltlagemikroorganismerne | | | | | | † | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.2. Teknologiske egenskaber | | | | | | | † | † | | | | | | | | | | | | | | |
| AP3 Saltlagekultures indflydelse på smagsudvikling | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3.1 Optimering af saltlagekulturer | | | | | | | | | | † | | | | | | | | | | | | |
| 3.2 Smagsanalyser af saltlagekulturer | | | | | | | | | | | | | | † | | | | | | | | |
| 3.3 Smagsanalyser af ostemodeller | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | † | | |
| AP4 Hæmning af skimmelkontaminanter | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4.1 Interaktionsstudier | | | | | | | | | | | | | | † | | | | | | | | |
| 4.2 Identifikation af inhiberende stoffer | | | | | | | | | | | | | | | † | | | | | † | | |
| AP5 Implementering i mejeriindustrien | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5.1 Validering i pilotskala | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | † |
| † Milepæle: | | | M1.1 | | | M1.2 | M1.3 | M1.4 | | M3.1 | | | M4.1 | M3.2 | M4.2 | | | M3.3 | M4.3 | | | M5.1 |
| | | | | | | M2.1 | M2.2 | M2.3 | | | | | | | | | | | | | | |

10. Afvigelser

Faglige afvigelser: AP4, opgave 4.3: Det blev ikke muligt at udføre metatranskriptomics på grund af begrænset adgang til laboratorier og mangel på materialer under COVID 19-pandemien.

AP5, opgave 5.2 Implementering af relevante saltlagekulturer til optimering af ostekvaliteten er kun til dels blevet udført. Vi har lavet pilotskala-forsøg på KU-FOOD med inhibering af mejerirelevante skimmelkontaminanter på osteoverflader ved tilsætning af stammer af *Debaryomyces hansenii* til saltlager.

Det var endvidere ikke muligt at lave forsøg på mejerierne under COVID-19 pandemien, hvilket gjorde at implementeringen af kulturerne på industrielt niveau ikke blev gennemført.

Økonomiske: Ingen.

Tidsmæssige afvigelser: Projektet er blevet forlænget af flere grunde. Under projektet har to medarbejdere haft barsel. Agnete Harboe Malskær (videnskabelig assistent) gik på barsel 25. september 2018 og Pernille Greve Johansen (postdoc) gik på barsel fra 6. februar 2020 til 19. oktober 2020. Desuden har COVID-19 forlænget planlægning samt udførelsen af det eksperimentelle arbejde for de to ph.d.-studerende på projektet.

11. Projektets resultater

AP1. Identifikation og isolering af saltlagens mikrobiota

Resultaterne fra AP1 er publiceret i Hastrup et al. 2018, International Journal of Food Microbiology 285, 173-187, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.015>

Opgave 1.1 Saltlageindsamling

Saltlagerne, der blev undersøgt i InBrine-projektet, blev indsamlet af to omgange fra fire forskellige danske mejerier, der alle producerer overflademodnede oste af Danbo-typen. Mejerier med forskellige håndteringer af saltlagerne blev udvalgt for at kunne kortlægge sammenhænge mellem disse og saltlagernes mikrobiologiske sammensætning. Se de forskellige mejeriers håndteringer af saltlagerne i Tabel 1.

Saltlagernes pH-værdi varierede fra 5,1 til 5,6, med et tørstofindhold fra 20 til 27% (w/w). Laktatindholdet lå fra 4,1 til 10,8 g/L og indholdet af frie aminosyrer var fra 65 til 224 mg/L.

Opgave 1.2 High-throughput sekventering af pro- og eukaryoter fra saltlagen 1.3 Isolering af relevante mikroorganismer i saltlagen og opgave

Antallet af isolerede mikroorganismer varierede mellem mejerier. I alt blev 31 arter af bakterier eller eukaryoter isoleret på de fem medier, der blev anvendt. Høje celletal ($\geq 6,0$ log CFU/mL) forekom for de to saltelskende bakterier *Tetragenococcus muriaticus* og *Psychrobacter celer*, mens celletal mellem $\geq 4,5$ and $< 6,0$ log CFU/mL sås for en række bakterier (*Lactococcus lactis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus hominis*, *Chromohalobacter beijerinckii*, *Chromohalobacter japonicus* og *Microbacterium maritypicum*). Blandt gær fandtes kun høje celletal (≥ 3.5 log CFU/mL) for *Debaryomyces hansenii*. Nogle af de isolerede mikroorganismer er velkendte i Danbo-ost, f.eks. gæren *Debaryomyces hansenii* eller bakterien *Staphylococcus equorum*, mens andre mest er kendt fra marine miljøer eller fermenterede fisk. Kun to arter blev fundet på alle mejerier (*L. lactis* og *T. halophilus*); yderligere blev 16 bakterie- og 4 eukaryotarter kun isoleret fra et enkelt mejeri. Mikroorganismer fra DL-starterkulturen, som bruges til Danbo-fremstilling, blev også isoleret (*L. lactis* og *Leuconostoc mesenteroides*). Højest sandsynligt findes disse indkapslet i ostekorn, der brækker af

under saltningen, og de er derved beskyttet fra saltlagernes hårde miljø. Yderligere blev seks arter af *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. fleurettii*, *S. hominis*, *S. pasteurii* and *S. warneri*) isoleret fra alle saltlager, undtagen på mejeri "D" der anvender mikrofiltrering.

