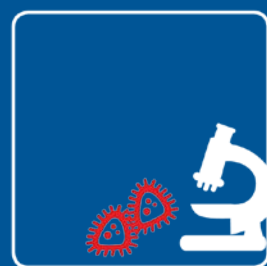


Optimering af ostekvalitet ved styring af mælks redoxpotentiale (OstRedox)





Skema 6

Slutrapport
for forskningsprojekt finansieret af
tilskudsbevillinger under
§24.33.02.10, § 24.33.02.30 og § 24.33.02.40

-
- 1. Forskningsprogram:** Fødevarerforskningsprogrammet
-
- 2. Journal nr.:** J. nr. 3414-09-02561
-
- 3. Projekttitel:** Optimering af ostekvalitet ved styring af mælks redoxpotentiale (OstRedox)
-
- 4. Projektets startår:** 2010 **Projektets slutår:** 2014
-
- 5. Projektleder** (*titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail*)
- Prof. Lene Jespersen, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, tlf +45 35333230 , fax: +45 35333513, e-mail:lj@food.ku.dk
-
- 6. Deltagende institutioner:** (*navn, adresse, tlf., fax., og e-mail*)
- Institut for Fødevarervidenskab (IFV), Det Natur og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, tlf +4535 33 32 30, fax +45 35 33 35 13, e-mail: lj@food.ku.dk
- Aarhus Universitet (AU), Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Institut for Fødevarer kvalitet, trine.dalsgaard@agrsci.dk
- Arla Foods (AF), Skanderborgvej 277, 8260 Viby, Afdelingsleder Søren Lillevang
- Thise Mejeri amba, Sundsørevej 62, 7870 Roslev, Mejeridirektør Poul J. Pedersen
- Chr. Hansen, Innovation, Dairy Cultures and Enzymes Division, Bøge Alle 10, 2970 Hørsholm, Director Anne Skrivers

7. Kontaktpersoner: (*titel, navn, adresse, tlf., fax., og e-mail. Der er udpeget én kontaktperson for hver deltagende institution*)

Prof. Lene Jespersen, KU, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, Tlf.: +45 35333230, fax: +45 35333513, e-mail: lj@food.ku.dk

Assoc. Prof. Trine K. Dalsgaard, AU, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Institut for Fødevarer, trine.dalsgaard@agrsci.dk

8. Øvrige projektmedarbejdere: (*titel, navn, adresse, tlf., fax., og e-mail*)

PhD studerende Birgit Brøsted Werner, Institut for Fødevarer, Københavns Universitet, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, bbw@life.ku.dk

PostDoc Nadja Larsen, Institut for Fødevarer, Københavns Universitet, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, nf@food.ku.dk

PostDoc Saloomeh M. Jenabian, Institut for Fødevarer, Københavns Universitet, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, smje@food.ku.dk

PostDoc Klaus Gori, Institut for Fødevarer, Københavns Universitet, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C

Bente M. Jensen, Aarhus Universitet, Institut for Fødevarer, bentem.jensen@agrsci.dk

Caroline Nebel, Aarhus Universitet, Institut for Fødevarer, caroline.nebel@agrsci.dk

Rita Albrechtsen, Aarhus Universitet, Institut for Fødevarer, rita.albrechtsen@agrsci.dk

Grith Mortensen, Aarhus Universitet, Institut for Fødevarer, grith.mortensen@agrsci.dk

9. Slutrapport:

Projektets hovedformål: (*Fra ansøgning*)

Projektets formål er at undersøge, hvordan styring af redoxpotentialer kan anvendes til at sikre en optimeret aroma, kvalitet og ensartethed af ost. Der fokuseres på effekt af mælken som råvare, effekt af processing, samt den primære starterkulturs syrningskapacitet og aromadannelse. Projektets delmål er: i) Afklaring af hvilke faktorer, der har afgørende betydning for mælkenes redoxpotentialer, herunder teknologisk behandling og karakterisering af mælkesyrebakterierne påvirkning; ii) Karakterisering af redoxpotentialernes indflydelse på den mikrobielle succession og regulering af gener/proteiner af betydning for mikrobiel aktivitet; iii) Afklaring af sammenhæng mellem ostens redoxpotentialer og aromaudvikling; samt iv) Optimering af mejeriprocesser med henblik på at opnå et redoxpotential, der er optimalt for ostemodningen og kvaliteten af den færdige ost.

A. Projektets forløb:

Resume

Dansk: Bakteriestammer af *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* og *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* isoleret fra DL-starterkulturen CHN-19 samt typestammer (10 stammer i alt) blev karakteriseret for deres evne til at syrne mælk og formindske redoxpotentialt (AP1). For at undersøge effekten af redoxpotentialt på fermenteringsforløb blev forsøgene udført ved højt og lavt initialt iltindhold opnået vha. gennemluftning af mælken med oxygen eller nitrogen før podning. Det er påvist, at det initiale iltindhold påvirker syrnings- og reduktionskinetikken, og at denne effekt er stammeafhængig. Alle mælkesyrebakterier kunne sænke redoxpotentialt i mælk undtagen to stammer af *Lc. Lactis* ssp. *lactis*, dog havde dette ingen betydning for deres syrningssevne. Ved højt initialt iltindhold blev syrningshastigheden reduceret og syrningsstiden forsinket for fem af de undersøgte stammer og for alle stammer blev faldet i redoxpotentialt forsinket med ca. 1 time. Syrningskinetikken var generelt ikke påvirket af et lavt initialt iltindhold. Artikel baseret på resultater af AP1 er blevet udarbejdet og publiceret i Journal of Dairy Science.

I AP2 blev køer fodret med vegetabilsk olie og en kontrolfodring med lavt fedtindhold. Resultaterne viste at i ingen af tilfældene havde fodring, laktationsstadiet og laktationsnummer betydning for redoxpotentialt i mælken. Pasteurisering og lagring havde en begrænset effekt på mælkens redoxbetydende faktorer (askorbinsyre, tocopherol, lipidoxideringsprodukter), mens andre faktorer (iltindhold, pH-værdier og metabolitter) var upåvirkede.

I AP3 blev der udført omfattende genekspressionsstudier med det formål at opklare de molekylære mekanismer, som medvirker til iltforbrug og mælkesyrning. I mejeristammen *Lc. lactis* ssp. *lactis* DSM 20481^T blev genekspressionen undersøgt vha. microarray og real-time kvantitativ PCR (qPCR). Mere end 100 gener var differentielt udtrykt efter sænkning af redoxpotentialt og pH. Oxygenstress i starten af fermenteringen førte til induktion af gener involveret i detoxifikation af reaktive oxygenforbindelser og trehalose syntese, medens gener kodende for purine biosyntetiske enzymer var nedreguleret. Differentielt udtrykte gener i forbindelse med iltforbrug hørte til metabolisme af pyrimidiner og forgrenede aminosyrer. Opregulering af gener involveret i pyruvat pathways tydede på et skift fra produktion af laktat til blandede syrer (diacetyl, acetoin og butandiol). Ændringer af gener relateret til pyruvat og aminosyre metabolisme, indikerede at iltindhold kan påvirke dannelsen af aromastoffer og således ostekvaliteten. Et manuskript som beskriver microarraystudiet er udarbejdet og under indsendelse til Int. J. Food Microbiol.

Genekspression i *L. lactis* ssp. *cremoris* CHCC 12080 blev undersøgt under mælkesyrning med højt iltindhold, vha. Illumina HiSeq 2000 sekventering og qPCR. I forbindelse med iltforbrug og pH-fald blev der påvist en induktion af gener hørende til laktose omdannelsen, redox homeostase, pyrimidine syntese, oligopeptide transport mm. Samtidigt var gener hørende til purine og riboflavin biosyntese, protein eksport og catabolisme, samt aminosyre transport nedreguleret. Manuskript baseret på Illumina resultater er under udarbejdelse til indsendelse til Int. J. Food Microbiology.

