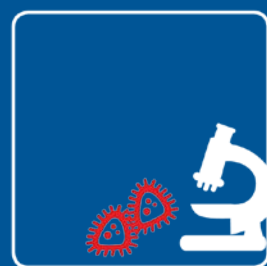


Brug af *Lactobacillus helveticus* ved udvikling af nye, spændende faste og halvfaste ostesorter





DATO: 28. oktober 2009

Slutrapport

for forsknings- og udviklingsprojekter med tilskud fra Innovationsloven

1. Projekttitle: Brug af *Lactobacillus helveticus* ved udvikling af nye, spændende faste og halvfaste ostesorter

2. FødevareErhvervs j.nr.: 3415-05-01067

3. Ansøger (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail):

Afd. chef Kim Tram Sørensen, Mejeribrugets ForskningsFond, Mejeriforeningen,
Frederiks Alle 22, 8000 Århus C., 8731 2062.

4. Deltagende samarbejdsparter

Københavns Universitet

Institut for Fødevarevidenskab, IFV

Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, LIFE, KU

Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C

Tlf.: 35 33 31 93; Fax: 35 33 31 90

Arla Foods Innovation Centre Brabrand

Rørdrumvej 3, Brabrand

Tlf. 8746 6710

Thise Mejeri

Sundsørevej 62, Thise, 7870 Roslev

Tlf: 9757 8001, Fax: 9757 8122

Alle relevante oplysninger **skal** fremgå af statusrapporten.

Slutrapport samt publikationer og artikler mm. fra hele projektperioden sendes i ét eksemplar til:

FødevareErhverv

Udviklingsstøttekontoret

Nyropsgade 30

1780 København V

University Wisconsin-Madison

Department of Food Science
1605 Linden Drive, Madison, WI 53706-1565, USA
Phone: (608) 262 3046, Fax: (608) 262 6872

Utah State University

Department of Nutrition & Food Sciences
8700 Old Main Hill, Logan, Utah 84322-8700
Phone: (435) 797-2113, Fax: (435) 797-2379

5. Kontaktpersoner

Ylva Ardö, Professor (projektleder)
Institut for Fødevarevidenskab, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet
Rølighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C
Tlf.: 35 33 31 93; Fax: 35 33 31 90; ya@life.ku.dk

Søren K. Lillevang, Arla Foods Innovation Centre Brabrand
soren.k.lillevang@arlafoods.com, direkte tlf. +45 8746 6710, mobile: +45 4050 3922

Henrik Kanstrup, Thise Mejeri
Henrik.Kanstrup@thise.dk, direkte tlf. +45 40328875

Jim Steele, Professor, Department of Food Science, University Wisconsin-Madison
e-mail: jlsteele@facstaff.wisc.edu

Jeff Broadbent, Professor, Department of Nutrition & Food Sciences, UtahState University
e-mail: broadbnt@cc.usu.edu

6. Øvrige projektmedarbejdere

Finn K. Vogensen, Lektor, Fødevaremikrobiologi, IFV, LIFE, KU, fkv@life.ku.dk
Mikael Agerlin Petersen, Lektor, Kvalitet og Teknologi, IFV, LIFE, KU, map@life.ku.dk
Marie P. Jensen, PhD stud. , LIFE, KU , mpj@life.ku.dk
Camilla Varming, Post-Doc, LIFE, KU, cva@life.ku.dk
Mona Østergaard, Laborant, LIFE, KU

Connie Benfeldt, Arla Foods Innovation, Brabrand (1. juli 2005 - 31. jan. 2007)

Janne Kristensen, Thise Mejeri (1. juli 2005 - 31. okt. 2006)

MSc/Specialstuderende i projektet ved LIFE, KU:

Helle Tind Kristensen

Jørgen Slot

Anne Braun

Marta López Villellas

Mario Augustin Rodriguez Fraticelli

7. Projektets start- og slutdato: 1. juli 2005 - 31. juli 2009

8. Slutrapport: (maks. 4-6 sider)

A. Sammendrag af projektets formål og af projektets indhold i henhold til den godkendte projektansøgning:

Projektet undersøgte de nødvendige grundvidenskabelige kriterier for, at modningskulturer af *Lb. helveticus* kan bruges innovativt til udvikling af nye halvfaste og faste ostetyper med forbedrede smags- og konsistensegenskaber, specielt lavfedtholdige oste. Dermed imødekommes forbrugernes ønsker om ostetyper med forskellige smagsprofiler, god konsistens og lavt fedtindhold. Osteproducenterne vil kunne benytte resultaterne til at udvikle nye produkter med stort potentiale både på det nationale og internationale marked.

B. Projektets resultater og konklusion:

Projektet har givet resultater omkring stammevariation hos *Lb. helveticus* i forhold til genetiske og fysiologiske egenskaber, samt effekter i ost:

Kulturer og stammer af *Lb. helveticus*

- En kultiverbar *Lb. helveticus* stamme blev isoleret fra moden ost lavet med mesofil starter og *Lb. helveticus* ved at benytte en ny metode. De molekylære typningsmetoder, pulse field gel electrophoresis (PFGE) og repetitiv polymerase chain reaction (rep-PCR) kunne differentiere *Lb. helveticus* stammer og benyttes til at udvælge seks forskelligartede stammer. (3, 17)

