

Afslutningsrapport

Lipolytisk og proteolytisk aktivitet samt forudsigelse af
modningsforløb ved fremstilling af Danablu

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-17

Juli 1998



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til MFF

for projektet

**Lipolytisk og proteolytisk aktivitet samt forudsigelse af
modningsforløb ved fremstilling af Danablu.**

Mette Dines Larsen

Mogens Jakobsen

Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet,
Levnedsmiddelmikrobiologi,
Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole,
Frederiksberg

”Lipolytisk og proteolytisk aktivitet samt forudsigelse af modningsforløb ved fremstilling af Danablu.”

Projektleder

Professor Mogens Jakobsen
KVL, Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet
Rolighedsvej 30
1958 Frederiksberg C

Medarbejdere

Mejeriingeniør, Ph.D.-studerende Mette Dines Larsen
Laborant Ömer Yilmaz

Resumé

Indledningsvis blev 30 industrielle stammer af *P. roqueforti* screenet for proteolytisk og lipolytisk aktivitet ved agar diffusion. På basis af disse resultater, som viste store forskelle mellem stammerne, blev 10 udvalgt til videre undersøgelser af effekten af relevante miljøfaktorer som salt, pH og temperatur på proteolytisk og lipolytisk aktivitet.

Nedbrydningen af kasein blev undersøgt ved kombinationer af pH, 5.5 og 6.0, og saltkoncentrationer på 0, 2, 4, 7 og 10 % (w/v) ved HPLC. Resultaterne viste, at der også var tale om kvalitative forskelle mellem stammerne, også mellem stammer med samme proteolytiske aktivitet bestemt ved agar diffusion. Størst nedbrydning for alle stammer blev set ved pH 5.5 og 0 % salt. Den proteolytiske aktivitet blev sammenlignet for pH 5.0, 5.5 og 6.0 overfor azokasein, og for alle stammer sås den største aktivitet ved pH 5.0, mens aktiviteten ved pH 6.0 var ca. 30 % lavere. En ny metode til bestemmelse af kaseinnedbrydning, kapillar elektroforese, blev afprøvet på fem stammer med forskellig proteolytisk aktivitet. Kvalitative forskelle i nedbrydningen af de enkelte kaseinfraktioner sås mellem tre kraftigt proteolytiske stammer: en stamme nedbrød fraktionerne lige hurtigt, en viste sig at nedbryde β A1-kasein mere end β A2-kasein, mens den sidste stamme nedbrød α_{s1} -kasein hurtigere end β -kasein. En stamme med medium proteolytisk aktivitet producerede et peptid med en migrationstid meget lig α_{s1} -I-kasein, der normalt dannes af chymosin, mens der for en stamme med lav proteolytisk aktivitet ikke kunne observeres nedbrydning af kaseinet gennem fem dages inkubation.

Den lipolytiske aktivitet blev undersøgt for ni stammer af *P. roqueforti*, som viste kvantitative forskelle ved agardiffusion på tributyrin agar, ved titrering af dannede frie fedtsyrer (FFA)

efter vækst i smørfedtemulsion, pH 5.5, 0 eller 7 % (w/w) salt. Generelt blev påvist de samme kvantitative forskelle. Der sås en kraftig stigning i mængden af dannede FFA fra dag 7 til dag 14, og et mere eller mindre kraftigt fald, afhængig af stamme, fra dag 14 til dag 20. Dette fald kunne skyldes en omdannelse af FFA til methylketoner. Efter 20 dage kunne stammerne deles i tre signifikant forskellige grupper mht. lipolytisk aktivitet.

Der blev påvist forskelle mellem stammer af *P. roqueforti* i produktion af aromakomponenter. Aromadannelse for to stammer blev undersøgt dels i modelsystemer, dels ved analyse af oste gennem modningen. 2-heptanon og 2-nonanon blev fundet i størst mængde, både i modelsystem og i ost. I begge systemer blev den største aromadannelse set lige inden sporulering af *P. roqueforti*. Der blev ikke observeret signifikante forskelle mellem to stammer i deres produktion af de to vigtigste aromakomponenter, 2-heptanon og 2-nonanon, men den ene stamme producerede generelt flere aromakomponenter.

Toogtres ud af 64 stammer, der blev undersøgt for produktion af sekundære metabolitter, producerede PR-toxin i varierende mængder. Stammerne kunne endvidere opdeles i to grupper efter om de dannede mycophenolsyre eller ej.

På grundlag af de opnåede resultater udarbejdes et katalog, som beskriver vigtige teknologiske egenskaber af industrielle stammer af *P. roqueforti*.

English Summary

Initially 30 industrial strains of *P. roqueforti* were screened for their proteolytic and lipolytic activity by agar diffusion. Based on these results, which showed large differences between the strains, ten strains were selected for further studies of the effect of relevant environmental conditions like NaCl, pH and temperature on proteolytic and lipolytic activity.

The degradation of casein was investigated by HPLC at combinations of pH, 5.5 and 6.0, and NaCl concentrations of 0, 2, 4, 7 and 10 % (w/v). The results showed that the differences between the strains were qualitative as well as quantitative also between strains designated the same proteolytic activity by the agar diffusion test. For all strains tested the most pronounced degradation was seen at pH 5.5, 0 % NaCl. The proteolytic activity against azocasein was compared at pH 5.0, 5.5 and 6.0 and for all strains the greatest activity was observed at pH 5.0 while the activity at pH 6.0 decreased approximately 30 %. A new method for determination of casein degradation, capillary electrophoresis, was tested on five strains

with different proteolytic activities. Qualitative differences were observed between three strongly proteolytic strains in their breakdown of the individual casein fractions: one strain broke down the fractions equally fast, another broke down β A1-casein faster than β A2-casein and the last strain preferred α_{s1} -casein to β -casein. A strain with medium proteolytic activity produced a peptide with a migration time similar to α_{s1} -I-casein a peptide normally produced by chymosin. For a strain with low proteolytic activity no degradation of the casein could be observed during five days of incubation.

The lipolytic activity was studied further for nine strains of *P. roqueforti* which showed quantitative differences by agar diffusion on tributyrin agar by titrating the free fatty acids (FFA) produced after growth in butterfat emulsions, pH 5.5, 0 or 7 % (w/v) NaCl. In general the same quantitative differences were seen. From day 7 to day 14 a large increase in the amount of FFA produced were observed followed by a more or less pronounced decrease from day 14 to day 20 depending on the strain. This decrease is assumed to be explained by the conversion of FFA to methyl ketones. After 20 days the strains could be divided into three significantly different groups regarding lipolytic activity.

Differences between strains of *P. roqueforti* in their production of aroma compounds were shown. Production of aroma compounds by two strains were investigated in a cheese based model system and by analysing dairy produced Danablu through the ripening period. The methyl ketones 2-heptanone and 2-nonanone were found in largest amounts both in model systems and in Danablu and for both systems the largest production of aroma compounds were observed just before sporulation of *P. roqueforti*. No significant differences could be observed between two strains in the production of the two most important aroma compounds, 2-heptanone and 2-nonanone, but one of the strains in general produced more aroma compounds than the other.

Sixtytwo out of 64 strains which were investigated for their production of secondary metabolites produced PR-toxin in varying amounts. The strains could be divided into two groups depending on if they produced mycophenolic acid or not.

