

Afslutningsrapport

Produktions- og lagerforholds betydning for mikrobielle interaktioner i skimmeloste og deres betydning for ostekvaliteten

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2000-34

Juni 2000



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for samarbejdsprojektet

Produktions- og lagerforholds betydning for mikrobielle interaktioner i skimmeloste og deres betydning for ostekvaliteten.

Medarbejdere:

Lektor, Ph.D., Per Væggemose Nielsen, (Projektleder), Institut for Bioteknologi, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby. Tlf. 4525 2631. Fax 4588 4922. E-mail: pvn@ibt.dtu.dk

Professor Mogens Jakobsen, (Projektleder på KVL), Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Inst. For Levnedsmiddelmikrobiologi, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. Tlf. 3528 3216. Fax 3528 3215.
E-mail: moj@kv1.dk

Forskningsadjunkt, Ph.D., Marianne Skovgaard Nielsen, Institut for Bioteknologi, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby. (Nuværende arbejdsplads: EU-kommisionen i Bruxelles (DG 12), Research Directorate-General, Square de Meeûs 8, office 6.79, 1050 Bruxelles.
E-mail: Marianne-S.NIELSEN@cec.eu.int).

Forskningsadjunkt, Ph.D. Tatjana van den Tempel, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Inst. For Levnedsmiddelmikrobiologi, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. (Nuværende arbejdsplads: Institut for Bioteknologi, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby. Tlf. 4525 2631. Fax 4588 4922.
E-mail: tte@dtu.ibt.dk).

Resumé (dansk)

Gær- og skimmelkontaminanternes rolle i Danablu er undersøgt for første gang. Screening af prøver indsamlet fra fire mejerier viste hyppig forekomst af gær gennem hele ostningsprocessen. Baseret på traditionelle metoder blev 166 repræsentative gærisolater identificeret fra forskellige stadier af fremstillingen og modningen af Danablu. *Debaryomyces hansenii* var den mest dominerende gær, og blev fundet i alle prøver af rå mælk og i stigende antal gennem fremstillingen og modningen.

Undersøgelser af indsamlede prøver viste endvidere høj forekomst af skimmelkontaminanten *Penicillium caseifulvum* på overfladen af lagrede oste, mens kontaminanten *Geotrichum candidum* kun blev isoleret i enkelte tilfælde fra den indre del af osten.

Detaljerede taksonomiske undersøgelser er blevet udført på de dominerende gær- og skimmel arter herunder *D. hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *P. roqueforti*, *P. caseifulvum* og *G. candidum*. På baggrund af disse undersøgelser blev 6 isolater af *D. hansenii*, 6 isolater af *Y. lipolytica*, 2 isolater af hhv. *P. roqueforti* og *G. candidum* samt 1 stamme af *P. caseifulvum* udvalgt til videre undersøgelser under miljøforhold relevante for produktionen af Danablu (10°C, pH 4.0-6.0 og 0-14% NaCl (w/v)).

Under disse miljøbetingelser kunne god vækst påvises for gæren *D. hansenii*, skimmelstarteren *P. roqueforti* og skimmelkontaminanten *P. caseifulvum*. Stammer af *Y. lipolytica* var generelt følsomme overfor saltkoncentrationer højere end 4-6% (w/v), ligesom ingen vækst kunne iagttages for stammer af *G. candidum* ved saltkoncentrationer højere end 1-2% NaCl (w/v).

Stammer af *D. hansenii* kunne assimilere laktose, galaktose, citrat og laktat ved høje saltkoncentrationer, fra 6 til 14% NaCl (w/v) afhængig af isolat, i modsætning til stammer af *Y. lipolytica* som kun assimilerede citrat og laktat ved NaCl koncentrationer lavere end 6% (w/v). Alle undersøgte gærisolater udviste esterase aktivitet ved 10°C på 0.1 % tributyrin, hvorimod kun stammer af *Y. lipolytica* kunne frigive frie fedtsyrer fra smørfedt. Proteolytisk aktivitet kunne ikke påvises for stammer af *D. hansenii* ved 10°C, hvorimod hovedparten af *Y. lipolytica* stammerne kunne nedbryde kasein.

Indledende interaktions-eksperimenter mellem stammer af skimmelstarteren *Penicillium roqueforti* og gærerne *D. hansenii* og *Y. lipolytica* samt skimmelkontaminanterne *P. caseifulvum* og *G. candidum* viste stammespecifikke interaktioner, hvor interaktionsmekanismen synes at være substratkonkurrence.

I forbindelse med udførelse af interaktions- og vækstforsøg under modificeret atmosfære blev iltforholdene undersøgt i Danablu. Iltmålinger med en oxygen mikrosensor viste overvejende anaerobe forhold i oste

modnet i 2-3 uger, dog var der "luft-lommer" med ca. 3% ilt mætning i osten. Disse resultater blev brugt i udformningen af realistiske model systemer til undersøgelse af atmosfære sammensætningens (0.3 - 21 % ilt / 0 - 25% kuldioxid), salts (0% - 4% NaCl (v/w)) og pH's (4.5 - 6.5) effekt på vækst af *D. hansenii*, *P. roqueforti*, *P. caseifulvum* og *G. candidum* og deres interaktioner.

Stammer af *P. roqueforti* og *G. candidum* viste sig at være godt adapteret til vækst ved lave iltkoncentrationer og høje kuldioxid niveauer, mens *D. hansenii* viste god vækst ved lav ilt men ikke i kombination med et højt kuldioxid niveau. Vækst af *P. caseifulvum* var primært korreleret til høje koncentrationer af ilt, mens kuldioxid havde en stærkt hæmmende effekt på væksten.

P. caseifulvum var generelt upåvirket af NaCl i mediet, efterfulgt af *P. roqueforti* og *D. hansenii*, i modsætning til *G. candidum* som slet ikke voksede ved tilsætning af 4% (w/v) til mediet. Mediets pH havde derimod ikke nogen tydelig effekt på væksten af de undersøgte mikroorganismer.

Interaktionerne mellem de undersøgte stammer var stærkt korreleret til miljøforholdene. *P. roqueforti* var således væsentligt mere påvirket af tilstedeværelse af *G. candidum* i saltfrie miljøforhold ved 25% kuldioxid end ved andre miljøforhold. *P. caseifulvum* havde en kraftig hæmmende effekt på væksten af *P. roqueforti* og *D. hansenii* ved atmosfæriske forhold, mens positive interaktioner blev observeret mellem *D. hansenii* og *P. roqueforti* ved 25% kuldioxid og 0.3% ilt i form af forøget kolonidiameter af skimmel starteren.

Endelig har digital billedanalyse vist sig, at være et godt og objektivt redskab til vurdering af interaktioner som involverer skimmel, og specielt til beskrivelsen af *P. roqueforti*'s kolonifarve og -struktur.

English summary

This is the first detailed report on the role of yeast and filamentous fungi in Danablu cheese. Samples collected from Danish dairies have demonstrated regular occurrence of yeasts in raw milk during the processing and maturation of Danablu. A high content of yeast (10^8 cfu/g) could typically be found in Danablu after four weeks of maturation. Based on traditional methods 166 representative yeast isolates were identified from the different stages of production and maturation of Danablu. *Debaryomyces hansenii* was the dominating yeast, found in all samples of raw milk and in increasing numbers during processing and maturation.

The studies showed that the fungal contaminant *Penicillium caseifulvum* frequently occur at all stages of the cheese production, where as the contaminant *Geotrichum candidum* could only be isolated at a few

instances.

Detailed taxonomic studies have been conducted of predominant yeast and mould species i.e. *D. hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium roqueforti*, *P. caseifulvum* and *G. candidum*.

These studies lead to the selection of six isolates of *D. hansenii*, six isolates of *Y. lipolytica*, two isolates of *P. roqueforti* and *G. candidum* respectively and one isolate of *P. caseifulvum* for further investigations under environmental conditions relevant for cheese productions.

