

# Afslutningsrapport

Hæmning af klostridier i ost og ensilage ved brug af antimikrobielle kulturer med bakterier, som forekommer naturligt i danske oste

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2005-72

*September 2005*

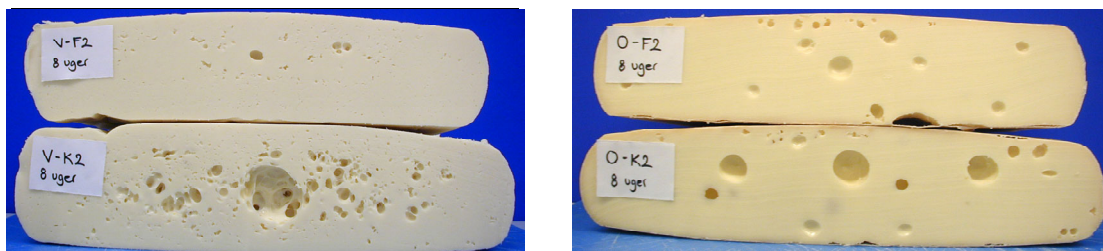


**mejeri**foreningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for projektet  
**Hæmning af klostridier i ost og ensilage ved brug af antimikrobielle  
kulturer med bakterier som forekommer naturligt i danske oste**  
Mejeribrugets ForskningsFond/FØTEK

**Ylva Ardö & Finn K. Vogensen**



Institut for Fødevarevidenskab  
Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole  
Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C

September 2005

**Projekttitle:** Hæmning af klostridier i ost og ensilage ved brug af antimikrobielle kulturer med bakterier som forekommer naturligt i danske oste

**Projektperiode:** 1 september 2001 – 30. april 2005

**Projektleder:**

Professor Ylva Ardö, projektleder

Institut for Fødevarevidenskab (IFV), Mejeriteknologi  
Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole  
Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C  
Tlf. 3528 3193. Fax: 3528 3190. E-mail ya@kvl.dk

**Projektdeltagere:**

Lektor Finn K. Vogensen (Fødevaremikrobiologi, IFV)

Lektor emeritus E. Waagner Nielsen, (Mejeriteknologi, IFV)

Udviklingschef, Ph.d., Kerstin Holmgren (Medipharm AB/ArlaFoods)

Seniorforsker Christer Ohlsson (DJF, Foulum/Medipharm AB)

Lektor Karl-Henrik Brogren (Fødevaremikrobiologi, IFV)

Ph.d.-studerende Pia Christiansen (Mejeriteknologi, IFV)

Gæste-Ph.d.-studerende Aneta Jánosková fra Slovakiet

Gæste-Ph.d.-studerende Stephan Tuma fra Tjekkiet

Forskningsassistent Mikkel Laust Broe

Leonardo-stipendiat Pedro J. Periera, Portugal

Studertermedarbejder Tove Kjær Christiansen

Studertermedarbejder Spyridon Sergiantis, Grækenland

Speciale-studerende Orreaga Goienetxe fra Spanien

Speciale-studerende Nicolai Møller-Jensen

Speciale-studerende René Nordgaard Greve

Laborant Julie Greve Kristensen

Laborant Marina Hansen

Laborant Mona Østergaard

Laborant Bashir Aideh

Laborant Lone Permin

**Finansieringskilder:** FØTEK 3/Mejeribrugets ForskningsFond

## Sammendrag

Projektet har undersøgt hæmning af klostridier i ost og ensilage ved brug af antimikrobielle kulturer med bakterier som forekommer naturligt i danske oste. Formålet var at finde økologisk holdbare veje til at minimere risikoen for senpustning af ost. *Lactobacillus* stammer var isoleret fra danske oste af høj kvalitet og det har vist sig at mange af dem har en evne til at hæmme klostridier og andre skadelige bakterier. Enkelte stammer og blandinger af dem blev evalueret for deres anvendelse i ost og ensilage.

*Lactobacillus* isolater med forskellige PFGE-profiler (Puls-Felt GelElektroforese, dvs. de er forskellige stammer) blev testet for hæmmende aktivitet overfor 15 udvalgte *Clostridium* isolater ved brøndtest og krydsstregpodning. Cirka en tredjedel af de 147 testede stammer hæmmede klostridier i nogen grad, og ni blev udvalgt for specielt bred aktivitet. Disse ni blev senere i projektet kompletteret med yderligere fem isolater.

Indledende studier blev udført af mekanismer bag de antimikrobielle aktiviteter. En del af de antimikrobielle stammer af *Lb. paracasei* producerede bakteriociner med forskellige egenskaber og hæmningsmønstre. Især to forskellige stammer blev vist at have en tydelig og bred antiklostridial effekt og desuden en god konkurrenceevne i ost. Disse to stammer er meget interessante at udvikle videre til brug ved osteproduktion.

I projektet har vi også vist at de antimikrobielle laktobaciller bliver inaktiveret ved pasteurisering, men at de fleste af dem vokser op igen i næringssubstrat (30°C) efter et par døgn. Følsomheden varierede mellem stammerne, men kun én stamme af de ni vi testede voksede aldrig op igen efter pasteurisering i mælk. Denne stamme er det muligt at bruge i ensilage, hvis det er vigtigt at den ikke skal overleve pasteurisering af ostemælk.

Det er i projektet udviklet og tilpasset en række molekylærbiologiske metoder til at identificere og klassificere klostridier og de pågældende laktobaciller, herunder ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) og Rep-PCR for klassificering og identificering af klostridier, og Rep-PCR og arts-specifikke genprober for laktobaciller.

Græs-ensilering blev undersøgt i modelforsøg, og helsæds-ensilering i rundballer. Ved begge tilfælde var der tale om en meget tør sommer og ensilagen blev tør og af høj kvalitet. Der var ikke ret stor vækst af klostridier - også dem vi tilsatte forsvandt ret hurtigt. Det blev dog vist at ved tilsætning af ensileringskultur faldt pH hurtigere og blev lavere end ved naturlig ensilering, *Lactobacillus* stammerne overlever ved det lave pH og havde evne til at holde det lavt, hvilket også hæmmer vækst af klostridier. Effekt af bakteriocin var ikke muligt at studere i den tørre ensilage, men de antimikrobielle laktobaciller overlevede højst sandsynligt, da der kun blev identificeret *Lb. paracasei* i ensilage, hvor de var tilsat.

Ved ostningsforsøg blev det demonstreret at tilsætning af antimikrobielle *Lactobacillus paracasei* ikke alene kan stoppe klostridieaktivitet, hvis der er et højt antal af sporer i mælken. Ved lave sporetal hæmmedes dog aktiviteterne under modningen af ost, også i ost der blev lavet uden brug af mikrofiltrering og tilsætninger som f.eks. nitrat og lysozym.

