

Forudsigelse af råmælksosts kvalitet og fødevareresikkerhed



DATO: 02-05-2012

Slutrapport

for forsknings- og udviklingsprojekter med tilskud fra Innovationsloven

1. Projekttitle: Forudsigelse af råmælksosts kvalitet og fødevarerikkerhed

2. Direktoratets j.nr.: 3414-06-01558

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

Professor Mogens Jakobsen, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Biovidenskabelig Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, tlf. 35283216, fax. 35333214, e-mail: moj@life.ku.dk

4. Deltagende samarbejdsparter (navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):

- Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Natur- og Biovidenskabelig Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C.
 - Arla Foods, Arla Strategic Innovation Centre, Rørdrumvej 2, 8220 Brabrand.
-

5. Kontaktpersoner (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail. For hver deltagende institution er der er udpeget én kontaktperson):

Lektor Finn Kvist Vogensen, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Natur- og Biovidenskabelig Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, Frederiksberg C, tlf. 35333211, fax. 35333215, e-mail: fkv@life.ku.dk

Søren Lillevang, Arla Strategic Innovation Centre, Rørdrumvej 2, 8220 Brabrand, tlf. 8746 6710, e-mail: soren.k.lillevang@arlafoods.com

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

Post.doc. Wafa Masoud, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Natur- og Biovidenskabelig Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, Frederiksberg C, tlf. 35333287, fax. 35333215, e-mail: wm@life.ku.dk

Post.doc. Monica Takamiya Wik (barselsvikar). Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Natur- og Biovidenskabelig Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, Frederiksberg C, e-mail: Monica.takamiya@gmail.com

Lektor Finn Kvist Vogensen, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Natur- og Biovidenskabelig Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, Frederiksberg C, tlf. 35333211, fax. 35333215, e-mail: fkv@life.ku.dk

Mette Nørtoft Kristensen. Arla Foods amba, Innovation Centre Brabrand, tlf. 8746 6719, e.mail: mette.nortoft.kristensen@arlafoods.com.

7. Projektets start- og slutdato: 1. januar 2007 - 30. juni 2010

8. Slutrapport: (maks. 4-6 sider)**A. Sammendrag af projektets formål:**

Efterspørgslen efter råmælksoste er stigende. De betragtes som mere naturlige og især vurderes de at have et rigere og mere tiltrækkende smags- og aromabillede. Modsat kan den rå mælk være en kilde til fødevarebåren sygdom. Projektet har haft til formål at finde frem til mikrobiologiske samfund som kan fremelskes i råmælksoste og føre til den ønskede smag og kvalitet samt eliminere sygdomsfremkaldende bakterier i osten. Et vigtigt mål for projektet var udvikling af nye molekylærbiologiske metoder til kortlægning og kontrol af mikrobiologiske samspil.

B. Projektets resultater og konklusion:

Den molekylærbiologiske metode PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), som er en ny direkte og hurtig metode, der ikke kræver dyrkning, blev i projektet udviklet og anvendt til påvisning af specifikke mikroorganismer i rå mælk og i halvfaste råmælksoste på forskellige trin i modningsforløbet. Såvel DNA som RNA blev ekstraheret med det formål at bestemme alle bakterier, levende som døde (DNA), og deres metaboliske aktivitet (RNA) i mælk og ost. De opnåede resultater viste en stor mangfoldighed af bakterier i rå mælk. I modsætning hertil blev der påvist et snævert og ensartet udvalg af bakterier i de fremstillede danske og tilsvarende franske råmælksoste. Disse var domineret af *Lactococcus*, *Lactobacillus* og *Streptococcus* af varierende metabolisk akti-

vitet. Pyrosekventering af amplificeret ekstraheret DNA eller kopieret fra ekstraheret RNA blev for første gang taget i anvendelse for at få et endnu dybere kendskab til mælks og osts mikrobiologi. Pyrosekventering er en ny teknologi med en særdeles høj kapacitet, og resultaterne bekræftede dominansen af *Lactococcus*, *Lactobacillus* og *Streptococcus* alle med en overordnet dominans af *S. thermophilus* i osteprøverne, jævnfør DGGE analyserne, men viste endvidere en tilstedeværelse af mindre populationer af bakterier, som ikke kunne påvises ved DGGE. Som eksempel på den ny viden der kan opnås ved pyrosekventering kan nævnes at der blev påvist over 200 arter af bakterier i rå mælk dvs. en langt større mangfoldighed end påviselig ved DGGE og klassiske dyrkningsmetoder. Hovedparten optræder dog i så lave koncentrationer, at de ikke skønnes at påvirke ostens smage.