These studies showed that the yeast *D. hansenii*, the fungal starter *P. roqueforti* and the fungal contaminant *P. caseifulvum* showed good growth at conditions typical for maturation of Danablu, i.e. 10°C, pH 4.0-6.0 and 0-14% NaCl (w/v). The yeast *Y. lipolytica*, on the contrary was sensitive to salt concentrations higher than 4-6% (v/w). The fungal contaminant *G. candidum* was even more affected by high salt concentrations, as no growth appeared on media with more than 1 % NaCl (w/v). Strains of *D. hansenii* were able to assimilate laetose, galactose, citrate and lactate at high salt concentrations, ranging from 6 to 14% NaCl (w/v) depending on the isolate. Strains of *Y. lipolytica* could on the contrary only assimilate citrate and lactate at NaCl concentrations lower than 6% (w/v). All the examined yeast isolates showed esterase activity at 10°C, whereas only strains of *Y. lipolytica* could form free fatty

acids form butterfat. Proteolytic activity was not seen from strains of *D. hansen ii* at 10°C,

whereas most *Y. lipolytica* strains could degrade all casein components.

Preliminary interaction experiments between strains of the bille mould starter *P. roqueforti* and the yeast *D. hansenii* and *Y. lipolytica* revealed that some of the interactions were strain specific, and that the mechanism of interactions seemed to be explained by competitions for nutrients.

In connection with investigations of interaction and growth at modified atmosphere the atmospheric conditions in Danablu was investigated. Oxygen measurements conducted with an oxygen micro sensor showed predominately anaerobic conditions in cheese matured for two to three weeks. Though there were "air-pockets" with approximately 3% oxygen saturation in the cheese. Based on these results a realistic design for the study of growth and interactions in cheese was deployed. *D. hansenii*, *P. roqueforti*, *P. caseifulvum* and *G. candidum* were cultured at 0.3 - 21 % oxygen, 0 - 25% carbon dioxide, 0% - 4% NaCl (v/w) and pH level s of 4.5 - 6.5.

Strains of *P. roqueforti* and *G. candidum* displayed good ability to grow at low oxygen concentrations and high carbon dioxide levels, while *D. hansenii* showed good growth at low oxygen levels but not in combinations with high carbon dioxide levels. Growth of *P. caseifulvum* was primarily correlated to ambient levels of oxygen, while carbon dioxide had a strongly inhibitory effect on its growth. *P. caseifulvum* was generally unaffected by salt, *P. roqueforti* and *D. hansenii* were somewhat more affected, while *G. candidum* did not grow at NaCl concentrations higher than 4%. The pH of the media did not show any clear effect on growth of the studied microorganisms.

Interactions between the strains were strongly correlated to the environmental conditions. *P. roqueforti* was much more affected by *G. candidum* at low salt levels with 25% carbon dioxide than at other environmental conditions, while *P. caseifulvum* had a strong inhibitory effect on growth of *P. roqueforti* and *D. hansenii* at ambient atmospheric conditions. Positive interactions were observed between *D. hansenii* and *P. roqueforti* at 25% carbon dioxide and 0.3% oxygen.

Digital image analysis has proven to be a good and objective tool for the judgement of interactions involving moulds, especially to describe colony colour and structure of *P. roqueforti*.

1. Formål

Det har været projektets formål at undersøge, forekomst og betydning af gær og skimmelkontaminanter under produktion og modning af Danablu, samt at evaluere gærs potentielle evne som starterkultur og undersøge interaktionerne mellem skimmelstarteren *Penicillium roqueforti*, gær og skimmelkontaminanter under de miljøforhold der eksisterer i Danablu.

2. Baggrund

I blåskimmelost forekommer gær og skimmel som en naturlig del af mikrobiotaen introduceret via ostningsprocessen. Afhængig af art kan gær forekomme i et antal på 10^6 - 10^8 cfu/g gennem modningsfasen - mens skimmelkontaminanter ofte findes i et niveau på 10 - 10^3 cfu/g. Betydningen af sådanne niveauer er ikke kendt.

Tilstedeværelse af gær i højt antal i blåskimmelost kan accelerere ostemodnings-processen via deres lipolytiske og proteolytiske aktivitet, ved assimilering af ostekomponenter som laktose, galaktose, laktat og citrat, gennem ændringer i ostestruktur ved luftdannelse og endeligt ved positive interaktioner med de tilsatte starterkulturer. Alle disse potentielle positive egenskaber vil underbygge ideen om brug af gær som starterkultur i produktion af skimmeloste.

Omvendt kan gær også forårsage uønskede kvalitets forringelse af osteprodukter enten via misfarvninger, dannelse af off-flavours eller uønsket luftdannelse. Derfor bør nye potentielle gærstammer udvælges på baggrund af detaljerede studier af deres positive og negative effekt på ostekvalitet.

Tilstedeværelsen af skimmelkontaminanter i produktionen af blåskimmeloste kan foranledige misfarvninger på osteoverfladen eller hæmning af vækst og sporulering af den sekundære starterkultur *P. roqueforti* i ostemassen. En bedre styring af ostningsprocessen kan opnås via forøget viden om de miljøfaktorer, som påvirker vækst af uønskede kontaminanter. Sådanne undersøgelser foreligger ikke.

Blåskimmelost er et kompleks mikrobielt system med mange interaktioner i et meget heterogent mikromiljø med udtalte salt- og pH gradienter. Prikning af blåskimmelost samt store variationer i ostens struktur bevirker, at ilt og kuldioxid niveauerne varierer meget fra ostens ydre til ostens indre og igennem

modningsforløbet. Disse niveauer har stor indflydelse på mikrobiel vækst - men har aldrig været undersøgt i forbindelse med fremstilling af blåskimmelost. Ej heller har de fundamentale mekanismer for mikrobielle interaktioner mellem *P. roqueforti*, skimmelkontaminanter og gær været undersøgt.

3. Resultater

Indsamling af prøver til karakterisering af de dominerende gær og skimmelsvampe i blåskimmeloste blev foretaget på mejerierne; Bornholms Andelsmejeri, Høgelund Mejeri, Kirkeby Mejeri og Grenå mejeri. Prøverne blev udtaget fra tankvogn, ostemælk, valle fra ostetank, ostekorn, saltlage, ost fra saltlage samt ost lagret 1-4 uger.

3.1. Forekomst af gær i Danablu

Gær populationer i niveauet 10^1 - 10^4 celler/ml blev fundet i rå mælk fra de fire undersøgte mejerier. Et antal på 37 isolater blev isoleret fra prøver på rå mælk og gæren *Debaryomyces hansenii* (ukønnet stadie, *Candida famata*) blev karakteriseret som den mest dominerende efterfulgt af isolaterne *Candida catenulata*, *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*), *Candida krusei* og *Trichosporon cutaneum*.

Prøver udtaget fra saltlagen viste et gær indhold på 10^4 til 10^6 gær/ml afhængig af mejeri og på trods af variationer mellem mejerier kunne *D. hansenii* identificeres til at udgøre den dominerende gær på samtlige undersøgte mejerier.

Danablu analyseret umiddelbart efter saltnings proceduren viste en meget heterogen gærflora, heriblandt arter som *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *Zygosaccharomyces* spp., *Candida rugosa* og *Candida sphaerica*. Efter en modnings periode på 28 dage domineredes gærfloraen i Danablu fuldstændig af *D. hansenii*, hvor den kunne findes i niveauet $6.2 \cdot 10^6$ - $1.4 \cdot 10^8$ gær/g i henholdsvis dybden og overfladen af osten (se Tabel 1).