On the basis of the achieved results a catalogue has been made describing important technological characteristics of industrial strains of *P. roqueforti*.

Formål

Det har været projektets formål at undersøge proteolytisk og lipolytisk aktivitet for et større antal stammer af *P. roqueforti*, under forhold der imiterer miljøet i Danablu, samt at undersøge effekten af relevante miljøfaktorer på produktion og aktivitet af de lipolytiske og proteolytiske enzymer.

Desuden i samarbejde med FØTEK-projektet ”Interaktioner mellem mesofile og termofile starterkulturer og *Penicillium roqueforti*” at karakterisere stammerne yderligere ved aromaprofiler og profiler af sekundære metabolitter.

Baggrund

Til trods for at blåskimmeloste, herunder Danablu, har en lang tradition bag sig i europæisk mejeribrug, har forskningen omkring den sekundære starterkultur, *P. roqueforti*, været meget begrænset. Procesforløbet i bl.a. Danablu er styret af et komplekst samspil af mange faktorer, men kendskabet til disse faktorer og deres virkningsmekanismer er mangelfuldt. Derfor hviler produktionen ofte på et erfaringsgrundlag fremfor eksakt viden, hvilket kan øge risikoen for ukontrollerede modningsforløb, varierende kvalitet og kvalitetsfejl. På grund af manglende karakterisering af stammerne er det også begrænset, hvor mange forskellige stammer der anvendes kommercielt.

Penicillium roqueforti spiller en afgørende rolle for modningen af Danablu på grund af dens produktion af lipaser og proteaser. Proteaser dannet af *P. roqueforti* influerer kraftigt på konsistensen, vandbindingsevnen og til dels på smagen og aromaen af den færdige ost, mens lipaserne har den overvejende betydning for dannelsen af den karakteristiske ”blue-aroma”, der domineres af metylketoner og de korresponderende sekundære alkoholer. Der er store forskelle mellem stammerne på den lipolytiske og proteolytiske aktivitet, hvilket udnyttes til produktion af oste med forskellige karakteristika.

Ifølge litteraturen danner *P. roqueforti* minimum fem proteaser, både ekstracellulært og intracellulært, der blandt andet varierer med hensyn til substrat-, temperatur- og pH-krav. Det proteolytiske system og mængdeforholdet mellem de enkelte proteaser varierer desuden stammerne imellem. Den vigtigste protease for kasein nedbrydning menes at være den ekstracellulære aspartylprotease, der med et pH-optimum på 5.5 er aktiv under en stor del af modningen af Danablu. Generelt anses de ekstracellulære enzymer for at have den største betydning for modningen, da de dannes af både mycelium og konidier og udskilles direkte i

osten, men dette er kun overfladisk undersøgt.

For *P. roqueforti* er påvist to lipaser ekstracellulært, en sur og en alkalisk, og måske to-tre lipaser intracellulært. Som med proteaserne kan der være forskel i lipasernes mængdeforhold stammerne imellem. Den extracellulære sure lipase anses for at være den vigtigste for lipolysen.

Udover den enzymatiske aktivitet fra *P. roqueforti* vil der være en effekt af den primære starterkultur, af løben og af overlevende enzymer fra ostemælken (primært plasmin og nativ mælkelipase) samt af tilstedeværende gær.

Sammenfattende må det konkluderes, at den eksisterende viden om *P. roqueforti*'s proteolytiske og lipolytiske aktivitet og effekten af relevante miljøfaktorer, ved projektets start ikke var tilstrækkelig til en teknologisk beskrivelse af de kulturer, som finder industriel anvendelse.

Resultater

Indledende undersøgelser af proteolytisk og lipolytisk aktivitet

Ialt 30 industrielle stammer af *P. roqueforti* blev indledningsvis screenet for kvantitative forskelle i proteolytisk og lipolytisk aktivitet ved agar diffusion på hhv. kasein agar (proteolytisk aktivitet), tributyrin agar (esterase aktivitet) og olivenolie agar (lipase aktivitet). Resultaterne er vist i Tabel 1. Der blev observeret store forskelle imellem stammerne for proteolytisk og lipolytisk aktivitet, mens esterase aktiviteten var mere ensartet. På baggrund af disse resultater blev et antal stammer valgt ud til mere detaljerede undersøgelser af indvirkningen af vigtige miljøfaktorer som salt og pH på enzymatisk aktivitet.

Proteolyse

Den proteolytiske aktivitet af *P. roqueforti* blev yderligere undersøgt mod azokasein (10 stammer), ved High Pressure Liquid Chromatography (HPLC, 10 stammer) og ved Capillary Electrophoresis (CE, 7 stammer). De indledningsvist påviste kvantitative forskelle blev bekræftet og desuden påvistes kvalitative forskelle mellem stammerne. Ved alle metoder blev stammerne rangordnet stort set ens. Små forskelle blev set i forhold til agar diffusion på kasein agar, hvilket formodentlig skyldes den manglende følsomhed af denne metode.

Ved undersøgelse af aktivitet overfor azokasein blev et opkoncentreret cellefrit ekstrakt, indeholdende ekstracellulære proteaser fra *P. roqueforti*, anvendt. Aktiviteten blev undersøgt ved pH 5.0, 5.5 og 6.0. Alle stammer udviste størst aktivitet ved pH 5.0, mens aktiviteten ved pH 6.0 var ca. 30 % mindre afhængig af den anvendte stamme. I Tabel 2 ses resultaterne for fem af de undersøgte stammer.

Til undersøgelse af kaseinnedbrydning ved HPLC og CE blev der anvendt et minimalmedie (Czapek Dox bouillon) tilsat 1 % bestrålet (10 Kgy) kasein nach Hammerstein. Til HPLC blev 10 repræsentative stammer udvalgt på baggrund af resultaterne fra agardiffusion på kasein agar. Der blev inkuberet ved 25 °C i rystevandbad, pH 5.5 eller 6.0, tilsat 0, 2, 4, 7 eller 10 % (w/v) salt. Prøver blev udtaget efter 3, 4 og 5 dages inkubation. HPLC-resultaterne viste kvalitative forskelle i nedbrydningen af kasein mellem stammer, der ved agar diffusion havde den samme proteolytiske aktivitet. Nedbrydningsprofiler for fire stammer med forskellig aktivitet ses i Figur 1. De meget forskellige nedbrydningsprofiler, der ses for de to kraftigt proteolytiske stammer, blev også set for de andre stærkt proteolytiske stammer.

Der var endvidere forskel på nedbrydningen afhængig af pH (Fig. 3), hvor der generelt sås en kraftigere nedbrydning ved pH 5.5, hvilket stemmer med resultaterne fra azokasein testen. Med hensyn til effekten af salt sås en langsommere nedbrydning jo mere salt der var tilsat mediet (Fig. 4). Ved 10 % salt tilsat kunne der ikke detekteres nedbrydning af kaseinet efter 5 dages inkubation. Det kunne ikke ud fra HPLC-profilerne afgøres, om der var kvalitative forskelle på kaseinnedbrydningen, hvis der var salt tilstede, men dette er ved at blive undersøgt i samarbejde med Torben Ellebæk Petersen (Laboratorium for Proteinkemi, Århus Universitet) ved sekventering af opsamlede peptider. Dette vil blive udført for to stammer med henholdsvis lav og høj proteolytisk aktivitet (roq 1 og roq 2).