I AP4 blev betydningen af redoxpotentialen for de færdige oste undersøgt på Thise Mejeri og i pilotskala hos Chr. Hansen A/S i Hørsholm. Forsøget på Thise Mejeri fulgte mælken undervejs fra landmanden til løbetilsætning under osteproduktionen. Der var ingen væsentlige ændringer af pH og redoxpotentialer under forløbet, men efter tilsætning af syrevækker blev der observeret et fald i iltindholdet. Lactoperoxidaseindholdet faldt ved pasteurisering, standardisering og transport til ostekarret. Tocopherolniveauet var stabilt indtil syrningen, hvorefter et fald blev observeret. I et efterfølgende forsøg blev effekten af iltning, vakuumering og tilsætning af en iltforbrugende kultur undersøgt på sammensætning, sensoriske egenskaber, frie aminosyrer, peptider og flygtige komponenter i modne oste (Gouda 45+). Der var en svag tendens til at iltindholdet påvirker flygtige komponenter og peptid-mønstre i ost. Samlet blev der ikke påvist signifikante forskelle mellem behandlinger på de øvrige karakteristika i osteprøverne.

English: Strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* and *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* isolated from DL-starter culture CHN-19 and the type strains (10 in total) were characterized for the ability to acidify milk and decrease the redox potential (WP1). The kinetic of fermentation was investigated at high and low initial levels of redoxpotential produced by milk gassing with oxygen or nitrogen. The initial levels of dissolved oxygen affected acidification and reduction kinetic and this effect was strain-dependent. Two strains of *Lc. lactis* ssp. *lactis*, though having high acidification power, were not able to decrease the redox potential to the negative values. Oxygen treatment had a negative effect on acidification power of the tested strains, reducing the acidification rate and delaying the acidification. Besides, the decrease of redox potential was significantly delayed at high initial oxygen by 1 h. Fermentation kinetics of most of the strains was not significantly affected by nitrogen flushing. Article based on results of WP1 have been published in the Journal of Dairy Science.

Feeding of cows with vegetable oils showed that the redox potential in milk was not affected by feed, cow race or lactation phase. Milk pasteurization and storage had a little impact on production of ascorbic acid, tocopherol, and the products of lipid oxidation, while the other factors influencing the redox potential (dissolved oxygen, pH and metabolites) remained stable.

The gene expression studies in WP3 were carried out with the purpose to reveal molecular mechanisms linked to oxygen consumption and milk acidification. Gene expression studies in *Lc. lactis* ssp. *lactis* DSM 20481T were performed with the use of microarrays and real-time quantitative PCR (qPCR). More than 100 genes were found to be differentially expressed after the decrease of redox potential and pH. Oxygen stress resulted in induction of genes involved in detoxification of reactive oxygen species and trehalose biosynthesis, while genes encoding purine enzymes were down-regulated. Genes differentially expressed after oxygen depletion were involved in pyrimidine metabolism, and biosynthesis of the branched amino acids. Responses of genes of pyruvate pathways indicated shifts towards production of mixed amino acids rather than lactate. Expression pattern of genes involved in pyruvate and amino acid metabolism suggested that initial oxygen levels influence the aroma profile and cheese quality. Manuscript, describing the microarray results, has been worked out and will be submitted to the Int. J. Food Microbiology in April 2015.

Gene expression in *L. lactis* ssp. *cremoris* CHCC 12080 during milk acidification at high initial oxygen was investigated with the use of Illumina HiSeq 2000 technology and qPCR. Genes related to lactose catabolism, redox homeostasis, pyrimidine synthesis and oligopeptide transport were induced after oxygen depletion and pH reduction. Concurrently, genes involved in purine and riboflavin biosynthesis, protein export and catabolism, as well as amino acid transport were down-regulated. Manuscript based on Illumina results is in preparation for the Int. J. Food Microbiology.

The impact of initial redox potential on cheese quality (WP4) was investigated at the Danish dairy Thise and Chr. Hansen A/S at a pilot scale. Milk was followed from the farmers and through the whole process of cheese production. There were no significant changes in pH values and redox potential, though oxygen content was slightly decreased after addition of a starter culture. The levels of lactoperoxidase were reduced during milk pasteurization and transport to the cheese vats. The levels of tocopherol fall down after acidification. The effect of initial oxygen levels in milk on cheese composition, sensory properties, amino acid and peptide profile and volatile compound was investigated for cheese type Gouda (45+). The oxygen content in milk was manipulated by gassing with oxygen, vacuum treatment and addition of oxygen-consuming culture. The overall results showed a tendency that volatile compounds and peptide profile were related to the initial oxygen; however, other cheese characteristics were not significantly altered.

Diskussion af projektets forløb samt opnåede resultater

• *En vurdering af fremdrift i forhold til de oprindeligt opstillede milepæle samt opnåelsen af det oprindelige formål.*

M1.1 Indkøring af teknikker, der effektivt og pålideligt kan måle kulturernes evne til at reducere redoxpotentialet i mælk

Metoden til at studere fermenteringskinetik i mælk er blevet optimeret og indkørt. Metoden blev anvendt i AP1 og AP2 til at måle redoxpotentialet, pH, iltindholdet og temperaturen under 24 timers mælkesyrning med starterkulturerne. Målinger af redoxpotentiale og pH blev foretaget ved brug af kombineret platinum elektrode (Hamilton Easyferm Plis Rx VP120) og sølvklorid reference elektrode. Voltage- og redox signaler blev konverteret til værdier for pH og redoxpotentiale. Opløst ilt blev målt ved brug af oxygensensor (Hamilton Visiferm DO120) i fermentorerne. Variation af redoxpotentialet i mælken blev opnået med ilt- og kvælstof gennemluftning før podning med en starterkulturen. Denne batch-fermenteringsmetode blev udviklet til brug under laboratorieforhold og viste sig at være reproducerbar og pålidelig. Denne milepæl er opnået ifølge projektplan.

M2.1 Indkøring af metoder til karakterisering af modningsenzymers påvirkning af mælks redoxpotentiale

Lactoperoxidase og xanthinoxidase er ifølge litteraturen de mest afgørende redoxzymer i ostemodningsprocessen. Et lactoperoxidase assay, der tidligere var udviklet til mælk, blev optimeret til ost. Xanthin oxidase assayet blev udviklet og optimeret til ost. Denne milepæl er opnået ifølge projektplan.

M2.2 Plan for udførelse af pasteuriseringsforsøg i pilot-plants og i mejerier

Pasteuriseringsforsøg blev udført på Chr. Hansen før ostningsforsøget. De to pasteuriseringstanke blev afprøvet både under vakuum, ved normalt ilttention og ved iltmætning. Det blev konkluderet, at det lavest mulige ilttention kunne opnås ved tilsætning af en iltforbrugende kultur, hvilket blev overført til egentlige ostningsforsøg. Denne milepæl er opnået ifølge projektplan.

M3.1 Indkøring af metoder til måling af intracellulær redoxpotentiale

Metoden til bestemmelsen af intracellulær redoxpotentiale ud fra forholdene mellem NADH og NAD⁺ er blevet afprøvet og viste sig uegnet til formålet. Denne milepæl er udgået.

M3.2 Identifikation af gener og proteiner/enzymer af betydning for reduktionen af redoxpotentialet i mælk

Gener som har betydning for redoxpotentiale blev identificeret i *L. lactis* mejeristammerne vha. globale genekspressionsstudier. Metoden til oprensning af total bakteriel RNA fra mælk blev optimeret og indkørt for at sikre, at det ekstraherede RNA havde en tilstrækkelig høj kvalitet i genekspressionsstudierne. Genekspression i typestammen *L. lactis* subsp. *lactis* DSM 20481^T blev undersøgt ved brug af mikroarray-teknologi med *L. lactis*-specifikke arrays designet på Chr. Hansen A/S. Denne metode er baseret på hybridisering af cDNA fra *L. lactis* 20481^T til de matchede oligonukleotider, der er fikseret på mikroarrays. Ved hjælp af mikroarrayanalyse var det muligt at detektere ændringer i ekspressionsniveauer for mere end 100 gener under fermenteringsforløb. Genekspression i *L. lactis* ssp. *cremoris* CHCC 12080 blev undersøgt ved high-throughput DNA sekventeringsteknologien Illumina HiSeq 2000, da genomsekvensen for denne stamme ikke er kendt. Denne teknologi er baseret på RNA sekventering og kortlægning af genekspression ud fra mængden af DNA transkripter. Der blev detekteret op- eller nedregulering af mere end 400 transkripter annoteret til ca. 100 gener, som var påvirket af ændringer i redoxpotentialet og pH fald. Analysen af genekspressionsdata omfattede differential ekspressions analyse, kortlægning af metaboliske pathways samt funktionel genanalyse. Ændringer i genetiske faktorer tyder på at produktion af tilsvarende proteiner/enzymer vil ligeledes blive påvirket af redox potentialet. Denne milepæl er opnået med forsinkelse.