Table 1. Karakteristika for de fire mejerier der producerer semi-hårde Danbo oste.

| Dairy (Samples) | Capacity at dairy per year | NaCl concentration in the brine | Circulation | Filtration | Additions to the brine | Storage |
|---|----------------------------|--|--|---|---|---|
| A* (A1 [†] , A2) | 12,000 t | NaCl added on a regular basis to a level close to saturation | No | No filtration | None | Brines are kept in 35 vats |
| B (B1 [†] , B2 ^{††}) | 45,000 t | Adjusted daily to 21-22°Bé (app. 22.2-23.3% (w/w)) | Circulation once per batch | Coarse filtration once per batch | None | Brines are kept in two separate holding tanks (B1 and B2) |
| C (C1 [†] , C2 ^{††}) | 100,000 t | Adjusted daily to 20-22°Bé (app. 21.1-23.2% (w/w)) | Constant circulation during brining | Coarse filtration when in use | pH adjusted to 5.1-5.3 with lactic acid. <i>S. equorum</i> and <i>D. hansenii</i> commercial starter cultures occasionally added | Brines are kept in two separate holding tanks (C1 and C2) |
| D (D1 [†]) | 500,000 t | Adjusted daily to 21°Bé, app. 22.2% (w/w) | Circulated into smaller vats when in use | Ongoing coarse filtration. Microfiltration once every second week. | pH adjusted to 5.4-5.5 with lactic acid. CaCl ₂ is added. <i>B. linens</i> commercial starter culture occasionally added. | The brine is kept in a holding tank. |

Samples were taken from representative vats at Dairy A. [†] from a vat used for conventional cheese production or ^{††} from a vat used for organic cheese production. °Bé: degree Baumé.

Med amplikonsekventering (high-throughput sequencing) kunne mejerierne adskilles fra hinanden, hvilket indikerer, at der på mejerierne findes specifikke mikrobielle sammensætninger i deres saltlager. En række bakterier blev kun identificeret med sekventering (18 slægter/arter af Proteobakterier); dog udgjorde alle disse en mindre del af mikrobiotaen.

Vi fandt sammenhænge mellem mejeriernes håndtering af saltlagerne og den mikrobielle sammensætning. Saltlagen, som mikrofiltreres, havde både den laveste diversitet og en anderledes sammensætning af mikroorganismer. I modsætning til de andre saltlager indeholdt denne ingen gær (< 2.0 log CFU/mL) eller *Staphylococcus*-arter, hvilket tyder på, at mikrofiltrering effektivt fjerner visse mikroorganismer. Dette er dog ikke nødvendigvis en fordel, da både *S. equorum* og gær som *D. hansenii* spiller en vigtig rolle i etableringen af kitlaget og bidrager til smagsdannelsen under modningen.

Målet om at finde sammenhænge mellem saltlagehåndtering og mikrobiel sammensætning blev således kortlagt i AP1.

AP2. Karakterisering af nye mikroorganismer fra saltlagen

Opgave 2.1. Vækstkarakteristika hos mikroorganismene fra saltlagen

Resultaterne for gær er publiceret i: Zhang et al., 2020, Current Microbiology 77:3377–3384, <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02185-y>

Vækst og overlevelse blev undersøgt for 20 gærstammer isoleret fra saltlager tilhørende arterne *Candida intermedia* (2 stammer), *Debaryomyces hansenii* (11 stammer), *Kluyveromyces lactis* (1 stamme), *Papiliotrema flavescens* (1

stamme), *Rhodotorula glutinis* (1 stamme), *Sterigmatomyces halophilus* (2 stammer) and *Yamadazyma triangularis* (2 stammer).

Alle 20 stammer kunne gro under forhold, der minder om osteoverflader (medie med 4% (w/v) NaCl), med højest vækst ved 25 °C sammenlignet med 16 °C. Yderligere kunne alle gær på nær *C. intermedia* gro under forhold, der minder om saltlagers (medie med 23% (w/v) NaCl med 6,3 g/L laktat) ved 16 °C, mens kun én stamme af *D. hansenii* (KU-9) kunne gro ved 25 °C.

Tre gær (*D. hansenii*, *S. halophilus* og *Y. triangularis*) kunne overleve 13,5 dage ved 25 °C i medie med 23% (w/v) NaCl, hvor *Y. triangularis* viste sig at være den mest salttolerante. *D. hansenii* og *S. termophilus* viste først en nedgang i celledetal, hvorefter de steg igen, hvilket kunne tyde på, at der findes en salttolerant subpopulation. De resterende gærarter overlevede under 7 dage under disse betingelser. Disse resultater blev brugt til udvælgelsen af gær, der indgik i AP3-5.

Væksten af to *Staphylococcus equorum* isolater (KU-52 og KU-64) på osteagar-modeller blev testet med 4% og 8% (w/v) NaCl ved 16°C, 25°C og 30°C. Der sås forskel mellem de to stammers evne til at vokse på modellerne, således at KU-52 voksede bedst ved alle saltkoncentrationer og temperaturer, mens KU-64 kun havde svag vækst på osteagar-modeller ved 25°C på 4% (w/v) og ved 30°C på 4% og 8% (w/v) NaCl. Yderligere viste *S. equorum* KU-52 sig i stand til at vokse langsomt under forhold, der minder om saltlagers (tryptic soy broth med 23% (w/v) NaCl over 55 timer).

