

Afslutningsrapport

Kvalitet og holdbarhed af hvidskimmeloste

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2004-59

April 2004



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet:

"Kvalitet og holdbarhed af hvidskimmeloste"

Projektperiode:

1. februar 1999 - 31. juli 2003

Projektdeltagere:

- Professor Mogens Jakobsen, Levnedsmiddelmikrobiologi, MLI, KVL, tlf. 3528 3216, e-mail: moj@kvl.dk (projektleder),
- Lektor Per Væggemose Nielsen, BioCentrum-DTU tlf. 4525 2631, e-mail: pvn@biocentrum.dtu.dk,
- Adjunkt Tine Kronborg Hansen, Levnedsmiddelmikrobiologi, MLI, KVL, tlf. 3528 3287, e-mail: tkh@kvl.dk,
- Ph.d-studerende Marianne Decker, BioCentrum-DTU, tlf. 4525 2725, e-mail: mad@biocentrum.dtu.dk,
- Forskningsassistent Kari Düwel, Levnedsmiddelmikrobiologi, MLI, KVL,
- Laborant Anne Hinsby, Biocentrum-DTU,
- Laborant Heidi Rasmussen, Levnedsmiddelmikrobiologi, MLI, KVL,
- Laborant Mirella Simkus, BioCentrum-DTU,
- Leif Poll, Vegetabilieområdet, MLI, KVL, tlf 3528 3239,
- Leif Højslet, Kemiteknik, Overflade Analyse, Teknologisk Institut, Gregersvej, Postboks 141, Taastrup, tlf. 4350 4350,
- Sinne Bundgaard Nielsen, Arla Foods amba, Brabrand

Finansiering:

Mejeribrugets ForskningsFond og Direktoratet for FødevareErhverv (FØTEK III)

Resumé

Det har været projektets formål at undersøge vækstformen for *Penicillium camemberti* ved overflademodning af hvidskimmeloste med henblik på optimal skimmeludvikling og levedygtighed, for derved at opnå en længere holdbarhed. Undersøgelserne hviler på 20 kulturer af *P. camemberti*, som blev modtaget fra kommercielle kultursamlinger og mejerier.

Til projektets modelforsøg blev der udviklet et ostemedium hovedsageligt bestående af frisk hvidskimmelost og agar. I dette modelsystem viste alle kulturer proteolytisk aktivitet ved 14°C, og de kunne deles op i tre grupper med høj, middel og lav aktivitet. Tre af de 20 kulturer viste ikke proteolytisk aktivitet ved 4°C. Alle kulturer nedbrød tributyrin. I ostemediet blev der ligeledes konstateret både positive og negative interaktioner mellem isolaterne fra den primære starterkultur og *P. camemberti*. De positive interaktioner blev observeret som større væksthastighed for *P. camemberti* samt et tættere mycelium, mens de negative interaktioner blev observeret som hæmmet vækst og sporulering af *P. camemberti*. Undersøgelserne af den primære starterkulturs indflydelse på aromakomponenterne viste, at forskellige kombinationer af *P. camemberti* og udvalgte stammer fra den primære starterkultur resulterede i dannelsen af forskellige aromakomponenter - blandt andet blev mængden af metylketoner og de korresponderende sekundære alkoholer påvirket.

I samarbejde med projektets følgegruppe blev der produceret minioste á 50 g for hver af de 20 stammer. Aromaegenskaber for kulturerne blev analyseret ved elektronisk næse (E-næse). Der blev observeret en sammenhæng mellem sensoriske bedømmelse og E-næse profilerne. Detaljeret aromaanalyse for forsøgsostene blev undersøgt ved hjælp af GC-MS efter 36 dages modning. Der blev her observeret store forskelle mellem kulturerne, inklusive udseende af de tilsvarende oste.

Udvikling og hæftning af *P. camemberti* til ostens overflade blev undersøgt ved Cryo-scanning elektronmikroskopi. Der blev observeret store forskelle mellem de undersøgte kulturer vedrørende deres evne til at dække osteoverfladen og myceliets fasthæftning. Et løstsiddende mycelium synes at være stammebestemt og forbundet med stærk proteolytisk aktivitet.

Indvirkningen af forskellige niveauer af laktose, galaktose, glukose, laktat, citrat, NaCl, mineralblanding og pH på væksten af de udvalgte *P. camemberti* stammer på ostemedium blev undersøgt ved et brudent faktorforsøg. Niveauerne for de forskellige miljøfaktorer og næringsstoffer blev valgt som ydergrænser for de niveauer, der er aktuelle ved fremstilling af hvidskimmeloste. Generelt observeredes, at alle de undersøgte kulhydrater har en hæmmende effekt på sporedannelsen. Laktat og citrat samt lavt pH viste også en hæmmende effekt. Høj koncentration af NaCl viste den største hæmmende effekt på vækst målt som kolonidiameter på ostemedium.

For fire kulturer af *Penicillium camemberti* undersøgte vækstinteraktioner med *Lactomyces geotrichum* samt isolater fra den naturlige forekommende følgeflora på hvidskimmelost bestående af *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium caseifulvum* og en *Cladosporium*. Der blev observeret store forskelle mellem kulturerne evne til at hæmme kontaminanter. Nær-infrarød reflektans-optagelser (NIR) viste, at det er muligt at detektere skimmelvækst spektroskopisk før den er synlig.

Som led i projektet blev også indsamlet 24 stammer af *Galactomyces geotrichum*. Indledende studier af deres aromaprofil viste et væsentligt sammenfald med aromaprofilerne for *P. camemberti*.

English summary

The purpose of the project has been to examine the growth of *Penicillium camemberti* on surface ripening of white mould cheese with a view to optimal mould development and viability to improve shelf life. The studies rest on 20 cultures of *P. camemberti*, received from commercial culture collections and dairies.

For the model testing of the project, a cheese medium primarily existing of fresh white mould cheese and agar was developed. In the model system, all cultures showed proteolytic activity at 14°C, and they could be divided into three groups with high, average and low activity. Three of the 20 cultures did not show proteolytic activity at 4°C. All cultures broke down tributyrine. In the cheese medium, both positive and negative interactions between isolates from the primary starter culture and *P. camemberti* were also found. The positive interactions were observed as faster growth rate to *P. camemberti* and a closer mycelium, whereas the negative interactions were observed as delayed growth and sporangia formation of *P. camemberti*. The studies of the influence of the primary starter culture on the flavouring components showed that different *P. camemberti* combinations and selected strains from the primary starter culture resulted in the formation of different flavouring components. For instance, the number of methyl ketones and the corresponding secondary alcohols were affected.

In cooperation with the project reference group, small 50 g cheeses for each of the 20 strains were produced. The culture flavouring properties were analysed by means of an electronic nose (E nose). A connection between sensory assessment and E nose profiles was observed. A detailed flavouring analysis was examined by means of a GC MS after 36 days of ripening. Significant differences between cultures including appearance of the corresponding cheeses were observed.

