

Syrningsproblemer i mejeriindustrien

Forsuringsproblemer under osteproduktionen kan føre til uønskede ændringer i tekstur og smag. Et bedre kontrolsystem vil være løsningen.

I tillæg til ændringer i tekstur og smag kan forsuringsproblemer også føre til forlængede produktionstider og varierende vandindhold. I værste fald kan disse syrningsproblemer være sundhedsskadelige. I dag påvises denne ændring ved en forsurings-test, men denne kan p.t. ikke anvendes til fremadrettet at forudsige, om et syrningsproblem vil opstå - eller hjælpe til med at forstå årsagen.

Dette projekt havde som mål at undersøge denne problemstilling mere detaljeret. For at gøre dette var det nødvendigt at undersøge syrningshæmning under laboratorieforhold, der efterligner en anvendelse af bulk-starterkultur med samme bulkkultur hver gang og forskellig mængde kontaminering med valle i ostekaret. Denne opsætning sørger for, at vi kan simulere den kontaminering, man kan forvente sig at se hos mejerierne. Formålet til projektet var at lave en matematisk prædiktionsmodel, der kunne forudsige, hvornår man ville se syrningsproblemer, inden de faktisk opstod.

Forsøgsopstilling

I laboratorieforsøgene har vi efterlignet en bulk-starterproduktion, som sekventielt kontamineres med valle fra den foregående ostetank (1 %, 0,1 %, 0,01 % og 0,001 %, svarende til 150 L, 15 L, 1,5 L, 150 mL mellem fyldnin-

ger i en 15.000 L ostetank). Mælken podes med 1 % starterkultur, og pH følges kontinuerligt. Syrningshæmningen opgøres som den tidsforskel, der er mellem kontrollen, uden kontaminering når pH 5,5, og til de kontaminerede prøver når pH 5,5. Denne ændring defineres som ΔT , se figur 1A. Forsøget gentages ved, at vallen fra første syrnin overføres til næste portion mælk, hvorefter ny bulk-starterkultur tilsættes, se figur 1B. Dette gentages fem gange.

Resultater fra syrningsforsøg

De to starterkulturer opfører sig meget forskelligt. Kultur P opfører sig, som vi forventede, at kulturen ville gøre, og den bliver mere og mere følsom - det vises ved, at ΔT stiger for hver gentagelse, se figur 1C. Starter kultur T opførte sig dog helt anderledes. Der er en syrningshæmning ved første dag, men i de efterfølgende gentagelser var kultur T i stand til at lukke fagfølsomhed fuldstændig ned (resultater ikke vist). Dette var ikke forventet.

Modellering af ICinac data

Syrningskurverne blev i første omgang kun anvendt til at undersøge, hvornår en pH på 5,5 var nået. Dette blev så anvendt til at beregne tidsforskellen (ΔT) på syrnin med kontrol ver-

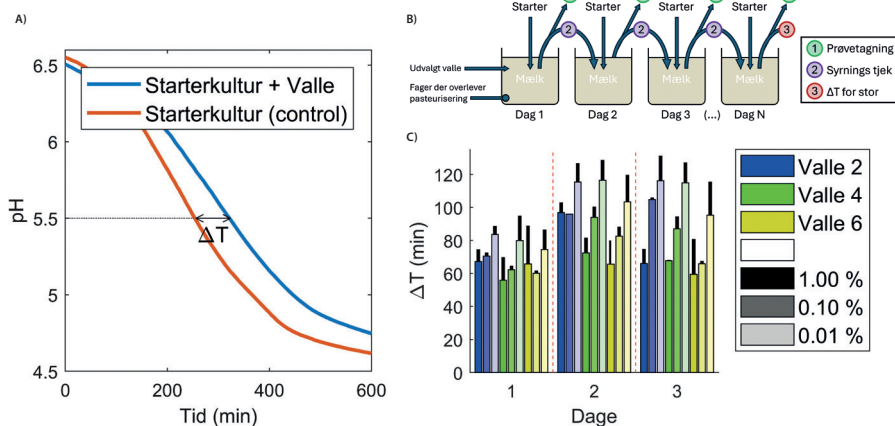


AF ÅSMUND RINNAN, LEKTOR, OG FINN K. VOGENSEN, LEKTOR, INSTITUT FOR FØDEVAREVIDENSKAB (KU-FOOD), KØBENHAVNS UNIVERSITET.

sus kontamineret prøve. Vi undersøgte også, hvordan man kan kigge nærmere på selve syrningskurven ved at beregne ændringen i pH per tidsenhed, og kunne på denne måde undersøge, hvornår pH-ændringen var på det største, altså hvornår prøven ændret sig hurtigst. På basis af disse ΔpH -kurver kunne vi adskille de forskellige dage af kontamination og de forskellige kontaminationsgrader fra hinanden ved hjælp af principal komponentanalyse (PCA, resultater ikke vist).