Opgave 2.2 Teknologiske egenskaber hos mikroorganismene fra saltlagen

Resultaterne er publiceret i: Huang et al., 2021, *Frontiers in Microbiology*, 12:662785.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662785> og Zhang et al., 2021, *International Dairy Journal* 121, 105135, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105135>

Blandt de 11 *D. hansenii*-stammer isoleret fra saltlagerne sås genetisk diversitet. Således havde ni af stammerne unikke kromosomprofiler, mens kun to havde identiske profiler. De to stammer fra mejeri "C" klyngede sammen, mens stammerne fra mejeri "A" og "B" ikke kunne skilles fra hinanden. Dette gav et indblik i diversiteten af *D. hansenii* stammerne, og gjorde det relevant at teste flere af dem i AP3-5.

Under vækst på ostemedier kunne både *D. hansenii* og *Y. triangularis* hæve pH-værdien signifikant, til hhv. 8,2-9,1 og 7,5-7,7. Dette er et vigtigt karakteristikum, der er nødvendigt for, at væsentlige smagsdannende mikroorganismer som *Staphylococcus* arter og coryneforme bakterier kan gro i osteoverfladernes kitlag.

AP3. Indvirkning af udvalgte saltlagekulturer på smagen i et ostemodellsystem

Opgave 3.1 Optimering af propagering af saltlagekulturerne

Vækst på ostemedie blev optimeret for udvalgte stammer af *D. hansenii* (stamme KU-78 og KU-80) og *Y. triangularis* (KU-74 og KU-76) til forsøgene omkring indflydelsen på aromadannelse udført i task 3.2 og 3.3.

Opgave 3.2 Smagsbidrag fra de udvalgte saltlagestammer og Opgave 3.3 Ostesmag beskrevet fra et kemisk perspektiv

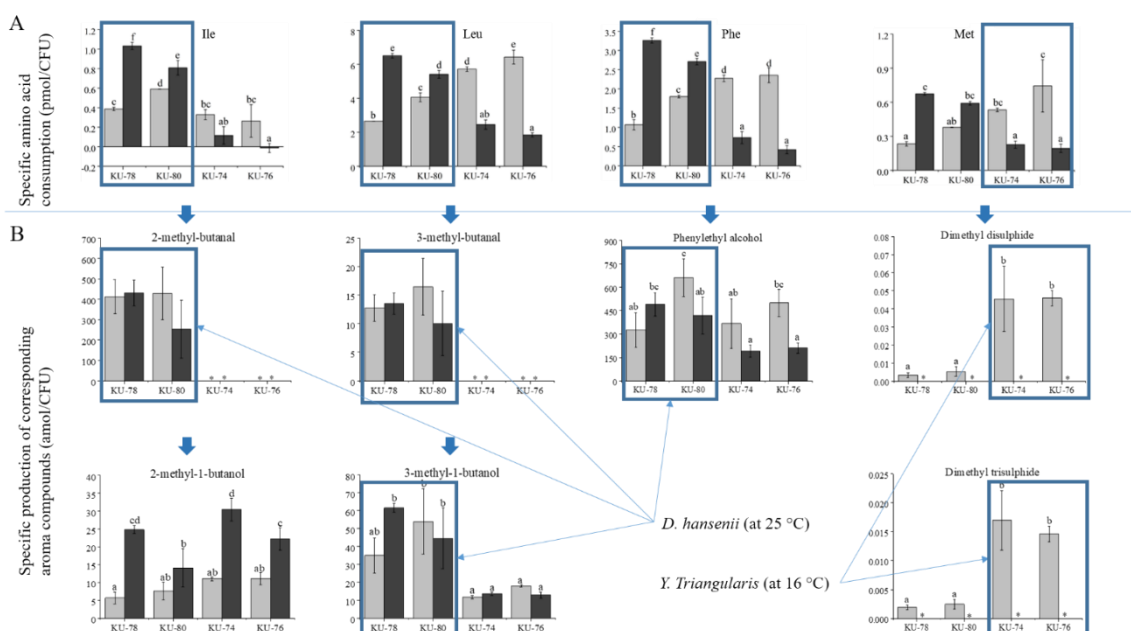
Resultaterne er publiceret i: Zhang et al., 2021, *International Dairy Journal* 121, 105135, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105135>

Aminosyreudnyttelsen samt dannelsen af afledte aromastoffer blev undersøgt i ostemedie for to stammer af hhv. *D. hansenii* (KU-78 og KU-80) og *Y. triangularis* (KU-74 og KU-76) ved 16 °C og 25 °C, svarende til hhv. temperaturen i starten af ostemodning samt optimal væksttemperatur. Det specifikke aminosyreoptag for to de gær var arts- og stammeafhængig, og også påvirket af inkuberingstemperaturen. *D. hansenii* havde generelt et højere aminosyreoptag

ved 25 °C, mens det for *Y. triangularis* var højest ved 16 °C. Aminosyreoptaget relaterede sig til aminosyretilgængeligheden i ostemedierne, og alle aminosyrer var under 600 mmol kg⁻¹ til start og aftog efter vækst.