Der blev påvist antimikrobielle egenskaber hos dominerende bakterier i rå mælk rettet mod *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Disse egenskaber blev undersøgt i laboratoriesubstrater med det resultat at *Enterococcus faecium*, *Anguinibacter orientalis* og *Enterococcus faecalis* blev påvist at være effektive mod *L. monocytogenes*, medens *Microbacterium lacticum* og *Rhodococcus equi* viste sig at være effektive mod *S. aureus*. Med det formål at undersøge overlevelsen af patogene bakterier i ost under forskellige betingelser blev der fremstillet 8 oste med forskellige blandinger af starterkulturer og modelorganismer for patogene bakterier. Af disse blev 4 oste eftervarmet ved 39°C i 2 min, hvilket resulterede i en 2 timers pH nølefase og i 8 timer til et fald i pH fra 6.7 to 5.4 ("langsom syring"). De resterende 4 oste blev eftervarmet ved 50°C i 2 min, hvilket resulterede i 2 timers pH nølefase og 4 timer til pH fald fra 6.7 til 5.4 ("hurtig syring"). Det blev i disse ostningsforsøg fundet at *Listeria innocua* and *S. aureus* i alle tilfælde blev inaktiveret. Modsat blev levende *E. coli* påvist i rå mælk og ost uanset om de var tilsat eller optrådte naturligt og uanset eftervarmnings betingelser. Dog var antallet lavere efter eftervarmning ved 50 °C. end ved 39°C. Kvantitativ PCR blev brugt til bestemmelse af antallet af bakterier fra de tilsatte starterkulturer samt antallet af *E. coli*, *S. aureus* and *L. innocua* i rå mælk og oste. Det viste sig at starterkulturerne voksede i den første uge og dernæst aftog i antal i de efterfølgende uger af ostemodningen. *Listeria innocua* og *Staphylococcus aureus* voksede ikke på noget tidspunkt uafhængigt af tilsætningen af starterkulturer og betingelserne for eftervarmning. Derimod voksede *E. coli* i alle tilfælde i den første uger, hvorefter den aftog i antal under den fortsatte modning, uden dog i noget tilfælde at forsvinde helt.

For de nævnte 8 forskellige oste blev der foretaget analyse af deres aroma- og peptidprofiler. Eftervarmning ved 39°C resulterede i lavere koncentrationer af aroma forbindelser end eftervarmning ved 50°C. Når *Brevibacterium linens* og *M. lacticum* blev tilsat som modningskulturer og ostemælken blev eftervarmet ved 50°C blev dannelsen af aromakomponenter stimuleret og antallet af peptider steg svagt. Tilsvarende virkninger af modningskulturerne blev ikke observeret ved eftervarmning på 39°C.

På grundlag af de opnåede resultater konkluderes som følger:

1. Projektet har udviklet og indkørt robuste metoder til direkte isolering og oprensning af bakterielt DNA og RNA fra komplekse matricer som mælk og ost. Udviklingen af

disse metoder var en forudsætning for udvikling og anvendelsen af nye molekylærbiologiske metoder til opnåelse af ny viden om ostemodningens mikrobiologi.