Genetisk og fysiologisk undersøgelse af *Lb. helveticus*

- Fire gener kodende for proteaser blev fundet, og deres distribution var meget stammeafhængig. Det passede med en høj grad af stammevariation i den kaseinolytiske aktivitet og specificitet, hvor det endvidere blev vist, at proteaserne kun blev udtrykt under dyrkning i mælk og ikke MRS. (4, 6, 13)
- Gener kodende for 13 peptidaser blev fundet, og alle stammerne havde de samme gener og det samme antal kopier. Ligeledes blev det fundet, at stammerne alle havde den samme peptidase specificitet selvom aktivitetsniveauet dog varierede og var i alle tilfælde højest efter opdyrkning i mælk. (5, 16, 18, 12)
- Stammerne havde alle gener kodende for aromatisk og forgrenede aminosyre aminotransferase og aktivitet mod de to slags aminosyrer (højest for de aromatiske) blev også påvist for stammerne med varierende aktivitetsniveau og varierende indflydelse af dyrkningsmedie. En af stammerne havde ikke genet, der koder for Asp aminotransferase, og denne stamme kunne heller ikke transaminere Asp. (5, 16)
- I sammenhæng med den høje aminotransferase aktivitet mod de aromatiske aminosyrer blev der fundet en meget høj α -ketosyredehydrogenase aktivitet mod phenylpyruvat (Phe) for alle stammer imens aktiviteten mod α -ketoisocaproat (Leu) var lav. Endvidere havde stammerne gener, som kodede for fosfatase og esterase aktivitet og disse enzymaktiviteter blev også påvist i stammerne. (20)
- Screening for antimikrobiel aktivitet viste, at blandt 19 *Lb. helveticus* stammer havde fem stammer antimikrobiel aktivitet mod termofile lactobacilli, syv stammer kunne inhiberes og de sidste syv stammer var resistente. Endvidere kunne stammerne inhibere starter kulturer, men det skyldtes udelukkende produktion af organisk syre. (2)

Effekt af *Lb. helveticus* i ost

- Syv oste fra markedet med det tilfældes, at de var lavet med mesofil starter og *Lb. helveticus* som modningskultur, havde karakteristiske peptid- og aminosyresammensætning i forhold til oste lavet med en *Lactococcus* som modningskultur, mens aromastofsammensætningen mere

var afhængig af ostetype. En metode til at kvantificere aromastoffer blev udviklet, som tog højde for fedtindholdet i ostene. GC-olfactometri blev brugt til at identificere lugtaktive flygtige komponenter i ostene. (1, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15)

- Et ostningsforsøg med Danbo 45+ blev udført i pilotskala, hvor tre stammer, udvalgt fordi de havde meget forskellige enzymaktiviteter, blev tilsat. De tre stammer øgede alle kasein nedbrydningen, peptidhydrolysen og mængden af aminosyrer, mens aminosyre- og aromastofsammensætningen ændredes afhængigt af stamme. Den stammeafhængige indflydelse på aminosyre- og aromastofsammensætningen kunne korreleres til de fundne enzymaktiviteter *in vitro*. (10)

Overordnet kan det på baggrund af dette projekt konkluderes, at specifikke *Lb. helveticus* stammer kan udvælges som modningskultur afhængig af den ønskede effekt i ost som for eksempel: acceleration af modning; mindre bitterhed; smagsforstærkning og nye smage/aromaer. (22)

C. Projektets faglige forløb:

Projektet blev gennemført efter den oprindelige plan med seks faser, a-f (se neden). Indholdet blev tilpasset resultater undervejs på en måde der er beskrevet i afsnit ”J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater”.

a. Valg af kulturer og stammer af *Lb. helveticus*

Lb. helveticus-stammer vælges fortrinsvis fra de mange tilgængelige kulturer, der findes på markedet. Herved bruges resultater fra tidligere forsøg med *Lb. helveticus*-stammer samt information i litteraturen specifikt om de pågældende stammer og generelt om *Lb. helveticus*. Vi regner med at udvælge omkring syv til ti kulturer med forskellige profiler og egenskaber.

b. Nøgleenzymer i *Lb. helveticus* bag forskellige effekter i ost

Enzymer af interesse for ostemodning og især aromadannelse skal identificeres og karakteriseres for forskellige stammer og kulturer. Resultater fra tidligere forsøg samt nye ostningsforsøg og ostanalyser skal bruges til at identificere hvilke enzymsystemer, der er mest hensigtsmæssige at undersøge. Screeningsmetoder for enzymaktiviteter i forskellige stammer og kulturer skal udvikles. Enzymer med egenskaber der gør, at de er velegnede til udvælgelse af *Lb. helveticus* stammer, vil blive nærmere undersøgt.

c. Kriterier for udvalgte *Lb. helveticus*-stammer til specifikke effekter i ost

Metoder til at analysere specifikke enzymer og systemer af enzymer skal undersøges og udvikles for at kunne afgøre hvilke stammer eller kulturer af *Lb. helveticus*, der bedst egner sig til at bidrage til udvikling af forskellige karakteristika i ost. Af interesse er metoder for aktivitets- og kinetikanalyser samt brug af genprober, fluorescens, laser scanning mikroskopi, immunologi, affinitets- og anden kromatografi, sekventering og sammenligning med *Lb. helveticus*-genomdatabase.

d. Effekter af *Lb. helveticus* i faste og halvfaste oste.