Undersøgelserne på CE blev udført uden salt i mediet. En række indledende undersøgelser viste at der kunne opnås acceptable kromatogrammer ved op til 4 % salt, men mindre peptider var svære at se, så CE anvendtes kun til at se kvalitative forskelle mellem stammerne ved pH 5.5 og pH 6.0. I Figur 5 ses CE-profilerne ved pH 5.5 for fem stammer med forskellig proteolytisk aktivitet: lav (roq 1), mellem (roq 5) og høj (roq 2, CSL, PV). En identifikation af toppene er givet ved roq 1. Ved de tre kraftigt proteolytiske stammer kunne der ses kvalitative forskelle i nedbrydningen af α_{s1} -kasein og af de to genetiske varianter af β -kasein, A1 og A2. Roq 2 nedbrød kaseinfraktionerne med samme hastighed, mens PV så ud til at nedbryde $\beta A1$ -kasein mere end $\beta A2$ -kaseinet. CSL nedbrød α_{s1} -kasein hurtigere end β -kasein. Roq 5 nedbrød langsomt kaseinet gennem de fem dages inkubation tilkendegivet ved fremkomsten af en top med en migrationstid meget lig α_{s1} -I-kasein (Fig. 6). Dette peptid dannes normalt af chymosin som det første produkt ved nedbrydningen af α_{s1} -kasein. Denne top blev kun observeret for roq 5, hvilket kunne skyldes dens relativt langsomme nedbrydningshastighed. For roq 1 kunne der ikke ses nedbrydning af kaseinet gennem fem dages inkubation. De kvalitative forskelle ved pH 5.5 blev også observeret ved pH 6.0, men ikke så tydeligt. Som for HPLC blev den største proteolytiske aktivitet målt ved CE også set ved pH 5.5.

Lipolytisk aktivitet samt aromadannelse

For stammer udvalgt efter den indledende kvantitative undersøgelse af lipolytisk aktivitet, blev effekten af pH og salt undersøgt både ved agar diffusion på tributyrin agar og olivenolie agar (to stammer) og ved titrering af frie fedtsyrer (FFA) fra smørfedtemulsioner (ni stammer). To stammer af *P. roqueforti*, en kraftig og en svag lipolytisk stamme, blev opformeret på osteagar i tre døgn ved 25 °C og derefter overført som plugs til hhv. tributyrin-

og olivenolieagar indstillet til følgende kombinationer af pH og salt: pH 4.5, 5.0, 6.0 eller 7.0; 0, 2, 4 eller 6 % (w/w) salt. Disse blev inkuberet ved 10 °C og 30 °C i op til 12 døgn og opløring eller farvning aflæst med passende interval. På tributyrin ved pH 4.5 og 5.0 sås en tendens til stimulering af esteraseaktiviteten ved 2 % salt for begge stammer, uafhængig af temperaturen. Ved pH 6.0 og 7.0 sås denne tendens ved enten 2 eller 4 % salt. Begge stammer var mest aktive overfor tributyrin. Overfor olivenolie udviste den svagt lipolytiske stamme meget lav aktivitet, specielt ved 30 °C. Denne stamme blev også hæmmet mere af salt end den kraftigt lipolytiske stamme. Den kraftigt lipolytiske stamme viste ikke forskel i esteraseaktivitet, hverken mht. temperatur eller pH.

Ni stammer af *P. roqueforti* blev inkuberet ved 25 °C i en smørfedtemulsion (20 % v/v), pH 5.5, med 0 % eller 7 % (w/w) salt tilsat. Prøver blev udtaget efter 7, 14 og 20 døgn inkubation. I Tabel 3 ses dels forskelle mellem stammerne i lipolytisk aktivitet, dels forskelle i deres salttolerance. Ved 0 % salt tilsat ses for alle stammer en kraftig stigning i mængden af FFA fra dag 7 til dag 14. Fra dag 14 til dag 20 ses overordnet to forskellige mønstre: mængden af FFA fortsætter med at stige, men langsommere end i den første uge eller mængden af dannede FFA stagnerer. Ved 7 % salt i emulsionen ses generelt højere koncentration af FFA. Stammerne voksede langsommere ved 7 % salt end ved 0 %. Faldet i mængden af dannede FFA fra dag 14 til dag 20 var ikke korreleret til væksten af stammerne, med formodes at være forklaret ved en omdannelse af FFA til metylketoner. Den høje koncentration af FFA ved 7 % salt kan skyldes at den langsommere vækst giver et forsinket billede af omdannelsen fra FFA til metylketoner, eller at der sker en inhibering af denne, således at FFA ophobes. En sådan ophobning af FFA ved 4-6 % salt i mediet er tidligere beskrevet i litteraturen.

De ni stammer kunne efter 20 dages inkubation opdeles i tre signifikant forskellige grupper med hensyn til lipolytisk aktivitet:

- lav aktivitet: roq 1 og PA
- mellem aktivitet: roq 2, PV, CSL, roq 5 og roq 15
- høj aktivitet: roq 18 og roq 19

Aromadannelsen er indledningsvis undersøgt for syv stammer, og senere for to stammer under forskellige miljøfaktorer. Aromadannelsen i Danablu er endvidere fulgt gennem modningen. De indledende aromaundersøgelser (Tabel 4) viste forskelle mellem stammerne i produktionen af de karakteristiske aromakomponenter 2-heptanon, 2-nonanon, 2-pentanon, 2-pentanol, 2-hexanon og 2-octanon. Alle stammer producerede mest 2-heptanon og 2-nonanon, der også regnes for at være de vigtigste komponenter i aromaen fra blåskimmeloste. To udvalgte stammer blev undersøgt for aromadannelse i ostedsubstrat ved pH 5.0 og 5.5 og med 0, 2, 4 eller 6 % (w/w) salt tilsat. Sideløbende blev kommercielle oste produceret med den ene stamme analyseret gennem fem ugers modning for de samme aromakomponenter. Undersøgelserne blev lavet ved dynamisk headspace. Begge stammer producerede mest 2-heptanon og 2-nonanon, og disse stoffer var også dominerende i osten i alle fem uger. Der var ingen signifikant forskel på stammernes produktion af disse stoffer. Generelt dannede den stamme, der blev anvendt i driftforsøget flere af de undersøgte aromakomponenter end den anden stamme. Både i osten og i laboratorieforsøget blev den største aromadannelse målt lige før begyndende sporulering af *P. roqueforti* kunne observeres. På osteagaren svarede det til 2 dages inkubation ved 25 °C og i osten til ca. 2 ugers modning ved 10 °C. Dette passer godt med at den kommercielt anvendte stamme producerede flest forskellige aromakomponenter ved 6 % salt i osteagaren, hvilket svarer til en a_w på 0.96, der er optimum for sporulering for *P. roqueforti*.