2. PCR-DGGE blev udviklet og taget i anvendelse til specifik bestemmelse af henholdsvis metabolisk aktive og metabolisk inaktive, herunder døde, bakterier i mælk og halv-faste oste.
3. Pyrosekventering blev taget i anvendelse i projektet som et helt nyt værktøj til studier af den mikrobiologiske mangfoldighed i mælk og halvfaste oste samt til overvågning og forudsigelse af starterkulturers teknologiske egenskaber og patogene bakteriers overlevelse i halvfaste råmælksoste.
4. Projektet har påvist en stor bakteriel mangfoldighed i rå mælk og en overraskende ensartet bakteriepopulation i råmælksost domineret af ganske få arter, i såvel danske som franske halvfaste råmælksoste. Med andre ord, den rå mælks bakterielle mangfoldighed synes hurtigt at gå tabt.
5. Det er vist at *L. innocua*, *S. aureus*, brugt som modelorganismer for patogener i ost, ikke vokser og overlever i de halvfaste råmælksoste, som har indgået i projektet.
6. Projektets resultater for *E. coli*, brugt som modelorganisme for sygdomsfremkaldende *E. coli*, har påpeget at virulente stammer af *E. coli* er en risikofaktor i halvfaste råmælksoste.

C. Projektets faglige forløb:

De primære formål med projektet blev opnået med en enkelt undtagelse, som nævnt i nedenstående. Optimale metoder for ekstraktion og oprensning af bakterielt DNA og RNA blev udviklet og skabte grundlaget for anvendelse af PCR-DGGE og pyrosekventering til mikrobiologiske studier af mælk og ost. De skabte endvidere et grundlag for fremtidige metagenomiske studier til kortlægning af gener involveret i eksempelvis i ostemodning (**Fase 1**). PCR-DGGE, kvantitativ PCR og pyrosekventering blev udviklet og anvendt til at bestemme sammensætningen af bakteriepopulationer i rå mælk og råmælksoste. Det resulterede i ny viden om forekomst og aktivitet af ønskede bakterier og aktuelle patogene bakteriers muligheder for overlevelse og vækst i halvfaste råmælksoste afhængig af ostningsbetingelserne, primært eftervæmming og syrningsforløb, samt tilsætning af modningskulturer (**Fase 2**). Sammenhængen mellem ostens bakteriologi, de anvendte ostningsbetingelser, dannelsen af aromakomponenter og peptider blev undersøgt ved preliminaire gaskromatografiske (GC-MS) og HPLC analyser, som kræver yderligere studier for verificering (**Fase 3**).

Anvendelse af pyrosekventering var ikke forudset fra projektets start og på det punkt har projektet oversteget de stillede forventninger. Pyrosekventering er en metode af stor fremtidig betydning i mejerimikrobiologien. Teknologien, som er i stærk udvikling, blev i indeværende

projekt for første gang brugt i mejeriforskningen. Den succesfulde brug af teknologien hvilede på et effektivt samarbejde med Professor Søren Sørensen, KU, et samarbejde, som er fortsat i nye projekter finansieret af MFF.

Projektet blev forlænget tre gange inden for rammerne af det oprindelige budget. Årsagerne til forlængelserne var graviditetsorlov for den projektansatte forsker og en ekstra indsats for anvendelsen af pyrosekventering med tilhørende bioinformatik.

For samarbejdsprojekter med flere projektparter redegøres yderligere for:

Ingen øvrige projektparter

D. Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:

Projektets tillægges afgørende betydning for produktudvikling af oste og specielt råmælksoste, som har forbrugertække og eksportmuligheder med tilhørende skabelse af arbejdspladser i dansk mejeriindustri. Afgørende for råmælksostes udbredelse er at anvendelsen af ikke-pasteuriseret mælk ikke giver anledning til overlevelse og tilstedeværelse af patogene bakterier med efterfølgende fødevarebåren sygdom. Dette kan forebygges ved tiltag i hele produktionskæden og et indgående kendskab til de mikrobiologiske forhold under processen og i den modnede ost. Denne mikrobiologiske indsigt kan ikke opnås ved anvendelse af de traditionelle dyrkningsbaserede analysemetoder og på dette punkt har de dyrkninguafhængige molekylærbiologiske metoder, som er udviklet i projektet, betydet et væsentligt fremskridt til fordel for kvalitet og sikkerhed af råmælksoste og andre mejeriprodukter. Forhold som er af afgørende betydning for produkternes heldige markedsføring. De nye metoder har allerede fundet anvendelse i andre forskningsprojekter og de indgår i undervisningen af mejeribrugsstuderende på KU.