Development and adding of *P. camemberti* to the cheese surface were examined by means of Cryo scanning electron microscopy. Significant differences between the examined cultures on their ability to cover the cheese surface and the mycelium adherence were observed. A loose mycelium seems to be strain-determined and connected with strong proteolytic activity.

Impact of different lactose, galactose, glucose, lactage, citrate, NaCl, mineral blends and pH on the development of the selected *P. camemberti* strains on the cheese medium was examined at a fractional factor test. The levels of the different environmental factors and the nutrients were chosen as limits to the levels, which are relevant to the manufacturing of white mould cheese. Generally it is observed that all the examined carbohydrates have an inhibitory effect on the sporangia formation. Lactage and citrate and low pH also showed an inhibitory effect. High NaCl concentration showed the highest inhibitory effect on growth measured as colony diameter on the cheese medium.

The growth interactions with *Lactomyces geotrichum* and isolates from the common resulting flora on white mould cheese consisting of *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium caseifulvum* and one *Cladosporium* were examined for the four cultures of *Penicillium camemberti*. Significant differences between the ability of the cultures to inhibit contaminants were observed.

Near-infrared reflectance registrations (NIR) showed that it is possible to detect mould growth before it is visible. As part of the project, 24 strains of *Galactomyces geothricum* were also collected. Preliminary studies of their flavouring profile showed a significant coincidence with the flavouring profiles as to *P. camemberti*.

1 Formål og baggrund

Det var projektets formål at kortlægge de basale mekanismer for overfladevækst, morfologisk differentiering og viabilitet for *Penicillium camemberti* ved overflademodning af hvidskimmeloste. Dette skulle tilvejebringe det videnskabelige grundlag for at sikre optimal skimmeludvikling og levedygtighed for derved at opnå en længere holdbarhed af slutproduktet. Derudover skulle de forhold kortlægges, der kan sikre *P. camemberti* en konkurrencemæssig fordel overfor skimmelkontaminanter. Hvidskimmeloste har en relativ kort holdbarhed sammenlignet med f.eks. blåskimmeloste, hvilket begrænser mulighederne for eksport. Dette faktum hænger sammen med egenskaberne af *Penicillium camemberti*, der danner et hvidt mycelium. Et tæt, stabilt og levedygtigt mycelium af *Penicillium camemberti* har afgørende betydning for ostens kvalitet og holdbarhed. Tab af levedygtighed viser sig ved, at myceliet på ostens overflade falder sammen og bliver brunligt og slipper osteoverfladen. Andre kvalitetsfejl kan være bitterhed og fremvækst af skimmelkontaminanter. Kendskabet til, hvilke faktorer der påvirker levedygtighed, overfladevækst, stabilitet af mycelium, enzymatiske aktiviteter samt andre forhold, som har effekt på kvaliteten af hvidskimmelost er begrænset, og baggrunden for projektet er netop at få et større kendskab til disse faktorer generelt og mere specifikt til de mest anvendte stammer af *P. camemberti*.

2 Resultater

2.1 Indsamling og rendyrkning af kulturer af *Penicillium camemberti*

Under projektet blev der indsamlet 20 kulturer af *P. camemberti* (Tabel 1).

Tabel 1. Indsamlede kulturer af *Penicillium camemberti*

Forsøgs Nr.	IBT Nr.	Stamme betegnelse	Oprindelse
1	922371	SN 89	Alfred Jørgensen
2	922372	HP 6	Rodia
3	922373	<i>P. camemberti</i>	Visbv
4	922374	Cal D	Alfred Jørgensen
5	922375	Visbv	Visbv
6	922376	H	Alfred Jørgensen
7	922377	B	Alfred Jørgensen
8	922378	F	Alfred Jørgensen
9	922379	NR	Visbv
10	922380	AM	Visbv
11	923813	SC	Visbv
12	15441	IBT 15441	Camembert ost
13	922381	<i>P. candidum</i>	Visbv
14	922382	TH	Alfred Jørgensen
15	922383	P	Alfred Jørgensen
16	922387	726	Visbv
17	922384	Arla	Visbv
18	922385	FAAX	
19	922386	Indu-1	Chr. Hansen
20	922388	ABL	Visbv

Isolaterne blev modtaget fra kommercielle kultursamlinger og mejerier. Der er ved indsamlingen lagt vægt på at få mange kommercielle kulturer i samlingen således det er muligt at sammenligne data fra laboratorieforsøgene med erfaringerne i produktionen. Alle kulturerne blev rendyrkede og beskrevet mikro- og makromorfologisk. Endvidere blev den sekundære metabolitprofil bestemt ved hjælp af HPLC for *P. camemberti*-kulturerne. De taksonomiske studier blev udført for at sikre, at kulturerne var korrekt klassificeret.

2.2 Udvikling af ostemedium

For at de videre forsøg i projektet bedst muligt kunne sammenlignes med *Penicillium camemberti*'s udvikling på hvidskimmelost, blev der udviklet et ostemedium. Ostemediet var baseret på 300 g/l frisk hvidskimmelost; 600 ml H₂O og 15 g/l agar. I forbindelse med de forskellige forsøg blev ostemediet tilsat NaCl til justering af saltprocenten og 1M HCl til justering af pH, desuden blev forskellige kulhydrater og mineraler tilsat i ønskede koncentrationer

2.3 Teknologiske egenskaber for *P. camemberti* bestemt i ostemodell

Proteolyse

Den proteolytiske aktivitet blev undersøgt ved 4 og 14 °C i agardiffusionssystemer. Efter vækst på ostemedium blev en udskåret cylinder af kulturen overført til kasein agar, hvor diameteren af den opklarede zone blev målt som et udtryk for proteolytisk aktivitet. Alle kulturer viste proteolytisk aktivitet ved 14°C, og de kunne deles op i tre grupper med høj, middel og lav aktivitet. En yderligere gruppering blev lavet, idet isolaterne med høj proteolytisk aktivitet ved hjælp af gelelektroforese og kapillar elektroforese (CE) blev delt op i to grupper.

Gruppe I (isolat nr. 1, 2, 4, 10, 11) var i stand til at nedbryde kasein i løbet af 3 døgn, mens gruppe II nedbryder kaseinet på 4-5 døgn. Stammerne nr. 3, 6 og 12 viste ikke proteolytisk aktive ved 4°C.

Tabel 2. Proteolytisk aktivitet. Kaseinnedbrydning bestemt ved agardiffusion

Enzymaktivitet/niveau	Høj	Middel	Lav
Kulturnummer	1, 2, 3, 4, 10, 11, 13	5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 20	8, 17, 18, 19

Nedbrydning af β -kasein 193-209

Det bitre peptid bestående af aminosyrerne 193-209 fra β -kasein blev udvalgt som model. Ved hydrolyse af β -kasein katalyseret af chymosin nedbrydes bindingen imellem Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ hurtigt, hvorved peptidet β -kasein 193-209 dannes. Dette bitre peptid blev fremstillet ud fra en 1% β -kasein opløsning i citratbuffer tilsat 0,2% af en genmodificeret løbe "chymogen" ved pH 6,0 for at få en så ren top af det ønskede peptid som muligt. Ved at anvende *P. camemberti* kunne det ved hjælp af HPLC vises, at peptidet β -kasein 193-209 blev nedbrudt ved hydrolyse i 48 timer ved 30°C. Forskellen i nedbrydningsprofilen var statistisk signifikant mellem de 20 isolater af *P. camemberti*. Derudover blev der observeret en forskel på aktiviteten af enzymer fremstillet ved pH 4 og pH 6, hvor sidstnævnte havde højeste aktivitet.