Sekundære metabolitter

64 stammer blev analyseret for produktion af sekundære metabolitter på CYA (Czapek yeast extract agar) og YES (Yeast extract sucrose agar). Alle stammer på nær to dannede PR-toxin, men i varierende mængder. Stammerne kunne opdeles i to grupper efter om de dannede mycophenolsyre eller ej: 28 stammer dannede det, 36 gjorde ikke. Øvrige metabolitter der blev detekteret var: roquefortin C, roquefortin C derivater, mycophenolsyre derivater, PR-toxin derivater, isofumigaclavin A, metabolit A, RAI og CAN. De tre sidstnævntes struktur er ikke bestemt. En yderligere differentiering mellem stammerne på basis af deres metabolitprofiler er under udarbejdelse i samarbejde med Jens Christian Frisvad, DTU.

Forudsigelse af modningsforløb

I kraft af et nyt og større kendskab til den proteolytiske og lipolytiske aktivitet af industrielle stammer af *Penicillium roqueforti*, samt ny viden om relevante miljøfaktorerens betydning for den enzymatiske aktivitet, vil det være nemmere at forudsige og dermed regulere modningsforløbet i Danablu. Denne viden, kombineret med resultaterne fra FØTEK-projektet ”Interaktioner mellem termofile og mesofile starterkulturer og *Penicillium roqueforti*”, vil blive inkluderet i det planlagte katalog, som derved kan blive et vigtigt redskab for mejeriindustrien i en fremtidig udvælgelse af kulturer.

Modellering af modningsforløbet i Danablu viste sig at være vanskeligere end forudset, men vil blive forsøgt, når resultaterne fra et driftforsøg, gennemført i samarbejde med FØTEK-projektet ”Interaktioner mellem termofile og mesofile starterkulturer og *Penicillium roqueforti*” er færdig behandlede. Resultatbehandlingen er forsinket p.g.a. barselsorlov.

Konklusion

Projektet har bekræftet at der er store forskelle i lipolytisk og proteolytisk aktivitet blandt stammer af *P. roqueforti*, og at den enzymatiske aktivitet varierer afhængig af forskellige miljøfaktorer som pH, salt og temperatur.

Med hensyn til nedbrydningen af kasein har projektet vist, at der både er kvantitative og kvalitative forskelle mellem stammer af *P. roqueforti*. De kvalitative forskelle sås ved HPLC og specielt tydeligt ved CE, hvor tre kraftigt proteolytiske stammer udviste forskellig præference for de enkelte kaseinkomponenter. Dette kunne have en effekt på vandbindingsevne og smag i den færdige ost. Desuden er det vist, at en af de undersøgte stammer af *P. roqueforti* kan nedbryde α_{s1} -kasein til et peptid, der i migrationstid ligner α_{s1} -I kasein, der normalt dannes af chymosin. CE er en meget lovende metode til påvisning af forskelle i kasein nedbrydning og et godt supplement til de eksisterende HPLC-analyser.

Den lipolytiske aktivitet af *P. roqueforti*, bestemt ved titrering af FFA, var signifikant forskellig for ni stammer. Desuden sås forskelle i mængden af producerede FFA gennem 20 dages inkubation, der kunne forklares med omdannelse til methylketoner. En generelt fremmede effekt på dannelsen af FFA ved 7 % salt blev observeret, der måske skyldtes en ophobning af FFA.

Forskelle mellem stammerne mht. produktion af karakteristiske aromakomponenter blev også observeret. Disse forskelle i lipolytisk aktivitet og aromaproduktion vil have en kraftig effekt på aromaen og smagen af den færdige ost, og ved en yderligere karakterisering af hvilke FFA og aromakomponenter, der dannes, vil der være basis for yderligere optimering af produktionen.

Der er endnu ikke opbygget matematiske modeller til forudsigelse af modningsforløbet i Danablu, da resultaterne fra driftforsøget ikke er færdigbehandlede endnu.

Den nye viden, der er opnået i projektet, vil blive beskrevet i et katalog indeholdende oplysninger om proteolytisk og lipolytisk aktivitet, aromadannelse, effekt af miljøfaktorer på disse, produktion af sekundære metabolitter, vækst ved forskellige pH, a_w , salt og temperaturer samt beskrivelser af stammerne. Dette vil kunne give en øget mulighed for kvalitetsoptimering af produktionen, da der er en bedre baggrund for valg af kulturer. Desuden vil oplysningerne kunne danne basis for en mere ensartet kvalitet ved forudsigelse af de enkeltes stammers bidrag til modningen.

Publikationer:

- Kronborg Hansen, T., Dines Larsen, M. & Jakobsen, M. (1996). Anvendelsen af *Penicillium roqueforti* og *Penicillium camemberti* ved ostefremstilling. Forelæsningsnoter til faget ”Fermenterede Levnedsmidler”.
- Dines Larsen, M., Kronborg Hansen, T. & Jakobsen, M. (1997). Danablu – verdens bedste ost. Kan den gøres bedre? Mælkeritidende, 19, 499-501.
- Dines Larsen, M. & Rotvig Kristiansen, K. (1998) Proteolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti* for production of Danablu. Submitted to *International Journal of Food Microbiology*.

Posters ved kongresser og konferencer:

- Larsen, M. D. & Jakobsen, M. Forudsigelse af modningsforløb ved fremstilling af Danablu. **Poster** præsenteret ved Mejeriforskningsdag 1995 (KVL).
- Larsen, M. D. & Jakobsen, M. Lipolytisk og proteolytisk aktivitet samt forudsigelse af modningsforløb ved fremstilling af Danablu. **Poster** præsenteret ved Levnedsmiddelkongres 1996 (DTU).
- Larsen, M. D. & Jakobsen, M. Technological, important characteristics of selected strains

of *Penicillium roqueforti* used for production of Danablu. **Poster** præsenteret ved IDF Symposium: Ripening and Quality of Cheeses. Besançon 26.-28. februar 1996.

- Larsen, M. D. & Jakobsen, M. Characterization of *Penicillium roqueforti* by proteolytic activity and aroma formation. **Poster** præsenteret ved Danish Biotechnology Conference, Food Biotechnology, Vejle, Munkebjerg 23.-24. maj 1996.
- Larsen, M. D. & Jakobsen, M. The use of Capillary Electrophoresis for characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti*. **Poster** præsenteret ved Food Micro '96. Technology, safety, stability. Budapest 26.-30. august 1996.
- Larsen, M. D. & Jakobsen, M. Brug af kapillarelektroforese til karakterisering af den proteolytiske aktivitet af starterkulturer af *Penicillium roqueforti*. **Poster** præsenteret ved Levnedsmiddelkongres 1997 (KVL).
- Hansen, T. K., Larsen, M. D. & Jakobsen, M. Teknologiske egenskaber af *Penicillium roqueforti* stammer anvendt til produktion af Danablu. **Poster** præsenteret ved Mejeriforskningsdag 1997 (Århus Universitet) og ved Levnedsmiddelkongres 1998 (DTU).
- Larsen, M. D., Hansen, T. K. & Jakobsen, M. Nedbrydning af kasein i Danablu. **Poster** præsenteret ved Mejeriforskningsdag 1997 (Århus Universitet) og ved Levnedsmiddelkongres 1998 (DTU).

Deltagelse i andre kongresser/konferencer:

- IDF Symposium: Yeasts in the dairy industry – positive and negative aspects. København 2.-3. september 1996.
- 18th ISSY. Yeast nutrition and natural habitats. Bled, Slovenien, 24.-29. august 1997.