M4.1 Syrningsforsøg og ostefremstilling i pilot-plants

Der blev udført et ostefremstillingsforsøg i pilot-skala på Chr. Hansen, hvor initialt iltindhold og redoxpotentiale i ostemælk blev varieret vha. vacuum/luft behandling og tilsætning af iltforbrugende kultur. Endvidere blev virkning af vacuum/luft behandling undersøgt i forhold til sammensætning, flygtige komponenter, proteiner og aminosyrer i modnet ost. Der blev udført sensorisk analyse af færdige oste på Arla Foods ved anvendelsen af ASIC's external panel (ISO 4121) og udarbejdet en rapport om effekten af ostemælk på lugt, udseende, konsistens, mundfornemmelse og smag i oste. Denne milepæl er opnået med forsinkelse.

M4.2 Syrningsforsøg og ostefremstilling i mejerier

Projektgruppen besluttede at køre forforsøg på osteproduktion hos Thise mejeri, hvor der blev optimeret på målemetoder samt udtag gennem syringen, hvilket ikke er trivielt. På Thise mejeri blev

ostemælk fra fire gårde fulgt fra landmanden til løbetilsætning. Der blev målt redoxpotentiale, iltindhold og pH samt undersøgt betydning af disse karakteristika på frigivelsen af enzymer, vitaminer, aminosyrer, frie fedtsyrer og aromakomponenter i mælken under fremstillingsprocessen. Konsortiet har besluttet at udføre samtlige forsøg på pilot-scala på Chr. Hansen da der kunne køres i fire parallelle kar med bedre styring af ostekarene (see milepæl M4.1). Denne milepæl er opnået ifølge projektplan.

• **Skematisk oversigt over milepæle. Ændringer i forhold til oprindelige planer angives**

Projektet blev forlænget hos MFF og hos Innovationsloven ultimo december 2014. Forlængelse af projektet var udgiftsneutral.

Milepæl	Projekt år																				Status for milepæle	
	År1/2010				År 2/2011				År 3/2012				År 4/2013				År 5/2014				Opnået	Opgivet
kvartal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
M1.1			x																		x	
M2.1					x																x	
M2.2					x																x	
M3.1						x																x
M3.2											x								x		x	
M4.1										x						x					x	
M4.2													x								x	

Justeret tidspunkt markeret med lysegråt

• **En vurdering af resultaternes aktuelle anvendelighed og resultaternes fremtidige perspektiver, herunder i relation til miljø, dyrevelfærd samt arbejdsmiljø**

Resultater opnået i projektet vil bidrage til en øget forståelse for redoxpotentialets betydning for mælkesyrning og osteproduktion. Kendskab til redoxforholdene under mælkesyrning muliggør optimal udnyttelse af starterkulturerne og resultere i en mere kontrolleret syrnings- og modningsproces samt hurtigere produktionstider, idet en hurtig nedsyrning vil være mulig. Hurtigere syrningsforløb kan bidrage til mere effektivt produktionsgang, mindre forbrug af spildevand og generelt mindre spild, da man undgår fejlproducerede oste. Optimering vil føre til mindre miljøbelastning af mejeriindustrien.

• **En vurdering af resultaternes eventuelle erhvervsmæssige potentiale, herunder innovation m.v. og eventuelle bidrag til en positiv samfundsøkonomi**

Sammenhæng mellem fodring, proces teknologiske forhold under ostefremstilling, aktivitet af starterkulturer og ostekvalitet blev undersøgt i indeværende projekt. Projektet resulterede dermed i ny viden om, hvordan det initiale iltindhold og redoxpotentialet påvirker syrningsaktivitet af syrningskulturerne samt ostekvalitet. Der blev yderligere opklaret molekylære mekanismer, som har betydning for ændringer af redoxpotentialet samt pH under mælkesyrning. Viden opnået i projektet

skaber grobund for en høj grad af innovation. Kulturproducenter har fået viden, der kan bruges til udvikling af nye kommercielle syrningskulturer specifikt tilpasset de aktuelle iltindhold under syrningsprocessen, hvilket giver en bedre mulighed for formindsket procestid, optimal vandbinding samt en bedre og mere ensartet smag af de færdigproducerede oste. Mejeriindustrien har gennem projektet fået en bedre mulighed for en mere effektiv udnyttelse af redoxpotentialen til at sikre en ensartet syrnings fra batch til batch og forbedre ostekvaliteten. Udvikling af syrningskulturer samt en effektiv udnyttelse af redoxpotentialen i ostemælken med det formål at optimere produktionen vil kunne reducere omkostningerne, forbedre produktsortimentet og sikre forbrugerne en høj og konstant kvalitet af mejeriprodukter. Nye produkter med en ensartet høj kvalitet styrker, naturligvis, konkurrenceevne af mejerierne både lokalt og på eksportmarkederne.

• *En vurdering af resultaterne, nye kompetencer, m.v. på institutionen, dvs. fastholdelse af projektmedarbejdere, projektet som basis for nye projekter og aktiviteter på institutionen.*

Medarbejderne, der deltog i projektet, fik styrket deres kompetencer indenfor viden om optimering og kontrol af fermenteringsprocesser, samt viden om kemiske, fysiske og biologiske processer under mælkesyrning, identifikation af metabolitter i mælk, genekspressionsanalyser, mm. PostDoc Nadja Larsen var ansat på OstRedox og tog efterfølgende del i ansøgningen om bevilling til projektet BioSyn i Dansk-Brasiliansk strategisk samarbejde indenfor Food Science. BioSyn blev bevilget fra Det Strategiske Forskningsråd og NL er ansat på dette projekt (FOOD, KU). Trine K. Dalsgaard blev under sin ansættelse på OstRedox projektet evalueret og udnævnt til lektor på Institut for Fødevarer på AU. Hun fik etableret et samarbejde med Chr. Hansen, som efterfølgende indgik i en ansøgning om Dansk-Brasiliansk strategisk samarbejde om naturlige farvestoffer fra Annatto-planten. Dette projekt er blevet bevilliget i januar 2015.

I OstRedox har faggruppen Fødevaremikrobiologi (FOOD, KU) etableret en batch-fermentor for kontrolleret syrnings af mælk til brug i laboratoriet. Dette anlæg udnyttes nu i beslægtede projekter, bl.a., "MetaPhageLab" finansieret af FTP (Danish Research Council), som belyser udviklingen i populationer af mælkesyrebakterier udsat for fag-stress. Faggruppen har endvidere udvidet sin kompetence indenfor molekylærbiologiske metoder, bl.a. RNA oprensning fra mælk og mikroarray teknologi. Andre nye kompetencer opnået i projektet omfatter anvendelsen af Illumina HiSeq sekventeringsteknologi i genekspressionsstudier og analyse af store mængder sekventeringsdata. Disse nye værktøjer og ekspertiser er aktuelt for nuværende projekter på FOOD, KU, herunder "MiniGut" bevilget af Det Fri Forskningsråd, "Controlling synergistic and antagonistic microbial activities" bevilget af Norrmejerier samt DANIDA projektet "GreenGrowth". Viden og ekspertise opnået i OstRedox indgår nu i undervisning på flere kurser, herunder, "Microbiology of Fermented food and beverages" (MSc kursus, FOOD, KU), "Dairy Microbiology" (MSc kursus, FOOD, KU) og "Food Molecular Biology" (PhD kursus, FOOD, KU).

• *En eventuel vurdering af resultaternes anvendelse set i forhold til institutionens myndighedsberedskab.*

Resultaternes anvendelse er begrænsede i forhold til myndighedsberedskab.

B. Lister over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet:

Artikler i internationalt anerkendte tidsskrifter

Larsen N., Werner B.B., Vogensen F.K., and Jespersen L. 2014. Effect of dissolved oxygen on redox potential and milk acidification by lactic acid bacteria and a DL-starter culture. *J. Dairy Sci.* 98:1640–1651.