Tabel 3. Inddeling af isolater ud fra deres ekstracellulære aktivitet ved nedbrydning af β -kasein 193-209 (bittert peptid).

	Nedbrydning af β -kasein 193-209	
	Aktivitet af enzymer dannet ved pH 4	Aktivitet af enzymer dannet ved pH 6
Høj	1, 6, 12, 13, 17	3, 5, 6, 9, 11, 14, 15, 16, 17, 20
Middel	2, 4, 9, 11, 20	4, 7, 8, 10, 12, 18, 19
Lav	3, 5, 7, 8, 10, 14, 15, 16, 18, 19	1, 2, 13

Aroma

For alle *P. camemberti* isolaterne blev der lavet aroma analyse efter vækst på ost og ved hjælp af dynamisk headspace GC-MS. Der blev påvist ca. 45 forskellige forbindelser. Antallet og mængden af dannede aromakomponenter varierede meget isolaterne imellem. Generelt blev der dannet større mængder af alkaner, ketoner, alkoholer, aldehyder, estre, ethanol og eddikesyre.

Interaktioner med primære starterkultur

Som en del af projektet blev stammerne af *P. camemberti* undersøgt for interaktioner med ti isolater fra den primære starterkultur. Screeningen blev foretaget både i ostemedium og i laboratoriemedier ved pH 5, 6 og 8. Interaktionerne blev bestemt ved at måle kolonidiameter og ved visuel bedømmelse. Der blev konstateret både positive og negative interaktioner mellem isolaterne fra den primære starterkultur og *P. camemberti*. De positive interaktioner blev observeret som større væksthastighed for *P. camemberti* samt et tættere mycelium med øget sporulering, mens de negative interaktioner blev observeret som hæmmet vækst og lav sporulering af *P. camemberti*. For de fleste kombinationer af kulturer gjaldt, at interaktionerne er påvirket af pH. De negative interaktioner aftog med stigende pH i intervallet pH 5-8. Undersøgelserne af den primære starterkulturs indflydelse på aromakomponenterne viste, at forskellige kombinationer af *P. camemberti* og udvalgte stammer fra den primære starterkultur resulterede i dannelsen af forskellige aromakomponenter. Blandt andet blev mængden af metylketoner og de korresponderende sekundære alkoholer påvirket. Det formodes, at disse ændringer primært skyldes ændringer i *P. camemberti*'s væksthastighed og den opnåede biomasse (mycelium).

Fysiologi og viabilitet

For at følge væksthastighed og henfald af mycelium på ostemedium, blev de 20 indsamlede isolater af *P. camemberti* podet på overfladen af ostemedium og inkuberet ved 15 °C, ca. 95% relativ luftfugtighed (RH). Væksthastigheden og henfald af myceliet blev fulgt ved måling af overflade-pH, visuel bedømmelse af mycelium og mikroskopi for at følge sporuleringen.

Endvidere blev der optaget NIR-spektre, digitalbilleder og impedansmålinger (elektrisk ledningsevne). De forskellige grupperinger efter multivariat PCA (principal component analysis) modellering for NIR målinger, billedanalyse, impedans, overflade pH, visuel bedømmelse og sporulering er følgende:

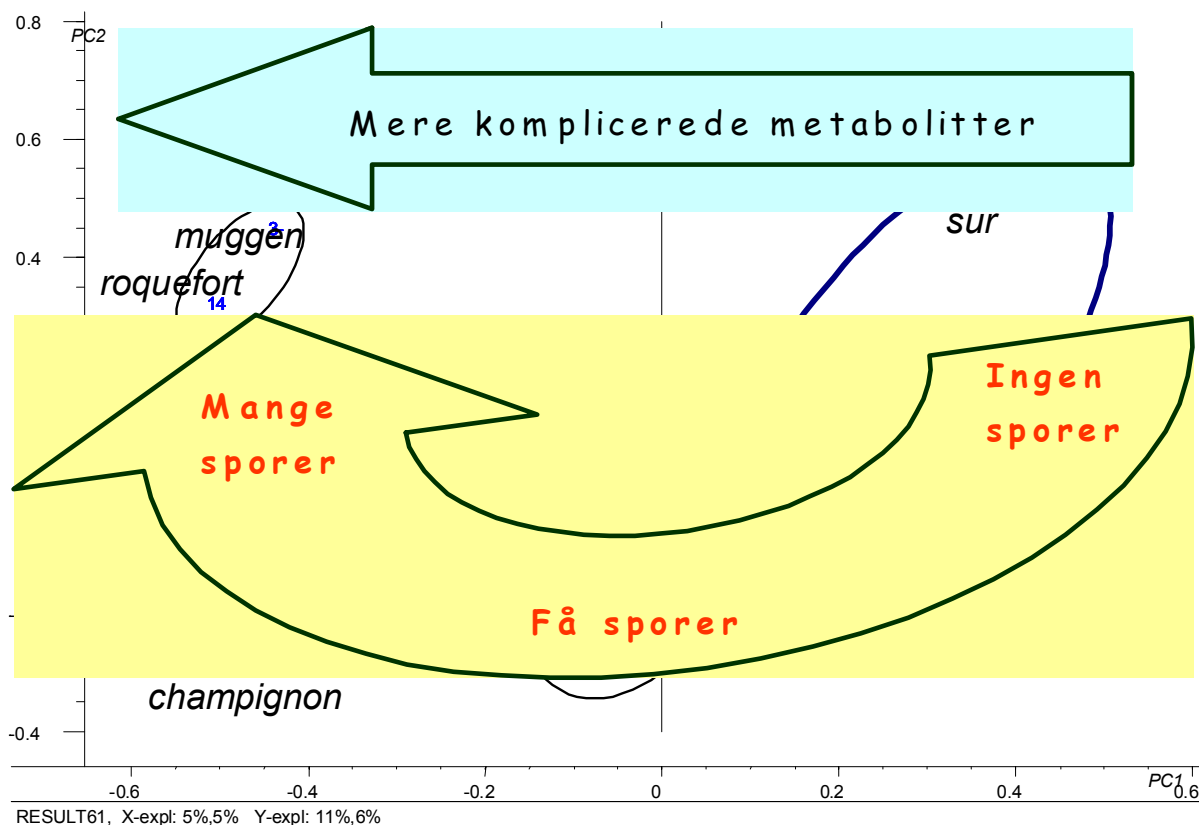
Analyse	Gruppering
<i>Væksthastighed</i> (μ): (impedimetri)	lav: 5, 7, 8 Middel: 2, 3, 4, 6, 14, 15, 16, 18, 19 Høj: 1, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 20
<i>Billedanalyse:</i> (Angle Measure Technique)	3 5, 7, 12, 13, 15 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20
<i>Nær infrarød reflektans:</i> (gruppering)	2, 4, 20, 8 (2), 5, 7, 10, 15 1, 4, 9, 11, 18, 19, 20 6, 12, 13, 14, 16, 17
<i>Visuel bedømmelse af mycelium:</i> (farve)	gul : 4, 6 gråhvid: 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20 hvid: 1, 16, 18, 19 grågrøn: 3
<i>Overflade:</i> (ruhed)	jævn: 1, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19 let ujævn: 2, 6, 7 ujævn: 8, 14, 15, 17, 20
<i>Plicering:</i>	ingen: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 18, 19 let: 5, 14, 15, 20 kraftig: 12, 17
<i>Henfald:</i> (mycelium)	ingen: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 14 let: 5, 9, 15, 4, 7, 11, 13, 16, 18, 19 kraftigt: 12, 17, 20
<i>Substratfarve:</i> ”creme”/gullig: grålig/mørk: rødlig/mørk:	1, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 16 5, 8, 9, 14 2, 4, 18, 19, 20
<i>Sporulering:</i> Ingen sporulering:	2, 3, 4, 9, 14, 16, 17, 18, 19, 20 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15