Isolering af 200 starterisolater fra starterkultur P og T

Baseret på de foreløbige data isolerede vi 200 isolater, dels 180 isolater fra LM17 og modificeret mælkeagar for *Lactococcus*, dels 20 isolater isoleret fra MRS med vancomycin,



Figur 1: Tidsforskel (ΔT) til syrningskurverne. A) ΔT , eller syrningshæmningen, er defineret som øgningen i tid til syrningskurven når en pH på 5,5. B) forsøgsopstillingen der viser at noget valle bliver overført mellem dagene om syrninngen er ok. C) Syrningshæmning (ΔT) for tre forskellige valler med starter kultur P målt over tre dage med kontamination som vist i B).

RESUMÉ

Vi har analyseret to starterkulturer - P og T - for syrningshæmning med kontinuerlig pH-måling ved hjælp af ICinac systemet. Starter P bliver mere og mere følsom, mens starter T lukker fagangrebet ned efter første runde. Vi har isoleret 200 isolater fra hver kultur, og de er nu genomsekventeret i MFF-projektet Casandra (Lukasz Krych). I kultur T fandt vi et hidtil ukendt resistenssystem, CBASS I, der i andre bakterier er vist at kunne lukke fagangreb ned. Vi har udviklet et mikrotiter-baseret screeningsassay til at følge individuel sensitivitet til syrningshæmning, og der er designet nye primersæt.

som er selektiv for *Leuconostoc*. Isolaterne blev oprenset tre gange og blev så nedfrosset ved -60 °C i mikrotiterplader og i individuelle fryserør.

Undersøgelse af enkeltisolaters følsomhed over for valleprøver

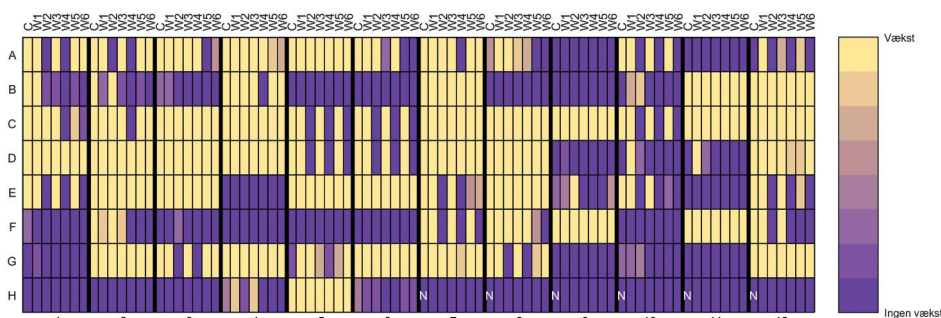
Ellikersbouillon tilsat indikatoren Bromcresolpurpur (BCP) blev brugt til at undersøge formodede *Lactococcus* isolater for syrningshæmning, mens MRS bouillon tilsat BCP blev brugt for formodede *Leuconostoc* isolater. Bouilloner blev overført til mikrotiterplader. Pladerne blev replikeret fra mikrotiterplader ved -60 °C og inkuberet natten over. De fremgroede mikrotiterkulturer blev derefter replikeret til nye mikrotiterplader med samme bouillon (kontrol), samt til mikrotiterplader med samme bouillon tilsat 1 % vallefiltrat (forsøg). Et eksempel på resultater fra starter P isolater isoleret på LM17 er vist i figur 2.

Genom sekventering af starterkultur isolater

I samarbejde med projektet Cassandra (ledet af Lukasz Krych) genomsekventerede vi alle 400 isolater. Fra starterkultur P fandt vi som forventet *L. lactis*, *L. cremoris*, *Le. mesenteroides* samt *Le. falkenbergense*. Fra starterkultur T isolerede vi *L. cremoris*, *L. laudensis* samt *Le. mesenteroides*. *L. laudensis* blev kun isoleret på LM17, men ikke fra modificeret mælkeagar. Alle *L. laudensis* isolater var proteinase negative. *L. laudensis* er tidligere isoleret fra rå komælk i Italien samt i den hollandske ur DL-kultur. Den er ikke tidligere isoleret fra traditionel dansk mesofil DL-starterkultur. Fra genomsekvenserne kunne vi se, at en del af *L. laudensis* isolaterne var bærere af profager. Vi var i stand til at inducere fem af disse og genomsekventere dem. Fire var næsten identiske og var karakteristisk med en cirka 300 nm lang "spike", der let gik tabt under oprensning. Den sidste lignede de sædvanlige inducerede profager af P35-gruppen.

Fagresistensmekanismer fundet ved hjælp af bioinformatik

Alle 400 genomsekvenser blev analyseret for at finde forskel mellem de to starterkulturer. I kultur P fandt vi, at mange stammer havde forskellige klassisk kendte R-M og abortive infektionssystemer og ofte flere systemer i samme isolat. Ud over dette fandt vi, at næ-



Figur 2: Syrehæmnings assay fra individuelle isolater fra starter kultur P behandlet med 1% v/v valle. Isolaterne blev dyrket i Ellikers medium med bromcresol violet som indikator for succesfuld syring. Hver kombination af bogstav (A-H) og tal (1-12) indikerer et enkelt isolat. De syv prøver er kontrol, samt seks forskellige valler (W1-W6). Negative kontroller med kun medium er markeret med et hvidt "N".

sten alle *L. cremoris* isolater fra kultur T indeholdt et ikke tidligere observeret resistenssystem, kaldet CBASS I. Os bekendt er det første gang dette resistenssystem er fundet i starterkulturer. I andre bakterier er det vist, at CBASS I systemet kan lukke fagininfektioner ned, om end mekanismen bag ikke er helt kendt. Vi formoder, det er CBASS I systemet i den dominerende population af *L. cremoris* i starterkultur T, der lukker fagininfektionen ned.

Sekvensering af nye bakteriofager

For at forøge vores database af faggenomer har vi dels fra litteraturen, men også fra egne faggenomsekventeringer, tilføjet cirka 150 nye faggenomer hovedsagelig fra *Skunavirus*, men også fra andre *Lactococcus* og *Leuconostoc* faggrupper.

Primerdesign

Primersæt blev identificeret for *Lactococcus* faggrupperne P087 og 949. Desuden er der konstrueret primersæt til henholdsvis *Le. mesenteroides*- og *Le. pseudomesenteroides*-faggrupperne. Der er derudover designet 19 primersæt til receptorbindingsproteingenet (RPN) i *Skunavirus* (936 faggruppen) relateret til værtsspecificitet samt syv primersæt til RPN for *Leuconostoc*-fagerne.

Hvad kan det bruges til?

Vi har skilt kulturen ad, og vi har genomsekventeret det hele. Vi har fundet ud af, at bakteriofag resistensmekanismer i T kulturen ikke er følsom over for en ophobning af kontaminerende valle. Ved at genomsekventere prøverne kunne vi forstå, hvad forskellen mellem kultur T og P skyldes. En qPCR på prøverne mellem hver enkelt kontaminering ville kunne have givet mulighed for automatisk estimering af syrningshæmning. På grund

af uheldige omstændigheder nåede vi dog ikke dette. I dag anvendes ΔpH, men det giver endnu bedre og mere robuste resultater, hvis man anvender deltatid.

Disse resultater kan anvendes som et første trin i at få en bedre og mere robust kontrol på syrningsproblematikken i osteproduktionen. For faktisk at have et kontrol- og monitoreringssystem, der direkte kan anvendes af mejerierne, er der dog behov for videre undersøgelser af processen (men dette projekt har givet en rigtig god basis). ●



PROJEKTINFO

Projekttitel: Forudsigelse af bakteriofagproblemer på ostemejerier (PhageWarn)

Projektleder: Åsmund Rinnan, lektor (01.10-2022 to 31.05.-2023):
aar@food.ku.dk

Finn K. Vogensen, lektor (1/6-2020 to 30/9-2022): fkv@food.ku.dk
Københavns Universitet, Institut for Fødevarevidenskab (KU-FOOD)

Projektdeltagere: Dennis S. Nielsen, professor, KU-FOOD, Søren K. Lillevang, Arla Foods, Louise Tjørnum Kanz, videnskabelig assistent, Gøksen Arik, Post.doc (finansieret af Tübitak), Dorentina Homulli (ERASMUS trainee), Finn K. Vogensen, lektor emeritus.

Projektperiode: juni 2020 - maj 2023

Hovedformål: Formålet var at lave en matematisk prædiktionsmodel, der kunne forudsige, hvornår man ville se syrningsproblemer i ostekar.

PROJEKTER UNDER MEJERIBRUGETS
FORSKNINGSFOND