Opnåede patenter; Indlæg ved kongresser, symposier o.l.

Werner B.B., Gori K., Vogensen F.K. and Jespersen L. (2011). Influence of redox potential and acidification activity of primary starter cultures for cheese production. 10th Symposium of Lactic Acid Bacteria, Holland, 28. 08 - 01.09. 2011. Posterbidrag.

Werner B.B., Carrigues C., Vogensen F.K. and Jespersen L. (2012). Oxygen Response in *Lc. lactis* subsp. *lactis* during Milk Fermentation. IDF Cheese Ripening and Technology Symposium 2012, Madison, Wisconsin, USA, 21. – 24. maj 2012. Posterbidrag.

Larsen N, Birgit B. Werner, Finn K. Vogensen and Lene Jespersen. Transcriptional analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* during milk acidification and decrease of redox potential. FOOD MICRO 2014 Nantes, France 1-4 Sept. Posterbidrag.

Faglige artikler; Anden formidling. F.eks. mødeindlæg, åbent hus m.m.

Werner B.B., Gori K., Mortensen G. og Jespersen L. (2010). Redoxpotentialets betydning for ostekvaliteten. *Mælkeritidende* 123(24): 10-12

Planlagte publikationer og artikler. Indsendes løbende, når de er accepteret.

Jenabian S.M, Birgit B. Werner B.B, Larsen N, Garrigues C, Neves A.R, Vogensen F.K, Jespersen L. 2015. Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in response to oxygen during milk fermentation (manuskript er udarbejdet og indsendes til *Int.J. Food Microbiol.* i april 2015)

Larsen N, Werner B.B., Vogensen F.K., and Jespersen L. 2015. Transcriptional responses in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* during milk fermentation (manuskript er under udarbejdelse til indsendelse til *Int.J. Food Microbiol.*)

Redegørelse for forskeruddannelse (ph.d. og post doc.), herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering. Eventuelle afhandlinger vedlægges i ét eksemplar eller eftersendes, når de foreligger.

Ph.d.-studerende Birgit Brøsted Werner har gennemgået PhD uddannelse (3 år) på Institut for Fødevidenskab, Københavns Universitet

PostDoc Nadja Larsen har gennemgået PostDoc uddannelse (2,5 år) på Institut for Fødevidenskab, Københavns Universitet

PostDoc Saloomeh M. Jenabian har gennemgået PostDoc uddannelse (6 måneder) på Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet

Ph.d.-studerende Else Vesterlund har gennemgået 1 års PhD uddannelse på Institut for Fødevarekvalitet, Aarhus Universitet

Postdoc Bente M. Jensen har gennemgået PostDoc uddannelse (1 år) på Institut for Fødevarekvalitet, Aarhus Universitet

C. Redegørelse for tilknyttede speciale- og bachelorstuderende.

Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer til offentlige og private forskningsmiljøer, erhverv m.m.

Projektet er et tværgående projekt der har inkluderet forskning i krydsfeltet mellem råvarekvalitet, mikrobiologi og mejeriteknologi. Fra erhvervslivet deltog Arla Foods, Thise mejeri og Chr. Hansen A/S. Erhvervspartnerne har bidraget betydeligt med (i) undersøgelser af mælkekvalitet i sammenhæng med teknologiske behandlinger, fodring, mælketype, mm., (ii) med ostefremstilling i mejeri og pilotskala hvor redoxpotentialen i oste blev ændret vha. vacuumering eller luftmætning, og (iii) med relevante startekulturer. Endvidere, blev sensoriske analyser i sammenhæng med teknologiske behandlinger udført på Arla Foods, og analyser af sammensætning af ost, flygtige komponenter, aminosyrer og peptider blev foretaget på Chr. Hansen (AP4). Projektets forskningsdel blev udført af 2 førende danske universitetsteam, Københavns Universitet (Institut for Fødevarevidenskab, FOOD) og Aarhus Universitet (Institut for Fødevarekvalitet, DJF). FOOD-KU var ansvarlig for projekt koordinering, samt for aktiviteter inden for AP1 og AP3, bl.a. indsamling og karakterisering af syringsevne af mælkesyrebakterier, indkøring nye teknikker for måling redoxpotentialen under syring, genetisk karakterisering af redoxpotentialens indflydelse på kultureernes syrningsaktivitet. AU-DJF var ansvarlig for AP2 og AP4, med fokus på betydning af korace, fodring, mælkekvalitet og teknologisk behandling for redoxpotentialen (AP2) og dette sammenhæng med ostekvalitet, bl. a. aroma, vitaminer, enzymer, mm. (AP4). Den tværdisciplinære tilgang til emnet har været særdeles nyttigt og nødvendig for at løse en række af de udfordringer, der er med til at få syrningskulturene til at spille optimalt sammen med råvaren og procesbehandlingen. Samarbejdet forventes at fortsætte efter projektets afslutning.

D. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater

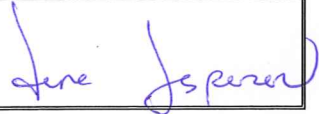
(maks. 10 A4-sider). Se Appendix

Oversigt over projektets samlede finansiering.

	Bevilget tilskud fra NaturErvervs tyrelsen	Forbrug af tilskud fra NaturErvervs tyrelsen	Institutionens med- finansiering	Støtte fra anden side	TOTAL
Lønudgifter	1.073.770	1.079.188	349.273	961.468	2.393.785
VIP:	879.984	885.402	349.273	759.771	1.998.302
TAP:	193.786	193.786		201.697	395.483
Øvrige driftsudgifter	235.200	234.731		244.312	479.043
Apparatur	49.000	49.223		51.233	100.456
Andet (specificeret)	44.100	38.928		40.517	79.445
Direkte udgifter i alt	1.402.070	1.402.070		1.297.530	3.052.729
Indirekte udgifter (maks. 20 % af direkte udgifter)	616.912	616.912	153.680	570.913	1.343.201
I alt	2.018.982	2.018.982	502.953	1.868.443	4.395.930

Eventuelle bemærkninger til regnskabet:

10. Underskrift:

Navn	Institution	Dato	Underskrift
Projektleder: LONE DESPERSEN	KU-FOOD	25/3-2015	

Appendix

D. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater

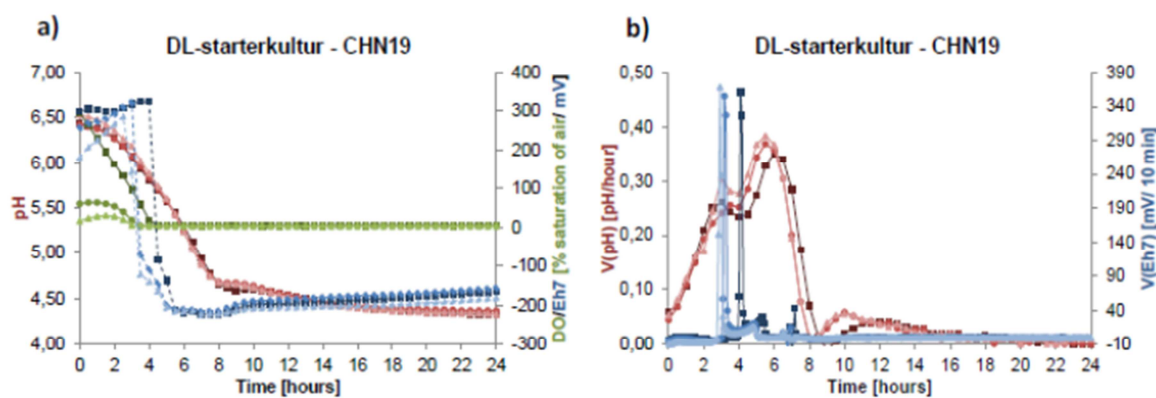
AP1. Indsamling og udvælgelse af nye innovative kulturer ud fra deres evne til at reducere redoxpotentialen i mælk.

Formål: Formålet med AP1 var at indsamle og karakterisere stammer isoleret fra en DL-syringskultur samt relevante typestammer for deres evne til at reducere redoxpotentialen i mælk. I karakteriseringen af syrningskulturerne blev der fokuseret på redoxpotentialens effekt på syrningsaktiviteten, vækst og evnen til at fjerne ilt.