2.4 Teknologiske egenskaber af 20 forskellige stammer af *Penicillium camemberti* bedømt ved fremstilling af forsøgsoste

I samarbejde med projektets følgegruppe blev der produceret 16 minioste á 50 g for hver af de 20 stammer, i alt 320 oste, på Snejbjerg Mejeri. Ostene var ca. 2 cm i højden og 9 cm i diameter. Podningen med *P. camemberti* foregik ved at dyppe ostene i sporesuspensioner bestående af de

enkelte renkulturer. Ostene blev lagret ved 14°C i 9 dage ved 95% RH. Herefter blev de pakkede oste lagret i klimaskabe ved 4°C i 45 dage. Under forsøget blev *P. camemberti*'s sporedannelse, pH målt 1 cm fra kanten, bestemmelse af NIR-spektre, optagelse af digitalbilleder, aromaanalyse ved GC-MS og med elektronisk næse samt sensorisk bedømmelse anvendt til at følge modningen af ostene.

Der blev observeret tydelig forskel imellem stammerne med hensyn til sporedannelse på ostene, som vist i Figur 1. Figuren indikerer ligeledes en sammenhæng mellem sporulering og sensoriske egenskaber bedømt ved lugt.



Figur 1. Sammenhæng mellem sporulation og sensorisk bedømt lugt. Data fra forsøg med minioste fremstillet med 20 forskellige stammer af *P. camemberti*.

Der blev målt pH i ostene 1 cm fra kanten, 1 cm inde i osten. Resultaterne opdeler stammerne i to grupper, som adskiller sig ved at pH for den ene gruppe på dag 8 er steget mest for gruppe 1 (pH = 5,4-5,7), men denne gruppe har til gengæld den laveste pH på dag 21 (pH = 6,4-6,8). Den anden gruppe har på dag 8 pH 5,0-5,5 og på dag 21 er pH 7,0-7,7. Dag 28 udlignes forskellen mellem de to grupper, og alle oste bortset fra isolat nr. 3 og nr. 6 opnåede en pH på over 7, 1.

Aromaegenskaber for ostene blev analyseret ved elektronisk næse (E-næse). Der blev observeret en sammenhæng mellem sensorisk bedømmelse og E-næse profilerne. Detaljeret aromaanalyse for forsøgsostene blev undersøgt ved hjælp af GC-MS efter 36 dages modning. Generelt blev der dannet de samme stoffer, som omtalt i afsnittet om aroma. Derudover blev det fundet, at isolat nr. 3 skilte sig ud ved som den eneste at danne 3-octanol. Isolaterne 9, 14 og 16 danner megen heptan og at isolaterne 11 og 19 danner både 2-pentanone, 2-heptanone og 2-nonanone i store mængder. Isolaterne 6, 14 og 16 danner alle 1-octen-3-ol og isoamylpropionat, som er kendt for sin

champignonsmag, i relativt store mængder. Ost af isolat 6 fik også under de sensoriske bedømmelser smagskarakteristikken "champignon". Samtidig danner isolat 6 og 15 diacetyl. Isolat 10 og 14 danner forholdsvis megen eddikesyre, men dette kunne ikke direkte relateres til smagsbedømmelsen. Isolat 11 blev dømt forholdsvis bitter med svovl og ammoniak, men aromaprofilen skiller fra dette isolat sig kun ud ved at danne mere 2-propanon end de andre isolater. Smagsbedømmelsen af forsøgsosten blev foretaget på dag 31. Dommerpanelet bestod af fire personer tilknyttet mejeriindustrien med erfaring i bedømmelse af hvidskimmelost samt 8 utrænede dommere fra KVL og DTU. Resultaterne fra bedømmelsen var ikke konsistente, hvilket skyldes ustabile bedømmelser fra de utrænede dommere. På trods af dette blev der fundet en sammenhæng mellem lugt og E-næse resultaterne ved multivariat PLS dataanalyse. Gruppe 1 for begge analyser er identiske på nær stamme nr. 5, som i E-næse analysen indgår i gruppe 1. Sammenhængen mellem resultaterne er vist i tabel 4.

Tabel 4. Sammenhæng mellem resultater fra E-næse og sensorisk bedømmelse. Gruppering af *P.camemberti*-stammer efter multivariat dataanalyse.

E-næse

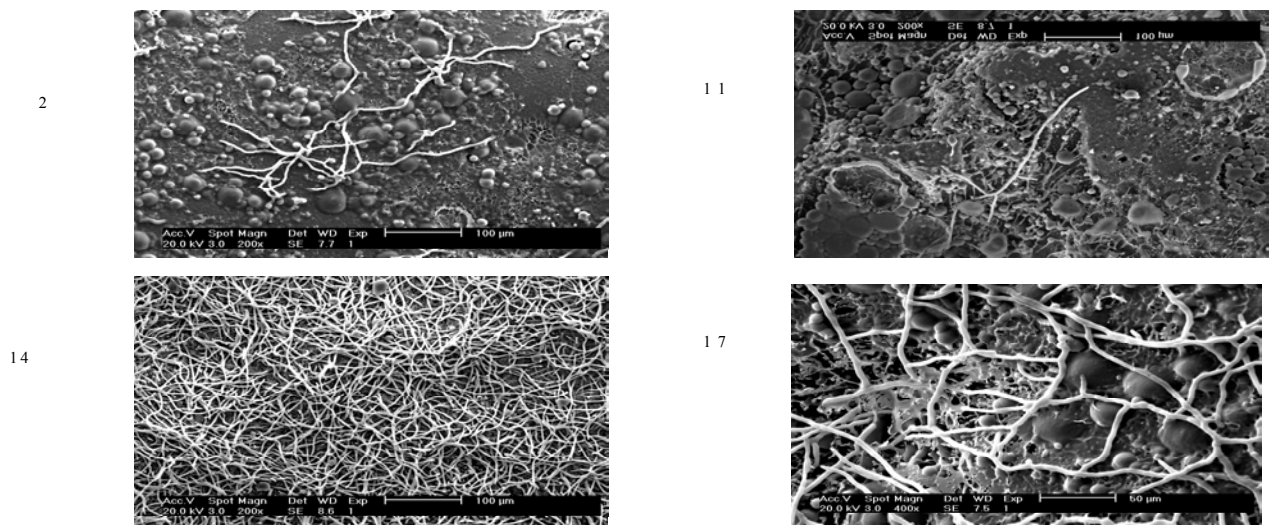
Gruppe 1: 5, 9, 11, 15, 18, 19, 20
Gruppe 2: 1-4, 6-8, 10, 12-14, 16-17