Gærisolaterne blev identificeret ved hjælp af traditionelle metoder efter Kreger-van Rij (kolonimorfologi, cellemorfologi, sporemorfologi, myceliedannelse, fermentering og assimilering af kulhydrater, assimilering af nitrat og vækst på 50% w/v glucose) API-32C assimilering test, protein profiler samt ITS-PCR ("Intergenic Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction").

3.2. Forekomst af skimmelkontaminanter i Danablu

Sideløbende med gærundersøgelserne blev de udtagne prøver undersøgt for uønsket vækst af skimmelkontaminanter. I prøver af rå mælk og saltlage blev *Penicillium caseifulvum* isoleret fra et enkelt mejeri ligesom *P. caseifulvum* blev isoleret fra ostekorn på 2 ud af 4 mejerier. På samtlige mejerier blev *P. caseifulvum* isoleret fra overfladen af lagrede oste i niveauet $10\text{-}10^3$ sporer pr. gram ost (1- 4 uger), mens kun enkelte prøver indeholdte kontaminanten *Geotrichum candidum* ($10\text{-}10^3$ sporer pr. gram ost) (Tabel 2).

3.3. Karakterisering af gær i Danablu

Detaljerede taksonomiske undersøgelser blev udført på de dominerende gærarter herunder *D. hansenii* (*C. famata*) og *Y. lipolytica* (*C. lipolytica*). Undersøgelser af vækst karakteristika ved forskellig pH (4.0-6.0), vandaktivitet (0.92-0.98) og temperatur (10, 20 og 30°C) viste sammen med undersøgelser af assimileringens mønstre og esterase aktivitet på 0.1 % tributyrin en udtalt variation på subspecies niveau for isolater af *D. hansenii*, i modsætning til stammer af *Y. lipolytica*, der kun varierede lidt på subspecies niveau.

Fænotypiske forskelle mellem stammer af *D. hansenii* kan være korreleret til den genetiske variabilitet af denne art. En sådan variabilitet blev indikeret for udvalgte isolater ved mitokondrie DNA restriktions fragment længde polymorfisme (RFLP).

Seks stammer af henholdsvis *D. hansenii* og *Y. lipolytica* blev udvalgt til yderligere undersøgelser i laboratorie skala for deres potentiale som starter kulturer til produktion af Danablu. Det primære formål med undersøgelserne var at karakterisere de teknologiske egenskaber under typiske forhold for modningen af Danablu, d.v.s. 10°C, pH 4.0-6.0 og 0-4% NaCl (w/v).

Alle undersøgte stammer kunne vokse ved pH fra 4.0 til 6.0 ved 10°C. Stammer af *D. hansenii* kunne assimilere laktose, galaktose, citrat og laktat ved høje salt koncentrationer, fra 6% til 14% (w/v) (Figur 1a), afhængig af isolatet. Stammer af *Y. lipolytica* assimilerede kun citrat og laktat og kun ved saltkoncentrationer lavere end 6% (w/v) (Figur 1b) hvilket indikerer at vækst af *Y. lipolytica* i Danablu vil være begrænset til midten af osten i starten af modningen.

Undersøgelser af esterase aktivitet viste, at alle stammer af *D. hansenii* og *Y. lipolytica* hydrolyserede 0.1 % tributyrin ved 10°C, hvor *Y. lipolytica* udviste den største aktivitet. *Y. lipolytica* viste også en kraftig lipolytisk aktivitet, som dog blev mindsket ved tilstedeværelse af 4% (w/v) L. *D. hansenii* frigjorde derimod kun lidt eller ingen frie fedtsyrer fra smørfedt.

Undersøgelser ved 25°C viste at *Y. lipolytica* efter 5 dages inkubation har en højere frigivelse af frie fedtsyrer fra smørfedt sammenlignet med *P. roqueforti* (Tabel 3). Efter 10 dages inkubation var mængden af frie fedtsyre gennemsnitlig større fra de undersøgte *Y. lipolytica* isolater sammenlignet med *P. roqueforti* isolaterne.

Gær stammernes evne til at nedbryde kasein ved 10°C blev først undersøgt ved agar diffusion. Positiv reaktion blev kun påvist for, fire ud af seks stammer af *Y. lipolytica*, mens *D. hansenii* ingen reaktion viste. Undersøgelser på kapillar elektroforese illustrerede, at de fire positive stammer af *Y. lipolytica* var i stand til at nedbryde alle kasein komponenterne. For *D. hansenii* stammerne blev kasein nedbrydning kun observeret ved 25°C og efter forlænget inkubation.

Pigment dannelse på osteagar blev undersøgt for de seks udvalgte stammer af hhv. *D. hansenii* og *Y. lipolytica*. For *D. hansenii* blev pigmentdannelse observeret for en stamme, men kun ved tilsætning af tyrosin til osteagaren. Fem ud af seks stammer af *Y. lipolytica* dannede et brunligt til rødt pigment på osteagar og i de fleste tilfælde blev farven intensiveret ved tilsætning af tyrosin. Pigmentdannelsen var kraftigere ved 25°C end ved 10°C.

3.4. Karakterisering af skimmelsvampe i Danablu

Til karakterisering af væksten hos de isolerede skimmelsvampe (*P. roqueforti*, *P. caseifulvum* og *G. candidum*) blev der foretaget et responsfladeforsøg på 4 isolater af hver art. Indflydelse af pH-niveau (4.0 - 6.0) og NaCl-indhold (0- 14% w/v) på koloni diameter blev undersøgt ved 5, 10 og 15°C. Undersøgelserne illustrerede ens vækstprofiler indenfor samme skimmelsvampeart. *P. caseifulvum*'s vækst var mest upåvirket af høje saltkoncentrationer, i modsætning til væksten af *P. roqueforti* og specielt *G. candidum* som blev hæmmet af høje saltkoncentrationer. Effekten af temperatur og pH var ubetydelig i forhold til salteffekten.

Vækstforsøg foretaget på osteagar viste, at stammer af *P. caseifulvum* under visse miljøbetingelser, (4% NaCl, pH 4.5) dannede et gulligt pigment efter 4-6 dages inkubation ved hhv. 10 og 25°C. I samarbejde med Thomas Ostenfeld Larsen, DTU (FØTEK-MFF-projekt: "Kemisk karakterisering af sekundær metabolitdannelse fra skimmelsvampe på ost") blev det forsøgt at oprense misfarvende metabolitter dannet af *P. caseifulvum*. De pågældende metabolitter har dog vist sig at være meget ustabile, hvilket har vanskeliggjort oprensningen og efterfølgende spektrometrisk strukturoptælling af de pågældende stoffer.

For at reducere antallet af skimmelisolater blev det besluttet, kun at benytte 2-3 stammer af *P. roqueforti*, 1 stamme af *P. caseifulvum* og 2 stammer af *G. candidum* i forbindelse med udførelse af interaktionsforsøg som beskrevet under punkt 3.5-3.7.

3.5. Karakterisering af atmosfæreforhold i Danablu

Karakterisering af mikromiljøforhold i Danablu (50+) i relation til pH, salt og vandaktivitet er undersøgt i tidligere mejeriprojekter (Mette Dines Larsen, KVL, FØTEK-MFF-projekt: "Lipolytisk og proteolytisk aktivitet samt forudsigelse af modningsforløb ved fremstilling af Danablu".) I nærværende projekt blev modeller udført på disse målinger til brug ved fastlæggelse af forsøgsbetingelserne i forbindelse med vækst- og interaktionsforsøg.

Atmosfæreforholdene blev karakteriseret i Danablu (50+) efter 1-4 ugers lagring samt efter 8, 13 og 20 ugers lagring.

Mikro-fordelingen af ilt blev målt i Danablu (50+) med en oxygen mikrosensor på Unisense i Århus.

Målingerne var baseret på diffusion af oxygen gennem en silikone membran til en oxygen reducerende katode, hvorefter oxygen niveauet blev bestemt elektrokemisk. Målinger af kuldioxid blev udført på Bioteknologisk Institut i Kolding ved hjælp af membran-inlet massespektrometri (MIMS).