Point-, bachelor- og specialeopgaver udført under projektet:

- Mette S. Pedersen & Peter Møller (1995). Karakterisering af *Penicillium camemberti*'s proteolytiske og lipolytiske enzymer. Pointopgave (KVL).
- Mette S. Pedersen & Peter Møller (1995). *Penicillium camemberti*. Miljøfaktorerens betydning for vækst og dannelsen af proteolytiske og lipolytiske enzymer. Specialeopgave (KVL).
- Anders V. Nielsen (1996). *Penicillium roqueforti*. Forskellige miljøfaktorerens betydning for aktiviteten af lipolytiske enzymer. Pointopgave (KVL).

- Anders V. Nielsen (1996). *Penicillium roqueforti*. Udvikling af en “dynamisk head-space analyse-metode” til gaschromatografisk identifikation af aromakomponenter i blåskimmelost. Specialeopgave (KVL).
- Karina Jensen (1997). Lipolytisk aktivitet af stammer af *Penicillium roqueforti*. Bacheloropgave (KVL).
- Käthe M. Rasmussen (1997). Interaktioner mellem stammer af *Penicillium* og bestemmelse af fysisk/kemiske parametre til blotlæggelse af af den mikrobiologiske udvikling i blå/hvidskimmeloste. Bacheloropgave (KVL).
- Tanja Gaardlykke Ettrup (1998). Effekt af interaktioner mellem stammer af *Penicillium roqueforti* og mælkesyrebakterier på lipolytisk aktivitet af *Penicillium roqueforti*. Specialeopgave (DTU).

Ph. D. afhandling:

Under udarbejdelse. Forventes afsluttet efterår 1998.

Frederiksberg den 6. juli, 1998.

Mette Dines Larsen

Mogens Jakobsen

Table 1: Proteolytic and lipolytic activity of 30 strains of *P. roqueforti* measured by agar diffusion test on casein agar, tributyrin agar (esterase activity) and olive oil agar (lipase activity) after five days incubation at 25 °C. Results for proteolytic and esterase activity are expressed as mm clarification zone, while lipase activity is given by plussystem (+ activity, (+) weak activity, - no activity). Strains are ranked according to increasing proteolytic activity. Mean and standard deviation are given for triplicate determinations, with repetition. (Larsen et al., 1998)

Stamme af <i>P. roqueforti</i>	Oprindelse af stammen	Proteolytisk aktivitet	Esterase aktivitet	Lipase aktivitet
roq 1	AJL ¹	0*	10.0 ± 0	-
roq 11	AJL	0*	9.8 ± 0.2	-
roq 14	AJL	0*	11.3 ± 0.5	-
roq 34	Visby ²	0*	9.5 ± 0	-
PJ	Visby	0*	9.0 ± 0	-
roq 4	AJL	6.3 ± 0.5	7.0 ± 0	(+)
roq 5	AJL	6.7 ± 0.5	11.0 ± 0	+
roq 31	Visby	7.3 ± 0.5	11.0 ± 0	+
roq 32	Visby	8.0 ± 0	7.0 ± 0	(+)
PA	Visby	8.0 ± 0	6.0 ± 0	(+)
fr 7	Blåskimmelost (F)	8.0 ± 0	9.7 ± 0.2	+
roq 33	Visby	9.0 ± 0	11.5 ± 0.4	+
roq 19	AJL	9.0 ± 0	9.2 ± 0.2	+
roq 8	AJL	9.3 ± 0.5	10.3 ± 0.5	+
fr 6	Blåskimmelost (F)	9.3 ± 0.9	12.0 ± 0.4	+
Mauri	Mauri ³	9.3 ± 0.9	5.0 ± 0	-
fr 2	Blåskimmelost (F)	10.0 ± 0	12.2 ± 0.2	+
roq 35	Visby	10.0 ± 0	10.8 ± 0.2	+
roq 36	Visby	10.0 ± 0	12.0 ± 0.8	+
roq 37	Visby	10.0 ± 0.8	12.2 ± 0.5	+
roq 2	AJL	10.0 ± 0.8	6.5 ± 0.5	+
PV	Visby	10.3 ± 0.5	10.3 ± 0.5	+
CSL	CSL ⁴	10.7 ± 0.5	12.0 ± 0	+
fr 1	Blåskimmelost (F)	11.2 ± 0.2	8.0 ± 0	-
roq 18	AJL	11.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2	+
fr 3	Blåskimmelost (F)	11.5 ± 0.4	12.0 ± 0	+
roq 15	AJL	11.7 ± 0.2	12.7 ± 0.2	+
fr 4	Blåskimmelost (F)	11.7 ± 0.5	10.0 ± 0	+
fr 5	Blåskimmelost (F)	11.7 ± 0.5	10.7 ± 0.5	+
roq 38	Visby	13.7 ± 0.5	13.8 ± 0.2	+

* Forlænget inkubation vil vise en opklaring af kaseinet, dvs. en svag proteolytisk aktivitet.

¹ Alfred Jørgensen Laboratorium A/S, København, Danmark

² Laboratorium Visby, Tønder, Danmark

³ Mauri Laboratories, Dorset, England

⁴ Centro Sperimentale Del Latte, Milano, Italien

Tabel 2: Proteolytisk aktivitet af 5 stammer af *P. roqueforti* målt mod azokasein ved pH 5.0, 5.5 og 6.0. En enhed af proteolytisk aktivitet (PAu) er defineret som en 0.01 stigning i absorbans efter en times inkubation under de givne assay betingelser og udtrykt som PAu/mL CFE (culture free extract) koncentrat. Middelværdi og standardafvigelse er opgivet for tredobbeltbestemmelser.

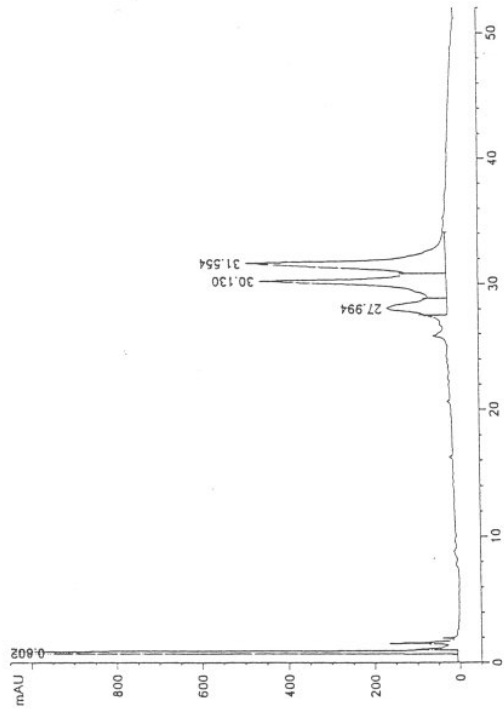
Stamme af <i>P. roqueforti</i>	pH 5.0 PAu/mL CFE koncentrat	pH 5.5 PAu/mL CFE konc.	pH 6.0 PAu/mL CFE koncentrat
roq 1	174.6 ± 83.6	192.1 ± 53.1	70.1 ± 8.1
roq 5	477.8 ± 37.0	421.4 ± 23.1	180.3 ± 35.1
roq 2	1394.7 ± 79.0	1130.3 ± 61.8	609.3 ± 60.9
PV	1028.9 ± 98.6	814.7 ± 80.0	409.4 ± 90.6
CSL	828.9 ± 39.0	644.3 ± 95.7	293.3 ± 51.3

Tabel 3: Mængden af dannede frie fedtsyrer (µmol FFA/100 g fedt) gennem 20 dages inkubation ved 25°C af ni stammer af *P. roqueforti* i smørfedt emulsion, pH 5.5, med 0 % eller 7 % NaCl. Resultaterne er et gennemsnit af to titreringer, kontrol fratrukket.