Sensorik

Gruppe 1: 9, 11, 15, 18, 19, 20 smeltende ostemasse, ammoniak, syrlig lugt og smag samt bitter smag. Mycelium vattet med rødlig tone.
Gruppe 2: 5, 7, 10, 12, 17 syrlig, frugtagtig og champignon smag og lugt. Mycelium gulligt, let og tyndt.
Gruppe 3: 1, 2, 4, 6, 8, 16 Syrlig, frugtagtig og champignon smag og lugt. Mycelium kraftigt, tykt og hvidt til creme farvet.
Gruppe 4: 3, 14 muggen og roquefort lugt og smag. Mycelium grå/blågrøn og tørt.

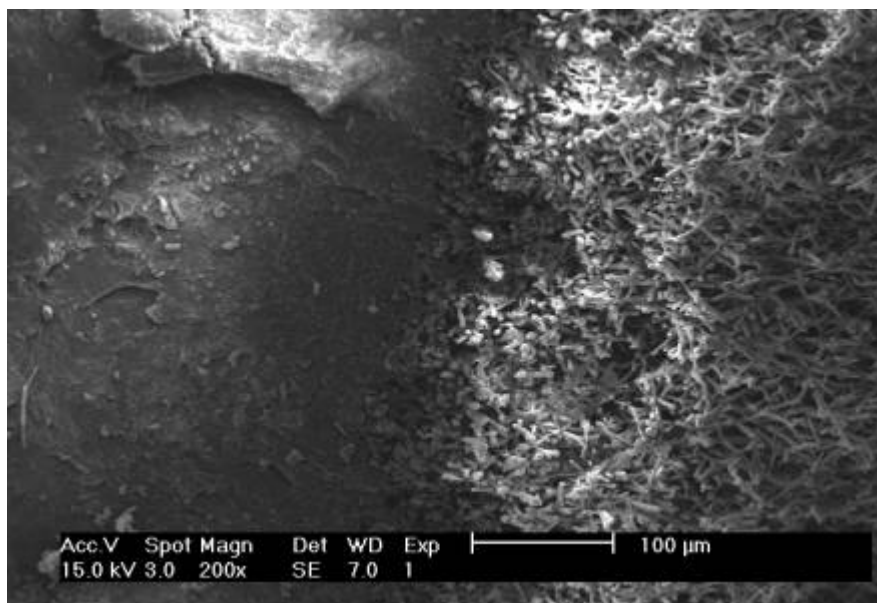
”Cryo-Scanning” elektron mikroskopi (Cryo-SEM) til vurdering af overfladevækst og fasthæftning af *Penicillium camemberti* til ostens overflade

Yderligere undersøgelser af stammernes udvikling og hæftning til ostens overflade blev foretaget ved hjælp af Cryo-SEM. Kort fortalt går metoden ud på, at der udtages en kubisk overfladeprøve (ca. 1 cm³) således, at der kan tages et billede i tværsnit. Det vil sige, at væksten ned i det øverste lag kan følges. Prøven lynfryses i flydende nitrogen. Det er nu muligt at holde prøven frosset ved meget lave temperatur og teknikken er udviklet således, at kondens på prøvens overflade undgås. Inden overfladen scannes med elektroner belægges prøven med et meget tyndt lag guld, som giver en meget høj billedkvalitet og dermed et godt indtryk af prøvens overfladetopografi. Med hensyn til morfologi og vækst var det muligt at se forskel på de fire undersøgte stammer af *P. camemberti* (nr. 2, 11, 14 og 17). De fire isolater havde alle forskellig morfologi. Morfologien har en visuel betydning, idet et mycelium med mange små forgreninger giver et vattet mycelium, mens et mycelium med få forgreninger giver et lavt og mere tæt udseende mycelium. Som vist i Figur 2 var der forskel på isolaterne med hensyn til udviklingen og vækst af myceliet.



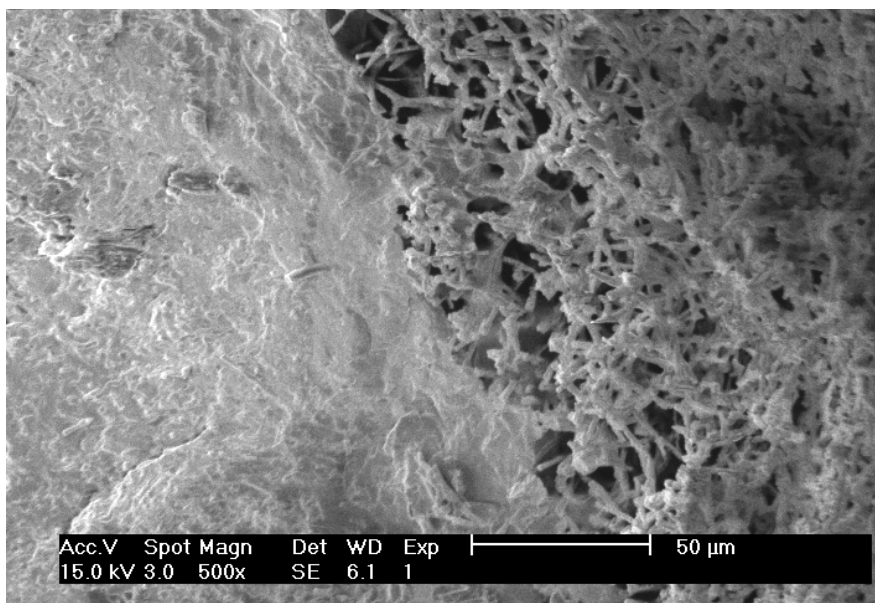
Figur 2. Udvikling af mycelium af *Penicillium camemberti* stammerne nr. 2, 11, 14 og 17 på overfladen af ostemedium - efter 2 døgn ved 14°C.