I forhold til dannelsen af afledte aromastoffer kunne det ses, at *D. hansenii* ved 25 °C især optog isoleucin, leucin og phenylalanin og producerede deres afledte aromakomponenter hhv. 2- og 3-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, og 2-phenylethanol. De endelige koncentrationer af disse aromakomponenter var alle signifikant øgede efter vækst af *D. hansenii* og over smagsgrænserværdien. Dette indikerer, at *D. hansenii* vil kunne bidrage med malt-, nødde-, frugtige og rosa smagsnoter. *Y. triangularis* producerede især de to sulfatholdige aromakomponenter (dimetyl disulfid og dimetyl trisulfid) og optog mere af deres prekursor, methionin. Disse to komponenter er associeret med behagelige oste- og hvidløgssmagsnoter i modnede oste, dog blev de produceret i koncentrationer under deres smagsgrænserværdi. Se figur 1.

Det er første gang, at aminosyreoptag og produktion af afledte smagskomponenter er blevet undersøgt for disse gær i en ostesammenhæng. Resultaterne opfylder målet om at få en øget forståelse af gærenes aminosyreanvendelse og produktionen af afledte aromakomponenter.



Figur 1. For *Debaryomyces hansenii* (KU-78 og KU-80) og *Yamadamyces triangularis* (KU-74 og KU-76) ved vækst på ostemedie ved hhv. 16 °C (lysegrå kolonner) og 25 °C (mørkegrå kolonner) er følgende målt: A) Specifikt optag af aminosyrerne isoleucin (Ile), leucin (Leu), phenylalanin (Phe) og methionin (Met). B) Specifik produktion af afledte aromakomponenter. Fremhævet med blå kasser er de aminosyrer og deres afledte aromakomponenter som forekom i signifikant ($P > 0.05$) forskellige mængder mellem de to gærarter.

AP4. Saltlagekulturernes evne til at hindre skimmelvækst

Resultaterne fra AP4 er publiceret i: Huang et al., 2021, *Frontiers in Microbiology*, 12:662785.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662785>

Opgave 4.1. Interaktionsstudier mellem saltlage-mikroorganismer og uønskede skimmelsvampe; indflydelse på spiring og sporedannelse

Cellefrie supernatanter fra 11 stammer af *D. hansenii* kunne hæmme især spiringen af skimmelsporer fra skimmelsvampe, der ofte isoleres på Danske mejerier (*Cladosporium inversicolor*, *Cladosporium sinuosum*, *Fusarium avenaceum*, *Mucor racemosus* og *Penicillium roqueforti*). De forskellige arter af skimmelsvampe blev hæmmet i forskellig

grad. Særligt *C. inversicolor* hæmmedes kraftigt med spiringsratioer under 5%. For *P. roqueforti* sås også en effektiv hæmning af spiring, især for *D. hansenii*-stammerne KU-9 og KU-11 (på hhv. 9,5% og 6,8%) sammenlignet med de andre stammer (13,7-33,8%). Derimod blev spiring for de andre undersøgte skimmelararter kun hæmnet i ringe grad. Se Tabel 2.

I forhold til mycelievæksthastigheder var effekten af de cellefrie supernatanter fra de 11 *D. hansenii*-stammer mindre. Den største hæmning sås igen for *C. inversicolor* på 69,3%, mens kun ringe hæmning blev observeret for *P. roqueforti* (83,0%) og *M. racemosus* (86,8%) og ingen hæmning for *C. sinuosum* og *F. avenaceum*. Se Tabel 2.

Tabel 2. Spiringsratioer (%) og mycelievæksthastigheder (μ /h) af skimmelsvampe ved tilstedeværelsen af cellefrie supernatanter af *D. hansenii* sammenlignet med kontrollen (uden cellefrie supernatanter).