For forskningsprojekter suppleres med:

Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer:

I forbindelse med anvendelsen af pyrosekventering etableredes et samarbejde med Professor Søren J. Sørensen, Biologisk Institut, KU.

Mere generelt har arbejdet med de molekylærbiologiske metoder været diskuteret ved flere lejligheder med Professor Luca Cocolin, Torino Universitet, Italien.

Resume på engelsk:

In the present project, bacterial communities of raw milk and raw milk cheeses were determined by the PCR based and cultural independent method denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Furthermore, we were the first to determine the bacterial communities in raw milk and in cheeses by pyrosequencing. It was found that added starter cultures and *Streptococcus thermophilus* were the dominant bacteria present in cheeses at different stages of ripening. Raw milk showed a high diversity of bacteria but most of these bacteria were not detected in cheeses. A very good agreement was observed between pyrosequencing and PCR-DGGE methods targeting 16S rDNA in detecting the dominating bacteria present in the raw milk cheeses. The dominating bacterial genera, which included *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus*, were detected by pyrosequencing and DGGE methods in both

16S rDNA and cDNA obtained from cheese samples at different stages of ripening indicating their viability and contribution to the ripening of cheeses. However, minor bacterial populations present in raw milk cheeses were not detected by PCR-DGGE. Pyrosequencing made it possible to obtain an in depth information of minor bacterial populations in raw milk and raw milk cheeses. In addition, while PCR-DGGE is a semi quantitative method in which the intensity of the bands correlates to the prevalence of bacteria in cheeses, pyrosequencing provided a more reliable estimate of the relative abundance of the individual bacteria by being able to calculate percentages of bacteria sequences to the total number of sequences obtained. The effects of starter cultures, cooking temperature and rate of acidification on growth of pathogenic bacteria in raw milk cheeses were studied by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. A very good agreement was observed between the pyrosequencing of 16S rDNA and cDNA and qRT-PCR for detection and quantification of starter cultures, *E. coli*, *L. innocua* and *S. aureus* in milk and cheeses. Pyrosequencing and qRT-PCR showed that *L. innocua* and *S. aureus* were only detected in the DNA extracted from cheeses to which they were added but not in the RNA extracted from the same samples indicating their non-viable states. It was observed that *L. innocua* and *S. aureus* showed the same behaviour in cheeses with and without the addition of the ripening starters *B. linens* and *M. lacticum*. It appears that *L. innocua* and *S. aureus* were not inhibited by *B. linens* or *M. lacticum* in cheese. Inhibition of *L. innocua* and *S. aureus* might be due to acidification or to other environmental conditions during cheese ripening. On the other hand, *E. coli* was found in the 16S rDNA and cDNA libraries extracted from raw milk samples and in all cheeses at different stages of ripening reaching the highest percentages at 7 days of ripening, where after it decreased at later stages of ripening. *E. coli* showed the same behaviour in milk and cheeses whether *B. linens* and *M. lacticum* were added or not indicating that these two bacteria did not have inhibitory effect on growth and survival of *E. coli*. In addition, the percentages of *E. coli* in cheeses cooked at 39°C were higher than those treated with 50°C indicating that the higher temperature seems to reduce growth of *E. coli* in cheeses. The use of culture independent methods pyrosequencing and qRT-PCR allow a deeper understanding of the behaviour of the indigenous microbiota, starter cultures and pathogenic bacteria in raw milk and cheeses at different stages of ripening. Further molecular biology based studies are needed to fully understand the occurrence and survival of undesired and pathogenic bacteria during ripening of raw milk cheeses. Such studies will help finding means for preventing survival of pathogenic microorganisms in raw milk cheeses.