Stammerne nr. 14 og 17 voksede meget hurtigt frem i løbet af de to første dage og dækkede overfladen af ostemediet, mens isolat nr. 2 og 11 istedet trængte ned under mediets overflade og kun viste sparsom vækst på overfladen. Den manglende vækst på overfladen giver evt. kontaminanter bedre koloniserings- og vækstbetingelser og lettere adgang til ostens overflade (substrat). I løbet af den første uge dækkede alle fire isolater af *P. camemberti* overfladen af ostemediet, og alle trængte ned igennem overfladen. Især isolat nr. 11 viste en kraftig vækst under overfladen. Denne kraftige vækst kombineret med stammens kraftige proteolytiske aktivitet er med til, at ostens overflade eroderer som vist i Figur 3.



Figur 3. Tværsnit af ostemedium podet med *Penicillium camemberti* stamme nr. 11 (høj proteolytisk aktivitet) efter 8 uger ved 14°C. Vækst og proteolytisk aktivitet har skabt erosion i ostemediet samtidig med at mediet ca. 100 µm under myceliet har en ændret tekstur. Dette skyldes stammens høje proteolytiske aktivitet.

Efterhånden som væksten og dermed proteolysen breder sig ned gennem ostemassen, bliver myceliets hæftning til ostens overflade langsomt løsere, da skimmelen mister en fast overflade at hæfte sig til. Dette blev for stamme nr. 11 observeret ved, at myceliet efter 6 uger begynder at løsne sig uden at have været udsat for fysisk påvirkning. For de andre isolater krævede det mekanisk påvirkning at få myceliet til at løsne sig efter 8 uger. I det ældste (nederste) mycelium på ostemediets overflade sker et langsomt henfald, hvorved der skabes lommer under det nyere mycelium (Figur 4), hvorfor skimmelen ikke længere hæfter til ostens overflade og derfor ved fysisk påvirkning lettere går løs. Derudover ses der i de sidste uger en begyndende erosion i ostemassen som observeret for stamme nr. 11.



Figur 4. Tværsnit af ostemedium podet med *Penicillium camemberti* stamme nr.14 (middel proteolytisk aktivitet) efter 8 uger ved 14°C. Bemærk de opståede lommes.

Igennem de 8 uger undersøgelsen varede, blev der ikke observeret misfarvninger eller kontaminanter. Metoden byder på helt nye muligheder for at følge udviklingen og hæftning af skimmel, gær og evt. også bakterier på en fast overflade. Endvidere er der mulighed for, at metoden kan anvendes ved interaktionsstudier samt taksonomiske undersøgelser.

2.5 Miljøfaktoreres betydning for udvikling, sporulering og henfald af udvalgte stammer af *Penicillium camemberti*

Indvirkningen af forskellige niveauer af laktose, galaktose, glukose, laktat, citrat, NaCl, mineralblanding og pH på væksten af de udvalgte *Penicillium camemberti*-stammer på ostemedium blev undersøgt ved udførelse af et brudt faktorforsøg. Niveauerne af de forskellige miljøfaktorer og næringsstoffer er valgt som ydergrænser for de niveauer, der er aktuelle ved fremstilling af hvidskimmeloste. Efter 1, 2, 3 og 4 uger blev kolonidiameteren (d) og sporulationsgraden (s) bestemt.

Tabel 5. Design faktorer i brudent forsøg (miljøfaktorer)

Faktor	Niveau (vægt%)	Faktor	Niveau (vægt%)
Laktose (lac)	0 og 3,0 %	pH	4,7 og 5,2 %
Laktat (lat)	0 og 3,0 %	NaCl	0,0 og 4,0 %
Glukose (glu)	0 og 0,5 %	CaCl	0,0 og 0,01 %
Galaktose (gal)	0 og 0,5 %	Mineralblanding* (Mi)	0,0 og 0,1 %
Citrat (cit)	0 og 0,2 %		

* Mineralblanding: Mg: 0,025% = 250 mg/kg; Fe: 5 ppm = 5 mg/kg; Cu: 1 ppm = 1 mg/kg; Zn: 50 ppm = 50 mg/kg; Mn: 0,5 ppm = 0,5 mg/kg.

For det brudne faktorforsøg gælder generelt, at alle de undersøgte kulhydrater har en hæmmende effekt på sporedannelsen. Den største hæmmende effekt på sporedannelser ses ved tilsætning af 3% laktose. Stimulering af sporedannelser blev observeret ved højt initialt pH (5,2). Høj koncentration af NaCl viste den største hæmmende effekt på væksten målt som diameter. Specifikt for de enkelte stammer viste forsøget, at for stamme nr. 11 blev sporuleringen hæmmet ved tilsætning af 0,2% citrat, 3% laktose eller 0,01% CaCl₂. Som det eneste isolat blev sporuleringen af nr. 17 øget ved tilsætning af 4% NaCl (resultatet ikke vist).

2.6 Interaktioner mellem *Penicillium camemberti* og nært beslægtede skimmel kontaminanter

Som afslutning på projektet blev der lavet undersøgelser af interaktioner mellem fire udvalgte *Penicillium camemberti*, to *Galactomyces geotrichum* og fire isolater fra den naturligt forekommende følgefloora bestående af *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium caseifulvum* og en *Cladosporium* sp.

Data fra forsøgene bliver stadig behandlet pr. marts 2004, men de foreløbige resultater fra forsøget har vist, at forholdet i podekoncentrationen spiller en væsentlig rolle for de undersøgte interaktioner. NIR-optagelserne viser endvidere, at det er muligt at detektere skimmelvækst før det er synligt, og at skimmelkontaminanterne kan skelnes fra *P. camemberti*. Det betyder i praksis, at ostene kan screenes online inden emballering således at vækst af skimmelkontaminanter kan opdages på et langt tidligere tidspunkt end det sker i dag.

Forsøget blev udført således, at *P. camemberti* og *G. geotrichum* blev dybdepodet hver for sig og sammen. For at simulere forholdene i mejeriet, hvor saltlagen forventes at være en af kontamineringskilderne, blev de øvrige isolater podet 24 timer senere end *P. camemberti*. Endvidere blev alle kontaminanterne punktpodet alene på ostemedium for at kunne måle evt. hæmning af disse.

Der er fundet forskelle i *P. camemberti* stammernes interaktionsegenskaber. Disse egenskaber kan have betydning for holdbarheden af hvidskimmeloste fremstillet med kulturerne. Resultaterne peger entydigt på *P. camemberti* stamme nr. 17 som den stamme, der har den største hæmmende effekt på *Penicillium* kontaminanter. Stamme nr. 2 i ren kultur er bedst, hvis det er *Cladosporium spp.*, der er problemet.

2.7 Galactomyces geotrichum

I projektet blev endvidere indsamlet 24 stammer af *G. geotrichum*, som vist i tabel 6.