Resultaterne fra iltmålingerne i Danablu illustrerede, at ilt niveauet i Danablu hurtigt falder gennem modningen. I oste modnet i en uge var mætningen faldet til 70% kun 0.25 mm under osteoverfladen og ned til 50%, 4 mm under osteoverfladen. Efter 3 ugers lagring fandtes overvejende anaerobe forhold i osten på grund af den mikrobielle aktivitet. Undtaget var små lommer i osten med cirka 3% ilt mætning. Dette er illustreret i Figur 2.

En metode baseret på måling af kuldioxid i ost har været under udvikling i samarbejde med Bioteknologisk Institut i Kolding og en special-udviklet probe til massespektrometrisk måling af kuldioxid blev afprøvet. Målinger på Danablu (50+) efter 1 uges lagring indikerede kuldioxid niveauer på 0 - 0.5 %. Efter 2 ugers lagring og fremefter blev koncentrationer på 3 - 18 % kuldioxid fundet i ostene. Variationer i målingerne indikerede problemer med probens membran, men resultaterne kunne dog give en indikation om kuldioxid niveauerne i Danablu under modningsforløbet.

Resultatet fra ilt- og kuldioxid målingerne blev brugt til at udforme realistiske model systemer til at undersøge effekten af atmosfære sammensætningen på vækst af gær og skimmel associeret med Danablu og deres interaktioner.

3.6. Indledende interaktionsforsøg

Kommercielle stammer af skimmelstarteren *P. roqueforti* og et repræsentative udsnit af Danablu relaterede skimmelkontaminanter (*P. caseifulvum* og *G. candidum*) og gær (*D. hansenii* og *Y. lipolytica*) blev undersøgt for deres indbyrdes interaktioner.

Interaktionsforsøgene blev udført som spot test på osteagar uden tilsat NaCl (pH 5.5). Podekoncentrationen af de undersøgte mikroorganismer svarede til de fundne niveauer i Danablu efter ca. 3-4 ugers modning, det vil sige for skimmel startere, skimmelkontaminanter og gær, hhv. 10^5 , 10^3 og 10^5 konidier eller celler ml^{-1} . Efter hhv. 7 og 14 dages inkubation ved 10°C blev kolonidiameteren på test-organismen aflæst. Resultaterne for de indledende interaktionsforsøg fremgår af Tabel 4. Disse resultater indikerer, at interaktioner er forholdsvis ens indenfor samme art, dvs. at de observerede interaktioner ikke kan relateres til isolaternes oprindelses sted (mejeri). Det ses endvidere, at hovedparten af de observerede interaktioner består i en væksthæmning.

Sammenligning af forsøg udført på henholdsvis KVL og DTU viste, at mængden af ostesubstrat i petriskålene havde en signifikant indflydelse på udfaldet af interaktionerne. Herefter blev det besluttet at standardisere substratmængden til præcist 20 ml per petriskål, og primært benytte ost fra samme batch.

3.7. Interaktionsmekanismer

Konkurrence om næringsstoffer ser ud til at være den hyppigste mekanisme bag interaktioner som involverer skimmelstartere (*P. roqueforti*), skimmelkontaminanter (*P. caseifulvum*) og gær (*D. hansenii* og *Y. lipolytica*). Dette bygger på følgende observationer:

- i) skimmelisolaterne hæmmes ikke af supernatant eller cellefrit ekstrakt af *D. hansenii* og *Y. lipolytica*.
- ii) god vækst af gærisolater på osteagar.
- iii) jo større indhold af gær dets større hæmning af skimmel.
- iv) den hæmmende effekt reduceres stærkt ved tilsætning af næringsstoffer.

Andre forskere har fundet, at skimmelkontaminanten *G. candidum* kan danne sekundære metabolitter, som eventuelt kan hæmme væksten af andre mikroorganismer. Som følge heraf blev interaktionsmekanismerne mellem *G. candidum* og *P. roqueforti* studeret mere detaljeret. Væksthæmning forårsaget af flygtige metabolitter blev undersøgt ved podning af *G. candidum* sammen med *P. roqueforti* på osteagar i petriskåle

med skillevæg. Efter 10 dages inkubation ved hhv. 10 og 25°C blevet tenaxrør til opsamling af flygtige aromastoffer påsat petriskålen.

Efter yderligere 4 dages inkubation blev de flygtige metabolitter undersøgt, og kolonidiameteren på *P. roqueforti* starterne blev målt. Resultaterne viste, at *G. candidum* ikke dannede flygtige metabolitter som hæmmede *P. roqueforti*, hverken ved 10 eller 25°C.

3.8. Miljøfaktorerers indflydelse på mikrobielle interaktioner

Interaktionsforsøg blev udført under kontrollerede atmosfæreforhold for to stammer af *D. hansenii*, to stammer af *P. roqueforti*, to stammer af *G. candidum* og en stamme af *P. caseifulvum* i et fuldfaktor forsøg i to niveauer. Disse undersøgelser blev foretaget i avancerede klimaskabe på DTU.

Kombinationer af *D. hansenii*, *P. roqueforti*, *G. candidum*, og *P. caseifulvum* blev podet på osteagar med varierende saltkoncentration (0-4% NaCl w/v) og pH (4.5 - 6.5). Pladerne blev inkuberet ved 10°C under forskellige atmosfæreforhold (0 - 25 % CO₂, 0.3 - 21 % O₂) og kolonidiameter samt sporulering blev vurderet efter 14 dage.

De opnåede resultater for interaktioner blev analyseret ved den multivariant statistisk metode PLS (Unscrambler, Camo, Oslo, Norge) som illustreret i Figur 3. Effekten af interaktionerne mellem mikroorganismene var generelt mindre udtalt end effekten af de undersøgte niveauer af salt og kuldioxid. Specielt for stammer af *G. candidum* var interaktionerne kraftigt korreleret til miljøforholdene, idet vækst og sporulering af *P. roqueforti* var væsentlig påvirket af tilstedeværelse af *G. candidum* i saltfrie miljøforhold og 25% kuldioxid uafhængig af luftens iltindhold. *Debaryomyces hansenii* kunne stimulere væksten af *P. roqueforti* ved 25% kuldioxid og 0.3% ilt, hvilket indikerer en positiv interaktion under modningen af Danablu. *P. caseifulvum* havde en kraftig hæmmende effekt på væksten af *P. roqueforti* og *D. hansenii* ved atmosfæriske forhold.

På baggrund af ovenstående resultaterne kan det slutes, at mikromiljøet i Danablu har en afgørende betydning for interaktioner mellem skimmel og gærkulturer. Miljøbetingelserne i Danablu er generelt betinget af lave iltkoncentrationer og høje kuldioxidkoncentrationer under hovedparten af modningsforløbet. Disse forhold selekterer for vækst af både *P. roqueforti*, *G. candidum* og *D. hansenii*. I starten af modningsforløbet er saltkoncentrationen i midten af osten lav og *G. candidum* kan etablere sig hurtigt. Eventuel tilstedeværelse af *G. candidum* i den tidlige modningsfase vil give en kraftig hæmning af vækst og sporulering af *P. roqueforti*. *D. hansenii* forekommer i høje koncentrationer i Danablu (10⁶ - 10⁸ cfu/g) og resultaterne indikerer positive interaktioner med *Penicillium roqueforti* i form af hurtigere vækst.

P. caseifulvum hæmmer væksten af *P. roqueforti* under betingelser defineret af høje saltkoncentrationer (4% w/w), 21 % ilt og 0% kuldioxid. Disse miljøforhold er karakteristiske for overfladen af Danablu og derfor vil *P. caseifulvum* ikke have nogen reel indflydelse på udbredelsen og sporulering af *P. roqueforti* i osten.