Resultater: DL-starterkulturen CHN-19, bakteriestammer *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* og *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* isoleret fra DL-starterkulturen og typestammer (10 stammer i alt) blev undersøgt for deres evne til at syrne mælk og formindske redoxpotentialen. Redoxpotentialen er et mål for hvor godt et biokemisk system er til at oxidere (frigive elektroner) eller reducere (optage elektroner). Det oxiderende eller reducerende niveau angives henholdsvis med en positiv eller negativ mV-værdi. Da redoxpotentialen påvirkes af iltindholdet, pH og temperatur, blev disse parametre samt væksten ligeledes målt. Forsøgene blev udført i mælk med højt (300% luftmætning) og lavt (30% luftmætning) initialt iltindhold opnået med mælk gennemluftning med enten ilt eller nitrogen. For at vurdere kulturernes aktivitet er der blevet beregnet maksimum iltforbrug (ΔDO_{max}), maksimum reduktionshastighed ($\Delta Eh_{7,max}$), minimum redoxpotentialen ($\Delta Eh_{7,min}$) og maksimum syrningshastighed (V^a_{max}) ud fra fermenteringsdata. Typiske syrningskurver og ændringer i Eh7 for DL-starterkulturen er vist i Fig. 1. Iltindhold var mest betydeligt for redoxpotentialen som set fra markant reduktion af Eh7 i takt med iltforbrug (fra ca. 300 mV til ca. -120 mV). Derefter fortsat redoxpotentialen med at falde (til ca. -210 mV) med lavere hastighed hvilket indikerede indblanding af mikrobiologiske faktorer udover iltindhold. For de fleste stammer sås et skift i syrningshastighed (to-faset syring) med maxima før og efter iltforbrug. Dette skyldes muligvis ændringer i pyruvat metaboliske veje med dannelsen af forskellige produkter af homolactic og heterolactic fermentation.

Der blev observeret en stor variation mellem stammerne i kinetiske parametre og således i deres syringsevne. Syrnings og reduktionskapacitet af starterkulturen CHN-19 var tilsvarende de mest aktive stammer hvilket indikerede deres additiv effekt. Alle stammer kunne sænke redoxpotentialen i mælk til negative værdier (op til -220 mV) med undtagelse af *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CHCC D1 og CHCC D3. Disse stammer havde også den laveste reduktionshastighed, men det påvirkede ikke syringen. Højt initialt iltindhold havde en effekt på syrningsforløb hvilket kunne ses fra formindsket hastighed (V^a_{max}) og forsinket syring tid. Denne effekt var væsentlig for stammerne *Lc. cremoris* CHCC O1 og CHCC O2, *Lc. lactis* CHCC D2 og DSM4366^T samt *Leu. mesenteroides* CHCC M1. Desuden blev faldet af redoxpotentialen forskudt med ca. en time ved højt ilt i alle fermenteringer. Kinetiske parametre bestemt for alle kulturer var ikke påvirket af mælk gennemluftning ved nitrogen, undtagen *Lc. lactis* ssp. *lactis* CHCC D2 som viste hurtigere

reduktion ved lavt ilt indhold. Væksten af bakterier i mælk blev tilsyneladende ikke påvirket af det initiale iltniveau.



Figur 1. a) Udviklingen af pH (rød), redoxpotentiale (blå) og iltindhold (grøn) under syring af mælk podet med 10^7 CFU/ml DL-starterkultur. (b) Udvikling af syrningshastighedens (rød) og reduktionshastighedens (blå). Det initiale iltindhold er angivet med symboler: ■ højt iltindhold (300% mættet luft, ilt gassed mælk); ● normal (80%, non-gassed mælk) og ▲ lavt iltindhold (30% mættet luft nitrogen gassed mælk).

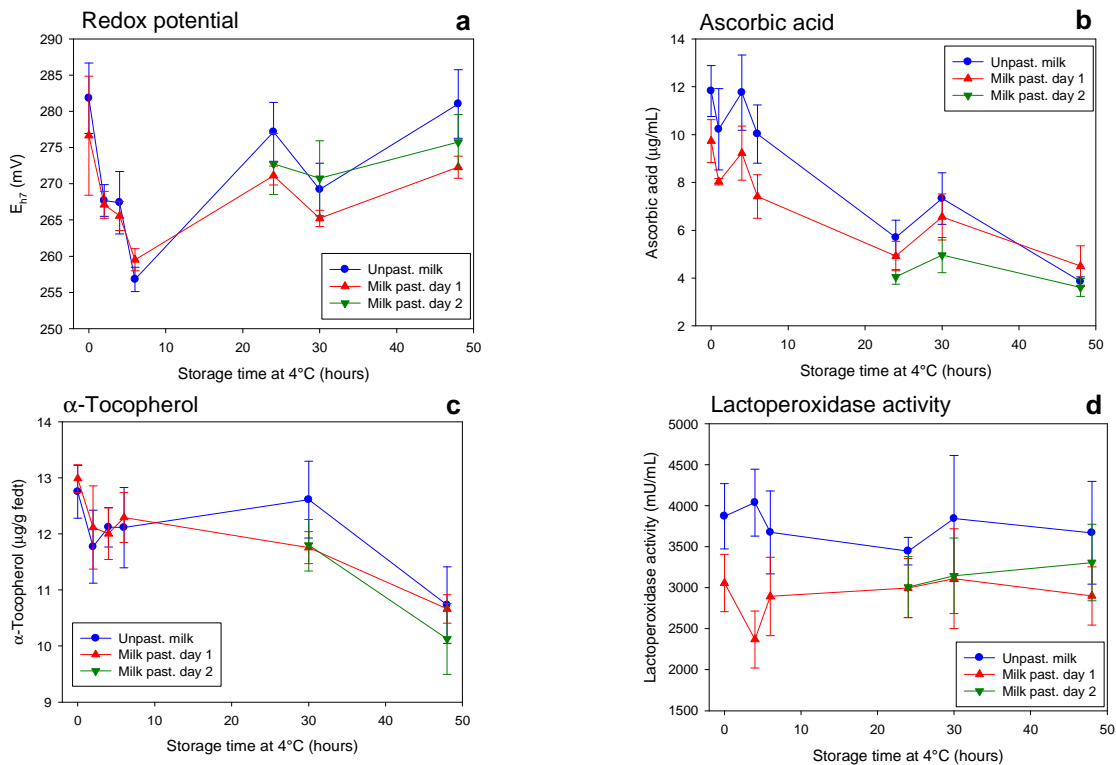
Konklusion: Initialt iltindhold i mælk har en effekt på kulturernes syrningsaktivitet, deres evne til at fjerne ilt og denne effekt er stammeafhængig. Forsøget afklarer sammenhæng mellem redoxforholdene i mælk og syrningskinetik af enkelte stammer og blandingskulturer. Denne viden er vigtigt for mejerierne for at udføre kontrollerede fermenteringer og standardisere kvalitet af mælkeprodukter. Artiklen baseret på resultater af AP1 blev publiceret i Journal of Dairy Science.

AP2. Betydning af mælkekvalitet og teknologisk behandling for redoxpotentialet

Formål: Formålet var at undersøge om fodringen har indflydelse på mælkens sammensætning, bl.a. indholdet af thiole, som forventes at kunne påvirke mælkens redoxpotentialet. Teknologisk behandling (pasteurisering og homogenisering) blev endvidere undersøgt for at afklare, hvordan behandlingerne påvirker redoxpotentialet.