Aromakomponenter skal analyseres i oste produceret med *Lb. helveticus*. Resultaterne herfra vil benyttes til at identificere mulige metaboliske veje og enzymer i *Lb. helveticus* ansvarlige for produktionen af aromakomponenter i ost. Forskellige *Lb. helveticus* stammer undersøges med hensyn til primær proteolyse af kaseinnetværket og produktionen af bitre peptider. Herudover undersøges de peptidolytiske aktiviteter for nedbrydning af de bitre peptider og frigørelse af aminosyrer. Uønskede bivirkninger såsom afvigende smag, misfarvning og luftdannelse skal også undersøges. Både laboratorieforsøg og ostningsforsøg vil blive udført.

e. Stimulering af smagsdannende bakterieaktiviteter i ost ved *Lb. helveticus*

Laboratorieundersøgelser planlægges for at studere virkningen af den accelererede aminosyrefrigørelse induceret af *Lb. helveticus* på andre ostekulturer med betydning for

smagsdannelse som f.eks. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *cremoris*, *Leuconostoc cremoris*, *Propionibacterium shermanii*, *Streptococcus thermophilus* og heterofermentative lactobaciller.
f. Rapportskrivning, publicering, formidling

D. For samarbejdsprojekter med flere projektparter redegøres yderligere for:

Projektet blev udført i tæt samarbejde mellem projektdeltagerne fra tre universiteter, to virksomheder og mejeriforeningen. Det løbende arbejde blev koordineret af professor Ylva Ardö ved projektmøder med hele den danske projektgruppe 2 – 3 gange årligt, med de amerikanske samarbejdspartner 1 – 2 gange årlig og med de tre deltagende faggrupper på LIFE, KU ca. hver 6:e uge. Styregruppemøder blev organiseret af Mejeriforeningens to gange årlig, ved hvilke projektets forløb og resultater blev diskuteret med repræsentanter fra industrien, Mejeriforeningen og forskere fra andre institut, fra KU, DTU og Århus universitet. Alle parter i projektet har opfyldt deres økonomiske tilsagn. Alt forskningsarbejde som blev udført på universiteterne i USA er betalt af dem. Der er ikke kommet noget kommercielt ud af projektet.

E. Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:

Da projektet må anses for at være grundlagsskabende forskning, er der ikke forventninger om specifikt udviklede produkter i forbindelse med projektet. Imidlertid forventes det, at resultater fra projektet skal kunne bruges ved udvikling af nye faste ostesorter, herunder lavfedtholdige oste. Disse oste må have et potentiale både nationelt og internationalt. Videnskabeligt er der ny viden af stor betydning om stammevariation for forskellige enzymsystemer i *Lb. helveticus*, der kan bruges til styring af smagsdannelse i forskellige retninger. Fysiologiske og genetiske analysemetoder er udviklet og evalueret til brug for karakterisering af andre stammer end de i projektet i forhold til de ønskede effekter i ost. Nye undersøgelser er meget relevante for hvordan de pågældende kulturer skal behandles i hvert trin fra opformering af kulturen, tilsætning til ostemælken, den videre ostningsproces og modningsforhold for optimal udvikling af de ønskede egenskaber i de nye ostesorter.

F. For forskningsprojekter suppleres med:

Projektet er gennemført i frugtbart samarbejde mellem tre universiteter, af hvilke et i Danmark (KU) og to i USA (UVM, UU) samt to mejerivirksomheder (Arla Foods og Thise mejeri) og Mejeriforeningen (MFF). På KU deltog forskere fra tre faggrupper (Mejeriteknologi, Fødevarer mikrobiologi og Kvalitet og Teknologi) med forskellige kompetencer. Derudover er MSc studerende tilknyttet af hvilke to fra Danmark, to fra Spanien og en fra Tyskland.

Projektet har uddannet en PhD studerende, Marie Penderup Jensen, der var udstationeret på University of Wisconsin i 3 måneder i 2006 og en post-doc, Camilla Varming. Projektets medarbejdere har været en del af NordForsk-netværket NordOst, "Biochemistry during maturation of cheese varieties of the Nordic countries related to health, flavour and texture" og deltaget i 5 workshops, 2 PhD-kurser og 2 symposia i Finland, Estland, Letland, Litauen, Norge og Danmark.

Engelsk resumé:

Use of *Lactobacillus helveticus* in the development of new semi-hard cheese varieties

The project investigated the basic scientific criteria for innovative use of *Lactobacillus helveticus*, which are known from hard cheeses like Emmental, as ripening cultures in new semi-hard cheese varieties with enhanced flavour and structure, with special emphasis on low-fat cheeses. The purpose was to study the criteria that are important for using *Lb. helveticus* as adjunct in the development of new cheeses.

Lb. helveticus is a thermophilic lactic acid bacterium that has a broad collection of enzymes that in concert hydrolyse casein and casein derived peptides into free amino acids and catabolise these into aroma compounds further into aroma compounds and thus have the potential for introducing specific characteristics in cheese. Six *Lb. helveticus* strains out of a total of 19 strains were selected mainly based on repetitive PCR profiles of the strains for further studies.

A large degree of strain variation in the caseinolytic activity and specificity was found, which was complemented by the large heterogeneity in the distribution of genes encoding proteases among the strains. Aminopeptidase activities releasing amino acids from the casein derived peptides had only quantitative variation between strains, which all contained the same vast selection of genes encoding peptidases. The six strains all contained genes encoding aromatic amino acid and branched chain amino acid aminotransferases to further breakdown the amino acids into aroma compounds, while specific activity on other amino acids was strain dependent.

The use of *Lb. helveticus* in commercially available cheeses could be demonstrated by characteristic peptide profiles, and specific effects on amino acid composition were also found. The commercially available cheeses made the basis for developing a GC method to quantify aroma compounds in cheese as well as identifying which are relevant for the flavour of the cheeses.

Three *Lb. helveticus* strains with different levels in their enzymatic activities were tested in cheese making experiments, and their effect on ripening were consistent with the specificities and levels of enzymatic activities of the strains found *in vitro*. In these experiments, the strain that improved flavour quality most during ripening had an overall low level in its enzymatic activities, while the strain with the overall highest enzymatic activity level produced off-flavours.

This project has increased our knowledge about strain variation in the capacity of *Lb. helveticus* to degrade casein, casein derived peptides and amino acids as well as contribution to flavour formation. It has clarified the importance of a well balanced enzyme system for flavour development during cheese ripening. Strains of *Lb. helveticus* with specific properties were identified, which may be used, independently to induce different characteristics to cheese, such as removal of bitter flavour, introduction of new flavour notes or enhance structure of low-fat cheese.

G. Redegørelse for projektets perspektiver:

Se E, Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning

H. Projektets økonomiske forløb:

Projektet blev forlænget indenfor oprinderligt budget; ellers ingen afvigelse. Alle parter har opfyldt deres økonomiske forpligtigelser.

I. Liste over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet:

Artikler i videnskabelige tidsskrifter med referee

1. Ardö, Y., Pripp, A.H. & Lillevang, S.K. 2009. Impact of heat-treated *Lactobacillus helveticus* on bioactive peptides in low-fat, semi-hard cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 64: 58-62
2. Jensen, M.P., Braun, A., Vogensen, F.K. & Ardö, Y. 2009 Study of antimicrobial activity among *Lactobacillus helveticus* strains using three different assays. *Annals of Microbiology*, 59, 187-190
3. Jensen, M.P., Ardö, Y & Vogensen, F.K. 2009. Isolation of cultivable thermophilic lactic acid bacteria from cheeses made with mesophilic starter and molecular comparison with dairy-related *Lactobacillus helveticus* strains. *Letters of applied microbiology*, 49: 396-402
4. Jensen, M.P., Vogensen, F.K. & Ardö, Y. 2009. Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *International Dairy Journal*, 19:661-668
5. Jensen, M.P. & Ardö, Y. (In Press). Variation in aminopeptidase and aminotransferase activities of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *International Dairy Journal*
6. Smeianov, V.V., Wechter, P., Broadbent, J.F., Hughes, J.E., Rodríguez, B.T., Christensen, T.K., Ardö, Y. & Steele, J.L. 2007. Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:26661-2672

Planlagte publikationer

7. Jensen, M.P. & Ardö, Y. (manus) Characterisation of commercially available cheeses made with mesophilic starter and *Lactobacillus helveticus* as adjunct. I. Composition of peptides and amino acids
8. Varming, C., Petersen, M.A., Skov, T.H. & Ardö, Y (manus) Characterisation of commercially available cheeses made with mesophilic starter and *Lactobacillus helveticus* as adjunct. II. Quantification of Aroma Compounds
9. Varming, C., Petersen, M.A. & Ardö, Y. (manus). Key aroma compounds in cheeses produced with *Lactobacillus helveticus* analysed by GC-olfactometry.
10. Jensen, M.P., Bakman, M., Vogensen, F.K., Lillevang, S.K. & Ardö, Y. (manus) Influence of different *Lactobacillus helveticus* adjunct cultures on ripening of semi-hard cheese studied in pilot plant experiments

Abstract til præsentationer ved videnskabelige kongresser og symposia

11. Varming, C., Petersen, M.A. & Ardö, Y. 2007. Key Aroma Compounds in cheeses produced with *Lactobacillus helveticus*. NordForsk Symposium on Potential of *Lactobacillus* in Northern European cheeses, Tallinn 23-25 april 2007. Abstract book, 10-12
12. Jensen, M.P., Vogensen, F.K. & Ardö, Y. 2007. Peptidase activities in different strains of *Lactobacillus helveticus*. Poster abstract. ECCE/LMC, Copenhagen
13. Jensen, M.P., Slot, J. & Ardö, Y. 2008. Caseinolytic Activity of *Lactobacillus helveticus* Studied in a Cheese Model. IDF 5th symposium on Cheese Ripening, Bern 2008. Abstract book

14. Petersen, M.A., Kristensen, H.T. & Ardö, Y. 2008. Aroma formation in a cheese model system by different *Lactobacillus helveticus* strains. Abstract to Weurman flavour symposium, Schweiz 2008
15. Petersen, M.A., Kristensen, H.T., Bakman, M., Jensen, M.P. & Ardö, Y. 2008 Aroma formation in a cheese model system by different *Lactobacillus helveticus* strains. Poster at the 12th Weurman Symposium
16. Broadbent, J., Thompson, R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L., Steele, J.L., Cai, H., Ardö, Y., Vogensen, F.K., Thompkins, T.A., Hagen, K., Altermann, E. 2008. Proteolysis in lactobacilli: applications in food and health. *Proceedings of Symposium on Lactic Acid Bacteria - health, evolution and system biology*, IL10
17. Vogensen, F.K., Jensen, M. P. and Ardö, Y. 2008. Strain stability and strain typing of *Lactobacillus helveticus*. *Proceedings of Symposium on Lactic Acid Bacteria - health, evolution and system biology*, A 043
18. Broadbent, J., Thompson, R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L., Steele, J.L., Cai, H., Ardö, Y., Vogensen, F.K., Thompkins, T.A., Hagen, K., Altermann, E. 2008. Comparative genome analysis of the obligately homofermentative lactic acid bacterium *Lactobacillus helveticus*. *Proceedings of Symposium on Lactic Acid Bacteria - health, evolution and system biology*, A063
19. Petersen, M.A., Kristensen, H.T., Bakman, M., Jensen, M.P. & Ardö, Y. 2009 Aroma formation in a cheese model system by different *Lactobacillus helveticus* strains. *Proceedings of the 12th Weurman Symposium*. In Press
20. Jensen, M.P. & Ardö, Y. 2009. A comparison of enzymatic activities of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus casei* with potential to improve ripening of low fat cheese. Poster at NordForsk Symposium on Health Aspects on Cheese, Oscarsborg, Drøbak, Norge

Populærvidenskab

21. Jensen, M.E.P. Varming, C., Vogensen, F.K., Petersen, M.A., Ardö, Y. 2006. Brug af *Lactobacillus helveticus* til udvikling af nye, spændende faste og halvfaste ostesorter. *Mælkeritidende*, 8: 190-193

PhD afhandling

22. Marie P. Jensen. 2009. Characterisation of *Lactobacillus helveticus* strains in relation to casein degradation in cheese. LIFE, KU

Studerenderapporter

23. Christina Axel, Silja Kej Diemer & Helle Bundgaard Vegger. 2006. Characterisation of a *Lactobacillus helveticus* proteinase of importance to cheese ripening. MSc course (7.5 ECTS): Food Enzymes and Application. KVL, Department of Food Science
24. Helle Tind Kristensen, Anna Frisenfeldt Horn & Anne Skov Jørgensen. 2006. Characterisation of semi-hard cheeses produced with *Lactobacillus helveticus*. Thematic Course (15 ECTS): Sensory analysis, Aroma and Chemometrics. KVL, Department of Food Science

25. Jørgen Slot. 2007. Strain variation in proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus* with impact on cheese ripening. MSc Thesis (30 ECTS). IFV, LIFE-KU.
26. Helle Tind Christensen. 2007. Aroma profiles of different strains of *Lactobacillus helveticus* studied in a cheese model system. MSc Thesis (45 ECTS). IFV, LIFE-KU.
27. Anne Braun. 2008. The antimicrobial activity and susceptibility of different *Lactobacillus helveticus* strains. Student project (15 ECTS). IFV, LIFE-KU.
28. Marta López Villellas. 2008. Study of aroma formation and amino acid composition in a semi-hard cheese. Student project (30 ECTS). IFV, LIFE-KU.
29. Mario Augustin Rodriguez Fraticelli. 2009. Study of aroma compounds in semi-hard cheeses with adjunct strains of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, ATCC15009 and MI2359. Student project (15 ECTS). IFV, LIFE-KU.

I pressen:

Riising, T. 2005, Forsker på landbohøjskolen udvikler ny fedtfattig ost. Børsen

J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater (maks. 5 A4-sider):

Alle projektets fem faser (a – e) blev udført i tæt samarbejde mellem flere af projektdeltagerne og arbejdet blev koordineret ved projektmøder med hele den danske projektgruppe 2 – 3 gange årligt, med de amerikanske samarbejdspartner 1 – 2 gange årlig og med de tre faggrupper på LIFE, KU ca. hver 6. uge. Resultat af projektets fem faser a - e er beskrevet nedenfor.

a. Valg af kulturer og stammer af *Lb. helveticus*

Omkring 30 *Lb. helveticus*-stammer blev samlet fra forskellige kultur-leverandører og bakteriebanker samt isoleret fra ostekulturer og fra ost. Forskellige versioner af to stammer af *Lb. helveticus* stammer, seks af CNRZ 32 og tre af CNRZ303, der blev opbevaret op til 33 år på forskellige laboratorier i Frankrig, USA, Sverige og Danmark blev undersøgt for stammestabilitet. En metode til at isolere termofile bakterier fra faste oste, der indeholder hovedsageligt mesofile bakterier (ca. 100 000 gange flere eller mere), blev udviklet og brugt til isolering af *Lb. helveticus* til de videre forsøg. Rep-PCR (repetitive polymerase chain reaction) og PFGE (pulse field gel electrophoresis) blev brugt til at klassificere, og partiel sekventering af 16S rRNA til at artsbestemme stammerne. Af de der var isoleret fra faste oste var kun en *Lb. helveticus*, medens de andre var *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum* og *Enterococcus faecium*. Af alle de undersøgte kulturer blev kun 60 % vist at være enkeltstammer af *Lb. helveticus*. Fra disse blev seks forskellige *Lb. helveticus* stammer udvalgt til studier af fysiologiske og genetiske egenskaber samt deres rolle i ost. Til undersøgelser af antimikrobiel effekt blev yderligere 13 stammer brugt.

b. Nøgleenzymer i *Lb. helveticus* bag forskellige effekter i ost

Enzymer af interesse for ostemodning og især aromadannelse (Tabel 1) blev identificeret og karakteriseret for de seks udvalgte forskellige stammer af *Lb. helveticus* (se ovenfor).

Tabel 1. Enzymer der blev undersøgt i projektet. For gener, der ikke var tilstede i genomet for *Lb. helveticus* CNRZ 32, er det ikke muligt at afgøre om de er tilstede i de andre stammer, eftersom alle stammernes DNA blev sammenlignet med genomet for CNRZ 32

Enzymer	Forventet rolle
<u>1. Proteinnedbrydning og aminosyrefrigørelse</u> a. Proteaser (4 forskellige) b. Aminopeptidaser, (PepN, PepX, etc.) c. Fosfataser	a. Accelereret modning, dannelse af bitter smag, konsistensforandringer b. Fjernelse af bitter smag, accelereret aromadannelse, konsistensforandringer c. Accelereret peptidnedbrydning, konsistensforandringer, energi
<u>2. Aroma fra aminosyrenedbrydning</u> a. ArATase, BcATase, MetAT, AspAT b. α -ketosyredehydrogenaser c. α -ketosyredekarboxylaser d. asparginase e. GDH – ikke i CNRZ32 genomet f. Gln syntetase – i alle stammers genomet	a-d. Metabolisk dannelse af aromakomponenter e-f. Regenerering af co-substrat til smagsdannelse; pH-regulering
<u>3. Anden smagsudvikling</u> Esteraser	Frugtsmag og skarp smag
<u>4. Enzymatiske ostefejl</u> Tyrosinase – ikke i CNRZ32 genomet	Misfarvning

Aktivitet og specificitet af proteolytiske enzymer er studeret i de seks udvalgte stammer som blev dyrket i et substrat rigt på peptider (MRS), eller i skummet mælk (SM), der blev mikrofiltreret og pasteuriseret eftersom sterilisering af mælken ødelægger kaseinerne. Aktiviteten i nedbrydningen af α_{S1} - og β -kasein var både stammeafhængig og afhængig af hvilket substrat stammerne havde vokset i. Kun de to stammer *Lb. helveticus* CNRZ32 og LHC2, og kun hvis de var dyrket i SM, var i stand til effektiv nedbrydning af kaseinerne. Specificiteten i nedbrydningen af α_{S1} -kasein var ens for de to stammer, men varierede ved nedbrydning af β -kasein. Resultaterne viste, at der er flere proteaser i *Lb. helveticus* stammerne, hvilket også blev vist i DNA microarray-analyserne. Fire forskellige gener for proteaser er vist at være tilstede i CNRZ 32, og de seks stammer, der er udvalgt i projektet, har forskellig sammensætning af dem. Som følge heraf er proteolytisk aktivitet overfor kasein stammeafhængig og meget forskellig mellem de seks stammer.

Der blev fundet gener for 13 forskellige aminopeptidaser, af hvilke flere er tilstede mere end en gang (totalt 27 gener), og det var eksakt det samme i alle de seks stammer. Specificiteten af enzymaktiviteter i cellefrie ekstrakt fra stammerne, efter at cellerne blev dyrket i SM eller MRS, var også de samme for alle stammer, og kun i aktivitets-niveauerne var der stammevariation. For alle stammer var aktiviteterne højere i ekstrakt fra celler dyrket i SM end i MRS.

Gener for seks forskellige aminotransferaser blev fundet i fire af stammerne, medens to af de seks stammer manglede den ene, og en af stammerne den anden af dem. Analyser af enzymaktiviteter i cellefrie ekstrakter bekræftede billedet, og der blev vist stor variation i evnen til at transaminere forskellige aminosyrer. Analyser af aminotransferaser viste at der var aktivitet mod 13 af 20 testede aminosyrer. Alle de seks stammer kataboliserede de aromatiske aminosyrer (Tyr, Phe, Trp) med højest aktivitet, og aktiviteten var højere efter vækst i MRS end i SM. De forgrenede aminosyrer (Leu, Ile, Val) blev også kataboliseret af alle stammerne, og aktiviteten var uafhængig af vækstmedium. Fem stammer var aktive mod Met, medens aktivitet mod Asn, Asp, Lys, Gln, His and Pro var tilstede for fire af stammerne, og det kun efter vækst i MRS.

Ved indledende forsøg blev det fundet, at alle stammerne indeholdt α -ketosyre-dehydrogenaser, som benyttede oxaloacetat (fra Asp), phenylpyruvic acid (fra Phe) og α -ketomethiolbutyrat (fra Met) men kun lidt og kun nogle stammer benyttede α -ketoisocaproat (fra Leu) som substrat. Yderligere forsøg blev lavet med phenylpyruvic acid og α -ketoisocaproat, ved brug af både co-factor NADH og co-faktor NADPH, og alle stammer viste meget høj aktivitet mod phenylpyruvic acid ved brug af NADH (men ikke NADPH), medens aktivitet mod α -ketoisocaproat var meget begrænset uafhængigt af co-faktoren.

GDH (glutamatdehydrogenase) aktivitet, der regenerer α -ketoglutaric acid til Glu ved brug af NAD^+ eller NADP^+ blev ikke vist i nogle af stammerne, og genet var heller ikke tilstede i *Lb. helveticus* CNRZ 32 (og derfor ikke mulig at analysere i de andre stammerne). Aktivitet af laktatedhydrogenase (LDH) var høj i alle stammer og både NADH og NADPH blev brugt. Sur fosfatase aktivitet var tilstede i alle stammer med tre gange højere aktivitet i CNRZ 32 (den højeste) end i MI 2275 (den laveste). Alle stammer havde esteraseaktivitet mod p-nitrophenyl (pNA) -butyrat, og kun en stamme (CNRZ 32) frigjorde caprylate, og ingen af stammerne havde aktivitet mod pNA-palmitate.

c. Kriterier for udvalg af *Lb. helveticus*-stammer til specifikke effekter i ost

I det følgende beskrives de studier, der blev udført ved brug af genetiske metoder som kunne bruges til bl.a. at identificere kriterier til at udvælge kulturer.

DNA fra de seks *Lb. helveticus* stammer blev ekstraheret, og ved brug af DNA microarray teknik blev tilstedeværelsen af relevante enzym-gener undersøgt i forhold til *Lb. helveticus* CNRZ 32, som blev færdigsekventeret i løbet af projektet. Disse analyser blev udført ved Utah State University, USA og University of Wisconsin, Madison, USA. Mindst 4 forskellige cellebundne proteaser (Prth, Prth2, Prth3, Prth4 eller 5) er blevet identificeret i *Lb. helveticus* CNRZ 32, og forekomsten af dem varierede på en måde, som forklarer de forskelle i specificitet der blev vist i undersøgelserne af nedbrydning af kasein beskrevet ovenfor. Mindst 13 gener (flere med en kopi eller mere) for aminopeptidaser var tilstede i alle de seks stammer. Gener, der koder for aminotransferaser med specificitet mod hhv. aromatiske eller forgrenede aminosyrer, blev fundet i alle seks stammer. Aspartat aminotransferase blev identificeret i alle stammerne på nær *Lb. helveticus* MI 2275, som sammen med *Lb. helveticus* LHC2 også manglede gener, der koder for glutamine amidotransferase. *Lb. helveticus* CNRZ 303 og MI 2359 udskilte sig ved ikke at have gener, som koder for fosfoserin aminotransferase samt serin dehydratase. Forskelle blandt stammerne blev også fundet i deres kulhydrat metabolisme, som stemte overens med det kulhydrat-fermenteringsmønster, der blev fundet for stammerne vha. API 50CH systemet.