3.9. Kvantificering af interaktioner mellem gær og skimmel ved hjælp af billedanalyse.

Interaktionsforsøg i valle blev udført for forskellige stammer af gær (*D. hansenii*, *Y. lipolytica* og *Saccharomyces cerevisiae*), kontaminanter (*P. caseifulvum* og *G. candidum*) og skimmelstarteren *P. roqueforti*. I den forbindelse blev der eksperimenteret med sterilfiltrering af valle. Forsøgene blev udført i samarbejde med pilotplant på DTU og forsøgene viste, at filtrering med et membranfilter med normal asymmetrisk struktur gav en steril valle. Den fremstillede valle blev undersøgt mht. tørstof, proteinindhold og mikrobiologi inden eksperimentel anvendelse.

Analyse af *P. roqueforti*'s vækst (farve og mycelie-struktur) som følge af interaktioner med andre mikroorganismer blev undersøgt ved hjælp af digital billedanalyse. Billederne af *P. roqueforti* blev digitaliseret i et videometer i samarbejde med Institut for matematisk modellering (IMM) på DTU. Multivariat dataanalyse af informationer ekstraheret fra digitale billeder af *P. roqueforti* resulterede i en yderst objektiv vurdering af kolonifarve og sporulering i relation til vækstmedie og interaktioner med andre mikroorganismer. Resultaterne har vist, at vækst og sporulering af *P. roqueforti* direkte kan korreleres til hvilken type af gær interaktionsforsøgene har været baseret på.

Ud over at digital billedanalyse er en ikke-destruktiv metode er det også en nem, hurtig og reproducérbar metode, som har generel anvendelse.

3.10. Mejeriforsøg

Debaryomyces hansenii's evne som starterkultur har været undersøgt i storskala forsøg i produktionen af Danablu (50+). *D. hansenii* (FB2) blev udvalgt til disse forsøg på grund af unikke teknologiske egenskaber; god vækst ved 10°C, assimilering af galaktose, laktose, laktat og citrat ved høje salt koncentrationer, aminopeptidase- og esterase aktivitet og positive interaktioner med *P. roqueforti*. Forsøgsostene blev produceret ved tilsætning af ca. 10^5 gærceller ml^{-1} til ostemælken sammen med de øvrige starterkulturer. Mikrobiologiske analyser blev regelmæssigt udført på to forsøgsoste samt to reference oste og analyser efter 4 uger viste omtrent samme gærkoncentration (10^8 cfu/gram) i de to typer oste. Kemiske analyser af ostene (% vand, % fedt, % NaCl, pH) indikerede ubetydelige forskelle mellem forsøgs- og reference ostene.

Vurdering af billeder taget af ostene under modningen indikerede en mere homogen vækst og sporulering af *P. roqueforti* i forsøgsostene end i referenceostene. Et trænet "blue" panel foretog en sensorisk bedømmelse af ostene og forsøgsostene tilsat *D. hansenii* fik en bedre evaluering i forhold til referenceostene i relation til ostetekstur. Øvrige osteegenskaber var ens for de to typer oste. Disse resultater indikerer, at tilsætning af *D. hansenii* som starterkultur i produktion af Danablu kan forbedre ostekvaliteten, men yderligere storskalaforsøg er nødvendige for at fastlægge dette.

4. Konklusion

De opnåede resultater har bidraget med ny viden angående de mikrobiologiske forhold i Danablu, især med henblik på gærstammerne *Debaryomyces hansenii* og *Yarrowia lipolytica* og skimmelkontaminanterne *Penicillium caseifulvum* og *Geotrichum candidum*.

Systematiske undersøgelser har vist, at gær oftest forekommer i høje koncentrationer (10^6 - 10^8 celler/g ost), mens skimmelkontaminanterne oftest findes i koncentrationer på 10 - 10^3 celler/g ost.

D. hansenii er identificeret til at være den mest dominerende gær i Danablu gennem hele produktionsforløbet og dens oprindelse synes at være den rå mælk og mejerimiljøet. *P. caseifulvum* forekommer hyppigt på overfladen af Danablu under lagring, mens *G. candidum* i enkelte tilfælde kan isoleres fra den indre del af Danablu hvor saltkoncentrationen er lav.

Screening af potentielle gærstarterkulturer har vist, at stammer af *D. hansenii* udviser gode vækstegenskaber ved miljøforhold svarende til dem som eksisterer i Danablu under modningen. Desuden kan disse gærstammer modificere mikromiljøet i Danablu ved omsættelse af laktat, citrat, laktose og galaktose under varierende høje saltkoncentrationer afhængigt af isolat. *D. hansenii* bidrager kun i meget begrænset omfang til nedbrydning af protein og fedt ved lagringstemperaturen 10°C . Interaktionsforsøg mellem *D. hansenii* og *P. roqueforti* ved osterelevante atmosfæreforhold har vist en positiv påvirkning af starteren i form af hurtigere vækst. Baseret på disse resultater kan det konkluderes at *D. hansenii* er ønskelig som starterkultur i produktionen af Danablu, eftersom denne vil danne et stabilt ostemiljø, forebygge mod uønskede mikroorganismer og give en mere ensartet ostekvalitet.

Stammer af gæren *Y. lipolytica* har vist betydelig protease og lipase aktivitet men betydelig sensitivitet mod de høje saltkoncentrationer eksisterende i Danablu under modningen. Dette indikerer, at disse stammers potentielle rolle som starterkulturer i Danablu er forbundet med tidlig lipolyse når starteren *P. roqueforti* ikke er tilstede i signifikante mængder. Visse stammer af *Y. lipolytica* har vist sig at producere pigment på ost og inhibere vækst af *P. roqueforti*, hvilket understreger vigtigheden af omhyggelig udvælgelse af

starterkulturer ved hjælp af screeningsstrategier. Yderligere studier er nødvendige for at konkludere på anvendelsesmulighederne af *Y. lipolytica* som starterkultur i Danablu. Skimmelkontaminanten *P. caseifulvum* forekommer hyppigt på overfladen af Danablu, på grund af dens høje salttolerance og præference for høje iltkoncentrationer. Interaktionsforsøg har vist, at *P. caseifulvum* ikke hæmmer vækst og sporulering af starteren *P. roqueforti* på grund af disses forskellige vækstpræferencer i osten. Derimod har kontaminanten *Geotrichum candidum* og *P. roqueforti* sammenfaldende vækstpræferencer i starten af modningsforløbet hvor saltkoncentrationen i centrum af osten er lav. En tidlig kontaminering af blåskimmelost med *G. candidum* vil hæmme vækst og sporulering af *P. roqueforti* og påvirke ostekvaliteten signifikant.

Publikationer:

van den Tempel, T. & Jakobsen, M. (1998) Yeasts associated with Danablu. International Dairy Journal. Vol. 8, No. 1, pp 25-31.

van den Tempel, T. & Jakobsen, M. (2000) *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* as potential starter cultures for production of blue cheeses. International Dairy Journal. In Press.

Nielsen, M. S., van den Tempel, T. & Gundersen, I. K. (2000) The Micro-distribution of Oxygen in Danablu measured by a Microsensor during ripening. To be submitted to International Journal of Food Microbiology.

van den Tempel, T. & Bundesen, F. (2000) Application of Digital Image Analysis in Quantification of Interactions involving *Penicillium roqueforti* and yeasts. In preparation for publication as a short communication.

van den Tempel, T. & Nielsen, M. S. (2000) Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. International Journal of Food Microbiology. In press.

Foredrag:

van den Tempel, T. (1996) The technological characteristics of *Candida famata* isolated from Danablu. IDF Symposium: Yeasts in the dairy industry - positive and negative aspects. København 2.-3. September 1996.

van den Tempel, T. (1997) Occurrence and Technological Properties of yeasts isolated from blue mould ripened cheeses. 18th ISSY. Yeast nutrition and natural habitats. Bled, Slovenien, 24.-29. August, 1997.