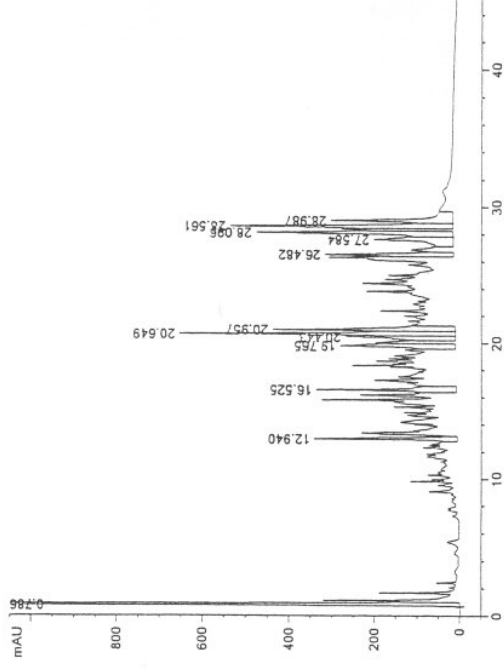
ink. tid (dage)	0 % NaCl (w/v)			7 % NaCl (w/v)		
	7	14	20	7	14	20
roq 1	156.61	329.08	338.78	169.28	566.33	616.32
roq 2	325.41	832.65	1004.34	394.79	1085.72	1107.14
PA	146.32	582.14	824.49	51.43	487.24	807.14
PV	368.78	1004.08	1041.33	429.49	930.61	1206.12
CSL	209.59	692.86	1059.69	193.77	851.02	1162.50
roq 5	256.02	1053.06	1304.85	308.06	767.35	798.72
roq 15	394.79	1175.51	1170.41	238.67	995.92	1202.04
roq 19	351.94	1077.55	1194.13	454.75	1224.49	1312.75
roq 18	308.06	946.94	1652.81	368.78	1322.45	1328.57

Tabel 4: Produktion af aromakomponenter for tre stammer af *P. roqueforti*. Resultaterne angiver arealet af aromakomponenten divideret med arealet af den interne standard. De vigtige methylketoner er markeret.

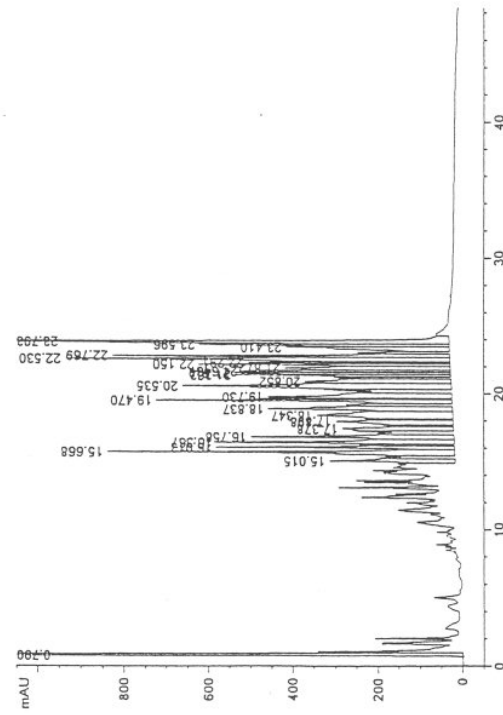
	roq 1	roq 8	CSL
n-butanal	0.31	0.31	0.37
2-pentanon	0.38	0.17	8.54
n-pentanol	4.45	11.47	15.91
n-pentanal	11.3	5.32	5.97
2-hexanon	0.71	0.5	3.39
1-hexanal	1.38	0.59	0.88
2-heptanon	59.97	52.92	47.07
2-octanon	32.59	12.78	5.43
2-nonanon	112.94	96.11	27.36
1-octanal	0.63	0.47	0.17



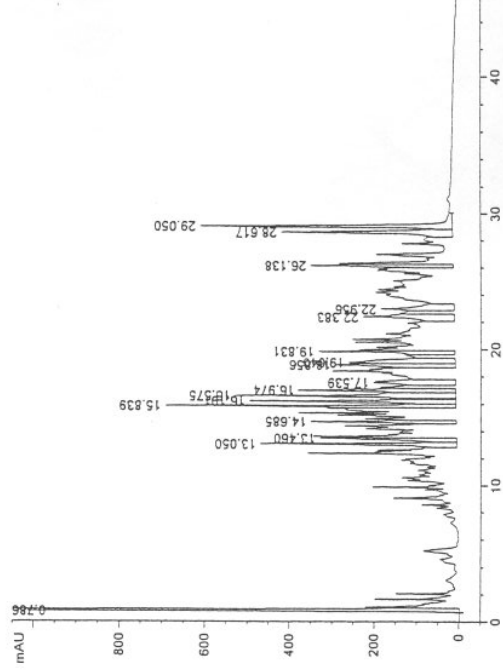
roq 14, 5 døgn ved 25 °C.



PA, 5 døgn ved 25 °C.

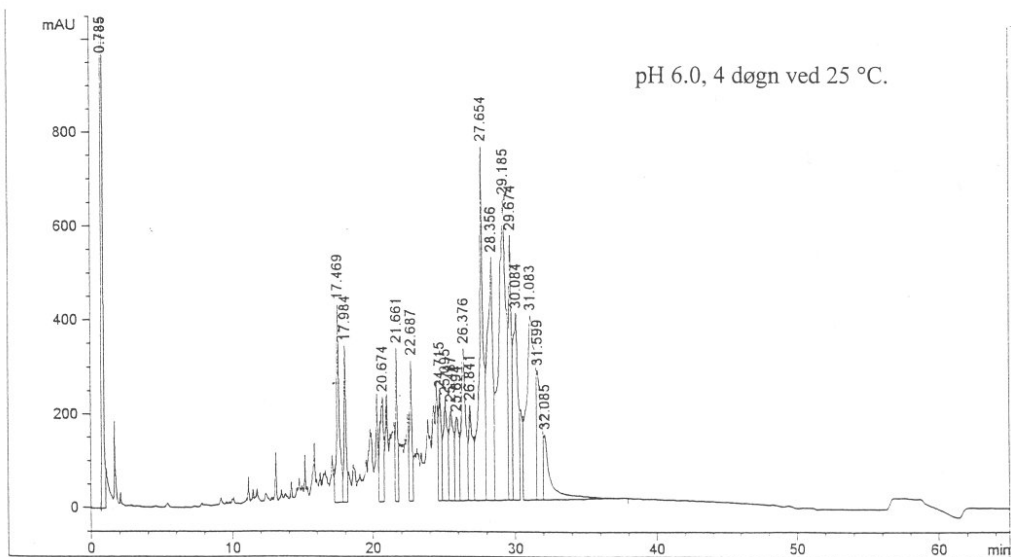
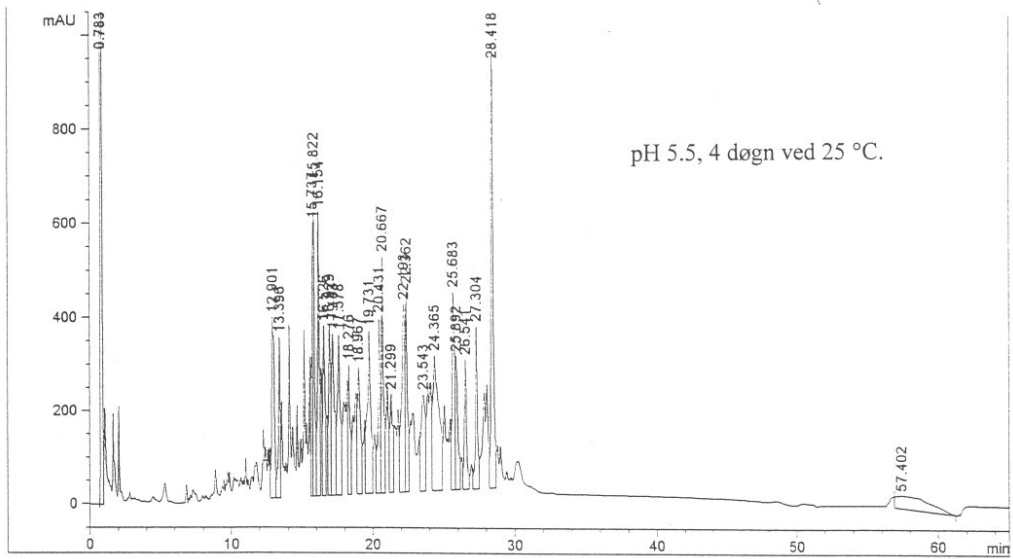


