

Afslutningsrapport

Medfølgefloraens rolle i modningen af danske ostetyper

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-49

Februar 2003



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for projektet
Medfølgefloraens rolle i modningen af danske ostetyper
Mejeribrugets ForskningsFond/FØTEK III

Ylva Ardö
Finn K. Vogensen
E. Waagner Nielsen

Mejeri- og Levnedsmiddelinstittet
Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole
Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C

November 2002

Projekttitle: Medfølgefloraens rolle i modningen af danske ostetyper

Projektperiode: 01.01.1999 - 31.08.2002

Projektledelse:

Lektor Ylva Ardö, projektleder

Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet (MLI)

Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole

Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C

Tlf. 3528 3193. Fax: 3528 3190. E-mail ya@kv1.dk

Lektor Finn K. Vogensen

Lektor E. O. Waagner Nielsen

Projektdeltagere:

Forskningsadjunkt Peter Lange Møller

Forskningsadjunkt Martin Antonsson

Ph.d.-studerende Dorte Fris Jensen

Gæste-ph.d.-studerende Lucie Nemcoval, Tjekkiet

Gæste-ph.d.-studerende Signe Kask, Estland

Gæste-ph.d.-studerende Kaarel Adamberg, Estland

Specialestuderende og forskningsassistent Martin Holst Petersen

Specialestuderende og forskningsassistent Mikael Petersen

Forskningsassistent Annika Cedergren

Laborant Jonna Holst Mathiesen

Laborant Mona Østergaard

Laborant Lone Permin

Laborant Julie G. Kristensen

Finansieringskilder: FØTEK III/MFF

Sammendrag

Medfølgefloraens rolle i modningen af danske ostetyper

Definitionen på en 'medfølgeflora' er bakteriekulturer, der vokser og dominerer i ost uden at være tilsat ved ostefremstillingen. Formålet med projektet var at undersøge, hvilken rolle medfølgefloraen har i modningen af danske gule oste. Der blev isoleret bakterier fra 60 prøver af ost med forskellig alder fra danske mejerier. Af de tæt på tusind isolater som blev indsamlet på forskellige mejerier, var cirka halvdelen arter der ikke tilsættes med syrevækkeren. Hovedparten af disse blev ved hjælp af ITS-PCR-profil (Inter Transskriptionelle Sekvenser – PCR) identificeret som tilhørende de fakultativt heterofermentative *Lactobacillus*, nemlig 87 % til *Lb. paracasei*-komplekset (indeholder *Lb. paracasei*, *Lb. casei* og *Lb. rhamnosus*), 3 % til *Lb. plantarum*, 4 % til *Lb. curvatus* og 6 % til ikke-identificerbare eller ikke tidligere beskrevne arter. Identificering af *Lb. paracasei*-stammerne ved kulhydratforgæringsmønster delte dem i fire hovedgrupper, *Lb. paracasei* I, II og III samt en gruppe der minder om *Lb. curvatus* i forgæringsmønstret, men som genetisk tilhører *Lb. paracasei*-komplekset. Der blev fundet en enkelt stamme som tilhører *Lb. rhamnosus*.

Lactobacillus-isolaterne blev grupperet ved pulsfelt gelelektroforese (PFGE) til knap 170 stammer. De *Lactobacillus*-stammer, der blev isoleret fra mere end én prøve, var stort set altid fra den samme ost med forskellig alder. En undtagelse var laktobaciller, af en ikke tidligere beskrevet art, af hvilken kun få forskellige stammer dominerede i nogle oste. Disse stammer blev også isoleret fra den anvendte syrevækker, og det blev vist at andre stammer af arten tidligere var blevet isoleret på KVL fra traditionelt anvendte danske mejerisyrevækkere. Der blev ikke fundet dominerende stammer i flere af ostene, der skulle kunne have kommet fra en enkelt sammensat husflora på mejeriet.

Evne til at vokse i mælk varierede meget mellem *Lactobacillus*-stammerne. Kasein blev ikke meget nedbrudt med undtagelse af κ -kasein, fra hvilken en del stammer langsomt spaltede det kulhydratrige glykomakropeptid af. Peptider fra β -kasein, dannet af mælkeproteasen plasmin, blev dog brugt. Der blev fundet enzymer (aminopeptidaser), der fraspaltede forgrenede og basiske aminosyrer samt dipeptider med prolin, og der var en variation mellem stammerne. Det er muligt for visse mælkesyrebakterier at opnå ekstra energi fra omdannelse af den basiske aminosyre arginin til ornitin. Dette var muligt for ca. 8 % af de 46 analyserede stammer.

Medfølgefloraen vokser i ost efter at laktose er opbrugt af syrevækkerbakterier, og det blev undersøgt hvilke energikilder den har mulighed til at bruge. Fra litteraturen blev identificeret forskellige kulhydrater på fedtkuglemembranproteiner, kasein, bakteriers cellevægge samt fra nedbrydning af nukleinsyrer fra DNA i bakterier og somatiske celler. Evnen til at forgære kulhydrater var afhængigt det omgivende miljø. Enkelte *Lb. paracasei*-stammer (4 %) fermenterede ikke mælkesukkeret laktose, og ca. 20 % manglede evnen til at fermentere ribose, som er dét kulhydrat, der teoretisk kan være mest af i osten. Alle stammer af *Lb. paracasei* fermenterede N-acetyl-glukosamin (NAG), der findes i fedtkuglemembranen og i bakteriecellevægge. *Lactobacillus*-stammernes evne til at lysere døde syrevækkerbakterier blev testet. Kun 17 % af stammerne lyserede cellerne og de fleste kun i et sukkerbegrænset substrat.

En meget stor del af *Lactobacillus*-stammerne (en tredjedel) producerede substanser, der hæmmede *Clostridium* i laboratorieforsøg, og en hæmmende effekt blev også vist i modelostningsforsøg. I ostningsforsøg med en cocktail af fire udvalgte antimikrobielle *Lb. paracasei*-stammer dominerede én af stammerne i begyndelsen af modningen, en anden senere, medens en tredje først genisoleredes efter et par uger, og den fjerde ikke blev genfundet. Forskellige grupper af syrevækkerens bakterier blev hæmmet mens andre blev fremmet, og ostene blev bedømt til at have en mere moden smag.