Nielsen, M. S. Protection of fungal starters against fungal spoilers in cheese. Foredrag på Biotechnology Conference IV, 28.-29. maj, 1998.

Nielsen, M. S. Biological control in cheese. Foredrag på EU-møde (Arbejdsgruppe 5 under Cost Action 835: Agricultural important toxigenic fungi, 25.-26. juni, 1998.

Nielsen, M. S. Fungal interactions in cheese in relation to growth and mycotoxin production. Oral præsentation ved Cost Action 835 Workshop (Agricultural important toxigenic fungi), Athen, Grækenland, 29-31. oktober, 1998.

Posters ved kongresser og konferencer:

Nielsen, M. S. Interactions between fungal starters and spoilers from cheese. Posterpræsentation ved "25th International Dairy Congress", Århus, 21-24. september, 1998.

van den Tempel, T, Nielsen, M.S., Jakobsen, M. and Nielsen, P.V. Possible role of microbial interactions for the quality of Blue cheeses. Posterpræsentation ved "Quality and Microbiology of Traditional and Raw Cheeses", Dijon, Frankrig, 30. november - 1. december, 1998.

Nielsen, M. S. and van den Tempel, T. Microbial interactions between fungi and yeast in blue cheeses. Posterpræsentation på IXth International Congress of Mycology, Sydney, Australia, 16-20 august, 1999.

Nielsen, M.S. Fungal interactions in cheese in relation to growth and mycotoxin production. Posterpræsentation ved "Eighth International Symposium on Microbial Ecology", Halifax, Canada, 9-14. august, 1998.

Kontakter:

M. S. Nielsen og T.v.d. Tempel på besøg hos Johan Schnurer, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Sverige, 15-19 maj 1998.

T. v. d. Tempel på besøg hos Centraal Bureau for Schimmelcultures, Delft, Holland, 9.-11. December 1998.

M.S. Nielsen på besøg hos Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Université de Caen, Frankrig (Dr. Micheline Gueguen), september 1999.

Point-, bachelor- og specialeopgaver udført under projektet:

Flemming Bundesen (1998). Undersøgelse af gær i Danablu 50+. Point opgave (KVL).

Irene Falk Byrgesen & Pia Christiansen (1998). Mulig anvendelse af gær ved modning af danske blåskimmeloste. Bachelorprojekt (KVL).

Joao Cordeiro (1998). Characterisation of *Candida colliculosa* and *Candida sphaerica* isolated from Danish Feta cheese. Specialeprojekt (KVL).

Thomas Friis (1998). Forekomst af gær i dansk produceret fetaost. Specialeprojekt (KVL).

Tina Hedeboe Hansen (1998). Afprøvning og udvikling af ny metode til identifikation af gær. Pointopgave (KVL).

Marianne Nielsen (1999). Hæmning afluftproducerende gær i Fetaost. Specialeprojekt (KVL).

Stephanie Ann L. R. Pereira de Carvalho (1999). Yeasts associated with blue veined cheeses. Pointopgave (KVL).

Flemming Bundesen (2000). Interaktioner mellem *Penicillium roqueforti* og gær vurderet ved hjælp af digital billedanalyse. Specialeprojektet (KVL).

Ph. D. afhandling:

van den Tempel, The Role of Yeast in the Ripening of Blue Mould Cheese. Forsvaret den 11. Februar 2000.

Lyngby den 26. Maj 2000

Tatjana van den Tempel og Per Væggemose Nielsen

Tabel 1. Gærudvikling (cfu/gram) i Danablu (Mejeri A, B, C og D) efter saltning og indtil 28 dage på modningslager (overflade og indre)

Gær isolat	Dag 1		Dag 14		Dag 28	
	overflade	indre	overflade	indre	overflade	indre
Mejeri A						
<i>Candida famata</i>	$3.3 \cdot 10^3$	<10	$1.0 \cdot 10^5$	$1.0 \cdot 10^4$	$1.4 \cdot 10^5$	ND*
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	$1.0 \cdot 10^2$	$1.0 \cdot 10^2$	$1.0 \cdot 10^5$	<10	<10	ND*
<i>Candida lipolytica</i>	<10	<10	$1.5 \cdot 10^2$	<10	<10	<10
<i>Candida lambica</i>	<10	10^2	<10	<10	<10	<10
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<10	10^2	<10	<10	<10	<10
Mejeri B						
<i>Candida famata</i>	$1.5 \cdot 10^3$	$1.0 \cdot 10^2$	$3.8 \cdot 10^5$	$3.0 \cdot 10^5$	$5.2 \cdot 10^8$	$8.0 \cdot 10^5$
<i>Trichosporon cutaneum</i>	$2.0 \cdot 10^2$	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Candida norvegensis</i>	10^2	<10	<10	<10	<10	<10
Mejeri C						
<i>Candida famata</i>	$2.7 \cdot 10^4$	<10	$2.5 \cdot 10^8$	$2.0 \cdot 10^5$	$1.4 \cdot 10^8$	$6.2 \cdot 10^6$
<i>Candida lipolytica</i>	$4.0 \cdot 10^4$	$1.1 \cdot 10^3$	<10	<10	<10	<10
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	$9.0 \cdot 10^4$	$1.1 \cdot 10^3$	<10	<10	<10	<10
<i>Candida rugosa</i>	<10	<10	<10	$1.0 \cdot 10^4$	<10	<10
<i>Candida sphaerica</i>	<10	$4.0 \cdot 10^2$	<10	<10	<10	<10
Mejeri D						
<i>Candida famata</i>	$1.1 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^3$	$1.9 \cdot 10^7$	$5.0 \cdot 10^5$	$2.3 \cdot 10^7$	$2.0 \cdot 10^6$
<i>Candida catenulata</i>	<10	$1.0 \cdot 10^3$	<10	<10	$3.5 \cdot 10^7$	$1.0 \cdot 10^6$
<i>Candida rugosa</i>	$3.4 \cdot 10^4$	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Trichosporon cutaneum</i>	$4.0 \cdot 10^3$	<10	<10	<10	<10	<10

* Ikke bestemt

Tabel 2. Forekomst af skimmelkontaminanter (sporer/gram) i Danablu (Mejeri A, B, C og D) efter saltning og indtil 28 dage på modningslaget.

Prøve	Mejeri A	Mejeri B	Mejeri C	Mejeri D	Sporer/gram
Rå mælk	<i>P. caseifulvum</i>				10
Saltlage	<i>P. caseifulvum</i>				$10^1 - 5 \cdot 10^2$
Ostekorn	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i>			10^2
Ost fra saltlage	<i>P. caseifulvum</i> <i>G. candidum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i> <i>G. candidum</i>	$10^2 - 10^3$
Ost lagret 7 dage	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i> <i>G. candidum</i>	<i>P. caseifulvum</i> <i>G. candidum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	$10^2 - 10^3$
Ost lagret 14 dage	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i> <i>G. candidum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i> <i>G. candidum</i>	$10^2 - 10^3$
Ost lagret 28 dage	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	$10^2 - 10^3$

Tabel 3. Lipolytisk aktivitet af 6 *Yarrowia lipolytica* stammer og 6 *Penicillium roqueforti* stammer bestemt ved titrering af smørfedt ved pH 5.5, 0% NaCl og 25°C (5, 10 eller 14 dage).

Aktivitet af <i>Yarrowia lipolytica</i> ^a			Aktivitet af <i>Penicillium roqueforti</i> ^b		
Stammer	Lipase aktivitet efter 5 dage	Lipase aktivitet efter 10 dage	Stammer	Lipase aktivitet efter 7 dage	Lipase aktivitet efter 14 dage
CBS 2075 ¹	1050±9	1046±46	PA ⁴	146	582
FB14 ²	550±55	756±72	Roq 1 ⁵	156	329
30 ³	580±70	526±11	Roq 2 ⁵	325	832
77 ³	849±49	1046±45	Roq 5 ⁵	256	1053
132 ³	834±83	1009±82	CSL ⁶	209	693
138 ³	920±37	544±10	PV ⁴	368	1004

^a Frigivelse af frie fede syrer (µmol FFA/100g fedt) efter 5 dage inkubation ved 25°C (pH 5.5 og 0% NaCl).

Gennemsnitsværdierne og standardafvigelsen bygger på dobbeltbestemmelser (ikke-publicerede resultater).

^b Frigivelse af frie fede syre (µmol FFA/100g fedt) efter 5 dage inkubation ved 25°C (pH 5.5 og 0% NaCl).

Gennemsnitsværdierne og standardafvigelsen bygger på dobbeltbestemmelser (modificeret efter Larsen og Jensen, 1999).

¹ Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, The Netherlands

² Isoleret fra fransk blåskimmelost

³ Isoleret fra Danablu

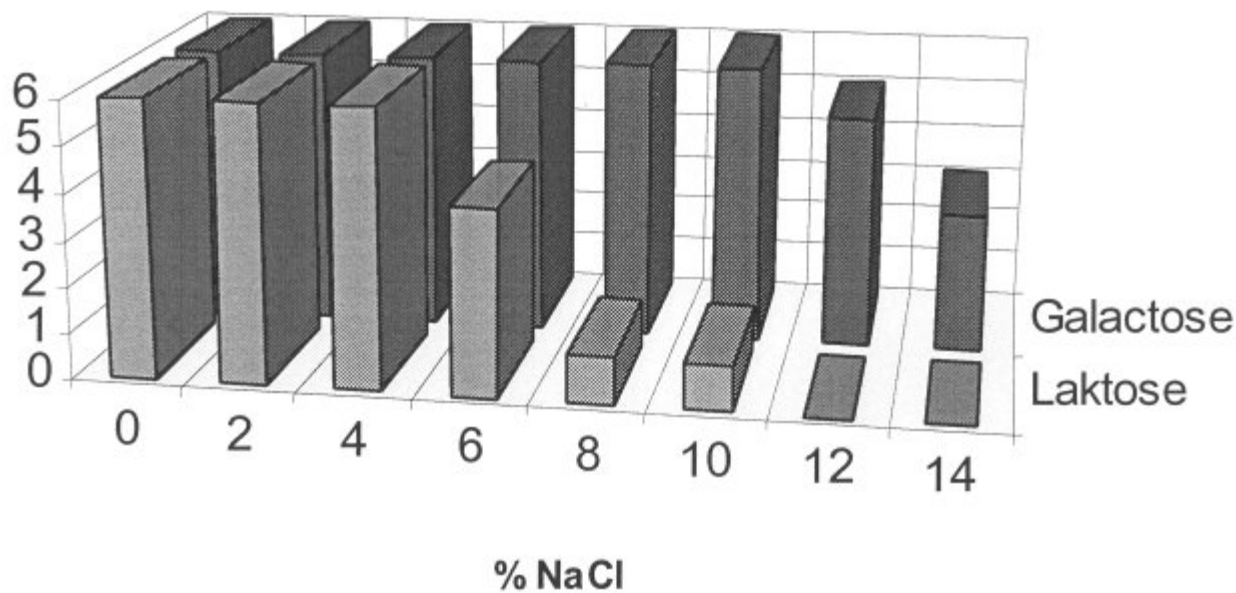
⁴ Laboratorium Visby, Tønder, Danmark

⁵ Alfred Jørgensen, Laboratory A/S, København, Danmark

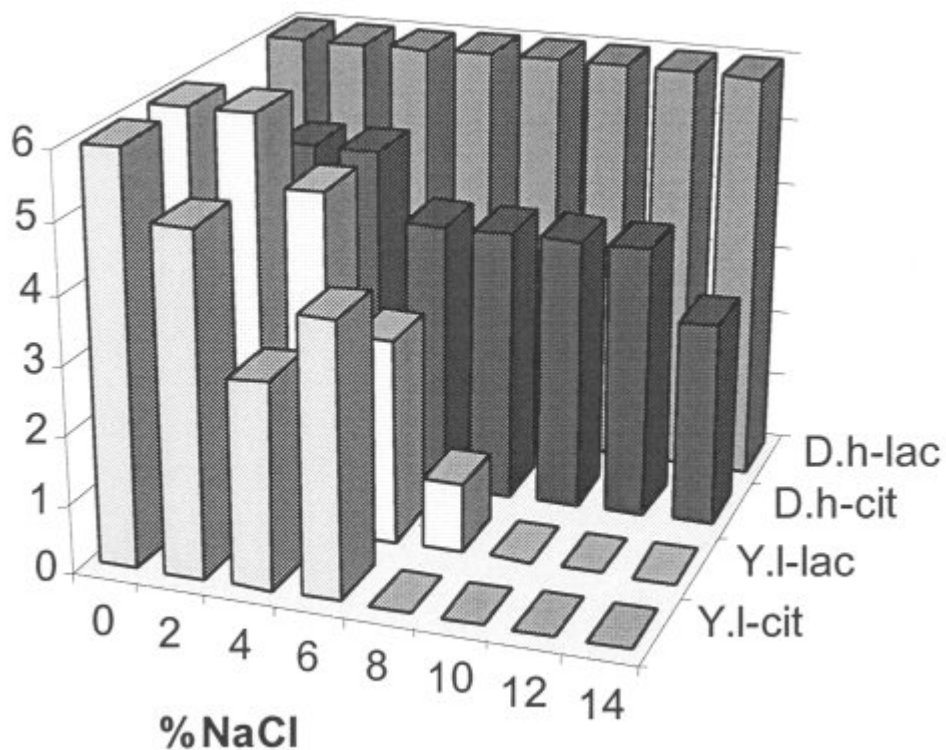
⁶ Centro Sperimentale Del Latte, Milan, Italy

Tabel 4. Relativ hæmning af dryppoddede isolater af overfladepoddede isolater på osteagar (pH 5.5 og 0% NaCl).