| PFGE cluster | Mold species | <i>D. hansenii</i> strains | | | | | | | | | | | Average |
|-------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| | | I | I | II | II | II | II | III | III | IV | IV | IV | |
| Mold growth | Mold species | KU-78 | KU-80 | KU-12 | KU-30 | KU-9 | KU-72 | KU-11 | KU-28 | KU-10 | KU-29 | KU-27 | Average |
| Germination ratio | <i>C. inversicolor</i> | 0.4 ± 0.4 ^a | 0.0 ± 0.0 | 0.8 ± 0.4 ^{ab} | 0.8 ± 0.8 ^{ab} | 4.5 ± 0.6 ^d | 0.4 ± 0.4 ^a | 1.9 ± 0.4 ^{bc} | 1.9 ± 1.1 ^{bc} | 1.4 ± 0.9 ^{abc} | 1.1 ± 0.0 ^{ab} | 0.4 ± 0.4 ^a | 1.2 ± 1.5 |
| | <i>C. sinuosum</i> | 74.6 ± 6.6 ^{ab} | 91.6 ± 12.6 ^{bcd} | 83.6 ± 6.5 ^{abc} | 98.3 ± 18.3 ^{bcd} | 82.0 ± 26.0 ^{abc} | 86.7 ± 2.2 ^{bc} | 74.6 ± 11.1 ^{ab} | 88.7 ± 1.1 ^{bc} | 67.3 ± 11.0 ^s | 86.9 ± 5.9 ^{cc} | 77.9 ± 11.0 ^{ab} | 82.9 ± 19.6 |
| | <i>F. avenaceum</i> | 102.6 ± 2.1 ^{bc} | 96.1 ± 3.6 ^{ca} | 99.6 ± 0.5 ^{ab} | 97.3 ± 4.1 ^{ca} | 98.8 ± 4.4 ^{ab} | 98.4 ± 2.3 ^{ab} | 99.4 ± 4.0 ^{ab} | 100.6 ± 2.8 ^{ab} | 102.7 ± 1.1 ^b | 99.3 ± 2.8 ^{ab} | 97.5 ± 2.6 ^{ca} | 99.3 ± 4.8 |
| | <i>M. racemosus</i> | 103.8 ± 1.2 ^{bc} | 100.8 ± 2.9 ^{bc} | 100.3 ± 1.9 ^b | 104.0 ± 1.0 ^c | 101.9 ± 1.0 ^{bc} | 104.5 ± 3.3 ^c | 92.8 ± 2.3 ^a | 101.4 ± 1.8 ^{bc} | 103.6 ± 3.9 ^{bc} | 99.0 ± 2.9 ^b | 105.2 ± 3.1 ^c | 101.6 ± 4.9 |
| | <i>P. roqueforti</i> | 16.2 ± 0.6 ^{cc} | 27.3 ± 5.4 ^{cd} | 14.9 ± 1.3 ^b | 20.2 ± 4.1 ^c | 9.5 ± 2.9 ^{ab} | 13.7 ± 2.9 ^b | 6.8 ± 0.5 ^a | 20.0 ± 2.3 ^c | 26.1 ± 1.4 ^{cc} | 33.1 ± 6.8 ^c | 33.8 ± 4.8 ^d | 20.2 ± 11.4 |
| Growth rate | <i>C. inversicolor</i> | 56.7 ± 14.0 ^{bc} | 50.9 ± 8.2 ^a | 79.8 ± 14.5 ^{abcd} | 78.1 ± 8.2 ^{abcd} | 59.7 ± 7.7 ^{ab} | 71.5 ± 9.2 ^{abcd} | 64.1 ± 6.0 ^{abcd} | 80.6 ± 11.9 ^{cd} | 63.4 ± 6.3 ^{abcd} | 75.5 ± 11.9 ^{abcd} | 78.0 ± 11.4 ^{abcd} | 69.3 ± 13.6 |
| | <i>C. sinuosum</i> | 98.0 ± 6.9 ^a | 104.2 ± 4.4 ^{abc} | 102.9 ± 3.7 ^{abc} | 106.8 ± 5.5 ^{abc} | 102.9 ± 3.7 ^{abc} | 111.7 ± 7.8 ^c | 99.5 ± 5.8 ^{ab} | 100.5 ± 6.3 ^{abc} | 101.3 ± 7.9 ^{abc} | 98.8 ± 4.4 ^a | 99.5 ± 5.8 ^{ab} | 102.4 ± 6.6 |
| | <i>F. avenaceum</i> | 109.5 ± 4.8 ^d | 96.1 ± 5.9 ^{ab} | 102.9 ± 5.9 ^{abcd} | 99.1 ± 4.1 ^{abcd} | 104.1 ± 5.3 ^{abcd} | 100.5 ± 2.5 ^{abc} | 92.1 ± 5.9 ^a | 100.0 ± 1.0 ^{abcd} | 109.6 ± 6.0 ^d | 100.6 ± 4.2 ^{abcd} | 103.7 ± 6.0 ^{abcd} | 101.9 ± 6.8 |
| | <i>M. racemosus</i> | 90.2 ± 4.6 ^{cc} | 83.1 ± 11.3 ^{abc} | 91.2 ± 4.5 ^c | 90.3 ± 2.2 ^{bc} | 82.2 ± 10.3 ^{abc} | 90.2 ± 3.5 ^{bc} | 75.8 ± 9.8 ^a | 87.5 ± 1.6 ^{abc} | 89.0 ± 3.9 ^{bc} | 86.8 ± 4.1 ^{abc} | 87.9 ± 4.5 ^{abc} | 86.8 ± 7.4 |
| | <i>P. roqueforti</i> | 85.7 ± 3.5 ^{cd} | 84.9 ± 3.7 ^{cd} | 86.0 ± 4.1 ^{cd} | 86.0 ± 2.7 ^{cd} | 70.0 ± 6.1 ^a | 83.0 ± 6.2 ^{bcd} | 77.0 ± 6.3 ^{ab} | 82.0 ± 4.0 ^{bcd} | 85.0 ± 2.3 ^{bcd} | 85.5 ± 3.4 ^{cd} | 88.0 ± 3.1 ^d | 83.0 ± 6.3 |

Values in the same row marked by different lowercase letters are significantly different using one-way ANOVA with Duncan's test ($\geq 95\%$ confidence, $n = 6$). Clusters are based on chromosome polymorphism between the stains as determined by PFGE.