Variationen i egenskaber hos de isolerede *Lactobacillus*-stammer giver mulighed for flere roller. I langtidsmodnede oste kan forskellige stammer bidrage på specifikke måder til smagen. Det store antal forskellige stammer øger sandsynligheden for, at tilsatte *Lactobacillus*-stammer med ønskede egenskaber kan komme til at dominere i ostene. I oste der kun bliver lagret et par uger er medfølgefloraens rolle sandsynligvis især at konkurrere med og hæmme produktskadelige bakterier. Egenskaber der formodentlig betinger denne konkurrence blev undersøgt, men her er der brug for mere forskning. Det er meget vigtigt for de milde oste at smagen er ren. En anden rolle i disse unge oste er måske at de antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer accelererer modningen ved at lysere bakterier fra for eksempel syrevækkeren.

Abstract

Role of non-starter lactic acid bacteria in ripening of Danish cheese

Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) grow and dominate in cheese without being added during cheese manufacture, and the objective of the project was to investigate which role they have in Danish semi-hard cheese varieties. Bacteria were isolated from 60 samples of cheeses at different ages from Danish dairies. Of the almost 1,000 isolates about half was of NSLAB species. The main part of these were by ITS-PCR profiles identified to the group of facultative heterofermentative *Lactobacillus*, i.e. 87 % to the *Lb. paracasei* complex (including *Lb. paracasei*, *Lb. casei* and *Lb. rhamnosus*), 3 % *Lb. plantarum*, 4 % *Lb. curvatus* while 6 % was either not possible to identify or belonged to a new *Lactobacillus* species. Identification of the strains of the *Lb. paracasei* complex using carbohydrate fermentation patterns divided them into four groups, i.e. *Lb. paracasei* I, II, and III and a group whose fermentation pattern showed similarities to *Lb. curvatus*. One single strain was identified to belong to *Lb. rhamnosus*.

The *Lactobacillus* isolates were classified using pulse field gel electrophoresis (PFGE) to almost 170 strains. *Lactobacillus* strains that were isolated from more than one sample were almost always from the same cheese sampled at different ages. One exception was a not earlier described *Lactobacillus* species, of which only a few strains dominated in some cheeses. The same species was also isolated from the starter that was used, and it had been earlier isolated at KVL from traditional dairy starters. Strains that could have originated from a persistent *Lactobacillus* house microflora at the dairies, were not found dominating in the cheeses.

The potential for growth in milk varied very much between the isolated strains. Casein was not much hydrolysed with the exception of κ -casein from which some strains cut off the glycomacropeptide. Peptides produced from β -casein by plasmin activity were efficiently used, though. The strains produced different amounts of aminopeptidases releasing branched-chain and basic amino acids as well as dipeptides containing proline. LAB may use the basic amino acid arginine to produce energy and ornithine and approx. 8 % of the tested strains had the ability to do so.

NSLAB grow in cheese after the starter bacteria have used most of the lactose, and it was investigated which energy sources they may be able to use in cheese. From literature were identified different carbohydrates at the fat globule membrane, casein, bacterial cell wall and from breakdown of nucleic acid from DNA in bacteria and somatic cells. The environment influenced their ability to use different carbohydrates. About 4 % of the *Lb. paracasei* strains did not ferment lactose and about 20 % not ribose, which is the single carbohydrate that theoretically is the most abundant in cheese. All strains of *Lb. paracasei* fermented N-acetyl-glucosamine (NAG) that is available from the fat globule membranes as well as bacteria cell walls. The ability of *Lb. paracasei* strains to lyse autoclaved *Lactococcus* cells was investigated. Only 17 % of the strains were shown to lyse the cells, and most of them only in a sugar limited substrate.

A large amount of the *Lactobacillus* strains (one third) produced substances that inhibited *Clostridium* in laboratory trials and an inhibition was also demonstrated in model cheese making. In a cheese making trial using a cocktail with four selected antimicrobial *Lb. paracasei* strains, it was shown that one strain dominated at the beginning, another later, a third was first reisolated after some weeks and the fourth was not found in the cheeses. Different groups of starter bacteria were retarded and other stimulated in the experimental cheeses, and they were assessed to have a more ripened flavour than the control cheeses.

The variations in properties of the *Lactobacillus* strains isolated from Danish cheese allow possibilities for them to have different roles. In long time-ripened cheeses, different strains may contribute in specific ways to the flavour development. The large number of different strains

found in the cheeses, increase the probability for added *Lactobacillus* strains, selected for specific properties, to develop well and dominate in the cheeses. In cheeses that are only ripened for a couple of weeks the most important activity of the NSLAB are to compete with and inhibit detrimental bacteria. Properties that may be beneficial for the ability to compete were investigated, but more research is needed to clarify their significance. Another possible role in short-time ripened cheeses is that the antimicrobial *Lactobacillus* strains may have accelerated cheese ripening by contributing to lysis of bacteria, e.g. from the starter.

1. Baggrund og mål

Den mikrobielle flora i de fleste gule ostetyper er efter et par uger domineret af bakteriearter, der er til stede på trods af, at man ikke tilsætter dem ved osteproduktionen. Dette har man været klar over helt tilbage i begyndelsen af 1900-talet, hvor S. Orla-Jensen (23) demonstrerede fremvækst af et stort antal *Lactobacillus casei* i ost under modningen. Dette tidlige kendskab blev i de følgende årtier ikke fulgt meget op i forskningen. Da pasteurisering af ostemælken introduceredes blev spørgsmålet igen aktuelt, og de tidlige resultater bekræftedes (21). Det blev fra disse undersøgelser konkluderet, at for at genskabe ostemælkens mikroflora efter pasteurisering skulle *Lactobacillus casei* tilsættes med starterkulturen. Ved praktisk osteproduktion viste det sig imidlertid, at de hidtil anvendte starterkulturer også kunne bruges til pasteuriseret ostemælk, idet gavnlige *Lactobacillus* var til stede i den rå mælk og på mejerierne og derfor af egne veje kom i ostene i form af medfølgeflora. Først i nyere tid, blandt andet under indførelsen af nye teknologier som baktofugering og mikrofiltrering og med stigende krav til hygiejne, er man igen begyndt at interessere sig for medfølgefloraen.