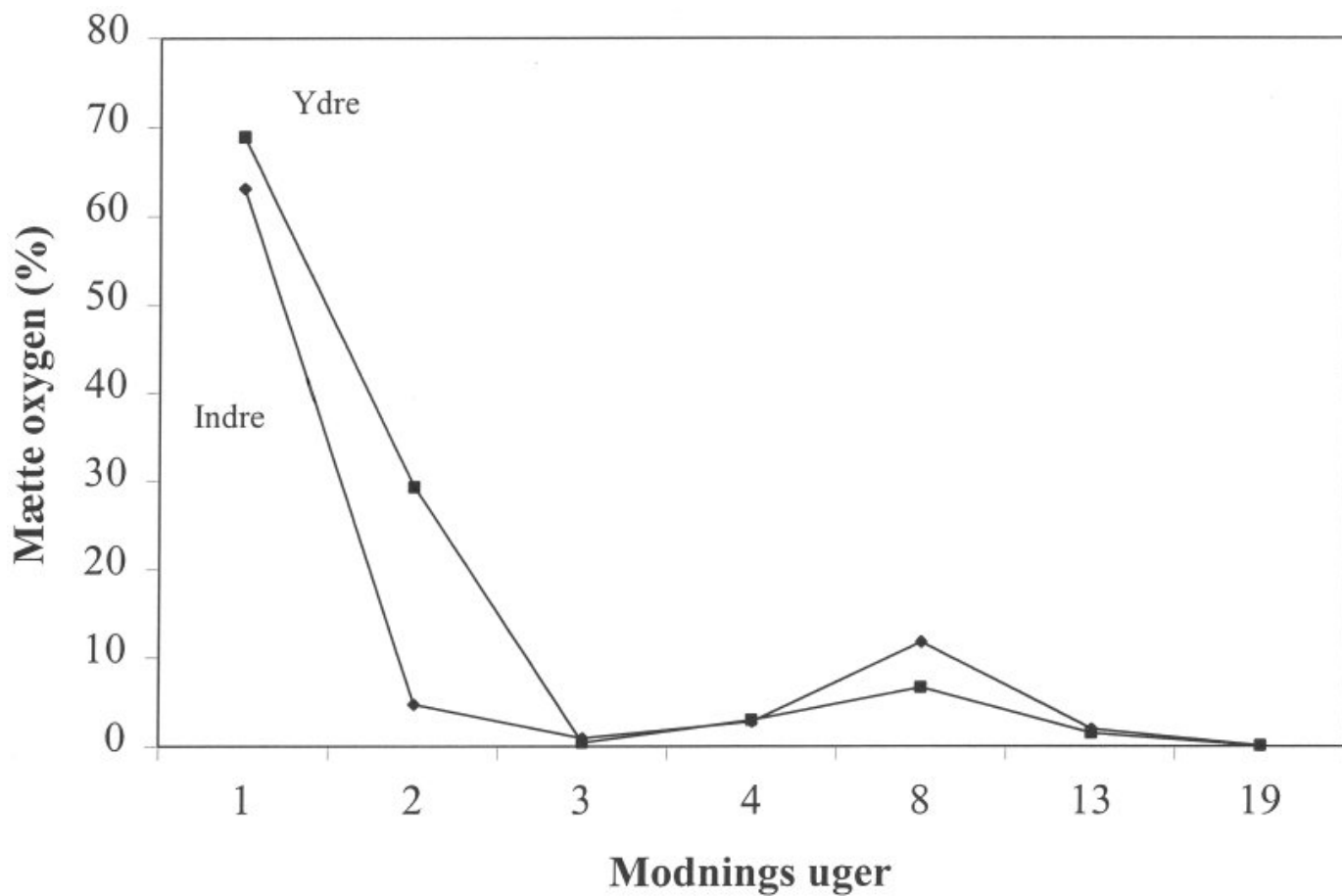
	Dryppodet				
	<i>P. roqueforti</i>	<i>G. candidum</i>	<i>P. caseifulvum</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>Y. lipolytica</i>
<i>P. roqueforti</i>	Ikke undersøgt	100	10 - 65	0	10 - 70
<i>G. candidum</i>	100	Ikke undersøgt	Ikke undersøgt	0 - 45	0
<i>P. caseifulvum</i>	40 - 100	Ikke undersøgt	Ikke undersøgt	100	100
<i>D. hansenii</i>	20 - 50	0	0	Ikke undersøgt	Ikke undersøgt
<i>Y. lipolytica</i>	20 - 45	0 - 10	0	Ikke undersøgt	Ikke undersøgt



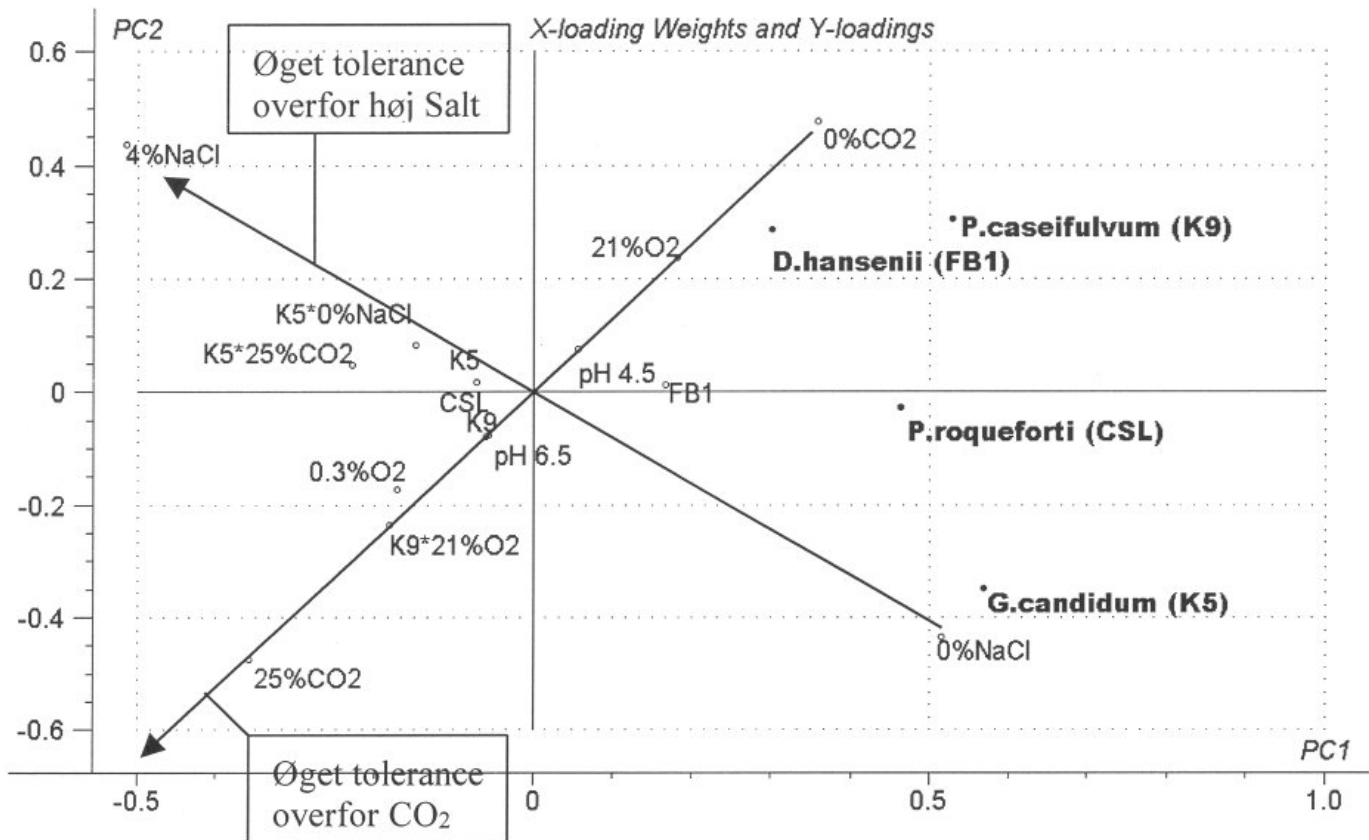
Figur 1a. Assimilering af laktose og galaktose ved forskellige koncentrationer af NaCl (w/v) for 6 isolater af *D. hansenii* ved 10°C og pH 5.5.



Figur 1b. Assimilering af laktat og citrat ved forskellige koncentrationer af NaCl (w/v) for 6 *D. hansenii* og 6 *Y. lipolytica* isolater ved 10°C og pH 5.5.



Figur 2. Oxygenmætning i ydre og indre del af Danablu målt under 19 ugers modning ved 10°C. Målingerne er et gennemsnit af flere målinger fra overfladen af osten ind til ostens centrum i måleintervaller af 5 mm.



Figur 3. PLS 2 loading plot som illustrerer forholdet mellem X = tilstedeværelse af NaCl (0% eller 4%), CO₂ (0% eller 25%), O₂ (0.3% eller 21%), pH (4.5 eller 6.5), *Penicillium roqueforti* (CSL), *P. caseifulvum* (K9), *Geotrichum candidum* (K5) og *Debaryomyces hansenii* (FB1). Y = kolonidiameter af *Penicillium roqueforti*, *P. caseifulvum*, *Geotrichum candidum* og *Debaryomyces hansenii* på osteagar efter 14 dages inkubation ved 10°C.