E. Redegørelse for projektets perspektiver

Analyser af mikrobiologiske samfund i rå mælk og råmælksoste ved hjælp af molekylærbiologiske metoder har i projektet ført til ny viden sammenholdt med anvendelse af de hidtil og stadig anvendte traditionelle dyrkningsmetoder. Projektet har skabt grundlag for at erstatte disse traditionelle dyrkningsmetoder med dyrkningsuafhængige metoder som har en betydelig større specificitet, følsomhed og præcision og samtidig kan være langt hurtigere end analyser der kræver flere dages inkubation og fremvækst af kolonier på et agar substrat. Denne udvikling, som især hviler på "next generation sequencing" (f.eks. pyrosekventering på Roche 454 og Illumina) giver nye perspektiver, der leder frem til metagenomics hvor ostekvalitet og fødevarer-

sikkerhed vurderes på grundlag af et overordnet billede af tilstedeværende mikrobielle enzymer og deres aktivitet, dvs. en forståelse på molekylært niveau. Det overordnede perspektiv er styring og overvågning af kvalitet og fødevarerikkerhed for råmælksoste på eksakt videnskabeligt grundlag frem for rutiner erhvervet gennem erfaring.

Projektets økonomiske forløb:

Der har ikke været ændringer i budgettet, men som nævnt ovenfor har projektet været forlænget under det bevilligede budget.

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

Peer-reviewed publikationer

Masoud, W., Takamiya, M., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S.J. & Jakobsen, M. 2011. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and pyrosequencing. *International Dairy Journal*, 21, 142-148.

Masoud, W., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S.J. & Jakobsen, M. 2012. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time PCR (qRT-PCR). *International Journal of Food Microbiology*, 153: 192-202.