Opgave 4.2 Identifikation af inhiberende stoffer, der modvirker uønsket skimmelvækst

For at undersøge mekanismerne bag skimmelhæmningen blev flygtige komponenter produceret af de 11 *D. hansenii*-stammer ved stationær vækst bestemt. I alt blev 71 komponenter detekteret, herunder 6 syrer, 22 alkoholer, 15 aldehyder, 3 benzenderivater, 8 estere, 3 heterocykliske komponenter, 12 ketoner og 2 phenoler. Variationer i de flygtige forbindelser forekom mellem *D. hansenii*-stammerne.

Spearman's korrelationsrangering blev brugt til at finde sammenhænge mellem flygtige forbindelser og skimmelhæmning. Fem flygtige forbindelser viste stærk korrelation til skimmelhæmning for *C. inversicolor* og *P. roqueforti*. Disse blev testet for effektiviteten af hæmningen. Her blev det fundet, at 3-metylbutansyre havde den stærkeste hæmning af både spiring og mycelievækst for de to skimmelararter med en hæmning på 50% ved koncentrationer på hhv. 10^{-5} og 10^{-4} mol/L. 2-phenylethanol og eddikesyre viste også god hæmning med 50% ved 10^{-3} mol/L. 2-pentanone og acetone gav kun en lille hæmning, se Tabel 3.

Tabel 3. Koncentrationen af forskellige flygtige komponenter (volatile compounds) der inhiberer til 50% spiring og mycelievækst af *C. inversicolor* og *P. roqueforti*.

| Mold growth | Volatile compounds | <i>IC</i> ₅₀ (mol/L) | |
|----------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| | | <i>C. inversicolor</i> | <i>P. roqueforti</i> |
| Germination ratio | Acetic acid | 2.47×10^{-3} | 2.80×10^{-3} |
| | 3-methylbutanoic acid | 9.53×10^{-6} | 2.00×10^{-4} |
| | Acetone | >1 | 9.21×10^{-2} |
| | 2-pentanone | 1.06×10^{-2} | 2.60×10^{-2} |
| | 2-phenylethanol | 1.99×10^{-3} | 1.73×10^{-3} |
| Mycelium growth rate | Acetic acid | 1.35×10^{-3} | 1.19×10^{-3} |
| | 3-methylbutanoic acid | 6.32×10^{-6} | 2.67×10^{-4} |
| | Acetone | >1 | >1 |
| | 2-pentanone | 9.45×10^{-1} | 9.51×10^{-1} |
| | 2-phenylethanol | 7.49×10^{-3} | 3.45×10^{-3} |

Resultaterne fra AP4 viser, at stammer af *D. hansenii* fra saltlagerne har en hidtil uudforsket rolle i naturlig beskyttelse mod skimmelvækst, og de opfylder målet om at finde biobeskyttende mikroorganismer fra saltlagerne. Disse vil i fremtiden kunne være brugbare i forhold til biokontrol af uønskede skimmelsvampe i osteproduktion.

AP5. Implementering af relevante saltlagekulturer i mejeriindustrien for at optimere ostekvaliteten

Opgave 5.1 Implementering, propagering og validering af saltlagekulturer i pilotskala (KU-FOOD)

For at teste skimmelhæmningen i pilotskala blev ostemodeller lagt i saltlager (steriliseret 23% NaCl (w/v), pH 5,4 justeret med mælkesyre) der var inokuleret med 10^6 CFU/mL af hhv. *D. hansenii*-stamme KU-9, KU-11 eller KU-29. Kontroloste lå i saltlager uden *D. hansenii*. Efter saltning blev osteoverfladerne spot-inokuleret med 50 sporer af hhv. *P. roqueforti* eller *M. racemosus*. Ostene blev inkuberet op til 14 dage ved 16 °C med visuelle inspektioner af skimmelvækst på overfladerne.

Der sås mindre skimmelvækst på de oste, der var blevet saltet med *D. hansenii* i saltlagen sammenlignet med kontrolterne uden *D. hansenii* i saltlagerne. Yderligere sås det, at *D. hansenii*-stammerne gav forskellig hæmning. Den kraftigste hæmning sås for *P. roqueforti*, hvor væksten blev fuldstændig forsinket med op til ca. 7 dage med *D. hansenii* KU-29 i saltlagen. For *M. racemosus* var væksten ligeledes lavere på oste med *D. hansenii*-stammerne i saltlagen, især for KU-9 og KU-11.

Yderligere blev væksten af de tre *D. hansenii*-stammer på osteoverfladerne bestemt på dag 1 og dag 7. Celletallene for dag 1 lå mellem $4,1 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$ til $6,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$ CFU/g. Disse resultater indikerer, at *D. hansenii*-stammerne havde gode fasthæftningsegenskaber, idet de blev tilsat til saltlagerne i suspension og kunne fæstne sig til osteoverfladerne i løbet af saltningen (1 time). På dag 7 sås signifikant højere celletal $1,2 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ til $4,9 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ CFU/g, hvilket indikerer, at *D. hansenii*-stammerne kunne gro på osteoverfladerne i løbet af inkuberingsperioden.

Resultaterne fra AP5 peger på, at stammer af *D. hansenii* kan bruges som biokonserverende mikroorganismer i mejeriindustrien, f.eks. som tilsætningskulturer til saltlager.