De morfologiske undersøgelser af *G. geotrichum*. i henhold til "The Yeast" 4. udgave, (eds) Kurtzman CP and Fell JW (1998) viste, at stammerne kunne deles op i tre grupper. Én gruppe hvor isolaternes morfologi lignede gærs, én hvor morfologien lignede skimmel og én hvor morfologien lignede både gær og skimmel. Stammerne af *G. geotrichum* blev i indeværende undersøgelse ved hjælp af PCR-RAPD delt ind i ni grupper (Tabel 6).

Tabel 6. Oversigt over inddeling af 24 *G. geotrichum* stammer ved "Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction" (RAPD-PCR).

Gruppe	Isolater
1	Geo 12-4-5 (Danablu) Geo C3 (Danisco) Geo Høgelund (Danablu) Geo 131 (Chr. Hansen)
2	Geo 10-3-1 (Danablu) Geo O12 (Danablu, lavpasteuriseret) Geo O13 (Danablu, lavpasteuriseret) Geo T23 (Danablu, termiseret)
3	CBS 615.84 (Ost) Geo (Hvidskimmelost) CBS 109.12 (Mælk) CBS 866.68 (Hvedemark) Geo 900 (Chr. Hansen) Geo C4 (Danisco)
4	Geo 408 (Chr. Hansen) Geo 130 (Chr. Hansen)
5	Geo 3Y (Mycella) Geo O21 (Danablu., termiseret) Geo O11 (Danablu, lavpasteuriseret) Geo T1 (Danablu, termiseret)
6	Geo Lp22 (Danablu, lavpasteuriseret)
7	Geo 132 (Chr. Hansen)
8	CBS 772.71 (Jord)
9	CBS 144.88 (Frugt)

Isolaterne af *G. geotrichum* danner mange af de samme aromastoffer som *P. Camemberti*. Aromaanalyser af ostemedium podet med *G. geotrichum* på overfladen viste, at antallet af de detekterede aromastoffer fra *G. geotrichum* varierede betydeligt. Udover de ovennævnte aromastoffer danner *G. geotrichum* desuden 2-ethylfuran og dimetyldisulfid/metyldisulfid. Ifølge litteraturen bidrager *G. geotrichum* positivt til hvidskimmelosts aromaprofil netop med svovlholdige forbindelser som dimetyldisulfid og metyldisulfid. Det har dog ikke været muligt at identificere andre svovlholdige forbindelser i dette projekt.

3 Konklusion

Projektet har resulteret i ny viden om 20 mejerirelevante stammer af *P. camemberti*. Der er påvist stor diversitet mellem disse stammer af *P. camemberti* med hensyn til sporedannelse, enzymatisk aktivitet, pH-udvikling og aromaprofil samt vækst og hæftning på ostens overflade. Projektet har også belyst, hvorledes miljøfaktorer som restsukker, NaCl, organiske syrer m.m. har indflydelse på væksten og sporuleringen af *P. camemberti* på ostens overflade.

Der er udviklet metoder, som med få justeringer forventes at kunne anvendes af mejeribrugget. Det gælder for nærinfrarød spektroskopi (NIR), som viste et stort potentiale som kvalitetskontrol for skimmelkontaminanter og som analysemetode til fysiologiske undersøgelser af overfladevækst. Cryo-SEM har ligeledes vist sig som et godt og brugbart redskab til undersøgelse af en kulturs evne til at vokse og hæfte sig til overfladen af ost. Sammenhængen mellem E-næse resultater og sensoriske data synes også at pege på en ny metode til kvalitetskontrol af hvidskimmeloste.

4 Perspektiv

Projektet har tilført ny viden om henfald og udvikling af *Penicillium camemberti* i relation til hvidskimmeloste. Der er fremkommet resultater og udviklet metoder, som med få justeringer kan anvendes af mejeribrugget, bl.a. dels resultatet fra nærings- og miljøfaktorenes påvirkning af vækst og sporulering af *P. camemberti*, hvor en kombination af NIR og billedanalyse er afprøvet og viser stort potentiale både som kvalitetskontrol for skimmelkontaminanter og som metode til fysiologiske undersøgelser af overfladevækst. Endvidere har Cryo-SEM vist sig som et godt og brugbart redskab til undersøgelse af kulturers evne til at udvikle og hæfte sig til overfladen af ost. Andre af de i projektet fremkomne metoder og resultater kræver yderligere optimering for at kunne anvendes, herunder sammenhængen af E-næse og sensoriske data, samt metoden til undersøgelse af nedbrydning af bitre peptider. Yderligere undersøgelser, som klarlægger betydningen af forskellige nærings- og miljøfaktorer på hæftningen af myceliet af *P. camemberti* til ostens overflade ville også være et af de områder, som der kunne være perspektiv i at undersøge i den nærmeste fremtid. Det er netop i projektet vist, at miljøfaktorerne har stor effekt på udviklingen af *P. camemberti*.

5 Relationer til andre mejeriprojekter

Projektet er en videreførelse af tidligere FØTEK-projekter på KVL og DTU, som omhandler skimmel i mejeriprodukter. Derudover har projektet forbindelse til igangværende projekter om brug af gær i overflademodnede oste, som er hovedemnet i flere projekter finansieret af Mejeribruggets Forskningsfond under FØTEK-programmet. De igangværende projekter er alle med til at klarlægge den betydning, gær og skimmel har for mejeriindustrien.

Analysen med elektronisk næse (E-næse) er udført i samarbejde med ph.d.-studerende Jeorgos Trihaas, der er ansat på projektet "E-næse til hurtig detektion af mikrobiel kvalitet af ost", der også medfinansieres af Mejeribruggets ForskningsFond.

6 Redegørelse for forskeruddannelse

Under projektet er der gennemført et ph.d.-studium. Kandidaten er Marianne Decker. Afhandlingen forventes at være færdigskrevet i forår 2004.

7 Samarbejde nationalt og internationalt

Jens Michael Carstensen, Institut for Matematisk Modellering, DTU / Videometer A/S, Hørsholm
Ilka Eppert fra Chr. Hansen A/S, France.

Ylva Ardö, Jeanette Otte og Kristian Rotvig, Mejeriområdet, MLI, KVL

Projektets følgegruppe bestående af:

- Lene Jacobsen, Troldhede Mejeri, Arla Foods amba
- Katrine Vindelbo, Troldhede Mejeri, Arla Foods amba
- Elise Borregaard, Tholstrup Cheese A/S
- Carl Henrik Pedersen, Tholstrup Cheese A/S
- Sinne Bundgaard Nielsen, Brabrand, Arla Foods amba

8 Publikationer

8.1 Internationale publikationer

- Geisen, R., Dines Larsen, M., Hansen T.K., Holzapfel W.H. and Jakobsen. M. (2001): Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. International Journal of Food Microbiology. 65 (3) 183-191.
- Hansen, T.K. and Jakobsen, M (2001): Taxonomical and technological characteristics of *Saccharomyces* spp. related to blue mould cheeses. International Journal of Food Microbiology 69, (1-2) 59-68.
- Hansen, T.K, Cantor, M.D, van den Tempel, T. and Jakobsen, M (2001): *Saccharomyces cerevisiae* as a starter culture in Mycella. International Journal of Food Microbiology 69 (1-2) 101-111.
- Hansen, T.K and Jakobsen, M (2003): Yeast in the Dairy Industry. In Handbook of Fungal Biotechnology. Eds. Dilip, A., New York, Marcel Dekker. In Press
- Cantor, M.D, van den Tempel, T, Hansen, T.K. and Ardö, Y. (2004): Blue Cheese. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: 3rd edition. Eds. Fox, P, McSweeney, PLH, Gogan, TM and Guinee, T. Academic Press, London. In Press