## Abstract

### **Inhibition of clostridia activities in cheese and silage using antimicrobial bacteria naturally occurring in Danish cheese**

The project has investigated inhibition of clostridia in cheese and silage by the use of anticlostridial cultures of bacteria originating from Danish cheeses. The aim was to find sustainable ways to minimize the risk for blowing defects in cheese manufacture. *Lactobacillus* strains were previously isolated from Danish cheeses of high quality, and it was shown that many of these isolates had the ability to inhibit clostridia and other harmful bacteria. Individual strains and mixtures were evaluated for their application in cheese and silage.

In a previous MFF project non-starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) were isolated. 147 isolates of *Lactobacillus* with different PFGE-profile (i.e. they are different strains) were analysed for their inhibitory activity against 15 selected *Clostridium* isolates using agar-well diffusion and cross-streaking assays. Approximately one third of the isolates inhibited one or more of the clostridia, and nine of the isolates with a broad inhibition spectrum were first selected for further analysis. These nine isolates were later complemented with additional 5 isolates.

Preliminary analysis has been conducted to elucidate the mechanism behind the inhibition. Strains of *Lb. paracasei* produced bacteriocins with different activities and inhibition spectrum. Particularly 2 strains were shown to have a clear and broad anticlostridial effect and in addition good competition ability in cheeses. It will be of interest to develop these strains for further use in cheese production.

We also observed that the many of the nine antimicrobial lactobacilli tested were inactivated immediately after pasteurization, but that they recovered when left in milk or media after a few days. The sensitivity between strains to pasteurization varied, and only one out of the 9 strains did not recover at all after pasteurization. This strain may be useful for silage fermentation if it is important that the strain used should not survive pasteurization of cheese milk.

In the project a number of molecular biology methods for identification and classification of clostridia and NSLAB has been developed or adapted. These include ARDRA and rep-PCR methods for identification of clostridia at species and strain level, and Rep-PCR and species specific primer set for lactobacilli were developed and tested.

Silage was made from grass in pilot scale and from whole crop in round bales of straw. In both cases it was very dry summers and the silage was of very good quality. In both trials we did not see growth of clostridia in any of the samples including the controls and also the clostridia we added disappeared rapidly. It was shown that when silage cultures were added the pH fell rapidly and to a lower pH than if a spontaneous fermentation took place. The added *Lactobacillus* strains survived at the low pH and kept the pH low, which also inhibit outgrowth of clostridial spores. It was not possible to demonstrate the direct effect of bacteriocin production in the dry silage, but the added antimicrobial lactobacilli probably survived, as *Lb. paracasei* only were detected in samples were they were added.

In cheese trails it was demonstrated that the addition of anticlostridial *Lactobacillus paracasei* alone cannot control clostridia development if spore counts are high. With low spore counts the development of clostridia was inhibited during ripening, even in cheeses made from milk without microfiltration or additions like nitrate or lysozyme.

## 1. Baggrund og formål

Senpustning af ost forårsages fortrinsvis af *Clostridium tyrobutyricum* sporer, selv når disse forekommer i små mængder i ostemælken. Det er et stort problem i mejeriindustrien og bekæmpes i dag mest ved kemiske og teknologiske metoder eller i nogle tilfælde ved frasortering af mælk med højt sporeindhold, der så kan anvendes til andet end ostefremstilling. Fodring med ensilage af dårlig kvalitet er den hyppigste årsag til at den rå mælk kontamineres med klostridiesporer. Det er i dag muligt at reducere den skadelige virkning i ost ved brug af tilsætningsstoffer (nitrat og lysozym), men der er problemer med anvendelsen af disse og de er forbudt ved økologisk ostproduktion. Mikrofiltrering og bacto-fugering er tekniske måder til effektivt at fjerne sporerne fra mælken, men de er dyre i anskaffelsespris og drift og de giver nye problemer. Begge teknikker kræver at fløden steriliseres sammen med en del af mælken for at slå sporerne ihjel med kraftige ostningstekniske forandringer til følge. En skånsommere håndtering af mælken på mejeriet forudsætter en meget mere kontrolleret fermentering og håndtering af ensilagen samt kontrol og sortering af mælken til ostproduktion.

Formålet med projektet var at finde økologisk holdbare veje til at minimere risikoen for senpustning af ost. Naturligt tilstedeværende *Lactobacillus* som er isoleret (i et tidligere FØTEK-projekt under Mejeribrugets ForskningsFond) fra danske oste af høj kvalitet og som producerer bakteriociner med evne til at hæmme smørsyre- og andre skadelige bakterier, er blevet evalueret for deres anvendelse i ost og ensilage. Projektet har undersøgt muligheder for at tilsætte forskellige bakterier til ensilage og ost på en måde som tager hele den økologiske kæde fra ensilage til færdig ost i betragtning. Ensileringskulturer, der tilsættes ensilage til foder til malkekøer, skal kun indeholde bakteriearter og -stammer der ikke er skadelige, hvis de kommer i ostemælken.

## 2. Resultat

*2.1. Lactobacillus paracasei* stammer med antimikrobiel aktivitet overfor *Clostridium* isolater

Det blev vist at 1/3 af de testede *Lactobacillus* isolater inhiberede klostridier. Af disse blev ni i første omgang valgt, fordi de havde en bredspektret og tydelig effekt. De blev alle vist at være af arten *Lactobacillus paracasei*, og de blev klassificeret som forskellige stammer eftersom de alle havde specifikke mønstre ved analyse ved PFGE og Rep-PCR. Disse ni blev opdelt i tre blandinger der blev testet i pilotostningsforsøg og i ensilage (se nedenfor). Stammerne blev også undersøgt for inhiberende aktiviteter overfor andre *Lactobacillus* arter samt mod hinanden sammen med fem andre af *Lactobacillus* stammer der blev valgt ud senere. Alle de totalt 14 udvalgte stammer havde forskellige Rep-PCR profiler (Fig. 1).

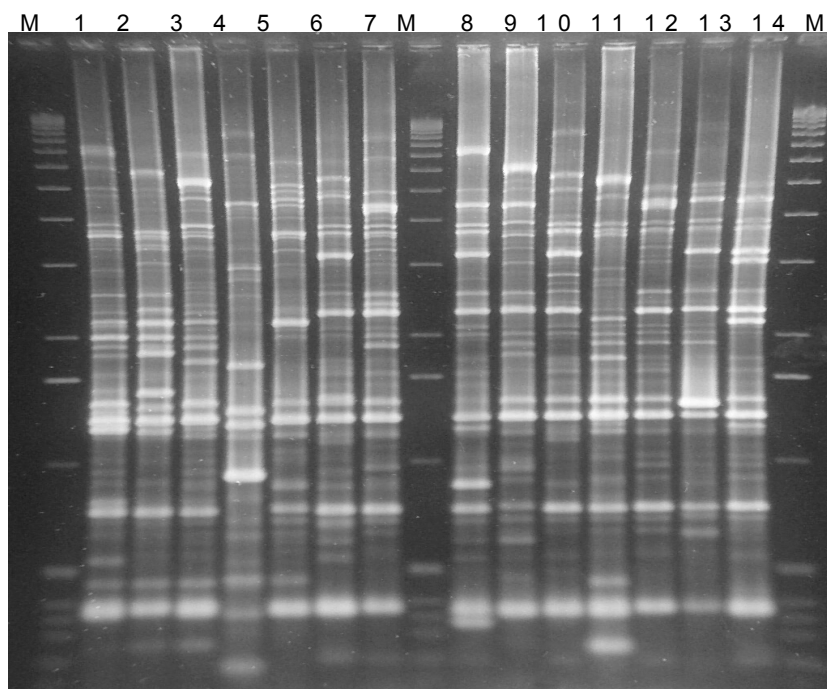
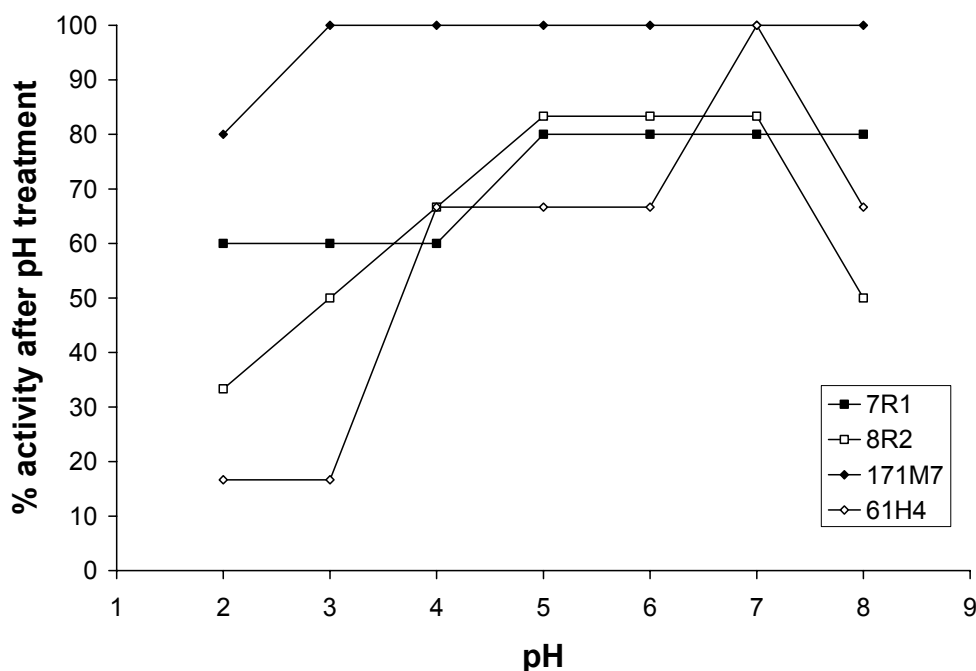


Fig. 1. Rep-PCR profiler af 14 *Lactobacillus* isolater (13 *Lb. paracasei* og 1 *Lb. plantarum* stamme) fra dansk ost der viser hæmning af *Clostridium* stammer.

*Lactobacillus* stammerne havde mange forskellige inhiberingsmønstre. Det blev specielt undersøgt, om den inhiberende faktor var af bakteriocin-type ved inkubering med og uden proteinase K, der effektivt bryder ned proteiner og peptider. En del inhibering blev vist formodentligt at være en følge af lavt pH, men også katalase blev brugt for at eliminere inhibering fra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fire *Lb. paracasei* stammer, der dannede bakteriocin, blev videre undersøgt. Bakteriocinerne blev ikke inhiberet ved 55 °C i 30 min, men inaktiverede ved 100 °C, og de var endnu aktive efter 30 min fra pH 2 til pH 8 (Fig. 2). Variationen mellem stammerne var stor, hvilket indikerer at det er tale om forskellige bakteriociner. Inhiberingsmønstret mod 15 forskellige *Clostridium* stammer varierede også, og resultatet indikerer at der er mindst tre forskellige slags bakteriociner. Indledende forsøg på at isolere bakteriocinerne gav en del viden om deres egenskaber, men der var ikke mulighed for at oprense og karakterisere dem indenfor projektets tidsperiode.

Af de fire udvalgte bakteriocindannende *Lb. paracasei* stammer var to også gode til at overleve og dominere andre *Lactobacillus* i ost (se nedenfor). Disse to, 7R1 og 8R2, var også nemme at opformere. En anden *Lb. paracasei* stamme, 4R4, voksede meget hurtigt og inhiberede andre bakterier, herunder *Clostridium*, men der blev ikke vist at den dannede bakteriocin.



**Fig. 2.** Inhiberende aktivitet mod *Clostridium* efter opbevarelse ved forskellige pH i intervallet 2 - 8 i 30 min. Ved hvert pH er den inhiberende aktivitet overfor 5 eller 6 stammer af *Clostridium tyrobutyricum* testet.

## 2.2. Teknologisk vigtige egenskaber

*Lb. paracasei* stammerne havde forskellig evne til at overleve neutralisering med NaOH, når de blev opformeret i MRS-substrat til høje celletal. En del stammer var ikke mulige at opformere til tilstrækkelige mængder for ensilageforsøg med rundballer.

Interessante forskelle mellem stammernes evne til at overleve varmebehandling i 5 min ved 60 °C blev vist i modelsystem udført med buffer ved pH 6.8 (Fig. 3). Syv stammer overlevede termiseringen, men det var tydeligt at hvilende celler var mere tolerante over for termisering end frisk opvoksede celler. To af stammerne var mere følsomme overfor varmebehandlingen end de andre og voksede ikke op umiddelbart efter termiseringen. For den ene, stamme 4R4, voksede celler der var hvilende under varmebehandlingen op igen efter 3 døgn, mens de friske ikke voksede op igen. For stamme 162M6 voksede både de hvilende og de friske celler op efter 5 døgn. Ingen af stammerne overlevede pasteurisering i buffer, og ingen af disse pasteuriserede celler blev revitaliserede i MRS eller gærmælk i løbet af 6 uger. Stammerne blev også testet i mælk som beskytter cellerne under varmebehandlingen. Ikke mange levende celler var tilbage efter pasteurisering, men de fleste voksede op igen efter 3 døgn, og det blev vist ved brug af Rep-PCR, at det var de oprindelige stammer der voksede op og ikke kontaminanter. Kun stamme 4R4 voksede ikke op igen efter pasteuriseringen i mælk.



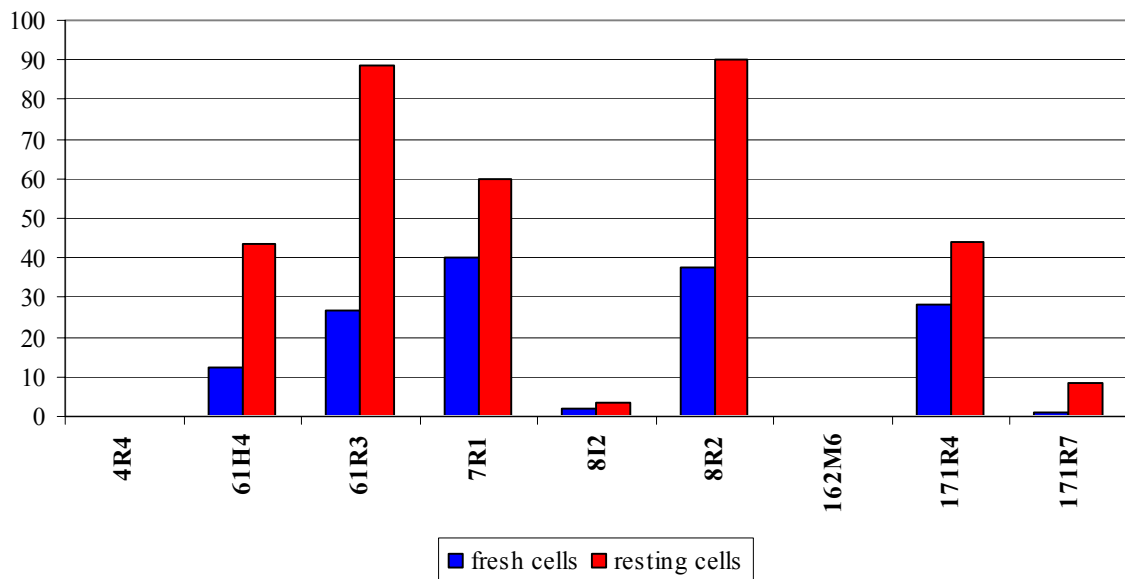
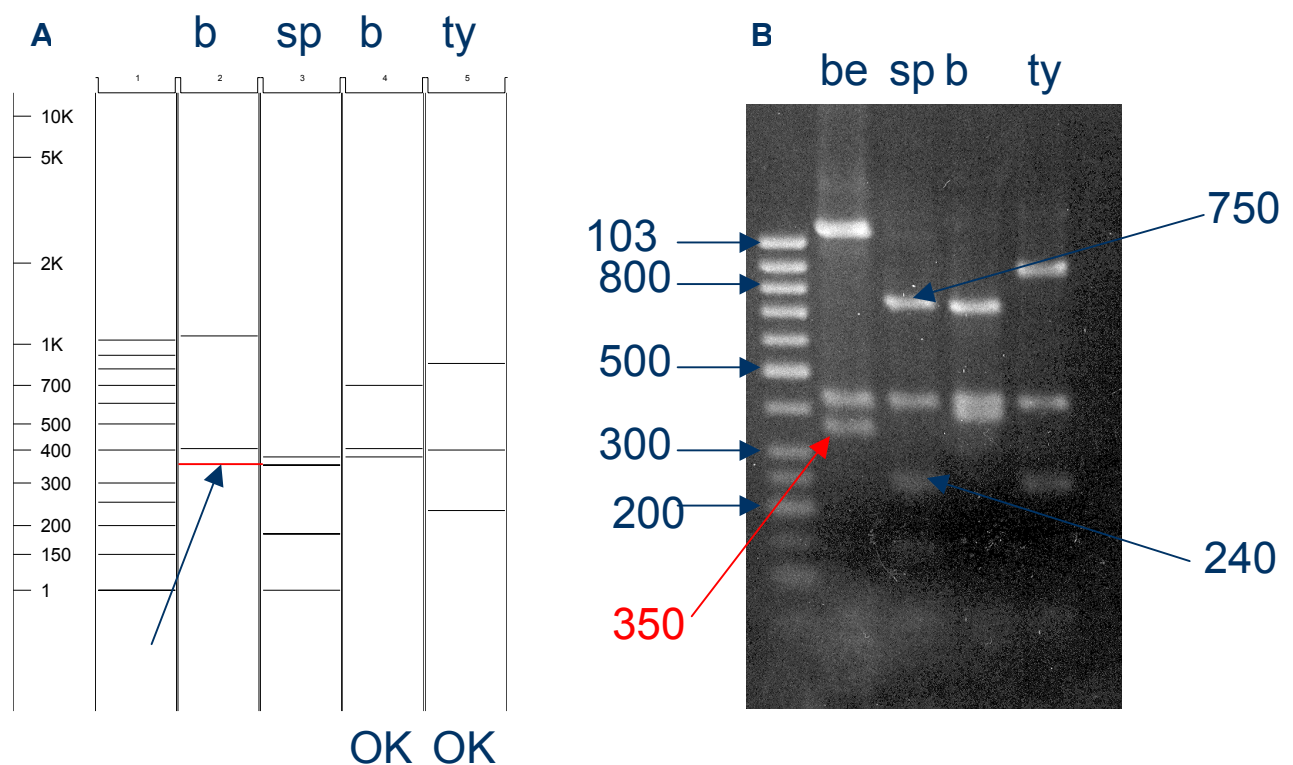


Fig. 3. Overlevelsesprocent direkte efter termisering (5 min ved 60°C) for friske og hvilende celler i buffer.

### 2.3. Metoder til at identificere og klassificere *Clostridium*, *Lactobacillus* og bakteriearter i ensilage-starter

En ARDRA metode blev udviklet til hurtig identifikation af *Clostridium* arter fundet i mejeriprodukter og ensilage. Metoden er baseret på PCR amplifikation af 16S ribosomale gener efterfulgt af skæring med restriktionsenzymet HhaI. Ved gelelektroforese opnås båndmønstre der er karakteristisk for hhv. *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* og *C. sporogenes* (Fig. 4). Metoden anvender simpel DNA fremstilling ud fra en cellepellet ved rystning med glaskugler.

Real-time PCR detektion og kvantificering af *Lactobacillus paracasei* i ensilage blev udviklet. Metoden er udviklet i samarbejde med Björn Rosén, Applied Biosystems i Stockholm og er baseret på TagMan PCR-princippet. Primere og probers specificitet er testet over for 10 *Lactobacillus* arter fundet i ensilage og i ost. Metoden er brugt til dyrkningsfri kvantificering af *L. paracasei* i ensilage forsøg i storballer. Det forventes at metoden kan videreudvikles til dyrkningsfri detektion og kvantificering af *L. paracasei* i ost.



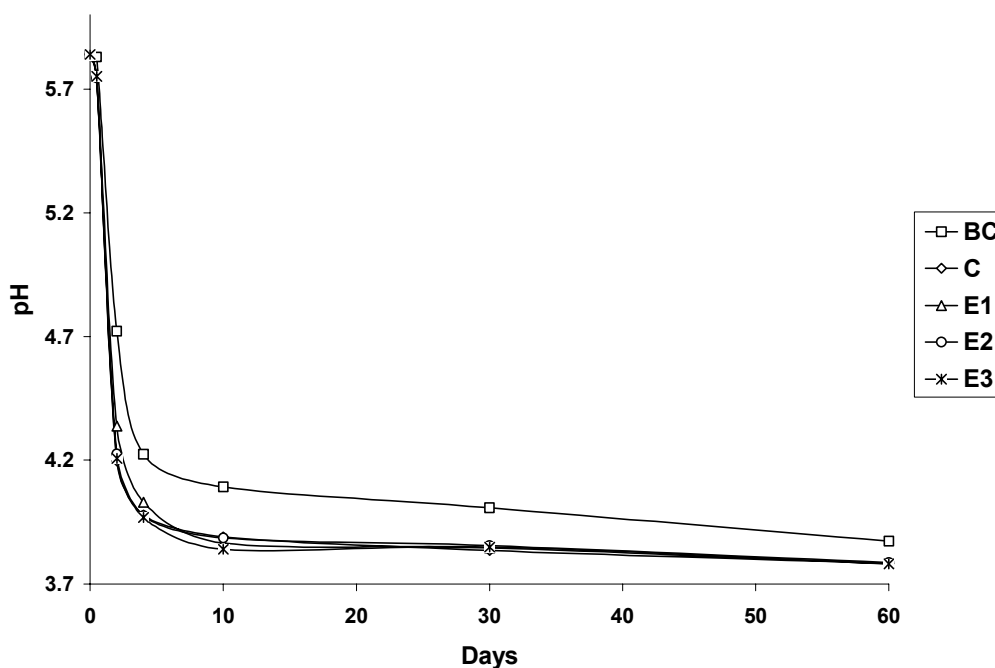
Figur 4. Teoretisk forventet gelmønster (billede A) og faktisk opnået gelmønster for PCR amplificerede 16S ribosomale gener skåret med HhaI (billede B). Forkortelser: (be): *C. beijerinckii*, (sp): *C. sporogenes*, (bu): *C. butyricum*, (ty): *C. tyrobutyricum*. Rød pil viser et ikke forventet bånd i gelmønstret fra *C. beijerinckii*.

Rep-PCR blev brugt til genkendelse af bakteriestammer i ost og ensilage. Rep-PCR metoden blev oprindeligt beskrevet for ca. 10 år siden som en alternativ typningsmetode på underartsniveau (dvs. til ”stamme” eller ”gruppe af stamme” niveau). Der er flere forskellige primersæt der har været brugt til typning bl.a. de oprindelige Rep-primere, ERIC-primere, BOX-primere og GTG<sub>5</sub>-primeren. Flere forskere har fundet at Rep-PCR med de rette primere er lige så god til stammetypning, som Puls-Felt GelElektroforese, der i mange år har været standardmetode til stammetypning. Vi har afprøvet Rep-primere og GTG<sub>5</sub> primere. Vi fandt at *Lb. paracasei* stammer bedst kunne types med Rep-primere. Vi fandt også at de oprindelige PCR betingelser ikke var optimale, idet fragmenter over ca. 3-4 kbp. ikke blev amplificeret. Vi modificerede derfor metoden så bånd op til ca. 7-8 kbp. blev amplificeret. Herved opnåede vi at vi var i stand til at adskille stammer der i forvejen var typet med PFGE. Vi har anvendt metoden til at genkende stammer vi har tilsat til ost og ensilage, samt til at kontrollere at de isolater der overlever i pastiseringsforsøg også var dem der blev tilsat. I kontrolstoffer uden tilsætning finder vi typisk 5-8 forskellige mønstre blandt 24 isolater, hvilket svarer til hvad vi tidligere har fundet når vi har analyseret med PFGE. I figur 1 er vist profiler for 14 *Lactobacillus* isolater der udviser antimikrobiel aktivitet over for *Clostridium*. Vi har også anvendt metoden til at type de *Clostridium* stammer der indgik i hæmningsassay forsøgene for at sikre at der var tale om forskellige stammer.

Artsspecifikke primere blev evalueret og udviklet til hurtig identifikation af mælkesyrebakterie arter. For hurtigere at kunne identificere hvilke *Lactobacillus* arter der blev isoleret fra oste og fra ensilage afprøvede vi i litteraturen beskrevne artsspecifikke primersæt for *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus* og *Lb. zae*. Vi fandt at et enkelt af de publicerede primersæt var specifikt for *Lb. paracasei*, et andet var specifikt for *Lb. zae*, mens to primersæt reagerede både med *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* og *Lb. paraplantarum*. Foreløbige resultater tyder på at også de to primersæt der er publiceret for henholdsvis *Lb. rhamnosus* og *Lb. curvatus* er artsspecifikke, men yderligere forsøg er nødvendige for at sikre dette. Vi har udviklet de artsspecifikke PCR bestemmelser så de virker direkte på kolonimateriale behandlet med mutanolysin (et cellevægs nedbrydende enzym). Vi har brugt de artsspecifikke primersæt til at påvise at *Lb. paracasei* overlever i græsensilage når den er tilsat men ikke findes i detekterbare mængder når den ikke er tilsat. Desuden har vi vist at *Lb. plantarum* (og/eller *Lb. pentosus*, og/eller *Lb. paraplantarum*) altid er til stede i græsensilage uanset om de er tilsat eller ej. Vi har også arbejdet på at udvikle primere der er specifikke for hhv. *Pediococcus acidilactici* og *Enterococcus faecium* idet der i litteraturen ikke var beskrevet sådanne. Dette er dog ikke lykkedes, idet der primere ikke har kunnet laves tilstrækkelig specifikke til kun at påvise de to arter. Af tidsmæssige årsager blev arbejdet derfor indstillet.

#### 2.4. Ensileringsforsøg

I sommeren 2002 blev der udført modelforsøg med græsensilering i Sverige. De tidligere beskrevne ni udvalgte antiklostridiale *Lb. paracasei* stammer blev opdelt ind i tre blandinger med tre stammer i hver. Sammensætningen af stammer blev optimeret ud fra forskelle i hæmningsmønster så de komplementerede hinanden i hver blanding og ikke inhiberede hinanden. Græsensilage blev fremstillet i modelskala ved brug af en kommerciel ensilage starterkultur med to *Pediococcus acidilactici* stammer, en *Enterococcus faecium* stamme og to *Lactobacillus plantarum* stammer. Disse blev komplementeret med de forskellige blandinger af antiklostridiale *Lb. paracasei* stammer. De tilsatte *Lb. paracasei* stammers evne for til at vokse og overleve i græsensilage blev undersøgt ved artsspecifik PCR analyse. Græsset var ekstremt tørt den sommer eksperimenterne blev udført og ensilagen blev meget god uden nogen vækst af klostridier selv i de spontant fermenterede kontrolensilager. Også de *Clostridium tyrobutyricum* vi satte til i eksperimenterne forsvandt hurtigt, hvilket gjorde det umuligt at undersøge hvor effektiv den antiklostridiale aktivitet var i ensilage. Det blev vist at de tilsatte antiklostridiale *Lb. paracasei* voksede i græsensilagen og overlevede i hvert tilfælde 60 døgn. Ved tilsætning af kultur til ensilage accelereres syrningsprocessen og et lavt pH dannes hurtigere (Fig. 5), og derved opnås der er en effektiv beskyttelse mod klostridievækst.



Figur 5. pH i ensilage under during ensiling for uden kulturer (BC), med starter (C) samt med de antikostridiale *Lb. paracasei* stammer i de tre blandinger (E1, E2, E3).

Der blev udført rundballe-ensilageforsøg med helsæd på Danmarks JordbrugsForskning i Foulum i sommeren 2003. Der blev anvendt 6 *Lactobacillus* stammer i to blandinger til forsøg. Fra erfaringen fra året før beregnede vi at der skulle anvendes 10 × koncentreret kultur fra mindst 30 liter til forsøgene hvis de blev opformeret på samme måde som til græsforsøgene. Medipharm var ikke i stand til at producere fra så små mængder og vores egen kapacitet sluttede ved ca. 5 liter. Vi forsøgte derfor at producere stammerne med NaOH neutralisering og øget kulhydrat tilstedeværelse så at tilstrækkeligt mange celler var levende fra 4 liter kultur. Det lykkedes uden problemer med de 3 af de seks kulturer, mens der var problemer med de 3 resterende kulturer, der enten døde under opkoncentrering/frysning, eller direkte lyserede. Disse fænomener så vi kun, når vi neutraliserede for at opnå en højere koncentration af celler i kulturen men ikke hvis vi høstede celler, der var i tidlig stationær fase uden neutralisering. P.g.a. tidspres (en meget varm sommer fremskyndede ensileringen 1½-2 uger) var vi nødt til at fremstille blandinger med i alt 5 stammer i 2 kombinationer af 3 stammer. Desværre var mængderne af levende celler heller ikke optimal i blandingerne idet 1-2 af stammerne kom til at dominere 10 fold over de 1-2 andre.

Ensilagen var af god kvalitet og tørstof var overraskende højt; ensilageprøver blev analyseret for tørstof, protein, aske, nitrat, stivelse, sukker (vandopløselige kulhydrater), fiberindhold, energiværdi og ammonium. Sukkerindholdet var lavest for ensilage med tilsætning af de antimikrobielle *Lactobacillus* stammer og generelt lavere i ensilage med bakteriekulturer end i ensilage uden tilsætning. Fermenteringen blev studeret ved analyse af pH, ethanol, 2,3-butanediol og organiske syrer (mælkesyre, eddikesyre, smørsyre, ravsyre) i ensilage efter 50 dage. Der var signifikante effekter af de tilsatte bakteriekulturer, f.eks. var pH lavere i ensilage med tilsatte bakteriekulturer og lavest i de to der kun var tilsat en af de to *Lb. paracasei* blandinger, medens ensilage med enterokokker, pediokokker og *Lb. plantarum* havde højest indhold af eddikesyre. Desværre var der ingen signifikant aktivitet af klostridier i nogen af ensilagerne, sandsynligvis som følge den gode kvalitet og det lave vandindhold. *Lb. paracasei* blev genfundet efter 12 dage i alle prøver (250 mg ensilage) hvor den var tilsat, og *Lb. plantarum* blev genfundet i alle prøver efter 12 og 52 dage uafhængigt af om de var tilsat eller ikke.

## 2.5. Ostningsforsøg

Der blev lavet flere serier af ostningsforsøg i pilotmejeriet på KVL med forskellige blandinger af de antiklotridiale *Lactobacillus* stammer. Hæmmende effekter blev fundet. Imidlertid var der lidt for mange sporer i ostemælken, og alle oste blev mere eller mindre pusede med tiden. Ost med tilsætning af *Lactobacillus* stammerne blev generelt anset som bedre i smagen end de andre.

Det blev vist i et forsøg at tre af fire tilsatte *Lactobacillus* stammer voksede efter hinanden i succession, medens den fjerde ikke blev genisoleret. En af stammerne dominerede i starten og dens andel mindskedes under modningen, medens en andens andel øgedes og en tredje først blev genisoleret i lave antal efter et par ugers modning. 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. Bakterier fra syrningskulturen udvikledes anderledes i oste med tilsætning af de antimikrobielle *Lactobacillus* stammer. De tilsatte *Lactobacillus* stammer påvirkede ikke nedbrydningen af kasein til peptider og aminosyrer i ostene ret meget. Der var kun små forskelle i aminosyreindholdet.

Tre blandinger (Mix 1, Mix 2 og Mix 3) af antimikrobielle *Lactobacillus* stammer blev testet i ostningsforsøg med tre gentagelser over tre uger. På hver af ni ostningsdage blev to ostekar fremstillet, en med Mix 1, Mix 2 eller Mix 3 sammen med en kontrolostning uden tilsætning. Ostningerne gik godt, men sporetallet af *Clostridium* i mælken var omkring 1000 sporer/L, og eftersom nitrat eller lysosym ikke blev brugt blev resultatet desværre en alt for tidlig og kraftig pustning. Den første forsøgsrække blev det registreret at gasdannelsen blev hæmmet af alle tre blandinger af *Lactobacillus* stammer og at pH øgedes langsommere i oste med tilsætningerne. Effekterne var ikke så tydelige i de andre to forsøgsrækker. Antallet af *Lactobacillus* var højere i alle oste med tilsætning af *Lactobacillus* stammer sammenlignet med i kontrollerne, ca  $10 \times$  højere efter to uger og ca.  $5 - 10 \times$  efter 5-6 uger. Dette indikerer, at de tilsatte stammer voksede. Konklusionen er, at kun hvis sporetallet holdes lavt i ostemælken med andre tiltag, er det muligt at bruge antiklotridiale *Lactobacillus* kulturer som en ekstra sikkerhed i produktionen.

Det blev besluttet at videre ostningsforsøg skulle laves på et ostemejeri hvor der regelmæssigt kontrolleres for sporetallet i mælken. Forsøgene blev udført på Thise Mejeri medio august. Forsøgene blev udført tilfredsstillende med mælk af god kvalitet (lave sportal), hvilket gav et godt udgangspunkt for undersøgelse af forsøgsparametrene – hvorvidt tilstedeværelse af forsøgsstammer (*Lb. paracasei*) i ost kan nedsætte senpustningsdefekter under lagring. Tre gentagelser af forsøg med at fremstille ost med og uden en mix af fem antimikrobielle *Lactobacillus* stammer blev udført. Osten blev fremstillet uden tilsætning af nitrat og ostemælken blev ikke mikrofiltreret.

Fra hver af de seks ostekar blev oste lagret både vakuumpakket og med overfladekultur. Bakterieflooraen i ostene var efter 1 måned domineret af de tilsatte *Lactobacillus* stammer i forsøgsostene, mens starterbakterier dominerede i kontrolostene (Fig. 6). Forandringer i vægtfylde under modningen blev analyseret som mål på gasdannelse i to serier af de vakuumpakkede oste. Der var som ventet relativt høj gasdannelse i alle de tolv oste, men unormalt kraftig gasdannelse forekom kun i tre af ostene, der alle var kontroller og uden tilsætning af de antimikrobielle *Lactobacillus* stammer.

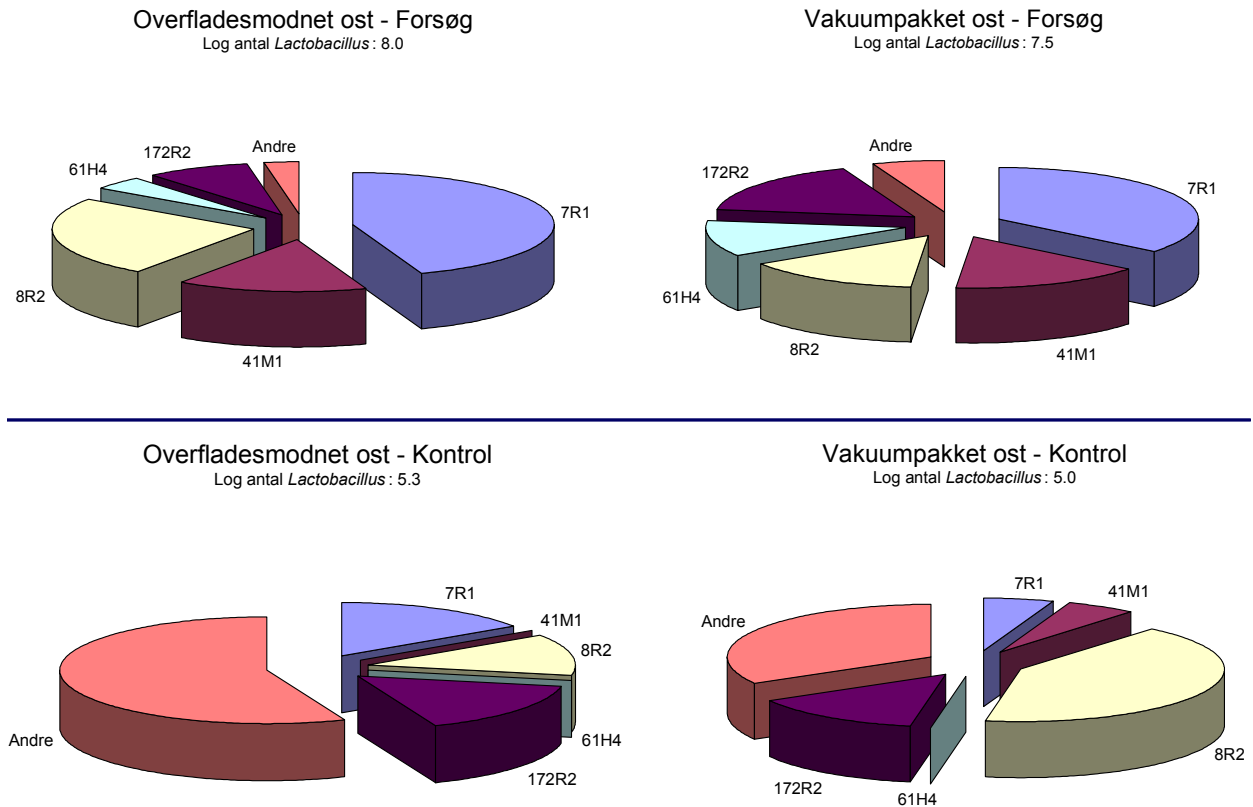


Fig. 6. Sammensætning af *Lactobacillus* stammer i oste efter 1 måneds lagring. Middelværdier af 3 ostninger.

Sensorisk var der ikke den store forskel mellem kontrol- og forsøgsoste. Evaluering af proteolyseresultater viste ingen større forskel mellem kontrol- og forsøgsoste, medens modningen var som ventet dybere i de overflademodnende oste end i de vakuumpakkede.

Det blev således demonstreret at tilsætning af antimikrobielle *Lactobacillus* stammer kan bruges til at øge salgstiden for økologiske oste der er fremstillet med lave antal sporer i mælken. Det blev også vist efter ostningsforsøgene, at det er muligt at optimere sammensætningen af *Lactobacillus* stammer i den antiklostridiale kultur endnu mere, og derved yderligere øge den hæmmende effekt mod klostridier i osten.

### 3. Konklusioner

Antimikrobielle egenskaber er almindelige hos *Lb. paracasei* stammer isoleret fra danske oste af høj kvalitet. En del stammer har bred og tydelig inhiberende aktivitet samt god evne til at dominere over andre bakterier i ost. Disse blev vist at være effektive i ost mod klostridier, hvis antallet sporer ikke var for stort.

Syrning af ostemodningen påvirkes ikke meget af tilsætningen af de antimikrobielle kulturer af *Lb. paracasei*, der vokser og danner bakteriocin under modningen, og ikke mest er aktive i begyndelsen som nisin-producerende starterkulturer er.

Resultaterne indikerer at de muligvis også er aktive i ensilage. En vigtig effekt er at de sænker pH lidt lavere end de andre ensilagebakterier, og at de er aktive ved det lave pH og holder det lavt under lagringen af ensilagen.

Rep-PCR er en god metode til at identificere re-isolerede *Lactobacillus* stammer der er tilsat oste for at studere deres udvikling under modningen. Ved arts-specifikke prober var det muligt at analysere *Lactobacillus* arter i ensilage semi-kvantitativt. ARDRA og Rep-PCR blev udviklet for klassificering og identificering af klostridier.

### 4. Publikationer i projektet

#### 4.1 Internationale videnskabelige tidsskrifter

CHRISTIANSEN, P., PETERSEN, M.H., KASK, S., MØLLER, P.L., PETERSEN, M., VOGENSEN, F.K., NIELSEN, E.W. & ARDÖ, Y. 2005. Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15:901-909

ADAMBERG, K., ANTONSSON, M., VOGENSEN, F.K., NIELSEN, E.W., KASK, S., MØLLER, P.L. & ARDÖ, Y. 2005. Fermentation of carbohydrates from cheese sources by non-starter lactic acid bacteria isolated from semi-hard Danish cheese. *International Dairy Journal*, 15:873-882

CHRISTIANSEN, P., VOGENSEN, F.K., BROGREN C.-H., NIELSEN, E.W. & ARDÖ, Y. Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *International Dairy Journal*, (Re-submitted after minor revision)

CHRISTIANSEN, P., VOGENSEN, F. K., BROGREN, C.-H., OHLSSON, C., HOLMGREN, K., NIELSEN, E. W. & ARDÖ, Y. Production of grass silage with addition of anticlostridial *Lactobacillus* isolated from semi-hard Danish cheese (*Manuscript*)

CHRISTIANSEN, P., BROE, M. L., BROGREN, C.-H., VOGENSEN, F. K., NIELSEN, E. W. & ARDÖ, Y. Potential of anticlostridial *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard Danish cheese to prevent blowing defects in semi-hard cheese. (*Manuscript*)

JANOSKOVA, A., CARL-HENRIK BROGREN, Y. ARDÖ, E. WAAGNER NIELSEN, V. KMET, AND F. K. VOGENSEN. Fast species and strain identification of Dairy related *Clostridium* species by Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and rep-PCR (*Manuskript*).

#### 4.2 Indlæg ved faglige internationale kongresser, symposier

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 at the IDF World Dairy Congress, Congrilait, Paris, France, September 2002

CHRISTIANSEN, P., ARDÖ, Y., PETERSEN, M.H., PETERSEN, M., MØLLER, P.L., NIELSEN, E.W. & VOGENSEN, F.K. 2002. *Lactobacillus* with anticlostridial activity isolated from Danish cheese. Poster at the Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria: genetics, metabolism and Applications, The Netherlands, 2002

- CHRISTIANSEN, MØLLER, KASK, PETERSEN, PETERSEN, ANTONSSON, ADAMBERG, JENSEN, WAAGNER NIELSEN, VOGENSEN & ARDÖ. 2004. Antimicrobial Activity of Genetically and Physiologically Characterized *Lactobacillus* Isolated from Semi-Hard Cheeses. Foredrag ved IDF symposium on Cheese Ripening, Characterisation and Technology in Prauge 2004.
- ADAMBERG, ANTONSSON, VOGENSEN, WAAGNER NIELSEN, MØLLER, KASK AND ARDÖ. Fermentation of Carbohydrates from Cheese Sources by Non-Starter Lactic Acid Bacteria isolated from Semi-Hard Danish Cheese. Foredrag ved IDF Symposium on Cheese Ripening, Characterisation and Technology in Prauge 2004.
- JANOSKOVA, A., ARDÖ, Y., NIELSEN, E.W., KMET, V. & VOGENSEN, F.K. 2004 Identification of Dairy Related *Clostridium* Species by Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). Poster 165 at IDF Symposium on Cheese Ripening, Characterisation and Technology in Prauge 2004.
- SERGIANITIS, S., MALAKAUSKAS, M., HANSEN, M., VOGENSEN, F.K., HABBERSETT R. AND BROGREN C.-H. 2004 Repetitive-PCR with high discriminatory power can differentiate microorganisms easily and more rapidly than PFGE. Poster at DBF kongressen., Munkebjerg
- TŮMA, Š., VOGENSEN, F.K. ARDÖ, Y. 2005. Inhibition of *Clostridium* sp. by bacteriocin-like substances produced by lactobacilli isolated from semi hard cheese. Poster at IDF 2005 World Dairy Summit, Vancouver, Canada

#### 4.3 Faglige artikler og mødeindlæg

- ARDÖ, Y., VOGENSEN, F.K., NIELSEN, E.W., CHRISTIANSEN, P. HOLMGREN, K. & OLSSON, C. 2002. Hæmning af smørsyre bakterier i ost og ensilage ved brug af antimikrobielle bakterier som forekommer naturligt i danske oste. *Mælkeritidende*, 115: 128-132

#### 4.3. Videnskabelige afhandlinger

- GOYENECHÉ DEL RIO, O. 2003. Survival capacity of antimicrobial *Lactobacillus paracasei* to different heat treatments. Master thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University. Department for Food Science
- Møller-Jensen, N. 2004. Væksthæmmende effekter af udvalgte stammer af *Lactobacillus paracasei* på mejerisyravækkere. 3-points-opgave. The Royal Veterinary and Agricultural University. Department for Food Science
- GREVE, R.N. & MØLLER-JENSEN, N. 2004. Changes in aroma formation by inhibition of starter culture activity in semi-hard cheese. Master thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University. Department for Food Science
- CHRISTIANSEN, P. (In preparation) Inhibition of *Clostridium* activities in silage and cheese using anticlostridial *Lactobacillus* isolated from Danish semi-hard cheese. Ph.D. thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University. Department for Food Science

#### 6. Master- og Ph.d.-uddannelse, gæsteforskere

- Ph.d.-studerende Pia Christiansen  
 Gæste-ph.d.-studerende Aneta Jánosková fra Slovakiet  
 Gæste-ph.d.-studerende Stephan Tuma fra Tjekkiet  
 Speciale-studerende Orreaga Goienetxe fra Spanien  
 Speciale-studerende Nicolai Møller-Jensen  
 Speciale-studerende René Nordgaard Greve



## 7. Samarbejdsrelationer

### *Nationalt:*

Danmarks JordbrugsForskning, Foulum  
Thise Mejeri, Thise  
Arla Foods Innovation, Brabrand

### *Internationalt:*

Medipharm (Arla Foods), Kågeröd, Sverige  
Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Science, Kosice, Slovakia  
Institute of Chemical Technology, Prag, Tjekkiet

## 8. Praktisk og videnskabelig betydning

Det blev vist at antimikrobielle *Lactobacillus paracasei* stammer, isoleret fra dansk ost af høj kvalitet, har evne til at inhibere klostridieaktiviteter i fast ost med eller uden overflademodning. De kan bruges som en ekstra sikkerhed i produktionen, og komplementere andre tiltag for at holde sporetallet lavt i mælkeråvaren. De antimikrobielle *Lb. paracasei* stammer bruger forskellige mekanismer, der kan komplementere hinanden, de kan bruges som enkeltstammer eller i blandingskulturer, og valget kan optimeres til den pågældende situation. Især blev tre stammer fundet med god evne til at vokse og dominere mikrofloraen i ostene. De har forskellige inhiberingsmekanismer, og to af dem danner forskellige slags bakteriociner. Disse stammer kan videreudvikles for brug i ost.

Resultaterne peger også på muligheder at bruge stammerne i ensilage, men pga. at der ikke voksede sporer i de testede ensilager (varmt og tørt vejr) må den antimikrobielle effekt i ensilage undersøges videre. Kulturer der tilsættes ensilage til foder til malkekøer skal gerne kun indeholde bakterier der er gavnlige for osten, eller ikke overlever pasteurisering.

Det blev vist at de fleste *Lb. paracasei* stammer fra ost lavet af pasteuriseret mælk havde evne til at overleve pasteurisering, hvilket viser at medfølgefloraen i ost godt kan komme ind gennem pasteuren.

Projektet har også evalueret og udviklet molekylærbiologiske analysemetoder for klassificering og identificering på art- og stammeniveau for *Clostridium tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. beijerinckii* og *Cl. sporogenes* samt *Lb. paracasei*, *Lb. /zeae* og *Lb. plantarum*. Indledende karakteriseringsarbejde har vist tilstedeværelse af flere nye bakteriociner i *Lb. paracasei* og en stor variation mellem stammerne.

## 9. Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter

”Brug af *Lactobacillus helveticus* ved udvikling af nye interessante faste og halvfastesorter” (2005-2008), som er finansieret af MFF/Innovationsloven. Projektleder er her også Ylva Ardö.