Overordnet konklusion:

InBrine-projektet formåede at kortlægge den komplette mikrobiota i danske saltlager fra fire danske mejerier, der håndterer deres saltlager forskelligt. Adskillige saltelskende mikroorganismer blev identificeret, herunder *Tetragococcus muraticus*, *Psychrobacter celer* og *Debaryomyces hansenii* samt bakterierne *Lactococcus lactis* og *Staphylococcus equorum*. Mikroorganismer fra DL-starterkulturen blev også isoleret fra saltlagerne (*L. lactis* og *Leuconostoc mesenteroides*); disse stammer højst sandsynligt fra afbrækkede ostekorn og kan i et vist omfang overleve, så længe de er indkapslet i ostematrixen, hvor saltkoncentrationen ikke er for høj. Mejeriernes saltlage-mikrobiota adskilte sig fra hinanden, hvilket indikerer, at der findes en specifik mikrobiel sammensætning på de enkelte mejerier. Den mikrobielle sammensætning i saltlagerne blev påvirket af mejeriernes håndtering af saltlagerne. Saltlagen, som mikrofiltreres, havde både den laveste mikrobielle diversitet og en anden mikrobiel sammensætning. I modsætning til de andre saltlager indeholdt den mikrofiltrerede saltlage ingen gær eller *Staphylococcus*-arter, hvilket tyder på, at mikrofiltrering effektivt fjerner visse mikroorganismer. Dette kan være uønsket, da visse gærarter (primært *D. hansenii*) og *Staphylococcus* arter er med til at skabe et stabilt mikrobielt miljø på osteoverfladen, hvilket hæmmer vækst af skimmel og *Listeria monocytogenes*.

Alle de 20 isolerede gærstammer på nær *Candida intermedia* kunne gro under forhold, der minder om saltlagers. Tre gærarter fra saltlagerne (*D. hansenii*, *Sterigmatomyces halophilus* and *Y. triangularis*) kunne overleve 14 dage under forhold, der minder om saltlagers, med *Y. triangularis* som den mest salttolerante gær. De to gær *D. hansenii* og *Y. triangularis* påvirkede aminosyre- og aromasammensætningen i et ostemodelforsøg. Desuden kunne *D. hansenii*, hæmme spiringen af skimmelsporer fra visse skimmelsvampe, der ofte isoleres på danske mejerier, især *Penicillium*

roqueforti og *Cladosporium inversicolor*, mens en mindre effekt sås for hæmning af mycelievæksten. Især 3-methylbutansyre, 2-phenolethanol og eddikesyre, produceret af *D. hansenii*-stammerne, viste sig effektive i hæmningen af spiring af skimmelsporer og mycelievækst. 3-methylbutansyre har ikke tidligere været beskrevet som et skimmelhæmmende stof, men viste sig at være hæmmende, selv i meget lave koncentrationer. I et pilotskala-forsøg med *D. hansenii*-stammer tilsat saltlager hæmmedes væksten af skimmelsvampene *Penicillium roqueforti* og *Mucor racemosus* på osteoverflader. Dette understreger potentialet for at bruge *D. hansenii* som biobeskyttende kultur f.eks. som tilsætning i saltlager.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

Projektet har tilvejebragt ny viden om de positive effekter af de mikroorganismer, der naturligt forekommer i ostesaltlager. Denne viden bidrager til forståelsen af den mikrobielle økologi i mejerimiljøet og under ostefremstilling. InBrine-projektets resultater kaster dermed for første gang lys over et mikrobielt miljø, der ikke tidligere har været undersøgt hos de danske mejerier.

Den opnåede viden vil kunne danne grundlag for udarbejdelse af nye retningslinjer for saltlagehåndtering i den danske mejeriindustri. Dette vil gøre mejeriindustrien i stand til at opnå en bedre kitdannelse med en positiv indvirkning på ostens smag og aroma, samt øge evnen til at hæmme uønsket skimmelvækst. Dette vil forbedre både ostekvaliteten og fødevarer sikkerheden til gavn for forbrugerne. Inden for den danske ingrediensindustri kan udforskning af saltlagens mikrobielle biodiversitet føre til nye biobeskyttende eller aromadannende starterkulturer tilpasset saltlager. Yderligere ligger der også potentielt set et uudforsket bioteknologisk potentiale for saltlagens mikroorganismer, f.eks. screening for enzymproduktion og særligt inden for produktion af skimmelhæmmende forbindelser.