roq 18, 5 døgn ved 25 °C.

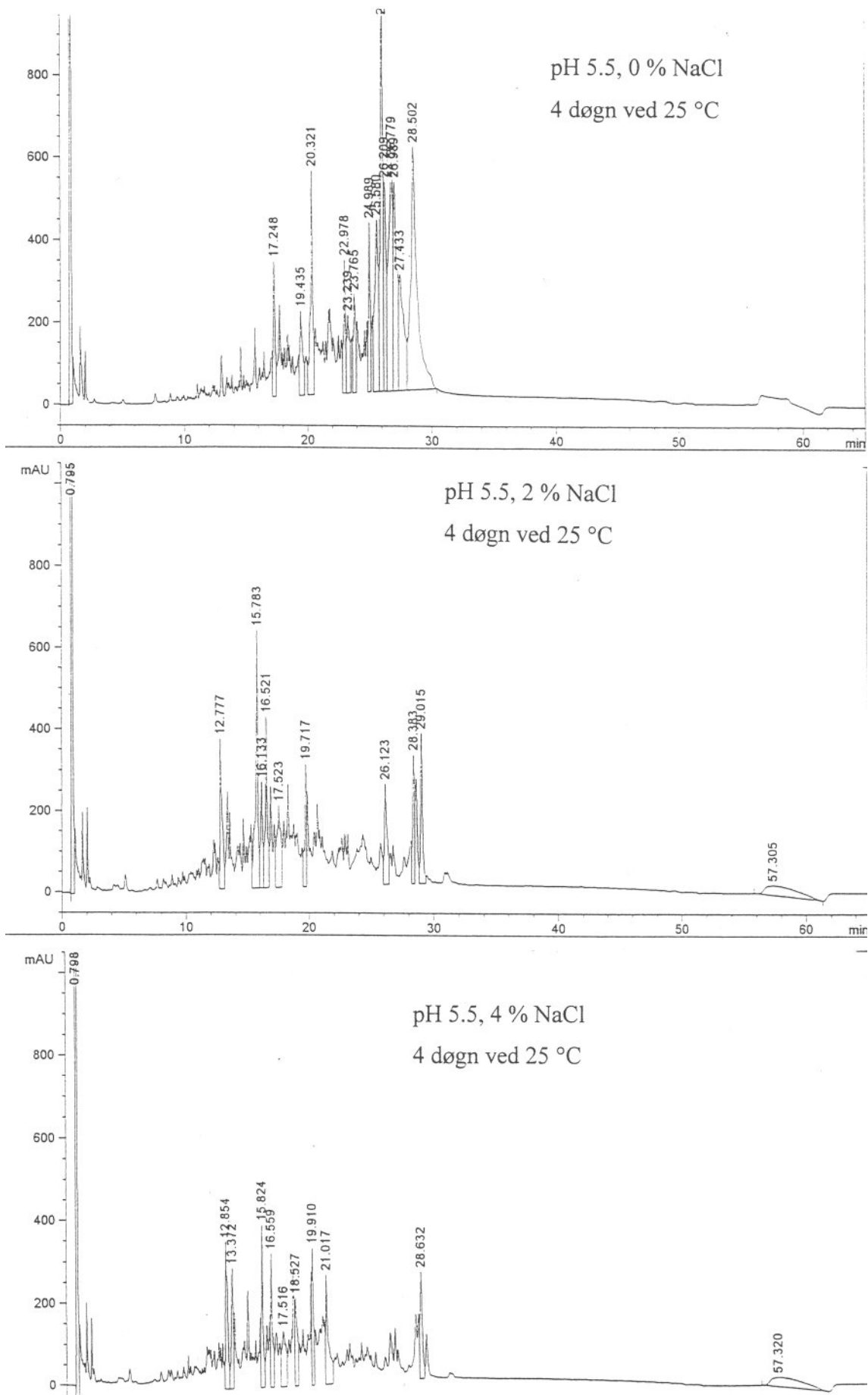


CSL, 5 døgn ved 25 °C.

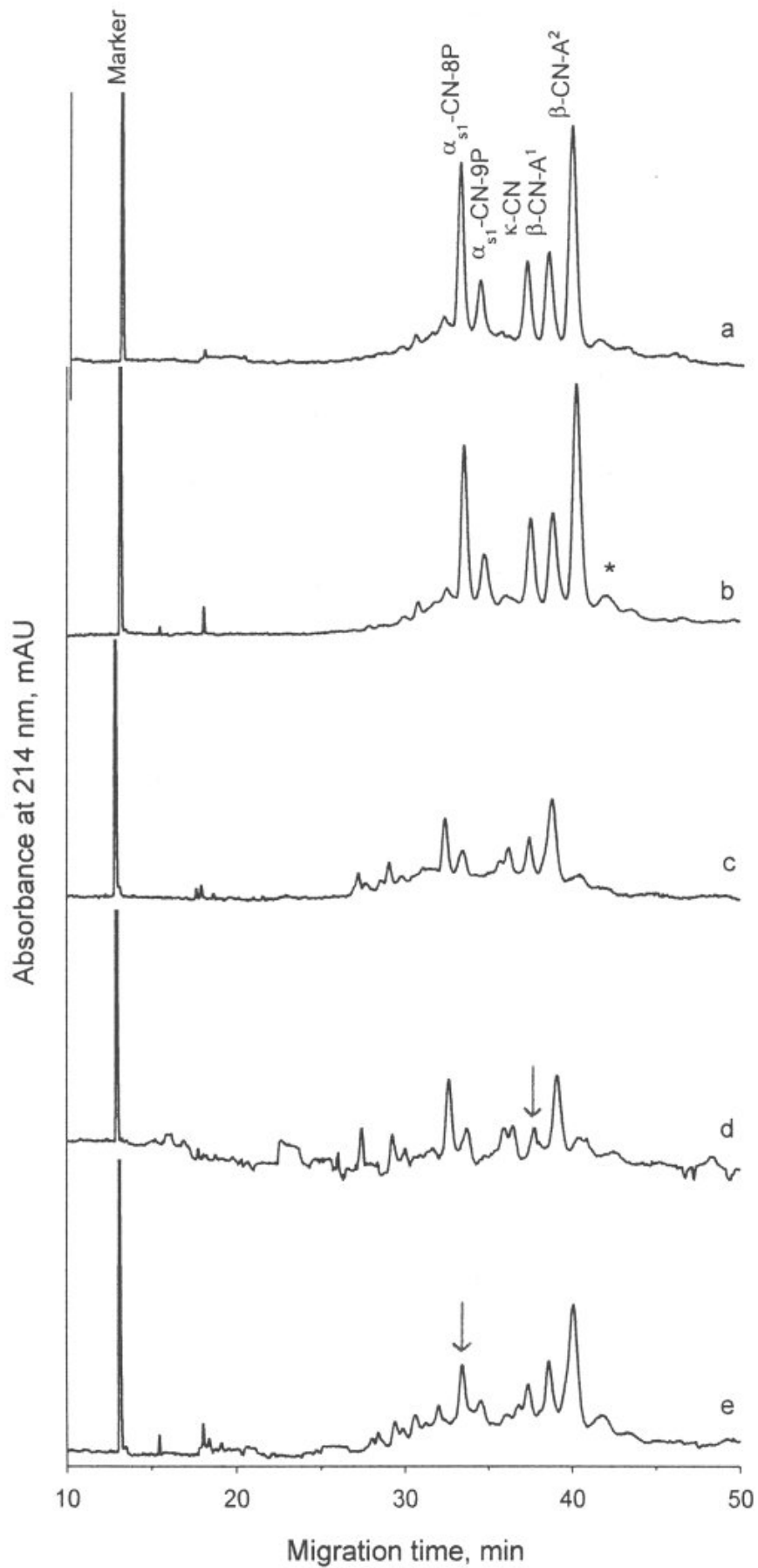
Figur 1: Forskelle i kaseinnedbrydning for fire stammer af *P. roqueforti*, bestemt ved HPLC. Profilen for roq 14 svarer til kasein, der ikke er nedbrudt.



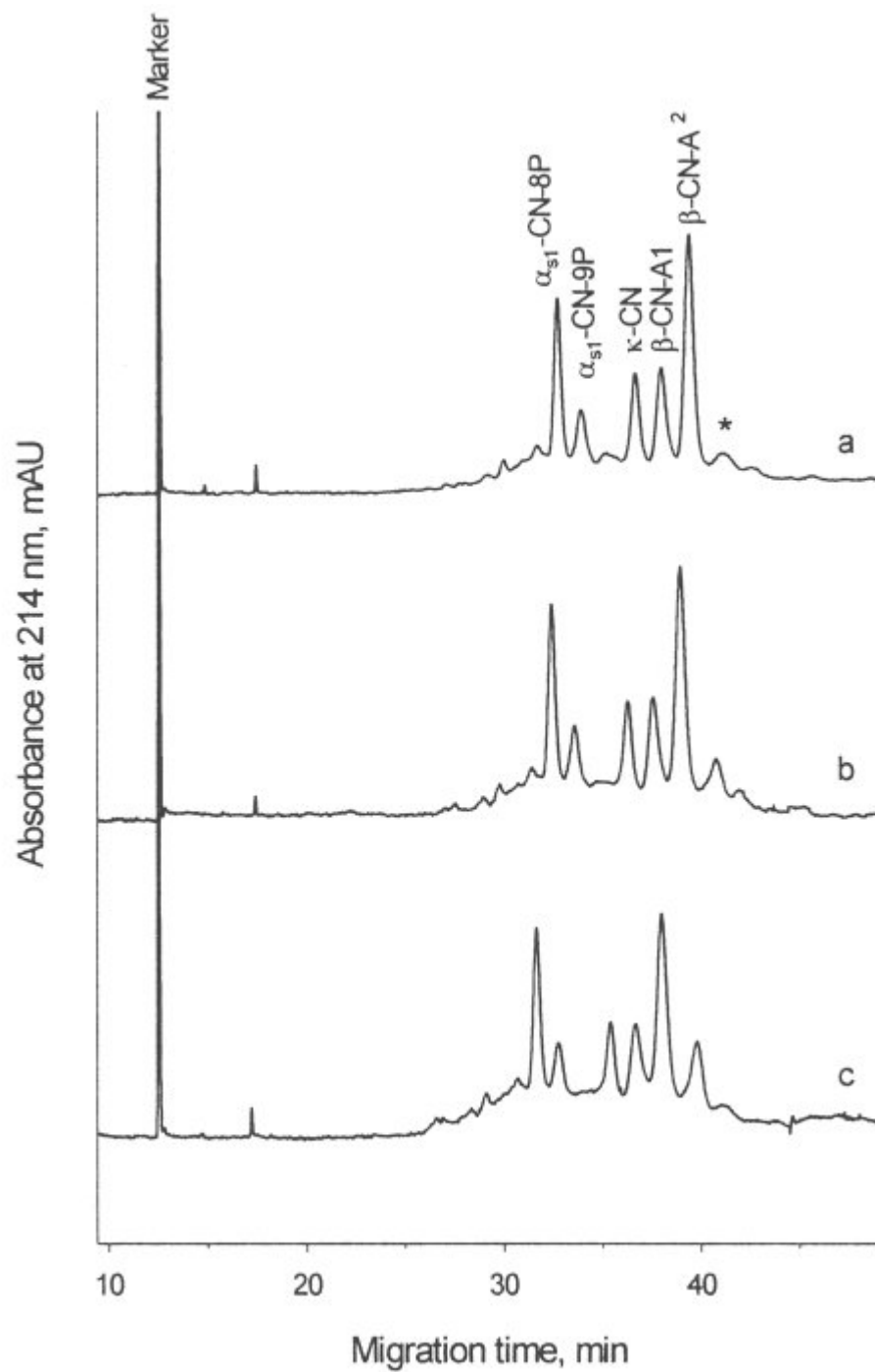
Figur 2: Forskelle i kaseinnedbrydning afhængig af pH for en stamme af *P. roqueforti*.



Figur 3: Forskelle i kaseinnedbrydning afhængig af salt koncentration for en stamme af *P. roqueforti*.



Figur 4: CE-profiler af roq 1 (a), roq 5 (b), roq 2 (c), PV (d) og CSL (e) efter tre dages vækst i kaseinmedium, pH 5.5, ved 25 °C. Migrationstid svarende til α_{s1} -I.



Figur 5: CE-profil for roq 5 efter 3 (a), 4 (b) og 5 (c) dages vækst i kaseinmedium, pH 5.5, ved 25 °C.

* Migrationstid svarende til α_{s1} -I.