Planlagte internationale publikationer:

- Decker, M. *et al.*, (2004): Nutritional and Environmental conditions influences on surface growth and viability of four selected *Penicillium camemberti* isolates grown on cheese medium. International Dairy Journal.
- Decker, M. *et al.*, (2004): Near Infrared Spectroscopy as explorative tools for investigation of the physiological differences between *Penicillium camemberti* isolates. Journal of Near Infrared Spectroscopy or "Applied Spectroscopy"
- Decker, M. *et al.*, (2004): Bactometer: changes in ionic metabolite profile as a function of growth time. Journal of Microbiological Methods
- Decker, M. *et al.*, (2004): Morphological and physiological differences of *Penicillium camemberti* isolates. International Dairy Journal.

- Decker, M. *et al.*, (2004): White moulded cheeses of 20 different *Penicillium camemberti* isolates
- Decker, M. *et al.*, (2004): Interactions of four *Penicillium camemberti*, two *Galactomyces geotrichum* and four common contaminating mould using, Image, NIR and impedimetric analysis.
- Hansen, T.K and Jakobsen, M. (2004): The effect of water relations on germination, growth and sporulation of *Penicillium roqueforti*. Applied Letters of Microbiology.
- B.C. Viljoen, A. Knox, L.R. Beuchat, T. Deak, M.M. Ferreirad T. K. Hansen, A. Hugo, V. Loureiro, A. Lourens-Hattingh and R. Vasdinnyi (2004): An inter-laboratory evaluation of selective media for the detection and enumeration of yeasts from blue-mould cheese. International Journal of Food Microbiology.
- Cantor, M.D., Nielsen Væggemose, P. and Hansen T.K (2004): Environmental conditions in Danablu. International Dairy Journal. Under udarbejdelse

8.2 Danske tidsskrifter

- Hansen, T.K. og Jakobsen, M. (2000): Samspillet mellem starterkulturer i blåskimmelost. Mælkeritidende 3, 100-106
- Decker, M, Hansen, T.K., Nielsen P.V og Jakobsen, M (2000): Kvalitet og holdbarhed af hvidskimmeloste. Mælkeritidende 11, 292-295
- Hansen, T.K., Decker, M., Nielsen, P.V. og Jakobsen, M (2003): *Pennicillium camemberti*; Holdbarhed og kvalitet af hvidskimmeloste. Mælkeritidende (fremsendt)

8.3 Afhandlinger:

- Hansen, T.K. (2001): Microbial interactions in blue veined cheese. Ph.d-afhandling. Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, MLI, Levnedsmiddelmikrobiologi.
- Decker, M: Ecophysiology of *Penicillium camemberti* in white mould cheese, New Methods for differentiation and characterization. Danmarks tekniske Universitet, CPB, BioCentrum-DTU. (under udarbejdelse)

8.4 Mundtlige præsentationer og posters:

- Hansen, T.K. Jespersen, L. and Jakobsen, M. Taxonomical and Technological Characteristics of *Saccharomyces* spp. Related to Blue Mould Cheeses. Poster præsenteret ved IUMS: IXth International Congress of Mycology 16.-21. 1999, Sydney, Australien; IDF Symposium: Yeasts in the Dairy Industry. Bologna, Italien, 9.-10. september 1999; LMC Levnedsmiddelkongres, DTU, januar 2000; IDF Symposium: Cheese Ripening and Technology. Banff, Canada, 12.-16. marts 2000.
- Larsen, M.D., Hansen, T.K., Tempel, T.v.d. and Jakobsen, M. *Saccharomyces cerevisiae* as an potential starter culture in Mycella cheese. Mundtlig præsentation ved IDF Symposium: Yeasts in the Dairy Industry. Bologna, Italien, 9.-10. september 1999; som både mundtlig indlæg og poster præsentation ved LMC Levnedsmiddelkongres, DTU, januar 2000 og som poster

præsentation ved IDF Symposium: Cheese Ripening and Technology. Banff, Canada, 12.-16. marts 2000

- Decker, M. and Hansen, T.K. Characterisation of *Penicillium camemberti* starter cultures for production of white mould cheese. Poster præsenteret ved LMC Levnedsmiddelkongres, DTU, januar 2000; IDF Symposium: Cheese Ripening and Technology. Banff, Canada, 12.-16. marts 2000 og Danish Biotechnology Conference, Food Biotechnology, Munkebjerg, Vejle, maj 2000.
- Er der liv I en ost? Foredrag udbudt på Dansk Naturvidenskabsfestival og hold for folkeskolebørn september 2000.
- Hansen, T.K og Cantor, M.D. Interaktioner mellem starterkulturer og andre mikroorganismer i og på osten. Mundtlig præsentation. ”Udvikling og forskning vedrørende srningskulturer og kvalitetssikring.” Mejeribrugets Forårsseminar, Odense 21.-23. marts 2001
- Decker M., Trihaas J., Nielsen P.V. White mould cheese - new tools for objective quality evaluation. Poster præsenteret ved LMC Levnedsmiddelkongres, DTU, 16.-17. januar 2002.
- Decker M., Nielsen P.V. (2002). Profile of metabolic differenties of *Penicillium camemberti* isolates. Poster præsenteret ved " The Seventh International Mycological Congress," Oslo, Norway, august 11-17th, 2002.
- Decker M. Quality and shelf-life of white mould cheese. Mundtlig præsentation, The Fifth European Symposium on NIR, Kolding, Denmark 15. – 17. September 2003.

8.5 Mødedeltagelse

- Decker M. Quality and shelf-life of white mould cheese. Center seminar. Center for Process Bioteknologi (CPB), BioCentrum, DTU, 2003.

9 Tilknyttede studerende

- Isabel Bertolo de Olivera (Erasmus studerende) (1999). *Saccharomyces cerevisiae* as a potential starter culture in Mycella. Speciale (KVL).
- Pavlo neves de Silva (Erasmus studerende) (2000). Microbial interactions in white mould cheese. Speciale (KVL).
- Line Budde Andersen (2001) Taxonomical characteristics of *Galactomyces geotrichum* associated to cheese. Bachelorprojekt (KVL).
- Kari Düwel (2002). Nedbrydning af peptid β -kasein 193-209 ved ekstracellulær proteolytiske enzymer dannet af *Penicillium camemberti* i relation til hvidskimmelost. Speciale (KVL).
- Line Budde Andersen (2003): Interaktioner mellem *Penicillium roqueforti* og *Galactomyces geotrichum*. Speciale (KVL)