For at mejerierne kan drage nytte af projektets resultater, er den opnåede viden blevet gjort tilgængelig for relevante aktører i mejeribranchen. Dette blev gjort i form af populærvidenskabelig litteratur, foredrag, virksomhedsbesøg etc. Endvidere er projektets resultater blevet videregivet til mejeriingeniørstuderende på Københavns Universitet i relevante kurser indenfor mejerimikrobiologi.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Artikler i internationale tidsskrifter:

Haastrup, M.K., Johansen, P., Harboe, A.F., Castro-Mejía, J.L., Kot, W., Krych, L., Arneborg, N. & Jespersen, L. (2018). Cheese brines from Danish dairies reveal a rather complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 285, 173-187. (doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.015)

Zhang, L., Huang, C., Malskær A.H., Jespersen, L., Arneborg, N. & Johansen, P.G. (2020). The effects of NaCl and temperature on growth and survival of yeast isolates from Danish cheese brines. *Current Microbiology* 77, 3377–3384. (<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02185-y>)

Huang, C., Zhang, L., Johansen, P.G., Petersen, M.A., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2021) *Debaryomyces hansenii* strains isolated from Danish cheese brines act as biocontrol agents to inhibit germination and growth of contaminating molds. *Frontiers in Microbiology*, 12, article 662785. (doi.org/10.3389/fmicb.2021.662785)

Zhang, L., Huang, C., Johansen, P.G., Petersen, M.A., Poojary, M.M., Lund, M.N., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2021) The utilization of amino acids by *Debaryomyces hansenii* and *Yamadazyma triangularis* associated with cheese. *International Dairy Journal*, 121, article 105135. (doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105135)

Zhang, L., Huang, C., Johansen, P.G., Petersen, M.A., Poojary, M.M., Lund, M.N., Jespersen, L., & Arneborg, N. Aroma contribution and microbial interaction of *Debaryomyces hansenii*, *Sterigmatomyces halophilus* and *Yamadazyma triangularis* during ripening in a cheese surface model. Manuskript under udarbejdelse.

Populærvideenskabelige artikler:

Harboe, A., Arneborg, N. & Jespersen, L. (2018) Uopdagede muligheder i saltlagens mikrobiologi (Unexplored possibilities in brine microbiota). Mælkeritidende, No. 22, pp 42-43.

Johansen, P.G., Arneborg N., & Jespersen L. (2022) Mejeriernes saltlager er fulde af liv (Brines at the dairies are full of life). Artikel sendt til Mælkeritidende for snarlig publicering.

Studenteropgaver:

Haastrup, M.K. (2017). Exploring the Last Frontier of Microbial Diversification at Danish Dairies: The Cheese Brine. MSc-afhandling.

Kanz, L. (2018). Technological Properties of Yeast Isolated from Cheese Brines. Testing salt tolerance, pH, and temperature. MSc-afhandling.

Varfi, E. (2020). Characterization of technological properties of cheese-related yeast species and their potential for styrene biosynthesis and polystyrene biodegradation. MSc-afhandling.

Nordal, S. & Uldall-Hansen, T. (2022) Inhibition of Spoilage Molds on Danbo Cheeses Using *Debaryomyces hansenii* Strains Isolated from Danish Cheese Brines. BSc-afhandling.

Hornnes, M. H. D (2018): Microbiology in Dairy Salt Brines. (7,5 ECTS).

Indlæg ved faglige kongresser, symposier etc.:

Jespersen, L. (2018). Improvement of the quality of traditional fermented foods – hidden identities, small talk and gut feeling. Main session speaker at ISSY 34rd International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY), 1.-4. oktober 2018, San Carlos de Bariloche, Patagonia, Argentina.

Johansen, P., Harboe, A.F., Huang, C., Zhang, L., Kanz, L.T., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2018). Characterisation of halotolerant and halophilic yeasts isolated from Danish cheese brines. ISSY 34rd International Specialized Symposium on Yeast (ISSY), 1.-4. oktober 2018, San Carlos de Bariloche, Patagonia, Argentina.

Harboe, A. F., Johansen, P., Kanz, L.T., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2018). Characterisation of halotolerant and halophilic yeasts from cheese brines from Danish dairies producing semi-hard surface-ripened cheese. 26th International ICFMH Conference, (FoodMicro), 3.-6. september, Berlin, Tyskland.

Johansen, P., Harboe, A.F., Haastrup, M.K., Castro-Mejía, J.L., Kot, W., Krych, L., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2018). Exploring the microbiota from cheese brines at Danish dairies by culture dependent and -independent techniques. 26th International ICFMH Conference, (FoodMicro), 3.-6. september, Berlin, Tyskland.

Mødeindlæg:

Jespersen, L. (2017). Impact of microbial biodiversity on the quality of Danish cheeses. Mejeriforskningens dag. 2. marts 2017, Billund.

Harboe, A.F., Haastrup, M.K., Kanz, L.T., Johansen, P., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2018). Influence of brine microbiota on flavour development and inhibition of spoilage moulds on Danish cheeses. Møde i Mejeriteknisk Selskab, 5. april 2018.

14. Bidrag til kandidat- og forskeruddannelse

Følgende er blevet uddannet undervejs i InBrine-projektet:

- To ph.d.-studerende: Chuchu Huang og Ling Zhang.
- Postdoc Pernille Greve Johansen
- 3 MSc-studerende
- 2 BSc-studerende
- 1 7.5 ECTS pointopgave


Yderligere er viden fra InBrine blevet inkorporeret i kandidatkurser på Food Science and Technology-uddannelsen på kurserne Microbiology of Fermented Food and Beverages, Dairy Microbiology samt Yeast Physiology and Application.

15. Nye kontakter/projekter

Projektet har link til det efterfølgende MFF-projekt "Improve Dairy Life".

16. Underskrift og dato

Dato: 20.07.2022 Projektleders underskrift:



Dato: 1. august 2022 MFF-repræsentants underskrift:

