

Afslutningsrapport

Fysiologi, økologi og resistensforhold hos skimmelsvampe
tilknyttet mejeriprodukter, især osteprodukter

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-15

Marts 1998



mejeriforeningen

danish dairy board

Mejeriforeningen

Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet

Fysiologi, økologi og resistensforhold hos skimmelsvampe tilknyttet mejeriprodukter, især osteprodukter.

Medarbejdere:

Lektor, Ph.D., Per Væggemose Nielsen, (Projektleder). Tlf. 4525 2631. Fax 4588 4922. E-mail: pvn@ibt.dtu.dk

Forskningsadjunkt, Cand. Scient., Biologi, Ph.D. Iben Haasum. Tlf. 4525 2727. Fax 4588 4922. E-mail: ih@ibt.dtu.dk

Forskningsadjunkt, Civilingeniør. Ph.D. Thomas Ostenfeld Larsen. Tlf. 4525 2619. Fax 4588 4922. E-mail: tol@ibt.dtu.dk

Forskningsadjunkt, Civilingeniør, Marianne Skovgaard Nielsen. Tlf. 4525 2727. Fax 4588 4922. E-mail: msn@ibt.dtu.dk

Adresse: Institut for Bioteknologi, Bygning. 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby.

Forord:

Projektets medarbejdere vil gerne takke Mejeriforeningen (Mejeribrugets ForskningsFond), Strukturdirektoratet, Erhvervsfremme Styrelsen og Undervisningsministeriet for økonomisk støtte til projektet. Vi vil også takke Mejeriforeningen for at have vist stor interesse for og opbakning af projektet. De gode diskussioner og den konstruktive kritik, vi fik gennem samarbejdet i styregruppen, er vi også meget taknemmelige for.

Resumé (dansk)

Projektet har vist, at nogle forhold har afgørende betydning for skimmelsvampes overlevelse, vækst, metabolisme og interaktion på oste. Det drejer sig især om substratets vandaktivitet/saltindhold, dets indhold af visse spormetaller (kobber, zink og magnesium) og aminosyrer (glutamin, cystein og alanin) og, specielt for farveudviklingen hos *Penicillium caseifulvum*, dets pH. De vigtigste opbevaringsforhold var kuldioxidniveauet og temperaturen, mens ilt niveauet ned til ca. 3% var uden indflydelse.

Interaktionen mellem de osteassocierede skimmelsvampe var speciel ved, at de øjensynligt voksede fint mellem hinanden (kun konkurrence om plads). Dog kunne *Geotrichum candidum* vokse hen over kontaminanter eller i nogle tilfælde holde dem væk fra ost. Skimmelsvampe-sporers resistens over for desinfektionsmidler varierede noget mellem arter og viser betydningen af anvendelsen af flere midler for at undgå, at de opformerer i produktionen og kontaminerer ostene.

Profilen af flygtige stoffer fra skimmelsvampe er så specifik for de enkelte arter, at den kan udnyttes til en hurtig identifikation af skimmelsvampe associeret til ost.

De opnåede resultater har medvirket til opbygning af en unik videnplatform inden for området, og sikret fundamentet for fortsat samarbejde mellem mykologigruppen og Mejeribruget.

Abstract (English):

This project has shown that some factors are crucial for fungal survival, growth, metabolism and interaction on cheese. In respect to substrate composition mainly water activity/salt content, content of some trace metals (copper, zinc and magnesium), and some amino acids (glutamin, cystein and alanin) and, especially for colour development for *Penicillium caseifulvum*, its pH. The most important storage conditions were the level of carbon dioxide and the temperature, whereas oxygen levels down to 3% were ineffective.

A special kind of interaction exists between the funga associated to cheese, as they apparently only grow well together and only compete for space. However, *Geotrichum candidum* could grow over and in some cases prevent the other fungi from growing on the cheese. The resistance of fungal spores towards disinfecting agents varies between species and demonstrates the importance of using more disinfectants to avoid growth in production facilities and subsequent contamination of cheese.

The profile of volatiles from fungi are species specific and can be utilised for rapid identification of fungi associated to cheese.

The results obtained in this project has been of great importance for developing unique knowledge and skills that can serve as the foundation for future collaboration between the Mycology Group and the Danish Dairy Board.

Formål:

At studere skimmelsvampes **overlevelse, vækst og metabolisme** på ost afhængig af ostens **sammensætning, forarbejdning og opbevaringsforhold**, specielt med henblik på effektiv **kontrol** af skimmelsvampes vækst og metabolisme.

Projektet består af fire delprojekter, som skal afklare betydningen af ostens sammensætning, opbevaringsforhold (ilt, kultveilde, fugt og temperatur), interaktion mellem skimmelsvampe på ost og flygtige stoffer fra skimmelsvampe. Resultaterne fra disse dele skal sluttelig sammenkædes i modeller til forudsigelse af skimmelsvampes overlevelse, vækst og metabolisme på ost.

Baggrund:

En af de vigtigste kvalitetsforringende faktorer for oste er vækst af uønskede skimmelsvampe. Det vides, at skimmelsvampe kan forårsage misfarvninger, ændringer i smag, lugt og konsistens, samt danne toksiske komponenter (mykotoksiner). Samtidig er enkelte skimmelsvampearter meget værdifulde starterkulturer til fremstilling af skimmelmodnede oste, idet skimmelsvampenes evne til at ændre ostens sensoriske og konsistensmæssige egenskaber her udnyttes til produktion af specielle ostetyper.

Kun en meget begrænset gruppe skimmelsvampe er fundet voksende på ost, enten som ønskværdige kultursvampe eller som uønskede fordærvere. Flere af disse skimmelsvampe er kun fundet på ost, mens andre er fundet voksende på flere levnedsmiddeltypen (se afslutningsrapport for "Moderne levnedsmiddelmykologiske metoder i relation til hygiejne" af Filtenborg, O. og Lund, F. 1997). At kun et begrænset antal arter er associeret til oste, gør det muligt systematisk at studere og sammenligne disse arter.

For at kunne styre vækst og metabolisme af skimmelsvampe på levnedsmidler er det vigtigt at forstå deres fysiologi, økologi og resistensforhold; altså hvorledes germination, vækst og metabolisme afhænger af det omgivende miljø (kemisk sammensætning af levnedsmidlet, pH, vandaktivitet, tilsætningsstoffer, temperatur, ilt og kultveilde niveauer i og omkring levnedsmidlet), samspillet og konkurrencen mellem de enkelte arter (interaktion) og deres evne til at overleve konserverings- og pakkeforhold.

Faktorenes betydning afhænger dog af, hvilken vækstfase organismen befinder sig i samt sporens eller myceliets fysiologiske tilstand. Undersøgelserne er derfor udførtes således, at alle vigtige begivenheder i skimmelsvampenes livscyklus er blevet inddraget.

Spiring af sporerne er en nøglebegivenhed i skimmelsvampes livscyklus. Denne begivenhed giver ophav til dannelse af det voksende mycelium. Information om de faktorer, der kontrollerer spiring, er af central betydning for at hindre infektion af levnedsmidler. Dannelse af sporer

(sporulation) ved afslutning af den aktive vækstfase er en anden vigtig begivenhed i skimmelsvampenes livscyklus. Sporene sikrer overlevelse og spredes let til omgivelserne, hvor nye kolonier kan opstå. Effekten af miljøfaktorer på sporedannelsen er derfor endnu et vigtigt område at undersøge.

Udover svampens fysiske tilstedeværelse i produktet er dannelse af sekundære metabolitter (herunder mykotoksiner og flygtige stoffer) en anden vigtig følge af svampevækst. Produktion af disse forbindelser er ofte underlagt en anden regulering end spiring og vækst. Vi fandt derfor såvel et behov for generelle undersøgelser af skimmelsvampe vækst, som for mere individuelle undersøgelser af spiring og dannelse af sekundære metabolitter. For at få det største udbytte af disse undersøgelser, er disse forsøg udført som multifaktor forsøg for også at kortlægge om nogle faktorer påvirker effekten af andre (synergieffekter).

Resultater:

1. Ostens sammensætning

Med henblik på at klarlægge betydningen af ostens sammensætning for skimmelsvampes vækst og metabolisme blev indflydelsen af spormetaller, N-kilder og aminosyrer i substratet samt tilsætning af krydderier, krydderiekstrakter og -olier undersøgt.

1.1. Spormetaller og aminosyrer

I studiet af sammenhængen mellem substratets kemiske sammensætning og skimmelsvampes vækst og metabolisme er det fundet, at der kræves et vist indhold af kobber og zink, før skimmelsvampene kan danne sporer samt de stoffer, som dannes sideløbende med sporulationen. Et for lavt indhold af magnesium kan resultere i dårlig skimmelvækst, mens indholdet af zink, magnesium og i nogle tilfælde også mangan har stor betydning for skimmelsvampes metabolisme. Det totale indhold af aminosyrer, især indholdet af aminosyrerne glutamin, cystein og alanin er afgørende for skimmelsvampenes metabolisme.

1.2. Udvikling af semisyntetisk ostesubstrat

Videnskabelige studier af skimmelsvampes vækst og metabolisme på oste er ofte vanskeliggjort af forskelle mellem ostetyper, indflydelsen af modenhedsgrad og årstidsvariationer. Vi har derfor søgt at udvikle en robust og reproducerbar ostesubstrat, som kan fremstilles ud fra kommercielle råvarer {17}.

Semisyntetiske oste (19 forskellige) sammensat på baggrund af et statistisk design blev sammenlignet med 9 forskellige kommercielle oste og 2 ostesubstrater fremstillet ud fra Danbo og roquefortoste. På alle oste blev indholdet af spormetaller og aminosyrer bestemt, hvorpå vækstkaraktistika (kolonivækst, farve og produktion af udvalgte mykotoksiner) for de vigtigste osteassocierede skimmelsvampe blev målt.

Ved hjælp af multivariat dataanalyse (PLS og PCA) fandt vi et substrat, som for de vigtigste osteassocierede skimmelsvampe giver de samme vækstkarakteristika som oste af Danbotypen.

Det anvendte forsøgsdesign gør det muligt at teste indflydelsen af forskellige spormetaller, sukre og aminosyrer på skimmelsvampenes vækst. Her blev det fundet, at kulhydratets form (laktose / laktat) ingen indflydelse har på skimmelsvampenes vækst og metabolisme, hvilket står i modsætning til billedet for bakterier og gær.

Farvedannelsen af *Penicillium roqueforti* har stor betydning for dens anvendelse som starterkultur. Her viste forsøgene, at især indholdet af protein (kasein), K, P, Zn, Fe og Cu havde betydning for farveudviklingen. Et vildtype isolat fra de Canadiske skove var generelt mere følsom over for niveauet af faktorerne end isolaterne fra ost. Specielt bemærkedes, at Cu ikke indvirkede på farvedannelsen hos osteisolaterne, mens effekten var udtalt for vildtypen. Højt jernindhold (over 3,5 mg/kg (w/w)) eller kaseinindhold på mere end 5,5% resulterede i brunfarvning af sporerne hos *P. roqueforti*, men også samspillet mellem faktorerne havde stor betydning.

1.3. Misfarvninger på roquefortoste

I samarbejde med projektet "Moderne levnedsmiddelmykologiske metoder i relation til hygiejne" har vi forsøgt at finde årsagssammenhængen for, at den nye skimmelsvampeart *Penicillium caseifulvum*, som er isoleret fra roqueforti oste, danner gulplettede misfarvninger på oste. Svampen blev podet på laboratoriesubstrat med variation af pH (4.2-5.6) og koncentration af NaCl (0-10%). Pladerne blev inkuberet ved 10 °C og 90%RH i 3 uger. Vækst og farveudvikling blev fulgt.

Resultaterne af forsøget med *P. caseifulvum* viser, at koncentrationen af salt har stor betydning for væksten af skimmelsvampen. Lav salt (<6%) resulterer i væsentlig større kolonier end højere salt koncentration. Derimod har pH ringe indflydelse på væksten, men stor indflydelse på farveudvikling, således resulterede lav pH (<5) i en kraftig gulfarvning. Effekten af saltkoncentration var ens under alle pH værdier og viste, at en saltkoncentration på 5% resulterede i den svageste gulfarvning.

1.4. Krydderier og olier

Det er kendt fra litteraturen, at krydderier indeholder antimikrobielle stoffer. Det var derfor oplagt at undersøge, om bestemte krydderier kan hæmme skimmelvækst på oste, specielt på dekorerede flødeoste, hvor der allerede anvendes krydderier.

På laboratoriesubstrater kan en tilsætning af 1% hvidløgsgrenulat, 4% purløg eller forårsløg hæmme ostesvampe fuldstændig i over 11 døgn ved 25°C (forsøgsperioden). Sort og hvid peber giver ved 10% tilsætning næsten fuldstændig hæmning. Krydderioleoresiner (ekstrakter) har meget kraftigere effekt end selve krydderierne, således giver oregano- og timianoleoresin næsten fuldstændig hæmning ved tilsætning af 500 ppm (0,05%). Af de testede citrus-

olier havde lemonolie og orangeolie samt stofferne octanal og decanal kun begrænset hæmmende virkning ved 0,2% tilsætning, som var den største, der blev undersøgt.

I forsøgsoste opnåedes kun en tydelig hæmning med purløg, ved 1% tilsætning. Det var ikke muligt at opnå tydelig hæmning af skimmelsvampevækst uden markante ændringer i produkternes udseende og lugt.

1.5. Desinfektionsmidler

14 desinfektionsmidler blev testet på 18 skimmelsvampe og 6 gær. Resultaterne viste, at hverken 0,5% Dodecyldiethyltiamineddikesyre, 2,0% formaldehyd, 3,0% hydrogenperoxid, 0,3% pereddikesyre eller 10 g/l chloramin-T (de anbefalede koncentrationer) havde nogen fungicid virkning. Den fungicide effekt af kvaternære ammoniumforbindelser og klorforbindelser varierer meget mellem de undersøgte arter og mellem isolater af samme art. Dog var klordioxid og hypoklorit generelt gode midler. Der kan således være en stor risiko for selektion af resistente isolater ved gennem lang tid udelukkende at anvende et af disse midler i en produktion. Alkoholer var effektive over for gær og de fleste skimmelsvampes konidiesporer; men ikke over for ascosporedannende skimmelsvampe. De er dog generelt ikke er noget problem på ost {7}.

Konklusionen på studiet er, at det er vigtigt at kende resistensen af de skimmelsvampe og gær der findes i produktionen (den associerede funga) og vælge desinfektionsmiddel derudfra. Desuden er det vigtigt at skifte mellem flere desinfektionsmidler for at udgå selektion af resistente isolater.

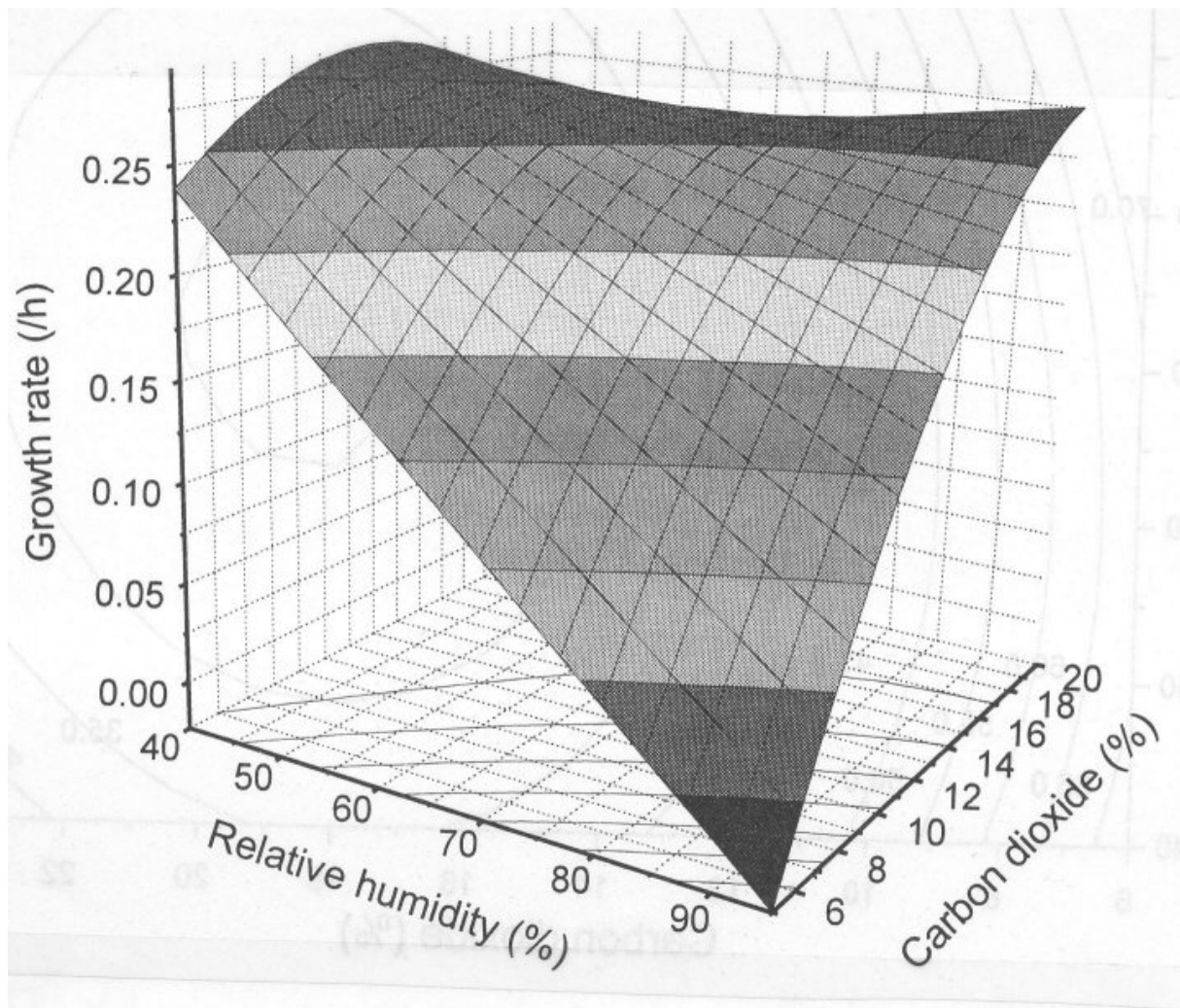
2. Atmosfæresammensætningens betydning for vækst og metabolitdannelse

Ved emballering af oste forekommer skimmelfordærv især i to fundamentalt forskellige situationer nemlig under modning, lagring, transport og salg af den emballerede ost eller efter åbning af emballagen. I det første tilfælde drejer det sig om at sikre en atmosfæresammensætning i pakken, som effektivt kan hæmme skimmelsvampene uden at påvirke ostens sensoriske kvalitet. Ønskes en god holdbarhed efter åbning skal atmosfæresammensætningen i pakken ikke blot hæmme men også inaktivere svampesporerne.

2.1. Emballeringsforholds betydning for vækst efter pakkens åbning

Den hyppigst forekommende skimmelsvamp på pakket ost er *Penicillium commune*. Dens sporer vil derfor ofte resultere i fordærv efter åbning af pakken. Denne skimmelsvamp blev derfor valgt som modelorganisme for studier af atmosfæreforholdenes indflydelse på hvor lang tid der går inden svampen begynder at spire frem (lagtiden), og hvor hurtig den efterfølgende vækst er (vækstraten). Disse parametre blev bestemt præcist ved impedimetri (Bacterometer). For at simulere pakning blev sporer opbevaret i forseglede beholdere i 14 til 56 dage. Luftfugtigheden blev styret ved at fylde mættede saltopløsninger i bunden af beholderne. Herefter blev beholderne flosset med de ønskede gasblandinger (15 forskellige kombinationer). Efterfølgende vækstforsøg viste, at sporerne havde overlevet under alle forsøgsbetingelser. Ved overførsel til vækstmedium kunne sporer opbevaret under samtlige forsøgsbeting-

elser bringes til at vokse $\{1, 13\}$.



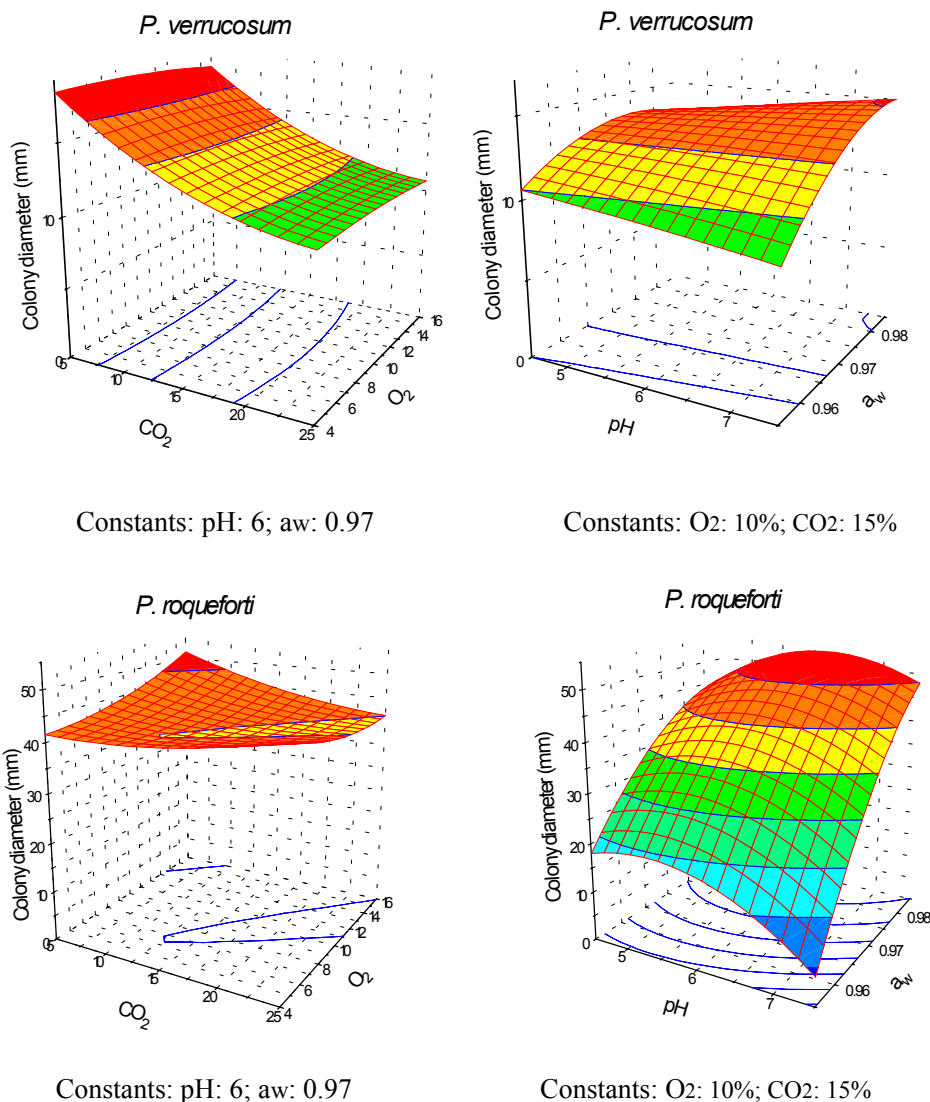
Figur 1. Vækstrate som funktion af relativ luftfugtighed og CO₂-indhold.

Resultaterne viste, at lagfasen, og efter længere tids opbevaring (56 dage) også vækstraten, blev påvirket af den relative fugtighed og kuldioxidniveauet (se figur 1). Ved opbevaring af sporer i atmosfærer med lavt kuldioxid indhold (6%) blev sporerne beskadiget og lagfasen forlænget og vækstraten sænket. Effekten på vækstraten var mest udtalt ved høj fugtighed. I atmosfærer med over 20% kuldioxid bevarede sporerne øjensynligt fuldstændig deres vitalitet. Der kan altså forventes en tydelig forlængelse af holdbarheden efter åbning, hvis levnedsmidlet opbevares ved under 20% kuldioxid. Dette vil dog kræve en god styring af pakkeforholdene, da et lavt kuldioxidniveau stiller større krav til et meget lavt iltniveau for effektivt at hindre skimmelsvampevækst i pakken under lagring.

2.2. Atmosfæreforholds betydning for skimmelsvampevækst

Effekten af pH, vandaktivitet, ilt og kuldioxid på vækst og sporuleringsevne af *P. commune* og 9 skimmelsvampe associeret til andre levnedsmidler blev undersøgt i et responsflade forsøg. Data blev analyseret ved hjælp af kemometriske metoder. Vandaktiviteten i mediet og niveauet af kuldioxid i atmosfæren over mediet udviste signifikant indflydelse på væksten, mens ilt og pH kun havde ringe indflydelse på væksten af de undersøgte organismer {20}.

Skimmelsvampene kan inddeles i tre grupper på baggrund af deres følsomhed over for de testede faktorer. Grupperingen svarer til de undersøgte svampes forekomst på levnedsmidler, og i de økologiske nicher med samme fysiologiske betingelser, der forekommer i og omkring forskellige levnedsmidler. De testede faktoreres indflydelse på de enkelte skimmelsvampe kan bedre ses på et tredimensionalt plot som i nedenstående figur. *P. roqueforti*, der er karakteriseret ved at kunne vokse under lave ilt- og forhøjede kuldioxidforhold f.eks. inde i blåskimmeloste eller i gastæt lagret korn er nærmest upåvirket af ilt- og kuldioxidniveauet. *P. verrucosum*, der er en hyppig kontaminant i forholdsvis tørre miljøer som på overfladen af saltede oste, spegepølser og korn, er derimod tydeligt påvirket af kuldioxidniveauet, men i mindre grad end *P. roqueforti* påvirket af vandaktiviteten.



Figur 2. Kolonistørrelse som funktion af CO₂- og O₂-indhold, pH og vandaktivitet

Effekten af de udvalgte parametre på sporulation hos de enkelte skimmelsvampe (iagttaget som farvedannelse) var mere følsom over for de testede parametre end væksten, bl.a. hæmmede/forsinkede lave ilt-niveauer sporulation. Opbevaring af levnedsmidler under lave ilt- og forhøjede kuldioxidforhold vil evt. vækst således ikke nødvendigvis give ophav til

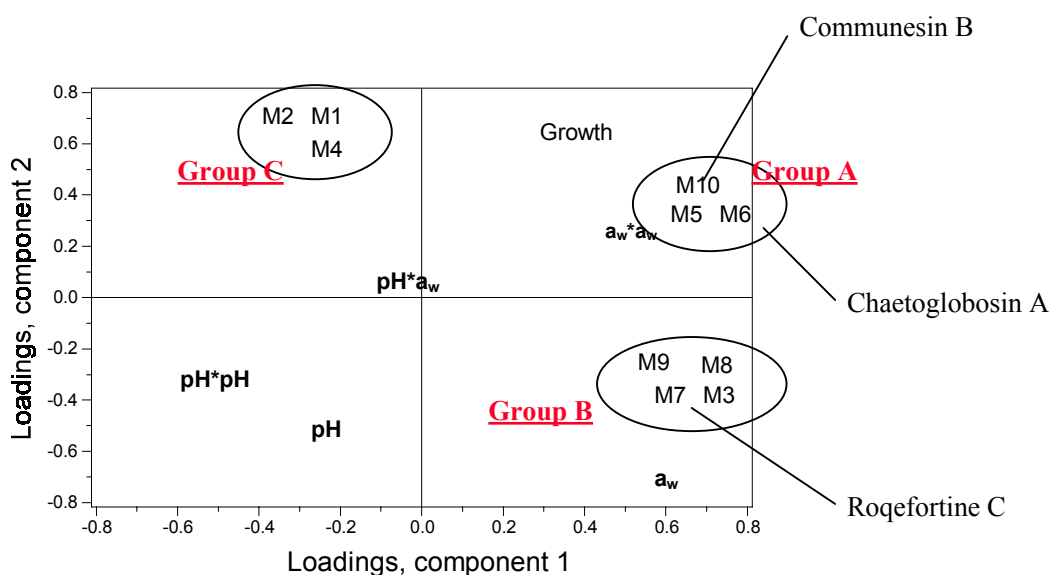
sporulering og dermed mulighed for spredning af fordærv.

De opnåede resultater viser, at det er muligt at forudsige, hvilke faktorer der vil have størst effekt i kontrol af en given skimmelsvamp. Der er desuden opnået en større viden om de enkelte organismers fysiologiske karakteristika og derigennem også en større viden om de forskellige livsstrategier skimmelsvampene benytter til overlevelse og udbredelse.

Væksten af de skimmelsvampe, der er de mest almindelige fordærvere på ost samt to af de vigtige starterkulturer, blev undersøgt på det tidligere omtalte semisyntetiske ostemedium ved 10 og 20 °C. Effekten af pH, temperatur, ilt, kuldioxid- og saltkoncentration på væksten af skimmelsvampe blev undersøgt. Resultaterne viste, at temperatur, saltkoncentration og kuldioxidniveau havde signifikant indflydelse på væksten af skimmelsvampene, og at skimmelsvampenes følsomhed over for de testede faktorer var mere udtalt i den tidlige vækstfase end senere i vækstforløbet. Dette var specielt udtalt for *Penicillium roqueforti*, som slet ikke var vokset frem efter 7 dage ved 10 °C og 25% kuldioxid. Den hyppige kontaminant på roquefort oste, *P. caseifulvum*, blev derimod kun hæmmet med 57% under de samme forhold. Efter 14 dage skiftede billedet, *P. roqueforti* blev hæmmet med 32% og *P. caseifulvum* med 42% i forhold til en kontrol dyrket uden kuldioxid. Dette viser tydeligt betydningen af en tidlig stikning af blåskimmeloste. Ønsker man yderligere at favorisere *P. roqueforti* over for kontaminanten kan temperaturen i starten af produktionen hæves, da hæmning af vækst ved et øget kuldioxidniveau ved 20 °C kun var 13%, mod 43% for kontaminanten {21}.

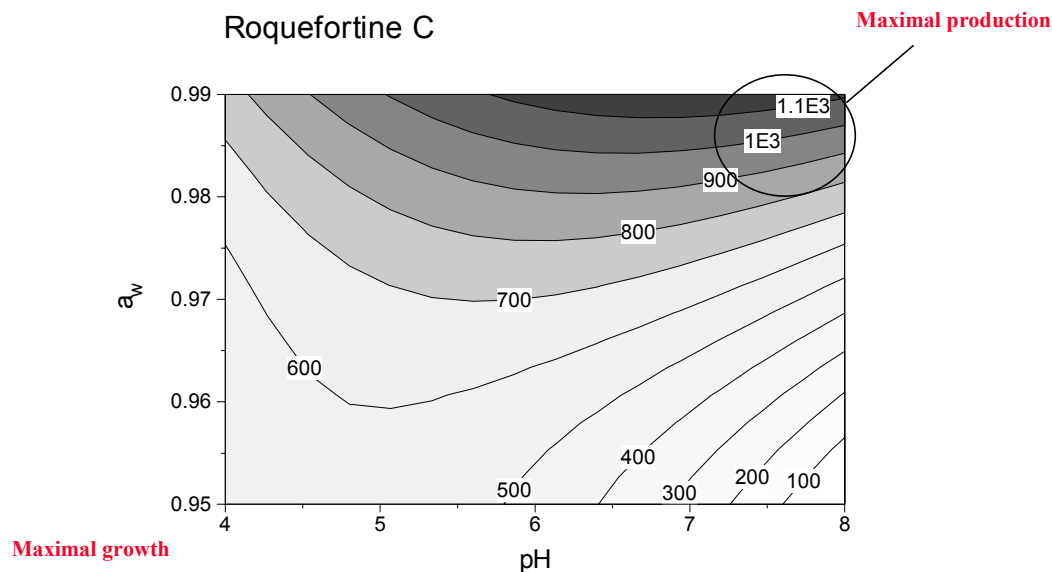
2.3. Metabolitproduktion

Penicillium expansum er en hyppig kontaminant på lagret frugt, (æbler, kirsebær mm.) og frugtsaft. Denne skimmelsvamp er kendt for produktionen af mykotoksiner, der ofte er fundet i frugtsaft. I et forsøg blev effekten af pH og vandaktivitet på vækst og produktionen af mykotoksiner og andre sekundære metabolitter fra *Penicillium expansum* undersøgt. Resultatet fra dette forsøg viste, at produktionen af 10 udvalgte metabolitter kunne opdeles i tre grupper afhængig af deres følsomhed over for pH og vandaktivitet (se figur 3) {26}.



Figur 3. Principal component analyse (klassificering) af 10 forskellige metabolitter fra *Penicillium expansum* produceret under forhold med forskellig pH og vandaktivitet.

Det blev ydermere vist, at optimal produktion af metabolitter, ikke altid var relateret til optimal vækst. Et eksempel er stoffet roquefortin C, der er et kendt mykotoksin. Maksimal produktion af dette stof blev fundet under betingelser, der resulterede i minimal vækst (figur 4).



Figur 4. Kontrast mellem forhold (vandaktivitet og pH) for optimal metabolitdannelse og vækst for *Penicillium expansum*.

Det blev ydermere vist, at optimal produktion af metabolitter, ikke altid var relateret til optimal vækst. Et eksempel er stoffet roquefortin C, der er et kendt mykotoksin. Maksimal produktion af dette stof blev fundet under betingelser, der resulterede i minimal vækst (se nederste figur på næste side).

Disse resultater demonstrerer vigtigheden af at anvende et multivariat design til studier af såvel vækst som metabolitdannelse. Desuden viser resultatet, at det er vigtigt at bestemme den totale metabolitprofil i kontrol af levnedsmidler. Ofte testes der kun for en enkelt metabolit, selvom det er kendt, at de fleste skimmelsvampe er i stand til at producere mange forskellige sekundære metabolitter, hvoraf flere og flere bliver fundet toksiske.

3. Mikrobiel interaktion

Mikrobiel interaktion betyder, at to organismer påvirker hinandens vækst og metabolisme. Fremvæksten af skimmelsvampe er bl.a. bestemt af deres evne til effektiv udnyttelse af næringsstoffer samt af deres væksthastighed (optagelse af plads) i forhold til andre mikroorganismer, altså de forhold, der er omtalt i de foregående afsnit. Konkurrence kan også være betinget af udskillelse af kemiske signalstoffer. Det kan f.eks. være toksiske metabolitter (mykotoksiner), som skimmelsvampen danner under de givne vækstbetingelser, eller som induceres ved kontakt med andre mikroorganismer. Omvendt kan der ske en hæmning af metabolitproduktion ved tilstedeværelse af andre mikroorganismer.

Sammen med de tidligere omtalte forhold (de abiotiske faktorer) er de mikrobielle interaktioner afgørende for udviklingen i det relative niveau af de forskellige organismer i osten og dermed for ostens samlede økosystem.

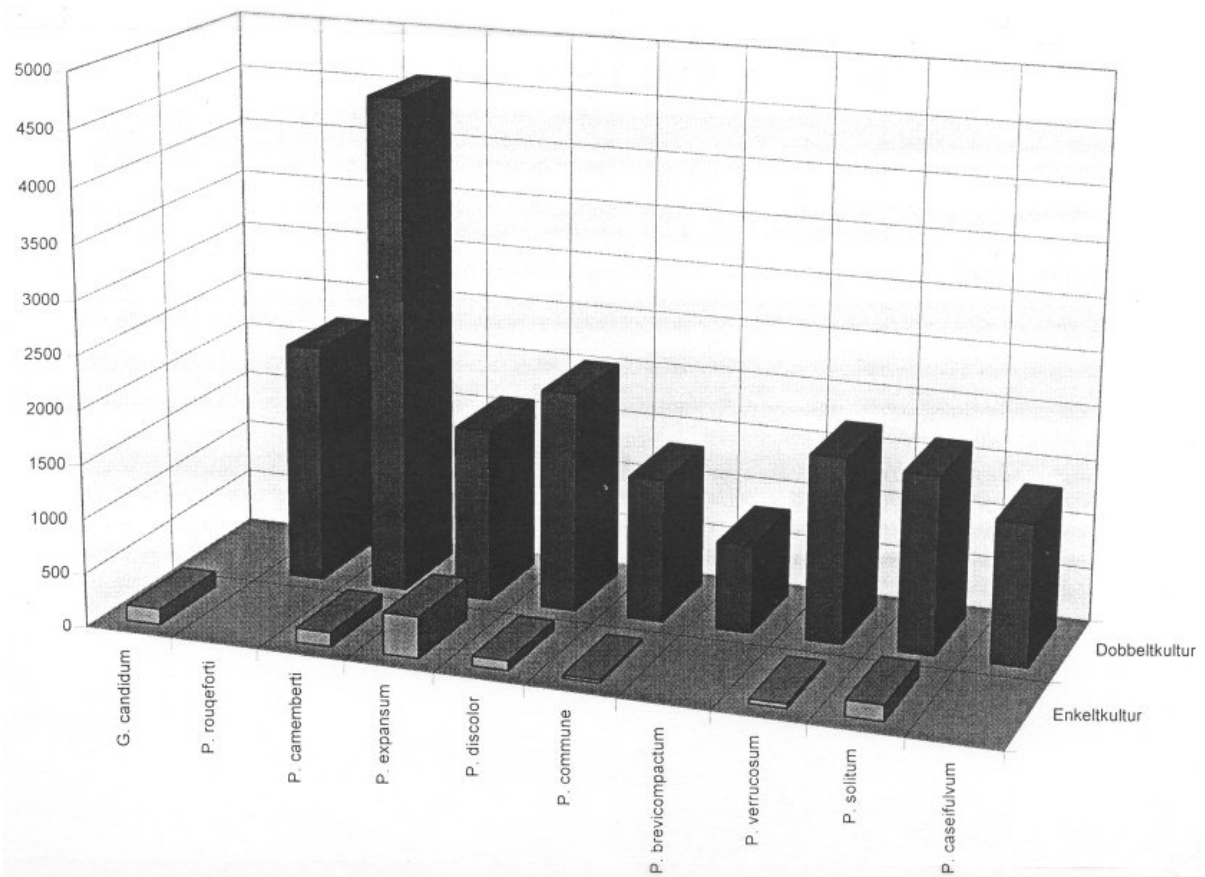
3.1. Indledende interaktionsforsøg mellem skimmelsvampe

I de indledende undersøgelser af interaktion mellem osteassocierede skimmelsvampe blev isolater af *Penicillium camemberti*, *P. roqueforti* og *P. nalgiovense*, som er typiske skimmelstartere, podet sammen med isolater af osterelaterede skimmelkontaminanter (*P. verrucosum*, *P. commune*, *P. caseifulvum*, *Aspergillus versicolor*) samt *P. brevicompactum*. Derudover blev *Geotrichum candidum* podet sammen med forskellige *Penicillium*-arter, hvoraf hovedparten er associeret med ost (*P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. commune*, *P. caseifulvum*, *P. discolor*, *P. verrucosum*, *P. solitum*) samt *P. brevicompactum* og *P. expansum*. Disse screeningsforsøg blev foretaget på laboratoriemedierne CYA og Semisyntetisk ostesubstrat {23}.

Efter 7 dages inkubation ved 25 °C sås, at de benyttede isolater vokser uafhængigt af hinanden (gensidig inhibering p.g.a. af plads). Dog er der en tendens til, at *Penicillium camemberti* voksede mere upåvirket end *P. roqueforti* ved tilstedeværelse af andre skimmelsvampe.

Interaktionen mellem *G. candidum* podet med *Penicillium*-arter på laboratoriemediet CYA inkuberet ved 25 °C viste, at *G. candidum* overvokser de fleste benyttede isolater af *Penicillium*. Dog sås gensidig inhibering ved podning sammen med *P. discolor* og *P. expansum*.

Metabolitprofilen fra renkulturer og blandingskulturer på laboratoriemediet CYA af de ovennævnte skimmelsvampeisolater blev undersøgt v.h.a. HPLC. Generelt sås, at metabolitbilledet fra blandingskulturerne er en kombination af renkulturernes metabolitbillede. I nogle tilfælde sås en markant øget produktion af en bestemt metabolit i blandingskultur i forhold til enkeltkultur. *P. roqueforti* podet sammen med *Aspergillus versicolor* gav en produktion af roquefortin C i op til 10 gange større mængde i blandingskultur i forhold til renkultur tidligt i vækstfasen (efter 3 dage). Dette sås dog ikke ved yderligere forsøg med andre isolater af *P. roqueforti* og *A. versicolor*.



Figur 5. Produktion af metabolitter fra udvalgte skimmelkulturer – renkulturer eller dobbeltkulturer.

En ukendt metabolit i blandingskultur med *G. candidum* øgedes ligeledes i forhold til renkulturen (se figur 5). Dette kunne reproducere med andre isolater af *G. candidum*.

Fra både *P. expansum* og *P. discolor* detekteres en metabolit (chaetoglobosin A), som ikke sås hos de øvrige *Penicillium* arter. Denne metabolit kunne tænkes at have indflydelse på interaktionen med *G. candidum*. Dette stof kunne dog ikke påvises at have nogen effekt på væksten af *G. candidum* ved tilsætning af stoffet på filterpapir.

Metabolitbilledet på ostesubstrat var meget svagt, hvorved der ikke kunne konkluderes ud fra resultater opnået på dette medium.

3.2. Interaktionsforsøg på ost

En undersøgelse af traditionelt anvendte skimmelstartere podet sammen med osterelaterede skimmelkontaminanter blev foretaget på Camembert ost. Dette blev sammenholdt med resultater på laboratoriemedierne CYA og det semisyntetiske ostesubstrat. Pladespredning af et isolat af følgende arter: *Geotrichum candidum*, *P. camemberti*, *P. nalgiovense*, *P. roqueforti* blev benyttet som skimmelstartere. Kontaminantisolaterne: *P. commune*, *P. caseifulvum*, *P. verrucosum*, *P. discolor*, *P. solitum*, *P. coprophilum* og *A. versicolor* blev derefter dryppet i 3

punkter ovenpå starterne. Efter inkubation ved h.h.v. 18 og 25 °C i 7 dage blev foretaget diametermåling af kontaminanterne samt HPLC-analyse af metabolitdannelsen {24}.

Hvordan skimmelkontaminanterne blev påvirket af tilstedeværelsen af skimmelstarter blev vurderet ved måling af kontaminanterne kolonidiameter efter 7 dages vækst. De statistiske modeller af resultaterne viser, at væksten af kontaminanterne bliver reduceret ved tilstedeværelse af skimmelstartere. *Penicillium* skimmelstarterne, specielt *P. nalgiovense*, viste størst inhibering af kontaminanterne på laboratoriemedierne CYA og ostesubstrat, mens *G. candidum* var den eneste starter, som viste en signifikant inhibering på Camembert oste.

Væksten af kontaminanter ved tilstedeværelse af starterne *G. candidum* og *P. nalgiovense* i forhold til renkultur uden starter (blind) blev udregnet (inhibitionsprocenten). I overensstemmelse med de statistiske modeller viser *P. nalgiovense* størst inhiberingsprocent på laboratoriesubstraterne, mens *G. candidum* har størst effekt på Camembert oste. I øvrigt sås en tendens til størst hæmning af kontaminanterne ved 25 °C i forhold til 18 °C. Dette er interessant, da ostene bliver lagret ved 18 °C.

Der blev ikke detekteret metabolitter fra skimmelstarterne. Fra kontaminanterne blev detekteret adskillige kendte mykotoksiner på laboratoriemediet CYA. Det mykotoksin, som blev detekteret i størst mængde på laboratoriemediet, blev ligeledes detekteret i Camembert ostene, som det eneste mykotoksin i ostene (griseofulvin fra *P. coprophilum*). På laboratoriemediet ses i lighed med væksten, at *P. nalgiovense* gav den største hæmning af metabolitdannelse fra skimmelkontaminanterne.

3.3. Analyse af skimmelsvampemetabolitter

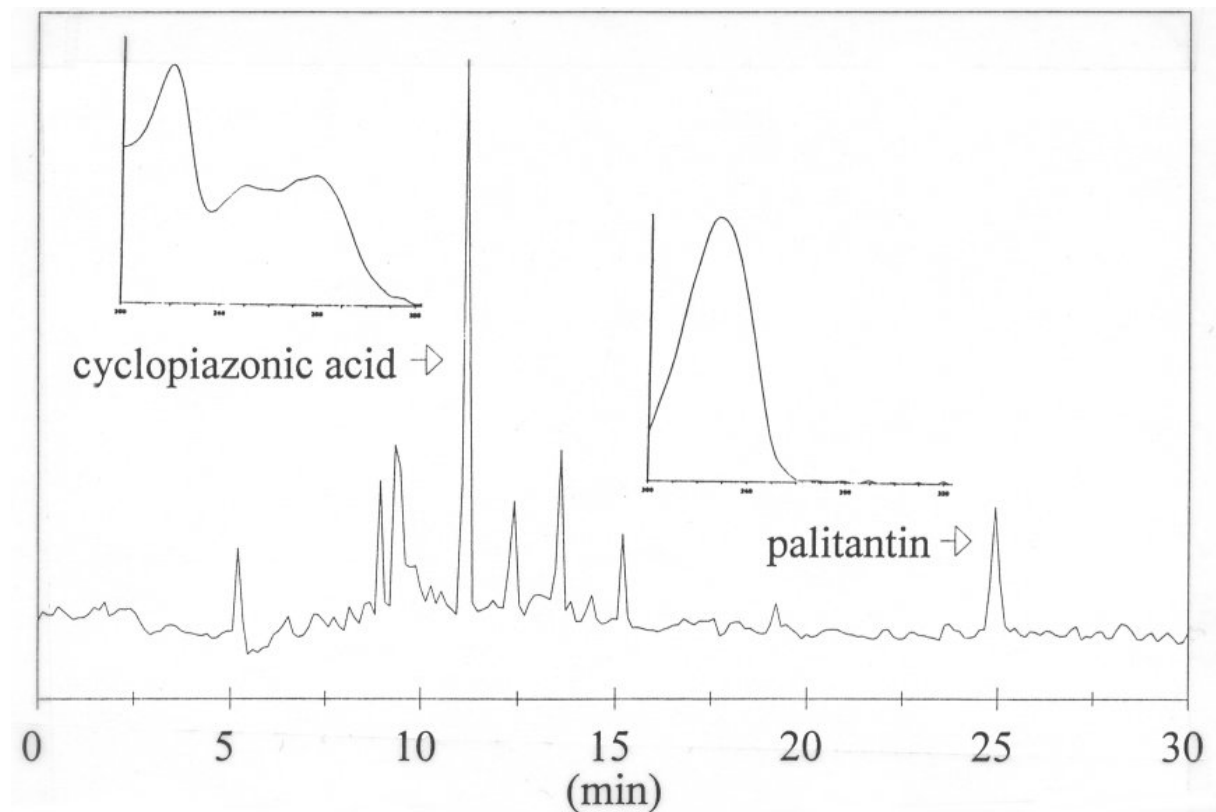
HPLC har været anvendt i de ovennævnte interaktionsstudier, da denne metode anvendes rutinemæssigt til detektion af sekundære metabolitter fra skimmelsvampe på vores laboratorium. En forholdsvis ny metode, kapillarelektroforese (HPCE), kan give supplerende oplysninger til HPLC. Det skulle bl.a. give mulighed for direkte analyse på skimmelsvampe-spore. Denne metode blev derfor undersøgt nærmere i projektet.

I udviklingen af en metode v.h.a. HPCE til analyse af sekundære metabolitter fra skimmelsvampe blev buffersammensætningen optimeret ved hjælp af eksperimentelt design. I et indledende faktorforsøg viste pH, tilsætning af SDS og acetonitril at have størst betydning for adskillelsen af metabolitterne. Ved hjælp af et responsfladeforsøg blev den optimale buffersammensætning fundet til 0.05 M SDS og 10 % acetonitril, pH=10.0 i en buffer bestående af 0.01 M NaH_2PO_4 og 0.005 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ {8}.

Ved analyse af 20 mykotoksiner fra osteassocierede skimmelsvampe med ovennævnte metode fandt vi, at den relative standardafvigelse ved 10 gentagne injektioner kunne forbedres fra gennemsnitlig 3,6% til 1,4% ved at bruge en intern standard. Det lykkedes således at få et system med god repetérbarhed af retentionstiderne {25}.

Mange mykotoksiner har et karakteristisk UV-spektrum, som kan benyttes ved identifikation af mykotoksinet. Ved anvendelse af ovenstående metode var det muligt at identificere myko-

toksiner i ekstrakter fra skimmelsvampe (*P. commune*, *P. roqueforti* og *P. caseifulvum*) ved hjælp af den relative retentionstid og UV-spektret af det pågældende mykotoksin (se figur 6).



Figur 6. HPLC-kromatogram af metabolitter fra skimmelkulturer, hvor cyclopiazonic acid og palitantin forekommer (de indsatte spektre gengiver stoffernes UV-absorptionsspektrum i bølglængdeintervallet $\lambda = 200 - 320$ nm).

For vigtige mykotoksiner relateret til skimmelsvampe associeret med ost såsom cyclopiazon-syre og roquefortin C er det svært at opnå en god effektivitet (smal top) på HPLC, hvilket kan bevirke interferens af disse mykotoksiner med andre komponenter i ekstraktet. Analyse af cyclopiazon-syre og roquefortin C på HPCE gav flere gange bedre effektivitet end på HPLC. De tættest relaterede komponenter, som blev analyseret, var rugulovasin A and B, som er isomere og produceres af de samme skimmelsvampearter. Adskillelse af disse to komponenter er meget dårlig på HPLC. I HPCE-analysen var der flere minutter imellem disse to metabolitter. I andre tilfælde lå retentionstiden af de undersøgte metabolitter dog tæt på hinanden i HPCE. Det må derfor pointeres, at hverken HPCE eller HPLC adskiller de undersøgte metabolitter fuldstændigt, men HPCE som supplement til HPLC giver en god separation af alle de undersøgte metabolitter.

Indledende forsøg viste, at det er muligt at analysere på skimmelsvampesporer v.h.a. HPCE. Det lykkedes dog ikke at opnå resultater inden for interaktionsstudier af tidsmæssige årsager.

3.4. Sammenfatning af interaktionsstudierne

Skimmelsvampe, som lever i samme økosystem (ost), ser generelt ud til at vokse fredeligt sammen på et komplekst laboratoriesubstrat som CYA. Laboratoriesubstratet giver optimale vækstbetingelser for alle skimmelsvampearterne, hvor det overvejende er konkurrence om plads/næring, som skaber en gensidig inhibering. Dog hæmmer *G. candidum* tydelig væksten hos mange af de undersøgte *Penicillier*.

Den indbyrdes konkurrence mellem skimmelsvampe er afhængig af næringsmediet. Interaktionen som ses på laboratoriesubstrat eller det semisyntetiske ostesubstrat, kan øjensynligt ikke overføres til osten. *Penicillium* skimmelstarterne, specielt *P. nalgiovense*, viste størst hæmning af kontaminanterne på laboratoriesubstraterne, mens *G. candidum* var den eneste starter, som viste en signifikant inhibering af kontaminanterne på camembert oste. Dette resultat kunne tyde på, at *G. candidum* spiller en vigtig rolle for konkurrencen med uønskede skimmelsvampe i skimmeloste.

Interaktionen mellem skimmelsvampe ses at være afhængig af indre og ydre miljøfaktorer. Dette undersøges nærmere i FØTEK 2 samarbejdsprojektet "Produktions- og lagerforholds betydning for mikrobielle interaktioner i skimmeloste og deres betydning for ostekvaliteten".

I lighed med observationerne på væksten af skimmelsvampe, ses generelt at skimmelsvampene ikke påvirkes til dannelsen af kendte mykotoksiner ved tilstedeværelse af andre skimmelsvampe fra samme økosystem (ost).

G. candidum skiller sig igen ud ved en øget detektion af en ukendt metabolit, når *G. candidum* podes sammen med *Penicillier*. Denne ukendte metabolit dannet i blandingskultur med *G. candidum* vil blive forsøgt identificeret i et FØTEK-2 samarbejdsprojekt ledet af Thomas O. Larsen.

I lighed med væksten er metabolitproduktionen stærkt substratafhængig. Der blev generelt detekteret meget færre metabolitter i ost i forhold til standardmediet. Det har ikke været muligt at påvise nogen sammenhæng mellem inhibering af vækst og induktion af metabolitdannelse fra skimmelsvampene. Men omvendt ses, at en hæmning af væksten giver en tilsvarende hæmning af metabolitdannelsen.

Ved udvikling af en kapillarelektroforesemetode til analyse af sekundære metabolitter fra skimmelsvampe var det muligt at analysere direkte på skimmelsvampesporer. Det lykkedes dog ikke at opnå resultater inden for interaktionsstudier.

En række stoffer er artsspecifikke og kan således bruges til karakterisering af svampefloraen (taksonomi).

camemberti gør. Begge danner dog bl.a. 2-methyl-isoborneol, som måske vil bevirke, at de resulterende oste vil smage for muggent eller for jordagtigt, hvis deres aktivitet er for kraftigt.

Arbejdet med flygtige stoffer har også vist, at selv om de fleste isolater af samme art laver/danner de samme stoffer, så er der ofte store kvalitative forskelle i produktionen. Dette er ikke studeret i detaljer, men det er øjensynligt muligt at skelne imellem isolater ved hjælp af analyser af flygtige stoffer.

En vigtig konklusion på studierne af flygtige stoffer er således, at skimmelsvampenes evne til aromadannelse bør være et vigtigt kriterium ved udvælgelse af nye starterkulturer.

4.2. Hurtig identifikation af skimmelsvampe

Da de flygtige stoffer dannes tidligt i vækstforløbet, er det muligt at identificere en række osteassocierede skimmelsvampe inden for de første 2 døgn efter, at der er podet ud som stregkultur på et laboratoriesubstrat. De kan altså identificeres, inden de begynder at sporulere, vel at mærke, hvis man har en idé om hvilke arter, der kan være tale om. Dvs. når man arbejder med en associeret funga og på forhånd har “styr på” hvilke arter, der kan dukke op, og dermed også hvilke flygtige stoffer man skal kigge efter eller analysere for. Det gøres i praksis ved at man kun analyserer for de største af de ioner, der dannes ved massespektroskopien af de enkelte flygtige stoffer. Herved opnås en betydelig større følsomhed {18}.

5. Samlet konklusion

De udførte forsøg har bidraget væsentligt til forståelsen af årsagssammenhængen for specifikke skimmelsvampes affinitet for særlige typer levnedsmidler. Det har således vist sig at pH, vandaktivitet (eller salt indhold) sammen med atmosfæreforhold har afgørende betydning for hvilke skimmelsvampe der vokser bedst på et substrat. Desuden har flere spormetaller indflydelse på skimmelsvampenes evne til at danne konidiesporer og dermed formere sig i miljøet (f.eks. produktionslokale eller lagerrum). Derudover har disse sporeres resistens over for desinfektionsmidler stor betydning. Også den mikrobielle interaktion afhænger af substratet, således vil *Penicillium nalgiovense* effektivt hindre andre skimmelsvampe i at vokse frem på laboratoriesubstrater, mens *Geotrichum candidum* udkonkurrerer alle andre svampe på forsøgsoste (brier).

Profilen af flygtige stoffer fra skimmelsvampe er så specifik for de enkelte arter, at den kan udnyttes til en hurtig identifikation af skimmelsvampe. Den biologiske aktivitet af de flygtige stoffer er for de fleste stoffer ikke kendt, men stofferne kan meget vel tænkes at have en funktion i interaktionen mellem skimmelsvampe.

Det lykkedes ikke at få opbygget samlende matematiske modeller til styring af kvalitet af oste og heller ikke at frembringe pilot/storskala modeller over procesparametres betydning for mikrobiel konkurrence og produktkvalitet. Det skyldes dels den sene afslutning af

delprojekterne "Atmosfæreforhold" (Ph.D. rapport 1/10 1996) og "Interaktion" (Ph.D. rapport afleveret 31/8 1997), dels at opgaven viste sig betydeligt sværere end oprindeligt forudsat. Vi vurderer at det vil være af stor betydning for levnedsmiddelindustrien, at dette arbejde fortsættes og udbygges sådan, at der med tiden vil kunne opstilles modeller til forudsigelse af skimmelvækst og metabolitdannelse under givne forhold. Vi arbejder videre med opbygningen af modellerne, selv om projektet er afsluttet.

Dokumentation:

Der er bl.a. holdt følgende indlæg ved nationale og internationale kongresser og møder:

- Nielsen, M.S. 1993 High-performance capillary electrophoresis of fungal metabolites. Nordisk Mykotosinmøde, Hanaholmen, Finland.
- Nielsen, P.V. 1993. Mould growth on cheese, significance and methods for biological control. FOOD MICRO '93, Bingen, Tyskland
- Nielsen, P.V. 1994. Antagonistic Yeasts in Dairy Products. NORFA symposium, "Practical applications of microbial antagonisms in food, feed, and gut ecosystem", Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sverige, 5-14 juni.
- Larsen, T.O. 1994. Rapid methods for characterization of fungi based on profiles of volatile metabolites. Third international workshop on standardization of methods for the mycological examination of foods". København, juni.
- Nielsen, P.V. 1994. Impedimetric studies of physiological characteristics of fungi. Third international workshop on standardization of methods for the mycological examination of foods. København, juni.
- Larsen, T.O. 1994. Chemosystematics of species in genus *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. Fifth International Mycological Congress (IMC5), Vancouver, British Columbia, Canada, 14-21 august.
- Nielsen, P.V., Nielsen, M.B. & Frisvad, J.C. 1994. Trace metals effects fungal morphology and metabolism. Fifth International Mycological Congress (IMC5), Vancouver, British Columbia, Canada, 14-21 august.
- Haasum I. 1994. Effect of modified atmosphere on interactions of fungi associated with dairy products. Fifth International Mycological Congress (IMC5), Vancouver, British Columbia, Canada, 14-21 august.
- Nielsen, M.S. 1995. Analysing fungal metabolites using capillary electrophoresis, Third International Symposium of Analytical Chemistry in Environmental Microbiology, Knoxville, Tennessee, 12-15 marts, 1995
- Larsen, T.O. 1995. Identification of penicillia based on volatile chemical markers. Workshop finansied by The European Community on "Fungal Identification Techniques", Barcelona, 5-8 April.
- Larsen, T.O. 1995. Hurtig identifikation af osterelaterede skimmelsvampe ved gaskromatografi. Temadag, skimmelsvampe i ost, anvendelse - påvisning - bekæmpelse, DTU, 9. maj
- Thrane, U. 1995. Kultursamlingen ved IBT, et vigtigt redskab for mejeribrugsforskning. Temadag, skimmelsvampe i ost, anvendelse - påvisning - bekæmpelse, DTU, 9. maj
- Haasum, I. 1995. Opbevaringsforholds betydning for skimmelsvampevækst (kontrolleret atmosfære opbevaring og modificeret atmosfære pakning) . Temadag, skimmelsvampe i ost, anvendelse - påvisning - bekæmpelse, DTU, 9. maj.
- Nielsen, P.V. 1995. Hvilken betydning har ostens sammensætning på vækst og evne til at danne flygtige-stoffer og toxiner. Temadag, skimmelsvampe i ost, anvendelse - påvisning - bekæmpelse, DTU, 9. maj.
- Nielsen, M.S. 1995. Konkurrence mellem skimmelsvampe på oste (mikrobiel interaktion) . Temadag, skimmelsvampe i ost, anvendelse - påvisning - bekæmpelse, DTU, 9. maj.
- Nielsen, M.S. 1995. High performance capillary electrophoresis of fungal metabolites. Capillary Electrophoresis for Analysis of Food, Ingeniørhuset, København. 7. september, 1995.
- Nielsen, P.V. 1995. Disinfection agents active against food spoilage fungi. Advances in Aseptic Processing and Packaging Technologies, København 11-12 september 1995.

- Hansen, B.V. Danish Biotechnology Conference, Vejle

Følgende artikler er publiceret i internationale tidsskrifter og bøger

1. Haasum, I. & Nielsen, P.V. 1994. Effect of preincubation of fungal conidia in modified atmosphere on subsequent germination and growth on a solid medium. pp. 992-995. *In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J., & Champ, B.R. (eds.). Stored Product Protection. Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection.* University Press, Cambridge, UK.
2. Larsen, T.O. & Frisvad, J.C. 1994. A simple method for collection of volatile metabolites from fungi based on diffusive sampling from Petri dishes. *Journal of Microbiological Methods*, 19:297-305.
3. Larsen, T.O. & Frisvad, J.C. 1994. Production of volatiles and presence of mycotoxins in conidia of common indoor *Penicillium* and *Aspergillus* species. pp. 251-279 *In: Samson, R.A., Flannigan, M.E., Verhoeff, A., Adan, O.C.C. & Hoekstra, E.S. (eds.): Health implications of fungi in indoor environment.* Elsevier Sciences Publishers B.V., Amsterdam.
4. Pelusio, F., Nilsson, T., Montanarella, L., Tilio, R., Larsen, T.O., Larsen, B.R., Facchetti, S. & Madsen, J.Ø. 1994. Solid-phase micro-extraction of VOCs from fungi. *Proceedings of the 16th. International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva del Garda.
5. Larsen, T.O. 1994. Chemosystematics of species in genus *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. Ph.D. Thesis. Institutet for Bioteknologi, DTU. ISBN 87-88584-03-8.
6. Boer, E. de & Nielsen, P.V. 1995. Food Preservatives, Chapter 8 *In Samson, R.A, Reenen-Hoekstra, E.S. van, Frisvad, J.C. & Filtenborg, O (eds.). Introduction to Food Borne Fungi.* 4ed. Baarn.
7. Bundgaard-Nielsen, K. & Nielsen, P.V. 1996. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 24 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. *Journal of Food Protection.* 59:268-275
8. Nielsen, M.S., Nielsen, P.V. & Frisvad, J.C. 1996. Micellar electrokinetic capillary chromatography of fungal metabolites: resolution optimised by experimental design. *Journal of Chromatography A* 721:337-344
9. Nilsson, T., Larsen, T.O., Montanarella, L. & Madsen, J.Ø. 1996. Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted from *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods* 25:245-255.
10. Larsen, T.O. & Frisvad, J.C. 1995. Characterisation of volatile metabolites from 47 taxa in genus *Penicillium*. *Mycological Research* 99, 1153-1166.
11. Larsen, T.O. & Frisvad, J.C. 1995. Chemosystematics of species in genus *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycological Research* 99, 1167-1174.
12. Larsen, T.O. & Frisvad, J.C. 1995. Comparison of different methods for collection of volatile chemical markers from fungi. *Journal of Microbiological Methods* 24, 135-144.
13. Haasum I. & P. V. Nielsen. 1996. Preincubation of *Penicillium commune* conidia under modified atmosphere conditions: Influence on growth potential as determined by an impedimetric method. *Journal of Stored Products Research* 32:329-337
14. Haasum, I. 1996. Physiological characteristics of fungi associated with dairy products. Ph.D. afhandling, Institut for Bioteknologi, DTU. ISBN 87-88584-24-0
15. Larsen, T.O. 1996. Identification of penicillia based on volatile chemical markers. *In: Fungal Identification Techniques, Proceedings from the workshop in Barcelona, 5 to 8 April 1995.* (eds. Rossen, L; Rubio, V; Dawson, M.T. and Frisvad, J.C.), EUR 16510, ECSC-EC-EAEC, Brussels.
16. Nilsson, T., Bassani, M., Larsen, T.O. & Montanarella, L. 1996. Classification of species in genus *Penicillium* by curie point pyrolysis/mass spectrometry followed by multivariate analysis and artificial neural networks. *Journal of Mass Spectrometry.* 31:142-1428.
17. Hansen, B.V. & P.V. Nielsen. 1997. Development of a semisynthetic cheese medium for fungi using chemometric methods. *Journal of Dairy Science.* 80:1237-1245.
18. Larsen, T.O. 1997. Identification of cheese associated fungi using selected ion monitoring of volatile terpenes. *Letters of Applied Microbiology* 24:463-466.
19. Nielsen, M.S. 1997. Interaction study and chromatography of fungal cultures related to cheese. Ph.D. afhandling. Institut for Bioteknologi, DTU.

20. Haasum I. & P. V. Nielsen. 1998 Ecophysiological characterisation of some food-borne fungi in relation to pH and water activity under atmospheric conditions. *Journal of Applied Microbiology*. (In press).
21. Haasum I. & P. V. Nielsen. 1998. Physiological characterisation of common fungi associated with cheese. *Journal of Food Science*. (In press.)
22. Larsen, T.O. 1998. Volatiles in fungal taxonomy. In: *Handbook of Applied Mycology Vol. 6. Chemical fungal taxonomy*. (eds. J.C. Frisvad, P.D. Bridge & D.K. Arora) (In press).
23. Nielsen, M., Frisvad, J.C. & Nielsen, P.V. 1998. Colony interaction and secondary metabolite production of cheese related fungi in dual cultures. *Journal of Food Protection* (In press).
24. Nielsen, M., Frisvad, J.C. & Nielsen, P.V. 1998. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *International Journal of Food Microbiology* (Accepted).
25. Nielsen, M., Bohl, C., Nielsen, P.V. & Frisvad, J.C. 1998. Retention Time Repeatability in Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Mycotoxins related to Spoilers of Cheese. *Talanta* (Accepted).
26. Hassum, I., Smedsgaard, J & Nielsen, P.V. 1998. Effects of pH and Water Activity on the Production of Selected Secondary Metabolites from *Penicillium expansum*, in culture. *Applied and Environmental Microbiology* (Submitted).
27. Larsen, T.O. 1998. Aroma production of *Penicillium caseifulvum* (In preparation)

Øvrige artikler

27. Haasum I. 1995. Skimmelvækst kan forebygges via styrede opbevaringsforhold. *Mælkeritidende*. 15: 354-355
28. Nielsen, P.V. 1995. Nye konserveringsprincipper, *Alimenta*, 18(10):10-13
29. Nielsen, P.V. 1996. Biokonservering af levnedsmidler, *Alimenta* 19(9):5-8.
30. Nielsen, P.V. & I. Haasum. 1997. Packaging conditions hindring fungal growth on cheese. *Scandinavian Dairy Information*. 4/97:22-25

Afsluttende projektarbejder med tilknytning til Projektet

- Tine Ramsø Nielsen, Flygtige stoffers hæmmende virkning på skimmelsvampe
- Kirsten Bundgaard Nielsen, Desinfektionsmidler mod skimmelsvampe
- Mette Bjerg Nielsen, Gærekstrakters indflydelse på svampes metabolisme
- Christina Boel, Sammenligning af HPLC og kapillarelektroforese
- Birgitte Vedel Hansen, Krydderier og citrus oliers indvirkning på skimmelsvampe
- Birgitte Vedel Hansen, Multivariat optimering af ostesubstrat til svampe
- Helle Allermann, Svampevækst på ost pakket i modificeret atmosfære
- Jørn Breumlund, Basiske Peptiders fysiologiske effekt på skimmelsvampe
- Karina Petersen, Karakterisering af skimmelsvampe ved Impedimetri

Øvrige medarbejdere

Laboranter:

Laborant Anne Winther Hinsby

Laborant Ulla Hansen

Laborant Ellen Kirstine Lyhne

Videnskabelige medarbejdere ansat i kortere perioder

Forskningslektor, Civilingeniør, Ph.D. Ulf Thrane.

Forskningsassistent, Civilingeniør, Kirsten Bundgaard Nielsen

Forskningsassistent, Civilingeniør, Birgitte Vedel Hansen

Forskningsassistent, Civilingeniør, Jørn Breumlund