Resultater: Betydning af mælkekvaliteten for redoxpotentialet blev undersøgt i fodringsforsøg, hvor kørerne blev fodret med højt niveau af rapsolie, vegetabilsk olie og en kontrolfodring med lavt fedtindhold. Fodring, laktationsstadiet og laktationsnummer havde ingen betydning for redoxpotentialet i mælken. For at simulere hver anden dags afhentning hos landmanden, blev mælken lagret i 48 timer med en pasteurisering på dag 0 eller 1 og lagret før og efter pasteurisering. Redoxpotentialet faldt gennem de første 6 timers lagring, hvorefter det vendte tilbage til det oprindelige niveau, mens pasteuriseringen ikke havde nogen effekt på redoxpotentialet (Fig. 2a). Ascorbinsyre- og tocopherolindholdet faldt med lagring, og en reduktion i askorbinsyreniveauet sås også efter pasteuriseringen, hvilket ikke var tilfældet for tocopherol (Fig. 2bc). Delvis inaktivering af lactoperoxidase blev observeret efter pasteuriseringen (Fig. 2d), men den tilbageblivende aktivitet ændredes ikke under lagring. Lipidoxiderationsprodukter (som hexanal) steg ved pasteurisering, mens lagring var uden betydning. Iltindhold, pH-værdier, niveauer af frie og totale

thioler og metabolitter målt GC-MS var uændret under pasteurisering og lagring. Derudover er redoxpotentialen og iltindholdet blevet målt under processering af ostemælken fra landmand til osteløbetilsætning på Thise Mejeri. Ingen væsentlige ændringer i pH og redoxpotentialen kunne måles inden for den givne tidsramme. Efter syrevækkertilsætningen observeredes et fald i redoxpotentialen, men, baseret på disse prøveudtag, er ingen af trinene i processeringen af ostemælken særligt kritiske mht. påvirkning af redoxpotentialen.



Figur 2. Udvikling af redoxpotentiale (a), askorbinsyre (b), α -tocopherol (c) og lactoperoxidase (d) under pasteurisering og lagring af mælk.

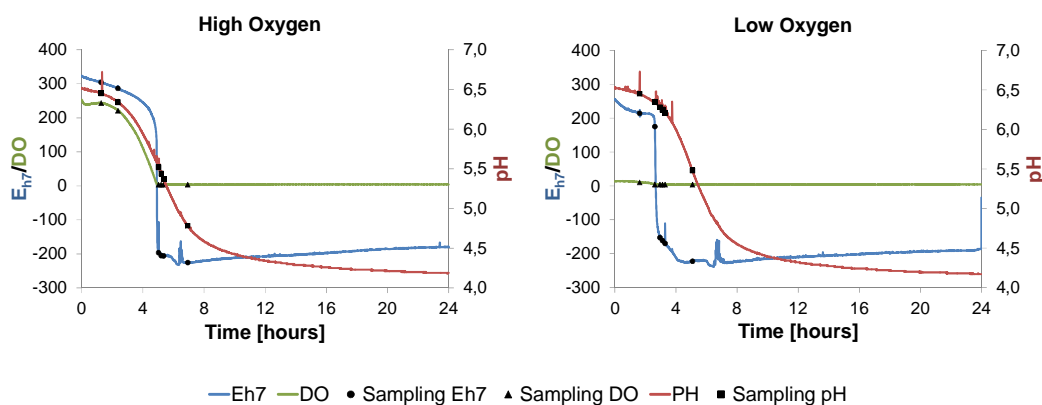
Konklusion: Fodring, laktationsstadium og laktationsnummer havde ingen betydning for redoxpotentialen i mælken. Pasteurisering og lagring havde en begrænset effekt på mælkenes redox-betydende faktorer (askorbinsyre, α -tocopherol, lactoperoxidase og hexanal) og dermed også på redoxpotentialen.

AP3. Redoxpotentialens betydning for den mikrobielle udvikling og genetisk tilpasning

Formål: Formålet med AP3 var at undersøge hvordan mælkenes initiale iltindhold og iltniveauets udvikling under syrningen påvirker genskudsregulering i starterkulturer og dermed udvide forståelsen for de væsentlige molekylære mekanismer af betydning for mælkesyrning og ændringer i redoxpotentialen.

Genekspressionstudiet i *L. lactis* subsp. *lactis* DSM20481^T vha. microarrays, herunder dannelsen af flygtige komponenter under syrning af mælk med *L. lactis* ssp. *lactis* DSM20481^T

Resultater: Studiet af genekspression i *L. lactis* ssp. *lactis* DSM20481^T blev udført ved hjælp af mikroarrays. Ændringer i genekspression fra et miljø med ilt og positivt redoxpotentiale til et miljø uden ilt og med negativt redoxpotentiale er blevet analyseret. Samtidigt var pH i mælk faldet fra 6.3 til 5.5 hvilket kunne også påvirke udtryk af generne. Prøvesamling til mikroarray-analysen under syrning ved start højt og lavt iltindhold er vist i Figur 3.




Figur 3. Ændringer i pH, ilt (DO) og redoxpotentiale (Eh7) under syrning af mælk med *L. lactis* subsp. *lactis* DSM 20481^T ved højt og lavt iltindhold. De angivne punkter viser prøver opsamlet til microarray-analyse.

Iltindhold i mælk samt ændringer i redoxpotentialet havde indflydelse på ekspressionen af mere end 100 gener. De fleste ændringer i geneekspression blev påvist i mælk ved højt ilt (Tabel 2), mens ved lavt initialt ilt var de fleste gener nedreguleret (Tabel 3). Oxidative stress pga. højt iltindhold førte til markant induktion (20-30 gang) af gener relateret til trehalose biosyntese og detoxifikation af reaktive iltforbindelser samt nedregulering af gene som koder for purinmetabolisme (*purCDLQN*). Gener hørende til pyruvat pathways (*adhE* og *pflA*), syntesen af forgrenede aminosyrer og glutamate (*ilvABCDN*, *leuBCD*, *gltBD*), aminosyrtransporter (*ctrA*, *oppBCDF*), energimetabolisme (*arcABC1C2D1*, *pfl* og *pyrZ*), og pyrimidine nukleotid pathways (*carAB*, *pyrBCEFZRP*) var for det meste højere udtrykt i forbindelsen med iltforbrug. Samtidigt var gener som medvirkede til nukleotidsyntese (*duka*, *nrdG*, *hprT*), aminosyre syntesen (*cysDKM*, *metB2*) og methionine/cysteine/glutamine transport (*glnPQ*, *plpABCD*, *yjgCE*) nedreguleret. Imidlertid var det svært at adskille effekten af fald i redoxpotentialet fra pH fladt under syrning på genekspression. Overekspression af gener relateret til pyruvat og aminosyrer metabolisme tyder på at iltindhold kan påvirke sammensætning af pyruvat omdannelsesprodukter (såsom acetat, butandiol, diacetyl, formate og ethanol) og frigivelsen af aroma stoffer (amonia, methanethiol, butyric syre mm.). Mikroarrays resultater blev bekræftet for 15 differentielt udtrykte gener (bl. a., *mtsA*, *sodA*, *ykjB*, *yeeA*, *yedF*, *recA*, *noxE*, mm.) vha. real time kvantitative PCR (qPCR). Arbejdet blev udført på Chr. Hansen (Hørsholm). Der er blevet påvist signifikant korrelation mellem mikroarray og qPCR data.

Et manuskript baseret på mikroarrayresultater er udarbejdet og bliver indsendt til Int. J. Food Microbiology i april 2015.

Tabel 2. Differentielt udtrykte gener i *L. lactis* ssp. *lactis* DSM20481^T når ilten er opbrugt i mælk med højt initialt iltindhold

High oxygen			
Gen	Fold	Funktion	OP
adhE	5,0 ± 0,2	Alkohol metabolisme, regenerering af NADH	
arcAC1C2D1	3,5 ± 0,3	Arginine/Ornithine metabolisme, Arginine -> Ornithine + ATP + CO2	
cadA	4,2 ± 0,3	ATPase, transport af kationer	
carAB, pyrBPR, pyrZCEF, yniC	3,0 ± 0,2	Pyrimidine, purine, nukleotid metabolisme DNA byggesten, vækst	
glmS	4,2 ± 0,4	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing)	
gltBD	2,3 ± 0,4	Glutamate synthase (NADPH) Samler nitrogen og carbon metabolisme	
nifJ	4,7 ± 0,3	Pyruvate ferredoxin oxidoreductase Elektron transport: pyruvate til flavodoxin/ferredoxin	
oppBCDF	2,9 ± 0,5	Oligopeptide transport	
pflA	2,5 ± 0,6	Aktivering af pyruvate-formate lyase omdannelse	
rcfB	3,9 ± 0,7	Stress respons, regulering Aktivering af gener med relation til anaerob vækst	
yafEF	2,8 ± 0,1	Relateret til DNA reparation	
ypjH	3,5 ± 1,6	Oxidoreduktase; Bruger oxygen og NAD+ som substrat	
yrjBCD	4,3 ± 0,8	Fe-S oxidoreduktase (yrjB) Aerob energi-metabolisme	
cysK, metB2	-3,8 ± 0,3	Cystein, methionin og sulfur metabolisme	
dukA	-2,9 ± 0,0	Reparation af DNA, dannelse af dGTP og dATP	
fhuG, ydcG	-2,3 ± 0,3	Ferrichrome (Fe ³⁺) transport, Fenton reaktion	
mtsABC	-3,3 ± 0,3	Mangan transport	
nagB	-3,1 ± 0,1	Glucosamine-6-P isomerase Dannelse af peptidoglycan til cellevægge	
nrdF	-2,3 ± 0,2	Reparation af DNA: nukleotid -> deoxynukleotid	
nrdG	-1,6 ± 0,2	Anaerob vækst, dNTP produktion	
yjgC yjgE	-3,3 ± 0,1 -2,1 ± 0,5	Aminosyre transport	NED

Tabel 3. Differentielt udtrykte gener i *L. lactis* ssp. *lactis* DSM20481^T når ilten er opbrugt i mælk med lavt initialt iltindhold

Lavt oxygen-indhold (30 %)			
Gen	Fold	Funktion	OP
adhA	-3,1 ± 0,2	Alkohol metabolisme, regenerering af NADH	 OP NED
arcABC1C2D1	-4,2 ± 1,2	Arginine/Ornithine metabolism	
bglS	-2,2 ± 1,2	Alternativ laktose transport i <i>Lc. lactis</i> IL1403	
celB, ybhE	-4,3 ± 1,2		
ptbA, ptcAB, yecA	-3,8 ± 0,7		
cstA	-2,7 ± 0,9	Tilpasning til carbon mangel	
dhaLM, yceJ	-2,6 ± 1,1	ATP + D-glucose ⇌ ADP + D-glucose 6-phosphate; energimetabolism	
malEFG; yreAB	-4,5 ± 1,2	Maltose transport	
msmK	-2,5 ± 0,1	Multiple sukker transport, ATP-binding protein	
mtsABC; ykjBC	-4,4 ± 1,5	Mangan transport	
pabAB	-2,8 ± 0,7	Co-faktor for fx superoxid dismutase	
pheST	-5,1 ± 0,2	Phenylalanyl-tRNA-synthetase	

Genekspressionsdata blev sammenholdt med udviklingen af flygtige komponenter i mælken under fermentering ved *L. lactis* DSM 20481^T. Dannelsen af aromakomponenterne methyldisulfid, benzaldehyd, 2-heptanone, pentanol, isopentanal, 2-nonanone, methional og benzenacetaldehyd var afhængig af iltindhold i mælk. Der er ikke fundet sammenhæng mellem udviklingen af flygtige komponenter og de udtrykte gener vha. multivariate dataanalyse.

Genekspressionstudiet i *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CHCC O2 (Illumina HiSeq 2000)

Resultater: Effekten af pH og redoxpotentialen på genekspression blev undersøgt for *L. lactis* subsp. *cremoris* CHCC O2 under syring af mælk ved højt initialt ilt. Kinetiske parametre ved udtagningsstidspunkter er vist i Tabel 4.

Table 4. Prøvesamling og kinetiske parametre (pH, ilt (dO₂, % luftmætning) og redox potentiale (E_{h7}, mV) under fermentering af mælk med *L. lactis* ssp. *cremoris* CHCC O2.

<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CHCC O2	Kinetic parameters		
	pH	dO ₂ , %	E _{h7} , mV
Reference sample 1	6.4	265	350
Test sample 2	6.0	35	340
Test sample 3	5.9	4	-37
Test sample 4	5.6	4	-178

Der blev identificeret mere end 200 transkripter (DNA sekvenser), som var differentielt udtrykte (fold-ændringer (fc)>2) under syring (prøver 2, 3 og 4) i forhold til startpunktet. Sekvenserne blev

yderligere annoteret til 92 funktionelle gener samt 17 gener med ukendt funktion. Samtidigt blev mange af de identificerede gener repræsenteret med flere transkripter som viste både op- og nedregulering for den samme gene. For at finde frem til de aktuelle fc-værdier, samt for at bekræfte sekventeringsresultaterne blev udført omfattende qPCR analyse af 60 gener. Gener som viste signifikante ændringer ved begge metoder er vist i Tabel 5.

Table 5. Differentielt udtrykte gener i *L. lactis* ssp. *cremoris* CHCC O2 (samples S2, S3 and S4) bestemt ved Illumina HiSeq 2000 og qPCR

Gene/ORF	Product	Function	Fold change		
			S2	S3	S4
Carbohydrate and lipid metabolism					
glgB	1,4-alpha-glucan-branching protein	Starch and sucrose metabolism	5	7	1
adhE	Alcohol/Acetaldehyde dehydrogenase	Glycolysis	5	8	2
cvcas_0157	Alpha/beta hydrolase	Glycolysis	6	4	2
glmS	fructose-6P aminotransferase	Carbohydrate biosynthesis	5	7	3
lacr_2205	Glycosyl hydrolase chitinase	Amino sugar metabolism	4	5	1
lacE	Lactose-specific PTS system IIC	Galactose metabolism	5	5	-2
kw2_1165	DAK2 domain-containing protein	Glycerol metabolic process	2	2	1
gapA	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	1	1	-2
ribBA	Dihydroxy-2-butanone-4P synthase	Riboflavin biosynthesis	-2	-4	-3
LACR_1917	Predicted phosphatase	Hydrolase activity	1	-2	1
Nucleotide and DNA metabolism					
carB	Carbamoyl-phosphate synthase	Pyrimidine biosynthesis	1	1	5
pyrC	Dihydroorotase	Pyrimidine biosynthesis	1	1	30
uc509_p6029	IS6 family transposase	DNA integration	20	20	2
purA	Adenylosuccinate synthase	de novo AMP biosynthesis	-2	-2	1
guaAB	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	Purine metabolism	-3	-4	1
pnp	Polynucleotide phosphorylase/	Degradation of RNA	-6	-18	1
Protein biosynthesis					
comGBEC	Competence protein	Protein export	-2	-3	-2
pepOF	Oligopeptidase O and F	Degradation of peptides	-2	-3	1
prkC	Serine/threonine protein kinase	Transfer of phosphor groups	-2	-3	1
Transport and binding proteins					
oppBD	Oligopeptide transport ATP-binding protein	ABC-type oligopeptide transport	1	1	3
lacr_1923	Amino acid ABC transporter permease	Amino acid transporting ATPase	-6	-8	1
kw2_0091	Amino acid transporter	Amino acid transport	-7	-9	2
emrB	MFS transporter	Response to ion gradients	-3	-4	1
iil_13985	Mn2+/Fe2+ transporter	Metal ion transporter	1	-2	1
uc509_1284	Multidrug resistance ABC transporter	Membrane ATP-binding cassette	-4	-5	1
llnz_01800	Cobalt ABC transporter	ATPase and hydrolase	1	-2	-10
kw2_2059	ABC transporter ATP-binding protein	ATP catabolic process	-2	-3	1
Oxidation reduction					
uc509_p6021	Pyridine mercuric reductase	Cell redox homeostasis	3	4	1
llh_2985	Putative oxidoreductase	Cell redox homeostasis	2	2	1
Energy metabolism					
atpA	ATP synthase F1 alpha subunit	ATP coupled proton transport	-2	-3	1
Folding, sorting and degradation					
cstA	Carbon starvation protein	Cellular respons to starvation	5	6	1
clpE	Protease ATP-binding subunit	Agregation of cellular structures	1	1	-2

Gener som var stærkt opreguleret i forbindelse med oxygenforbrug var primært impliceret i lactose metabolisme (*glgB*, *adhE*, *glmS*, *lacE*), cell redox homeostasis (pyridine mercuric reductase and oxidoreductase), og DNA integration (IS6 family transposase). Stærkt nedregulerede gener hørte til purine biosyntetiske veje (*guaAB* og *purA*), riboflavin biosyntesis (*ribBA*), RNA degradation (*pnp*), protein eksport og catabolism (*comGBEC*, *pepOF*, *prkC*) samt ion og aminosyrer transport. Gener som medvirkede pyrimidine biosyntesis (*pyrC* and *carB*) og oligopeptide transport (*oppBD*) var stærk opreguleret ved pH fald. Der arbejdes på et manuskript baseret på disse resultater til indsendelsen til Int. J. Food Microbiology.

Konklusion: Syrningskulturer *Lc. lactis* ssp. *lactis* DSM20481^T og *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CHCC O2 responderer på oxygenstress og tilpasser sig ændringer i redoxpotential og pH ved op- og nedregulering af en lang række gener. Der er opklaret molekylære mekanismer relateret til ilt- og pH-stress som tyder på at indledende iltindhold kan spille en rolle for production og sammensætning af metaboliter, som stammer fra lactose/pyruvat/aminosyrer omdannelse og dermed kan påvirke aromaudviklingen.

AP4. Redoxpotentialiets betydning for ostekvalitet

Formål: Formålet med AP4 var at klarlægge redoxpotentialiets betydning for ostekvaliteten. Dette blev opnået dels ved et forsøg på Thise mejeri og et pilotskala forsøg på Chr. Hansen ATC (Application and Training Center).

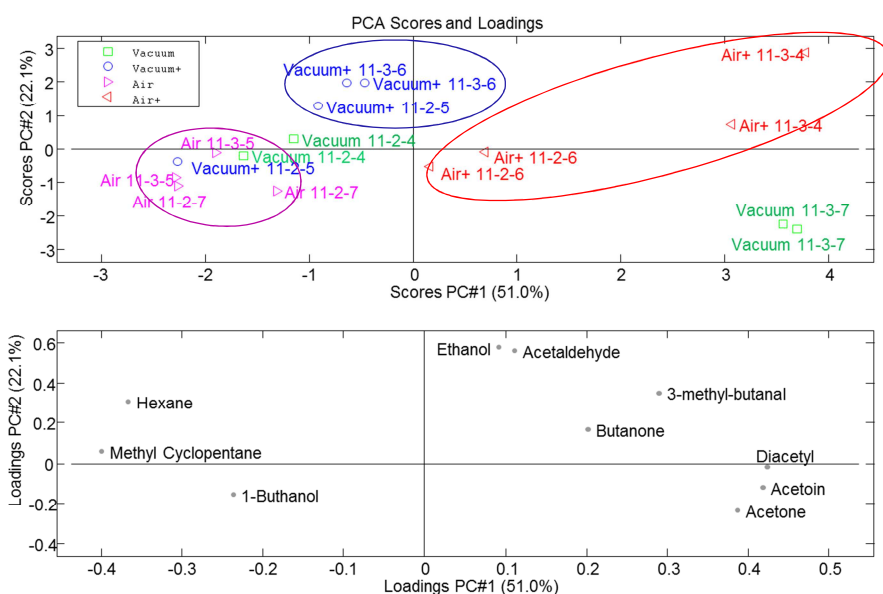
Indledende forsøg på Thise mejeri

Resultater: Formålet med dette forsøg var at få belyst, hvorledes prøvetagning og håndtering af prøver fra forskellige ostninger kunne udføres reproducerbart, samt at optimere de analysemetoder, som skulle anvendes på hovedforsøget hos Chr. Hansen. Redoxpotential og iltindholdet blev målt under processering af ostemælken fra landmand til osteløbetilsætning på Thise Mejeri. Mælken kom fra fire gårde, og der blev udtaget prøver fra råmælkstanken, i buffertanken, før og efter pasteurisering af skummetmælk og i ostekaret før og efter syrevækker og efter løbetilsætning. Der kunne måles små fald i pH og redoxpotential inden for den givne tidsramme. Efter syrevækkertilsætningen observeredes et fald i iltindholdet, men, baseret på disse prøveudtag, var ingen af trinene i processeringen af ostemælken særligt kritiske mht. påvirkning af redoxpotential. Lactoperoxidase (LPO)-aktivitet faldt under pasteurisering og yderligere under transport til ostekaret, hvilket er i overensstemmelse med resultaterne fra tidligere laboratorieforsøg (AP2). Niveaulet af vitamin E (tocopherol) var stabilt under pasteurisering, men faldt under syrningen. Der skete klare ændringer i aromakomponenterne både under processeringen af mælken, ostemodning og lagring af osten.

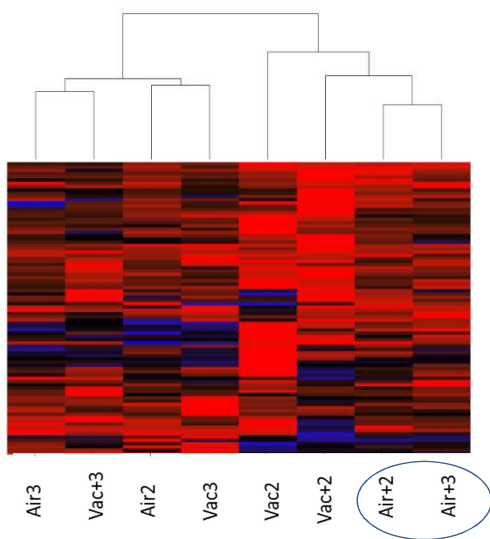
Konklusion: Teknologisk behandling af ostemælken havde en effekt på LPO-aktivitet, vitamin E og aromakomponenter, medens ændringer i pH og redoxpotential var ubetydelige.

Pilotskala forsøg på Chr. Hansen ATC (Hørsholm)

Resultater: Der blev fremstillet fire oste (Gouda 45+) hvor mælkenes iltindhold enten var sænket eller hævet, med og uden ekstra tilsætning af en iltædende kultur. Som starterkultur anvendtes den udefinerede DL-kultur CHN-19. Ostenes sammensætning blev bestemt i produktionsuge 0 og 19 efter saltning og der blev vurderet sensoriske egenskaber i modnede oste. Yderligere blev frie aminosyrer, peptid-sammensætning og flygtige komponenter undersøgt efter 18 ugers ostemodning. Samlet blev der ikke påvist forskel mellem behandlinger i sammensætning af osteprøver, hermed, pH, salt, tørstof, proteinindhold og fedt fra den samme produktions ugen (uge 0 og uge 19). Ligeledes viste de sensoriske analyser ingen signifikant virkning af vakuum/luft-behandling samt tilsætning af "iltædende" kultur i ostemælken på lugt, udseende, konsistens, mundfornemmelse og smag i oste. Aminosyresammensætning samt modne-, bitre- og søde aminosyre indices i færdige oste var heller ikke ændret betydeligt med disse behandlinger. Samtidigt er der dog tegn på, at der er en sammenhæng mellem udviklingen af flygtige komponenter (bl.a. hexane, methyl cyclopentan, acetaldehyde, acetone, butanone, diacetylbutanol og acetoin) og det initiale iltindhold og redoxpotential i ost (Fig. 4). Analysen af peptid-sammensætning tydede på at luftbehandling med tilsætning af iltædende kultur har en effekt på sammensætning af peptider i ost (Fig. 5).



Figur 4. PCA analyse som viser gruppering af oste efter indhold af flygtige komponenter. Prøver betegnelser i score plot: grøn "vacuum" - sænket ilt; blå "vacuum+" - sænket ilt og tilsæt en iltædende kultur; lysereød "air" - hævet ilt; rød "air+" - hævet ilt og tilsæt en iltædende kultur. Nummer står for forskellige batchers.



Figur 5. Heat-plot af peptidanalyser i ost (Gouda 45+). Prøver er markeret: "vac" – vacuum/sænket ilt; "vac+" – vacuum/sænket ilt og tilsæt en iltædende kultur; "air" – hævet ilt; "air+" – hævet ilt og tilsæt en iltædende kultur. Nummer 2 og 3 står for forskellige batchers. Prøverne Air+2 og Air+3 er grupperet sammen hvilket tyder på at luftbehandling med tilsætning a iltædende kultur har en effekt på sammensætning af peptider i ost.

Konklusion: Der var en tendens til at iltindhold påvirker flygtige komponenter og peptid-sammensætning i ost. Samlet blev der ikke påvist signifikante forskel mellem behandlinger på de øvrige undersøgte karakteristika i osteprøverne.