Microarray dataene viste endvidere, at alle stammer havde gener, der koder for phosphoesterase, esterase, metallo-phosphoesterase, lipaser og phospholipase.

Den store variation i protease- og aminotransferaseaktiviteter hos stammerne, der alle har stort potentiale til at accelerere frigørelse af aminosyrer, gør det muligt at vælge stammer efter ønsket

effekt i osten – f. eks. forbedre konsistens, modvirke bitter smag eller stimulere starterbakterier uden at introducere nye smagskomponenter og alternativt at påvirke aromadannelsen i forskellige retninger.

d. Effekter af *Lb. helveticus* i faste og halvfaste oste

Ved analyse af oste på markedet med *Lb. helveticus*, ostemodelforsøg, pilotostninger og osting i kommerciel skala blev effekter af *Lb. helveticus* undersøgt. Effekter på nedbrydning af kasein, frigørelse af aminosyrer og dannelse af aromakomponenter blev analyseret og sensoriske egenskaber blev undersøgt.

ANALYSE AF OSTE FRA MARKEDET

Indledningsvis blev 11 oste fra markedet analyseret, hvoraf 7 var lavet med *Lb. helveticus* og 3 med *Lactococcus* kultur for at accelerere modningen, og en var en ung Samsø med reduceret fedtindhold og uden modningskultur. Karakteristiske peptidprofiler og et højt indhold af aminosyrer vidnede om en fremskreden modning i alle ostene undtagen den unge Samsø 30+. Større peptider blev kun vist i fem af ostene, og ostene uden *Lb. helveticus* lignede Samsø 30+ osten meget. To peptider, som tidligere er vist at være karakteristiske for oste med *Lb. helveticus*, blev kun identificeret i oste med *Lb. helveticus*.

Samsø-osten havde et signifikant lavere indhold af aminosyrer (op til ti gange så lavt) end de andre ti oste. Længere modningstid kan ikke alene forklare denne forskel, da det maksimalt ville kunne give et to til tre gange så højt aminosyre indhold. Sammensætningen af de forskellige aminosyrer var også forskellig i ostene, og ved brug af principal komponent analyse (PCA) af aminosyresammensætningen blev ostene inddelt i tre grupper: Samsø 30+, oste med *Lactococcus* kulturer og oste med *Lb. helveticus* kulturer. Ostene med *Lactococcus* kulturer lignede Samsø 30+ mest og kunne karakteriseres ved højere relative koncentrationer af Asn, Leu og Phe og lavere af Pro og Lys end oste med *Lb. helveticus* kulturer.

Aromakomponenter i de 11 oste blev analyseret med gaskromatografi-masspektrometri (GC-MS). Nogle aromastoffer co-eluerede, men var mulige at evaluere statistisk med PARAFAC2. Resultater fra den anvendte metode er givet i normerede integrerede arealer, hvilket kun giver muligheder for at sammenligne indhold af den samme komponent i forskellige oste, og ikke at gøre støkiometriske kalkuler fra indholdet i mol per Kg i en ost. En kvantitativ metode blev udviklet ved, at suspensioner af tre af ostene med forskelligt fedtindhold blev tilsat 60 aromakomponenter i to blandinger og 4 koncentrationer af hver blanding. Resultaterne viste linearitet for de fleste af stofferne, dog med nogle undtagelser. For nogle af aromastofferne var der sammenhæng mellem hydrofobicitet og ostens fedtindhold (således at hældningen afhang af til hvilken af de tre oste aromastoffet var tilsat). Kvantificering af aromastoffer i de 11 kommercielle oste blev lavet ved hjælp af referencekurverne. I tilfælde med ens hældninger for de tre oste udførtes regressioner baseret på alle tre oste, og i tilfælde hvor der var forskellige hældninger anvendtes individuelle hældninger afhængig af ostens fedtindhold. PCA analyse af indhold af aromastoffer i de 11 oste viste, at modningen af oste tilsat *Lactococcus* respektive *Lb. helveticus* kulturer var accelereret i forskellige retninger.

Tre af de elleve oste blev udvalgt til GC-olfaktometrisk analyse (GC-O eller GC-SNIFF), så det samlede indhold af aromakomponenter i de elleve oste blev repræsenteret så godt som. GC-O analyserne blev udført vmd 8 dommere. I alt observeredes 36 lugte, hvoraf 16 var til stede i alle 3 oste. Af de 36 lugte kunne 26 identificeres, og blandt disse var flere aminosyreafledte forbindelser. Også estere, laktoner og aldehyder var blandt de identificerede aromastoffer. Det var ikke muligt at bruge resultaterne til at beskrive alle 11 oste, fordi at en så stor del af de lugtaktive stoffer ikke

kunne identificeres, det vil sige, at de var tilstede i koncentrationer under deres detektionsgrænse ved GC-MS.

De sensoriske egenskaber for 6 af de 11 oste blev analyseret af et studentpanel. Sød, nøddeagtig, og karamel-smag var typisk for de ældste fire oste med *Lb. helveticus*, og disse smage kunne relateres til stoffer fra aminosyrenedbrydning (3-methyl-1-butanol, benzaldehyde, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-butanal, 3-(methylthio)-propanal og phenylacetaldehyde).

OSTEMODELFORSØG

De seks *Lb. helveticus* stammers indflydelse på aromaproduktion blev undersøgt ved en Samsø ostemodell. Både levende celler og cellefrie ekstrakter af hver stamme blev undersøgt i ostemodellen, som var lavet af henholdsvis en 9 dage og 13 uger gammel Samsø. Efter 4 ugers lagring af ostemodellerne tilsat levende celler afslørede sensoriske analyser forskellig smagsudvikling afhængigt af den tilsatte *Lb. helveticus* stamme. Aromastofindholdet i ostemodellerne blev analyseret efter henholdsvis 2 og 4 ugers lagring ved 20 °C, og aromaprofilerne varierede for de anvendte stammer, og der sås en effekt af alder af den Samsø, ost som modellerne blev lavet af.

Modeloste blev også brugt i en undersøgelse af de seks stammers proteaseaktivitet sammen med de samme stammer opdyrket i rekonstitueret skummet mælk. Disse ostemodeller blev lavet af en 2 uger gammel Samsø og lagret i 2 og 4 uger ved 20 °C. Modelostene blev analyseret vha. kapillar elektroforese (CE) og omvendt-fase HPLC. CE viste ikke særlig meget proteolytisk aktivitet ved tilsætning af stammerne til modelostene på nær dannelsen af en ny top i et par af dem.

Peptidprofilerne analyseret ved HPLC viste, at de levende celler dyrket i MRS gav den mest effektive nedbrydning i modelostene. Dette kan skyldes, at stammerne lyserede nemmere, når de var dyrket i MRS i forhold til i mælk. Herudover var nedbrydningen af peptiderne afhængigt af stamme.

PILOTOSTNINGER

Ostningsforsøg er lavet i pilotskala hos Arla Foods Innovation i Brabrand med tre udvalgte stammer. I et første forsøg blev ostene lagret ved to forskellige temperaturprofiler, den ene af disse både med og uden overflademodningskultur. Der var en tydelig effekt af overflademodningen i form af højere indhold af visse svovlforbindelser, alkoholer, ketoner samt total mængde af frie aminosyrer. Desværre var aktiviteten af *Lactobacillus helveticus* kulturerne, der blev tilsat, ikke høj nok, så inden for lagringsprofilerne sås kun mindre forskelle mellem stammerne i indholdet af de enkelte aromastoffer og aminosyrer. Inden for lagringsprofilerne gav stammerne CNRZ32 og MI 2359 dog et signifikant højere indhold i ostene af 2-heptanon og 2-nonanon end oste med ATCC15099 og kontroloste. Mht. aromastoffer sås flere forskelle mellem stammerne for oste med overflademodning end uden, hvilket tyder på at indflydelsen af *Lb. helveticus* øges ved det højere pH eller andre faktorer forårsaget af overflademodning.

Nye pilotostninger blev udført ved Arla Foods Innovation i Brabrand med de tre udvalgte stammer (CNRZ 32, ATCC 15009 og MI 2359), hvilket overordnet viste at stammernes effekter på nedbrydning af kasein var begrænset, og at effekten især var at finde i omfattende nedbrydning af mindre peptider og frigørelse af aminosyrer. Tilsætning af *Lb. helveticus* øgede hastigheden af peptidnedbrydningen kraftigt. Samtidig ændrede peptidmønstrene sig i forhold til kontrolosten. Dette tyder på, at *Lb. helveticus* både har mere aktive peptidaser og peptidaser med bredere specificitet end starterkulturen. Indholdet af aminosyrer i ostene steg med modningstid, og til alle tider var indholdet større i ostene med de tre *Lb. helveticus* stammer. Alle tre *Lb. helveticus* stammer øgede indholdet af aminosyren prolin proportionalt og mindskede indholdet af leucin og methionin, og evnen til at gøre dette var stammeafhængig. De tydeligste effekter blev i alle sammenhæng opnået ved tilsætning af

stammen CNRZ 32. Efter 21 ugers lagring var der tydelige forskelle i smagen, afhængig af hvilken *Lb. helveticus* stamme der var tilsat. Oste med tilsætning af *Lb. helveticus* udviklede mere af forgrenede aldehyder, forgrenede alkoholer og svovl-komponenter samt mindre af estre end kontroloste uden tilsætning. Oste med CNRZ32 eller MI 2359 fik signifikant højere indhold af dimethylsulfid og forgrenede aldehyder og alkoholer end de andre, mens de med ATCC15009 fik et højere indhold af acetoin, 2-butanone og 2-butanol.

OSTNINGSFORSØG I KOMMERCIEL SKALA

Ostningsforsøg i fuld skala med *Lb. helveticus* ATCC 15009 i Danbo 45+ oste med overflademodning blev udført på Thise mejeri. To kar med økologisk og to med konventionel mælk blev ostet respektive med og uden tilsætning af *Lb. helveticus* kultur. Peptidprofiler og totalindhold af aminosyrer og smag påvirkedes i den forventede retning, men lugt og smag fra overfladesmodningen dominerede helt i de modne oste.

e. Stimulering af smagsdannende bakterieaktiviteter i ost med *Lb. helveticus*

Antimikrobiel aktivitet af 19 forskellige *Lactobacillus helveticus* stammer er blevet undersøgt. Ud af disse udviste især tre stammer stor antimikrobiel aktivitet imod de resterende 16 *Lb. helveticus* stammer samt *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stammer. Yderligere undersøgelse af de tre *Lb. helveticus* stammer viste, at deres antimikrobielle aktivitet skyldtes et proteinagtigt stof med aktivitet i pH området 3 – 8, og som blev inaktiveret ved temperaturer højere end 55 °C. En af *Lb. helveticus* stammerne udviste endvidere tegn på at indeholde mere end et aktivt antimikrobielt stof. Der var ingen antimikrobiel aktivitet imod *Lb. casei*, *Lactococcus* og *Leuconostoc* hvis man ser bort fra indflydelsen af lav pH.

Der blev ikke tid til at som planlagt lave specifikke undersøgelser af hvordan kraftigt forøget indhold af aminosyrer i osten stimulerer aktiviteter af forskellige mikroorganismer.

9. Underskrifter og dato (suppleret med navn, titel og institution/virksomhed i blokbogstaver):

_____ den _____

_____ den _____

_____ den _____

_____ den _____