Formålet med projektet var at undersøge hvilken rolle bakterier fra medfølgefloraen, især fakultativt heterofermentative *Lactobacillus*-arter, har i faste og halvfaste, gule ostetyper med henblik på at kunne anvende og styre bakteriefloraen i ost for sikrere modning. Det skulle undersøges hvilke bakterier der er tale om, hvordan de udvikles ved modningen, deres metabolisme af betydning for ostemodningen, hvilke næringsstoffer de lever af i ostene, og hvordan de kan påvirke andre bakteriers aktiviteter i ostene.

2. Resultat og diskussion

2.1 Udvalg af oste for isolering af bakterier

Prøver fra danske, faste og halvfaste, gule ostesorter blev udvalgt for at få en god dækning af den eksisterende variation i de roller medfølgefloraen må have. Strategien var at isolere bakterier fra oste af forskellig alder, oste som fremstilles på forskellige måde, herunder oste fra økologisk såvel som højteknologisk produktion, samt oste med veletablerede navne. Flere ostesorter blev sendt til KVL i en alder af ca. 2 måneder, og de blev lagret videre på KVL i op til et år med henblik på at undersøge om der udvikledes andre bakteriestammer senere under modningen (tabel 1). Ostene blev bedømt organoleptisk og analyseret kemisk.

Udover ostene nævnt ovenfor blev tre Danbo (Klovborg) der var fremstillet med en uges mellemrum udtaget med henblik på at undersøge om der eksisterede en egentlig husflora på det pågældende mejeri. Da der ikke blev fundet lige så mange *Lactobacillus* i Grube ost som i andre Danbo-oste blev der udtaget prøver fra yderligere et par Grube oste.

Desværre modtog vi ingen økologisk ost i nærværende projekt, men der var én med blandt de Danbo-oste, der tidligere var blevet indkøbt i detailhandlen med henblik på isolering af medfølgefloraen og identificering med TTGE (temporal temperature gradient gel electrophoresis) og RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA – PCR). Af de isolater, der blev identificeret fra den økologiske ost, var alle *Lb. paracasei*, der grupperede sig i den samme RAPD-gruppe (17). Der var også en Grube ost i den tidligere undersøgelse, og heller ikke i den fandt man *Lactobacillus*. Grube er derfor speciel ved at være domineret af syrevækkeren og at indeholde ingen eller meget få *Lactobacillus* som medfølgeflora.

2.2 Isolering og klassificering af medfølgeflora fra danske gule ostetyper

Fra de danske gule oste isoleredes den dominerende mælkesyrebakterieflora. Fra ostene blev udtaget prøver på 10 gram mellem kanten og midten, der blev behandlet med Stomacher og i

starten spredt på 5 forskellige agartyper (LM17, MRS, Rogosa, BHI, Acetat-agar); senere blev acetat-agar og LM17 udeladt, da de samme typer af bakterier blev fundet hhv. på Rogosa og BHI. Alle blev inkuberet anaerobt ved 28-30°C. Ved denne lave inkuberingstemperatur, til forskel fra ved 37°C, voksede også *Leuconostoc* på MRS- og Rogosa-pladerne, hvilket gav visse problemer især ved isolering fra unge oste, men 30°C blev alligevel brugt da det var vigtigt i projektet også at isolere laktobaciller der eventuelt ikke evner at vokse ved 37°C. Der blev fundet en ny *Lactobacillus*-art som følge af den valgte strategi. Fra hver osteprøve blev der rencydret 15-20 isolater, der blev gemt i en bakteriestammebank for nærmere fysiologisk og molekylær karakterisering.

Tabel 1. Ostetyper, hvorfra der blev isoleret bakterier.

Ost	Produktionsdag	Antal prøveudtagelser ¹⁾	Antal <i>Lactobacillus</i> -isolater	Antal <i>Lactobacillus</i> -stammer ²⁾
Danbo, Ribe	1999-09-02	3	63	20
Danbo, Tistrup	1999-03-21	4	52	16
Danbo, Tistrup	2000-03-07	2	33	5
Danbo, Grube	1999-03-19	2	2	2
Danbo, Grube	2000-02-23	1	0	0
Danbo, Grube	2000-06-12	1	5	4
Danbo, Grube, ikke MF ³⁾	2000-06-12	1	1	1
Danbo, Klovborg	1999-02-26	4	39	15
Danbo, Klovborg	1999-12-09	2	16	5
Danbo, Klovborg	1999-12-13	2	21	10
Danbo, Klovborg	1999-12-21	2	33	15
Samsø, Asaa	1999-08-17	2	30	19
Samsø, Asaa	1999-11-24	2	36	18
Samsø, Nordenskov	2000-01-19	2	28	3
Maribo, Nordenskov	2000-01-18	2	32	4
Esrom, Nr. Vium	1999-10-28	2	17	9
Svenbo, Aars	1999-13-17	3	41	16
Blanc de Blanc, Tholstrup	1999-09-23	1	5	5
			454	167

¹⁾Ca. 20 isolater isoleret pr. udtagelse (Fra hver af de tre sidste Klovborg oste blev der dog udtaget 54 isolater)

²⁾Baseret på PFGE-profiler

³⁾MF, mikrofiltreret

Isolaterne blev grupperet ved hjælp af to molekylære typningsteknikker, dels identifikation til artsniveau ved hjælp af PCR af de såkaldte ITS-regioner i de ribosomale operoner, dels typning af stammer ved pulsfelt gelelektroforese (PFGE). For enkelte isolater blev der foretaget 16S rDNA sekventering for at bekræfte ITS-PCR-identifikationen. Medfølgeflorastammerne blev også karakteriseret ud fra kulhydratforgærmingsmønstre (API-50 CHL).

Af de ca. 800 isolater fra de danske oste var omkring halvdelen *Lactobacillus*, mens de resterende tilhørte *Lactococcus* eller *Leuconostoc* og kom formentlig fra starterkulturen. De ca. 400 *Lactobacillus*-isolater blev placeret i ca. 135 PFGE-grupper (stammer). De enkelte PFGE-

grupper indeholdt mellem 1 og 17 isolater, og med få undtagelser var alle isolater der kunne henføres til samme PFGE-gruppe isoleret fra samme ost. ITS-PCR viste at 87 % af stammerne kunne henføres til *Lb. paracasei* komplekset (der indeholder *Lb. paracasei*, *Lb. casei* og *Lb. rhamnosus*), 3 % til *Lb. plantarum*, 4 % til *Lb. curvatus*, mens 4 % viste sig at tilhøre en ny *Lactobacillus*-art og 2 % ikke kunne sikkert identificeres. Kulhydratforgærmingsmønstre (API-profiler) delte *Lb. paracasei*-kompleksets stammer op i fire hovedgrupper med henholdsvis ca. 49, 3 og 24 % i *Lb. paracasei*-gruppe I, II og III, samt 24 % der lignede *Lb. curvatus*. Alle de sidste var dog identificerede som *Lb. paracasei* ved ITS-PCR. En enkelt stamme blev ved API-profilering identificeret som *Lb. rhamnosus*. De stammer, der ved ITS-PCR blev identificeret som hhv. *Lb. plantarum* og *Lb. curvatus*, blev generelt ved hjælp af API identificeret til samme art. (3, 7)

Udover de ca. 800 isolater fra forskellige produktionssteder, blev der isoleret medfølgeflora fra 3 oste produceret på samme produktionssted (Klovborg) med 1 uges interval. I alt blev ca. 150 isolater analyseret, hvoraf 70 på basis af ITS-PCR kunne henføres til medfølgefloraen, fortrinsvis tilhørende *Lb. paracasei*-komplekset, men enkelte *Lb. plantarum*-isolater blev også fundet. Disse blev alle analyseret for kulhydratforgærmingsmønstre og ved PFGE. Ved PFGE blev de inddelt i knap 30 stammer. Det var karakteristisk at ingen af PFGE-typerne blev genfundet i flere oste. Det viser, at på dette produktionssted var der ikke tale om en egentlig husflora med få *Lactobacillus*-stammer, der dominerede medfølgefloraen i ostene over tid. (5, 9, 25).

Tidligere isolerede bakterier fra Danbo, der blev indkøbt i detailhandlen, fra traditionelle danske mejerisyrevækkere, og fra dårlige oste samt type- og referenceorganismer er også blevet brugt i projektet.

2.3 Biokemisk karakterisering af bakterieisolater

Evne til at bruge de mulige energikilder der er i ost

En metode til at analysere de syv kulhydrater (laktose, galaktose, glukose, N-acetylglukosamin (NAG), deoxyribose, ribose og ribose-6P) der er interessante i forbindelse med ost, blev udviklet i begyndelsen af projektet. Metoden bruger anionbytningskromatografi ved højt pH og Dionex Carbopac søjle, og den er blevet beskrevet i Encyclopedia of Dairy Sciences (18). Metoden blev anvendt til indledende undersøgelser af hvilke kulhydrater der bruges af to *Lb. paracasei* stammer. De to stammer voksede bedst på NAG, og også på glukose, laktose og galaktose, men ikke så godt på ribose, deoxyribose, ribose-6P eller RNA. Screening af flere *Lactobacillus*-isolater blev udført i mikrotiterplader og med Bioscreen C udstyr (1). En litteraturundersøgelse af mulige kulhydratkilder i ost blev lavet, og *Lactobacillus*-stammer blev testet mod disse i et kulhydratbegrænset substrat, som blev udviklet i projektet. I alt blev 41 *Lactobacillus*-stammer fra danske oste undersøgt. De fleste fermenterede hurtigt glukose, NAG, mannose, galaktose, og laktose, medens nogle voksede langsomt eller overhovedet ikke på laktose, galaktose og ribose. De fleste stammer dannede dog små kolonier (1 mm i diameter) efter 1 - 2 uger på agar med ribose som eneste energikilde og 2.5 % NaCl inkuberet anaerobt ved 12°C. Også *Lactobacillus*-stammer, der blev forinkuberet med ribose, voksede hurtigere på hexoser med stor præference for NAG. N-acetyl-galaktosamin og N-acetyl-neuraminsyre var dårlige substrater for alle stammerne. (1, 11)

Der er rigeligt af NAG på mælkefedtkuglernes membranproteiner og det er også et af de vigtigste kulhydrater tilstede i syrningskulturens cellevæg. De isolerede *Lactobacillus*-stammer blev testet for lysisaktivitet overfor autoklaverede laktokokker dels i MRS og dels i det kulhydratbegrænsede medium. Af 147 undersøgte *Lactobacillus*-stammer havde 25 (17 %) evne til at nedbryde starterbakterier, 4 af dem i begge substrater, 1 kun i MRS medens 20 kun lysesede starterbakterier i det kulhydratbegrænsede substrat. (3)

Vækst og nedbrydning af kasein og peptider i mælk

Undersøgelser af, hvordan kasein bliver brugt af *Lactobacillus*-stammer, blev foretaget i mikrofiltreret og pasteuriseret mælk. *Lactobacillus*-stammerne voksede i 5 døgn ved 30°C, pH blev hævet og kasein, peptider og aminosyrer blev analyseret med kapillarelektroforese (CE) og HPLC. Det var ikke muligt at lave undersøgelserne i steril rekonstitueret skummetmælk, da varmebehandlingen ændrer kaseinets molekylære struktur for meget.

CE af kaseinkomponenterne viste at *Lactobacillus*-stammernes aktivitet på kaseiner var meget begrænset - også selv i løbet af en så lang tid som 5 døgn. Nogle stammer nedbryder dog κ -kasein langsomt og resultat af præliminære undersøgelser indikerer at der dannedes para- κ -kasein. Det er muligt at laktobacillerne brugte kulhydrater på glykomakropeptidet. Mælkeproteasen plasmin var aktiv i den mikrofiltrerede mælk, og de peptider der dannedes blev brugt af laktobacillerne. *Lactobacillus*-stammerne voksede meget forskelligt i mælken og en del sænkede pH meget langsomt. I disse prøver var plasmin mere aktiv, og den pH-sænkning, der var signifikant først efter flere døgn i en del prøver, må være stimuleret af kaseinnedbrydningen. (4, 6, 26, 27)

Aminopeptidaser i Lb. paracasei

Aminopeptidaser blev analyseret i ekstrakter fra 9 *Lb. paracasei*-stammer efter vækst i steriliseret rekonstitueret skummetmælk med 3 % gærekstrakt i 42 timer. Enzymekstrakterne blev fraktioneret med FPLC og aktiviteter mod 8 forskellige kunstige substrater for aminopeptidaser (AP) blev analyseret i fraktionerne. Der blev analyseret aktivitet af mindst seks enzymer (i seks forskellige fraktioner), en X-prolyldipeptidyl aminopeptidase (gly-pro-DAP), og aktiviteter af en lysin/leucin-aminopeptidase (lys/leu-AP), en leucin/valin-aminopeptidase (leu/val-AP), en lysin aminopeptidase (lys-AP), en leucin-aminopeptidase (leu-AP) og en prolin-aminopeptidase (pro-AP), af hvilke de tre sidste var mindre aktive end de andre. En af de undersøgte stammer havde ingen af de seks enzymaktiviteter, medens alle de andre havde signifikant aktivitet af de to enzymer lys/leu-AP og leu/val-AP. Kun halvdelen af stammerne havde gly-pro-DAP enzymet. Indledende analyser af ekstrakterne før FPLC-kromatografien med et DAP-substrat for en anden specificitet, arg-pro-DAP, viste dog aktivitet i alle de testede syv stammer der havde AP aktiviteter. Resultaterne viser en stor variation i de forskellige stammers evne til at fraspalte aminosyrer fra peptider. Én af stammerne uden gly-pro-AP-aktivitet havde en pro-AP-aktivitet, men den var ikke meget aktiv. Stammer der frigør meget prolin har mulighed til at indvirke på smagen så at den bliver mere sød. De forgrenede aminosyrer leucin og valin (isoleucin blev ikke analyseret) er forstadier til flygtige aromakomponenter. Lidt phenylalanin blev også spaltet fra af de to signifikante AP-enzymet og lidt prolin af det ene, medens glycin og glutaminsyre ikke blev fraspaltet af nogen af enzymerne.

2.4 Undersøgelse af *Lactobacillus*-isolaters antagonistiske egenskaber

Bakteriestammernes hæmning af laktatforgærende anaerobe sporedannere blev undersøgt i laboratorieskala med et stort antal af isolaterne fra danske oste overfor ca. 20 *Clostridium*-isolater, hovedsageligt fra ost. Produktionen af antimikrobielle substanser blev undersøgt med agarbrøndtest og med krydsstregpodning. Der var problemer med krydsstregpodningen, da de optimale vækstforhold ikke er de samme for *Lactobacillus* og *Clostridium*, men der blev dannet antimikrobielle substanser, som blev fundet med agarbrøndtesten. De fleste af disse antimikrobielle substanser var formodentlig bakteriociner, da de blev inaktiveret af proteinase K, medens enkelte ikke blev inaktiveret. I alt en tredjedel af stammerne hæmmede klostridier og flere af dem hæmmede mange af de forskellige stammer. De fleste af de testede stammer var *Cl. tyrobutyricum* (smørsyrebakterier) og de blev med en enkelt undtagelse hæmmed af mindst én af de an-

timikrobielle *Lactobacillus*-stammer. De antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer med den mest bredspektrede aktivitet overfor klostridier bliver undersøgt i ost og ensilage i et nyt igangværende samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet.

Effekten af antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer overfor andre ostebakterier blev også testet i indledende forsøg med krydsstregpodning. De antimikrobielle *Lactobacillus* blev testet mod hinanden, og mod *Lactobacillus* der tidligere var blevet isoleret fra dårlige oste. De testede stammer havde forskellig evne til at hæmme andre *Lactobacillus*-stammer. Der var:

1. Stammer, der ikke hæmmede andre stammer.
2. Stammer, der kun hæmmede andre arter af *Lactobacillus*
3. Stammer, der også hæmmede sin egen art.

Fire *Lactobacillus*-stammer blev udvalgt til ostningsforsøg med det formål at studere, hvordan de påvirker bakteriefloraen i ostene under modningen (se nedenfor), og disse fire blev også testet over for hæmning af syrevækkerbakterier (tabel 2). Især blev citrat-positive *Lactococcus lactis* hæmmede af de udvalgte stammer. (2, 8, 24)

Tabel 2. Egenskaber af betydning for konkurrenceevne for fire *Lactobacillus*-stammer, der blev brugt i ostningsforsøg med alle repræsenteret i samme oste.

Stamme	Bruger Laktose	Bruger Ribose	Lyserer <i>Lactococcus</i>	Hæmmer <i>Clostridium</i>	Hæmmer LAB	Bacteriocin påvist
8I2	+	+	+	++	+	+
7A3	+	-	+	+	-	-
61L2	-	+	-	+	+	+
4R4	+	+	-	++	+	-

2.5 Undersøgelse af *Lactobacillus*-isolaters rolle i ost med modelostesystem og pilotostninger

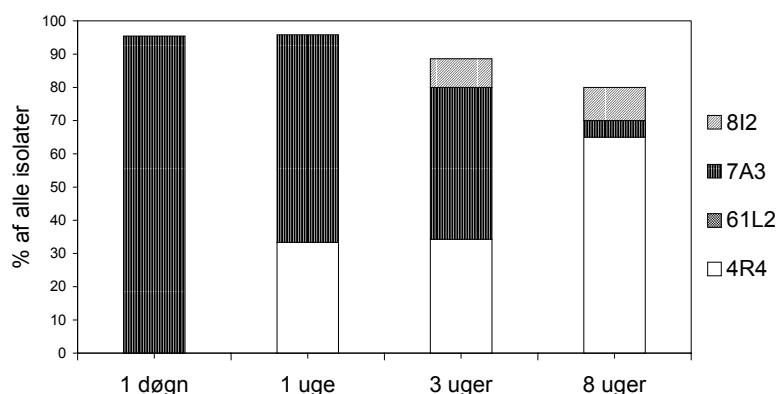
Et modelostesystem blev udviklet for Danbo-oste efter samme principper, som tidligere var udviklet for fisket ost (16). Fra en produktion af ostekorn produceres mange små modeloste med forskellige *Lactobacillus*-isolater, der blev tilsat ostekornene. Laktobacillerne udvikledes til at dominere og havde sandsynligvis en relativ god adgang til næring mellem kornene i ostene.

Fra screening af flere *Lactobacillus*-isolater - for deres evne til at hindre vækst af smørsyre-bakterier - blev tre isolater udvalgt til pilotostningsforsøg. De blev tilsat enkeltvis i ostningsforsøg af Danbo 45+, der blev lavet uden nitrattilsætning for at fremme smørsyrebakterierne. Oste-mælkens indhold af smørsyrebakteriesporer var ca. 200/liter. *Lactobacillus*-kulturene blev tilsat ostekornene lige inden forpresning. Ostene blev efter saltning emballeret i cryovac krympe-poser og opbevaret ved 16°C inden prøveudtagning. Alle tre *Lb. paracasei*-isolater udviste en hæmmende effekt på udviklingen af senpustning i forsøgsostene sammenlignet med kontrolostene. Konklusionen er, at tilsætning af antimikrobielle *Lb. paracasei* isoleret fra danske oste af høj kvalitet, kunne være anvendelige til at kontrollere og minimere smørsyrepustning ved ostefremstilling. De evner at dominere i ost under modningsforløbet uden at forstyrre udvikling af de ønskede karakteristika (smag og konsistens) samt medvirker som en hæmningskultur, der danner antimikrobielle stoffer med inhibitorisk aktivitet over for uønskede skadevoldende smørsyrebakterier (12, 24).

Lactobacillus-stammer med evne til at hæmme klostridier blev også testet i indledende ostningsforsøg af rundhullet ost med propionsyrebakterier. Klostridier blev hæmmet, men det blev propionsyreproduktionen også. Det samme forhold er blevet vist tidligere (19).

Ved indledende pilotostningsforsøg med en cocktail af 3 udvalgte antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer udvikledes en dårlig smag i kontrolostene medens forsøgsostene havde en frisk og ren smag.

Det blev undersøgt i pilotmejeriet, hvordan en cocktail af 4 udvalgte antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer med forskellige egenskaber (tabel 2), bidrager til modning af Danbo 45+. Fem gentagelser blev lavet på fem forskellige dage med ét kontrol- og ét forsøgskar hver dag. Bakterieflorens udvikling under modningen blev analyseret med tre metoder; Kalciumcitrat-agar (KCA) med X-gal for bestemmelse af syrningskulturens indhold af *Lactococcus lactis* (citratnegative og -positive) og *Leuconostoc*, MRS pH 5.6 inkuberet ved 37°C for *Lactobacillus* samt MRS pH 6.3 inkuberet ved 30°C som et mål på totalantal af bakterier. De fire *Lactobacillus*-stammer blev analyseret med KCA-metoden, og de var alle citratpositive og blev blåfarvede på X-gal ligesom *Leuconostoc*. I oste med de antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer blev citratpositive *Lactococcus* hæmmet medens *Leuconostoc* blev fremmet. Udvikling af de tilførte *Lactobacillus*-stammer i ostene blev analyseret med genetiske metoder, ITS-PCR for artsbestemmelse og PFGE for identificering af stammerne. De fire stammer voksede i succession (figur 1). Én af stammerne dominerede i starten og dens andel mindskedes under modningen, medens en andens andel øgedes og en tredje først blev genisolert i lave antal efter et par ugers modning. Den fjerde *Lactobacillus*-stamme blev ikke genisolert og det er muligt at den blev udkonkurreret tidligt da den ikke forgærer laktose. Den stamme der blev udkonkurreret senere under modningen fermenterede ikke ribose. Ostene blev analyseret kemisk og sensorisk. Der blev ikke udviklet dårlig smag i nogen af ostene, men de oste med de tilsatte antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer blev bedømt til at have en mere moden lugt og smag. Det planlægges senere at analysere nedbrydningen af kasein til peptider og aminosyrer i ostene med HPLC og kapillarelektroforese, da tiden desværre ikke tillod disse analyser under den sidste del af projektet. (2)



Figur 1. Genisolering fra ost af fire antimikrobielle *Lactobacillus*-isolater, der blev tilsat som cocktail til ostemælken ved fremstilling af Danbo 45+. Bakterier isoleredes fra prøver af oste fra fem ostekar på MRS agar, pH 5.6 og inkuberet anaerobt ved 37°C. *Lactobacillus*-stamme 61L2 blev ikke genfundet.

3. Konklusioner

Halvdelen af bakterieisolaterne fra de danske faste og halvfaste oste var *Lactobacillus* og mere end 85 % tilhørte *Lb. paracasei*-komplekset. Det er i overensstemmelse med hvad man har fundet i lignende ostesorter (15, 17, 20, 22). De ca. 450 *Lactobacillus*-isolater blev placeret i tæt på 170 grupper ved PFGE, hvilket viser at det er mange forskellige stammer, der findes i danske gule oste. Resultaterne indikerer at PFGE giver en dybere opdeling på stammeniveau end man har været i stand til i de publikationer, hvor RAPD-teknikken har været anvendt (15, 17, 20). Der kan dog stadig indenfor samme PFGE-gruppe ses forskelle i fermenteringsprofilen, hvilket indikerer at der er en endnu større variation i stammeantallet end PFGE-data viser.

ITS-PCR-metoden var en hurtig og sikker metode til frasortering af starterbakterierne, især *Leuconostoc*, der voksede på både Rogosa- og MRS-agar ved 30°C, og dominerede i forhold til medfølgefloraen, især i prøver fra unge oste. Desuden kunne ITS-PCR sikkert gruppere *Lactobacillus*-isolaterne enten i *Lb. paracasei*-komplekset, *Lb. plantarum* eller *Lb. curvatus*.

Det var ikke muligt i dette projekt at vise signifikante forskelle mellem *Lactobacillus*-stammer der blev isoleret tidligt og sent under modningen, som følge af det meget store antal forskellige stammer der blev isoleret. For at det skulle have været muligt, skulle der have været taget mange flere isolater fra hver ost. Der var dog forskel mellem ostene, idet nogle af ostene klart var domineret af relativt få PFGE-grupper gennem hele prøveudtagningsforløbet, mens der i andre oste blev isoleret forskellige PFGE-grupper på forskellige prøveudtagningsstidspunkter. Dette kan enten indikere en succession, men også at mange forskellige stammer var til stede fra starten. Der blev dog direkte vist en succession i udviklingen af fire *Lactobacillus*-stammer med lidt forskellige egenskaber der blev tilsat ved forsøgsostefremstilling.

Det store antal forskellige stammer viser også at medfølgebakterierne kommer fra mange forskellige kilder, og at der på de fleste mejerier ikke vokser en ensartet mikroflora (husflora) som kommer til at dominere i ostene. *Lb. paracasei*-komplekset dominerede i alle oste (med Grube ost undtagen) og i nogle oste var det de eneste *Lactobacillus* som blev isoleret. *Lb. paracasei* er vist at være bedre til at overleve pasteurisering end de andre fundne arter, og det er sandsynligt, at på moderne mejerier med meget høj hygiejnisk standard, er det især gennem pasteuriseringsudstyret at medfølgefloraen kommer i ostemælken. Hvis der er mulighed for spredning af bakterier med luft og vand fra håndteringen af den rå mælk til ostekarret bliver medfølgefloraen formentlig mere sammensat og varierende. Der arbejdes flittigt på at fjerne biofilm på mejerierne i dag, og det kan derfor være svært for de enkelte *Lactobacillus*-stammer at etablere sig. De pågældende *Lactobacillus* er ikke så gode til at vokse i mælk men deres vækst fremmes af, at andre bakterier etablerer sig først på biofilm og forfordøjer makronæringsstofferne til dem. De er således formentlig afhængige af, at biofilm er mere konstant etableret end hvad der er normalt på de danske mejerier i dag.

Det blev i ostningsforsøg vist at forskellige *Lactobacillus*-stammer konkurrerer med hinanden, og at de kan vokse i succession efter hinanden i osten. Det blev i det store isoleringsarbejde også indikeret, at der i lidt yngre oste var et mindre antal af aktive stammer end i de ældre oste. Det er sandsynligvis en følge af, at syrevækkeren dominerer i begyndelsen og at *Lactobacillus*-stammerne har forskellige evner til at bruge forskellige næringskilder i ostene. Det blev vist i projektet at knap 20 % af *Lactobacillus*-stammerne kan lysere syrevækkerbakterier og at de fleste kunne forgære de sukkerarter, der er til stede i bakteriecellevægge. Det er vigtigt at vide mere om konkurrenceegenskaberne for *Lactobacillus*-stammer, der skal bruges i oste til at påvirke smag eller hæmme produktskadelige bakterier.

I langtidsmodnede oste er det højest sandsynligt at forskellige *Lactobacillus*-stammer fra medfølgefloraen bidrager på specifikke måder til lugt og smag. I oste, der kun bliver lagret et par

uger, har vi set at medfølgefloraens rolle især kan være at hæmme produktskadelige bakterier og sikre de milde ostes friske og rene smag. En anden mulig rolle i disse unge oste er at antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer accelererer modningen ved at lysere bakterier fra for eksempel syrevækkeren.

4. Publikationer i projektet

4.1 Manuskripter til publicering i internationale tidsskrifter

1. ADAMBERG, K., ANTONSSON, M., VOGENSEN, F.K., NIELSEN, E.W. & ARDÖ, Y. Carbohydrate fermentation by NSLAB strains isolated from Danish cheese
2. CEDERGREN, A., CHRISTIANSEN, P., NIELSEN, E.W., VOGENSEN, F.K., & ARDÖ, Y. Study of interactions in cheese between four strains of antimicrobial *Lactobacillus paracasei* and DL-starter bacteria
3. CHRISTIANSEN, P., ANTONSSON, M., MØLLER, P.L., KASK, S., VOGENSEN, F.K., NIELSEN, E.W., JENSEN, D.F., PETERSEN, M.H., PETERSEN, M., ADAMBERG, K. & ARDÖ, Y. Antimicrobial activity of genetically and physiologically classified *Lactobacillus* strains isolated from semi-hard cheeses.
4. NEMCOVA, L., JENSEN, D.F., PETERSEN, M., & ARDÖ, Y. Casein breakdown in milk by *Lactobacillus paracasei* strains isolated from semi-hard cheese
5. PETERSEN, M., MØLLER, P.L., NIELSEN, E.W., ARDÖ, Y. & VOGENSEN, F.K. Molecular typing of non-starter lactic acid bacteria in different productions of Danbo cheese.

4.2 Indlæg ved faglige kongresser, symposier

6. JENSEN, D.F., NEMCOVÁ, L., ANTONSSON, M., MØLLER, P.L., VOGENSEN, F.K., NIELSEN, E.W. & ARDÖ, Y. 2000. Proteolytic activity in milk of facultative heterofermentative lactobacilli isolated from cheese. Poster på LMC's Levnedsmiddelkongres 2000, Lyngby og på IDF symposium on Cheese Ripening and Technology, Banff, Canada, 2000
7. MØLLER, P.L., JENSEN, D.F., KASK, S., ARDÖ, Y., NIELSEN, E.W. & VOGENSEN, F.K. 2000. Characterisation of non-starter lactic acid bacteria isolated from Danish cheeses. Poster på LMC's Levnedsmiddelkongres 2000 i Lyngby og på IDF symposium on Cheese Ripening and Technology, Banff, Canada, 2000
8. PETERSEN, M.H., MØLLER, P.L., VOGENSEN, F., NIELSEN, E.W. & ARDÖ, Y. 2001. Anticlostridial isolates from Danish cheeses. Poster på LMC's Levnedsmiddelkongres 2001 på Frederiksberg.
9. PETERSEN, M., MØLLER, P.L. & VOGENSEN, F. 2001. Changes in the composition of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) between different productions of Danbo cheeses. Poster på LMC's Levnedsmiddelkongres 2001 i Frederiksberg.
10. ARDÖ, Y. 2002. Controlling microbial activities in cheese maturation. Foredrag ved LMC's Levnedsmiddelkongres 2002, Lyngby
11. ADAMBERG, K., ANTONSSON, M., ARDÖ, Y., NIELSEN, E.W. & VOGENSEN, F.K. 2002. Carbohydrate fermentation by non-starter LAB isolated from Danish cheese. Poster på LMC's Levnedsmiddelkongres 2002, Lyngby
12. PETERSEN, M.H., MØLLER, P.L., VOGENSEN, F.K., NIELSEN, E.W. & ARDÖ, Y. 2002. Anticlostridial *Lactobacillus paracasei* prevent late blowing in semi-hard cheese. Poster på IDF World Dairy Congres, Congrilait, Paris, France, September 2002

4.3 Faglige artikler og mødeindlæg

13. ARDÖ, Y., JENSEN, D.F., VOGENSEN, F.K., MØLLER, P.L. & NIELSEN, W. E. 1999. Medfølgefloraens rolle i modningen af danske ostetyper. *Mælkeritidende*, 1999, 24:624-627
14. ARDÖ, Y. 2002. Medfølgefloraens rolle i dansk ost. Danmarks Mejeritekniske Selskab, Brødstrup, 23. januar

5. Andre referencer

15. ANTONSSON, M., ARDÖ, Y. & MOLIN, G. 2001. The spontaneous microflora and ripening of Herrgård cheese from three different dairy plants. *International Dairy Journal*, 11, 285-291
16. ANTONSSON, M., ARDÖ, Y., NILSSON, B.F. & MOLIN, G. 2002. Screening of *Lactobacillus* strains in a cheese model system designated for selection of adjunct cultures. *Journal of Dairy Research*, 69:457-472
17. ANTONSSON, M., MOLIN, G. & ARDÖ, Y. 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese and their function as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*, (accepted)
18. ARDÖ, Y. & KRISTIANSEN, K.R. 2002. Chromatographic methods, Analysis. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Ed. Roginski, H, Academic Press, pp. 55-62
19. CHRISTIANSSON, A., OGURA, H. & ALFREDSSON, S. 1993. Undesireable side-effects upon use of lactobacilli to prevent late blowing in cheese. *International dairy Journal*, 3: 560
20. FITZSIMONS, N.A., CONDON, S., COGAN, T.M. & BERESFORD, T. 1996. Identification of strains of *Lactobacillus* in Cheddar cheese using randomly amplified polymorphic DNA. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 35: 222-223
21. LEESMENT, H. 1956. Über die Entwicklung und die Eigenschaften von *Lactobacillus casei* in Mischkulturen unter besonderer Berücksichtigung des Käsestandpunktes. *PhD thesis* Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany
22. LINDBERG, A.-M., CHRISTIANSSON, A., RUKKE, E.-O., EKLUND, T. & MOLIN, G. 1996. Bacterial flora of Norwegian and Swedish semi-hard cheese after ripening, with special reference to *Lactobacillus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 50: 563-572
23. ORLA-JENSEN, S. 1904. Biologische Studien über den Käsereifungsprozess unter spezieller Berücksichtigung der flüchtigen Fettsäuren. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz*, 319-406

6. Master- og ph.d.-uddannelse, gæsteforskere

To specialeopgaver blev udført i projektet. Tre gæste-ph.d.-studerende har hver arbejdet ca. et halvt år i projektet og en KVL-ph.d.-studerende, der startede i projektet rejste desværre efter ca. et år. Resultater af de studerendes arbejde findes i de ovenstående manuskripter og præsentationer, og derudover er der udarbejdet følgende rapporter:

24. MARTIN HOLST PETERSEN. 2000. Anvendelse af udvalgte *Lactobacillus* isolater med antimikrobiel aktivitet over for smørsyrebakterier i ost. Specielearbejde, KVL
25. MIKAEL PETERSEN. 2000. Ændring af medfølgefloraens sammensætning mellem forskellige produktioner af Danbo undersøgt ved hjælp af molekylære identifikationsmetoder. Specielearbejde, KVL
26. DORTE FRIS JENSEN. 1999. Proteolytic activity in milk of facultative heterofermentative lactobacilli isolated from cheese. Ph.d.-report from explorative data analysis/chemometrics course, KVL
27. LUCIE NEMCOVA. 1999. Proteolytic activity of facultative heterofermentative lactobacilli isolated from cheese, in milk. Ph.d.-report, Dep. University Prague

7. Samarbejdsrelationer

Nationalt

Aars Mejeri, Arla Foods
 Asaa Andelsmejeri
 Nordenskov Mejeri, Arla Foods
 Nr. Vium Mejeri, Arla Foods
 Tistrup mejeri, Arla Foods
 Ribe Mejeri, Arla Foods
 Tholstrup Cheese
 Vellevej Mejeri, Arla Foods
 Arla Foods Innovation, Brabrand

Internationalt

Laboratory of Food Hygiene, Department of Food Technology, Lund University, Lund, Sverige.
National Institute of Chemical Physics and Biophysics, Tallin, Estland.
Institute of Chemical Technology, Prag, Tjekkiet.

8. Praktisk og videnskabelig betydning

Den praktiske betydning af projektet er at den nye viden om hvordan medfølgefloraen ser ud i oste fra danske mejerier i dag, kan bruges ved valg af modningskulturer. Forskningsprojektet har vist at medfølgefloraen i danske gule oste generelt er domineret af et meget lille antal arter af hvilke de fleste tilhører *Lb. paracasei*-komplekset. Antallet af forskellige stammer er derimod meget stort, hvilket indikerer at der vedvarende kommer nye *Lactobacillus* med den rå mælk, og at der ikke findes en veludviklet mikroflora i f.eks. biofilm på de danske mejerier. Arter af *Lb. paracasei*-komplekset er i internationale undersøgelser vist at have god evne til at overleve pasteurisering.

En hurtigmetode til at analysere arterne i medfølgefloraen er blevet afprøvet i projektet, og den blev med stor fordel brugt til at adskille syrevækkerbakterier fra den egentlige medfølgeflora i danske gule oste.

Lactobacillus paracasei-stammerne er forskellige i evne til at påvirke modning og smagsudvikling, og de har forskellige evner til at konkurrere og dominere den naturlige medfølgeflora i ostene. En stor del af dem er antimikrobielle. De hæmmer senpustning i ost og de bidrager til en ren og god smag i korttidsmodnede oste. De antimikrobielle *Lactobacillus*-stammer kan også bruges til at forandre den totale mikroflora i ostene under modningen, og derved forbedre modning og smagsudvikling.

Den videnskabelige betydning ligger i ny viden om forskellige egenskaber hos *Lactobacillus*-stammer der dominerer i faste og halvfaste oste, og især dem der har en betydning for stammernes evne til at konkurrere med andre bakterier. Der er også blevet beskrevet en ny *Lactobacillus*-art der kommer fra traditionelle danske mejerisyrevækkere.

9. Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter

”Hæmning af klostridier i ost og ensilage ved brug af antimikrobielle kulturer med bakterier som forekommer naturligt i danske oste”, (2001-2004). MFF/FØTEK III, Projektleder: Ylva Ardö.