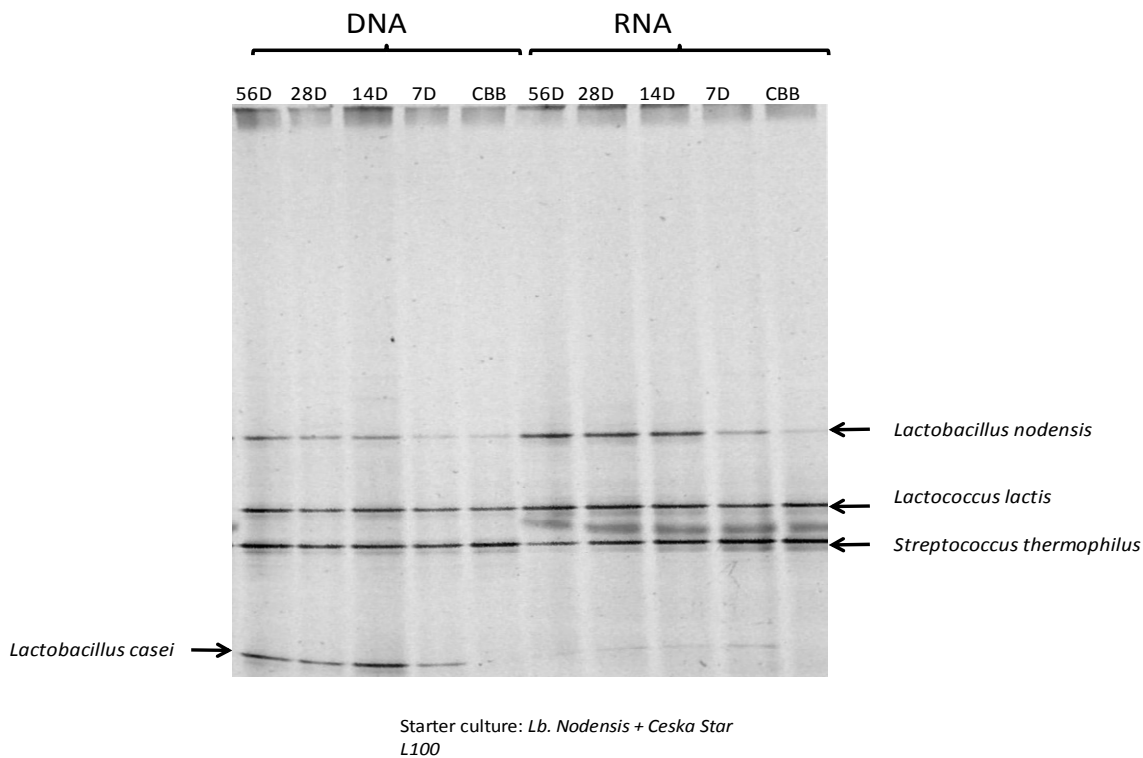
Nationale publikationer

Takamiya, M., Masoud, W. & Jakobsen, M. 2008. Danish raw milk cheese: quality and food safety. *Mælkeritidende*, 16: 370-372.

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

Analyse af mikrobiologiske samfund i rå mælk og råmælksoste ved Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE).

Efter udvikling og optimering af metoder til ekstraktion og oprensning af DNA og RNA fra mælk og ost blev PCR-DGGE metoden indkørt og taget i anvendelse, et udviklingsarbejde, som især var kompliceret og tidskrævende for en så sammensat fødevarermatrix som ost. PCR-DGGE blev udviklet til analyse af komplekse bakteriepopulationer i rå mælk og råmælksoste på forskellige modningstrin. Der blev påvist en stor mangfoldighed af bakterier i den rå mælk, som omtales senere. Modsat, og som det fremgår i det følgende, var mangfoldigheden uventet lav for selve osten i alle faser af produktionen med en snæver population domineret af de anvendte syrningskulturer og *Streptococcus thermophilus*. Figur 1 viser PCR-DGGE profilerne for DNA og RNA ekstraheret under forskellige tidspunkter af en osteproduktion, hvor *Lactobacillus nodensis*, *Lactococcus lactis* blev anvendt som starterkultur. *L. nodensis*, *L. lactis* men også *Streptococcus thermophilus* blev fundet i PCR-DGGE profilerne i alle prøver fra såvel DNA som RNA, hvilket viser at de tre bakteriearter er levende og metabolisk aktive. Også *Lactobacillus casei* fundet i DNA profilen, men kun svagt i RNA profilen, hvilket indikerer at den metaboliske aktivitet af *L. casei* er lav i osten. Resultater som disse underbygger at molekylærbiologiske metoder kan bidrage med ny viden sammenlignet med klassiske dyrkningsmetoder.



Figur 1. PCR-DGGE profiler for DNA og RNA ekstraheret fra prøver taget fra osteproduktion på forskellige trin, ost før saltning og efter 7, 14, 28 og 56 dages modning.

De dominerende bakterier, som blev påvist i PCR-DGGE profiler for DNA og RNA af en anden produktion af halvfaste råmælksoste er vist i Fig. 2. *Lactobacillus helveticus* and *S. thermophilus* blev påvist i både DNA og RNA profilerne som et tegn på at de er levende og aktive. *L. lactis* blev fundet i DNA profilerne fra prøverne men kun i RNA profilerne fra ostekorn, hvilket antyder at *L. lactis* hurtigt dør ud. *Lactobacillus delbrueckii* blev påvist i DNA PCR-DGGE profilerne fra dag 14, 28 og 56 men ikke i RNA profilerne fra de same prøver. *Lactobacillus fermentum* og *L. casei* blev fundet i PCR-DGGE profilerne fra RNA ekstraheret efter 14, 28 og 56 dages modning men ikke i PCR-DGGE profilerne fra DNA ekstraheret fra de same prøver. Sidstnævnte resultater tyder på at de to bakteriearter i PCR-DGGE analysen fra DNA kunne være blevet maskeret af andre bakterier, som var til stede i høje koncentrationer, men at de her er metabolisk meget aktive. *Brevibacterium stationis* blev kun påvist i RNA ekstraheret i ost undersøgt efter 28 dages modning. Dette kunne tyde på en tilstedeværelse i en lav koncentration tæt på eller under detektionsgrænsen.

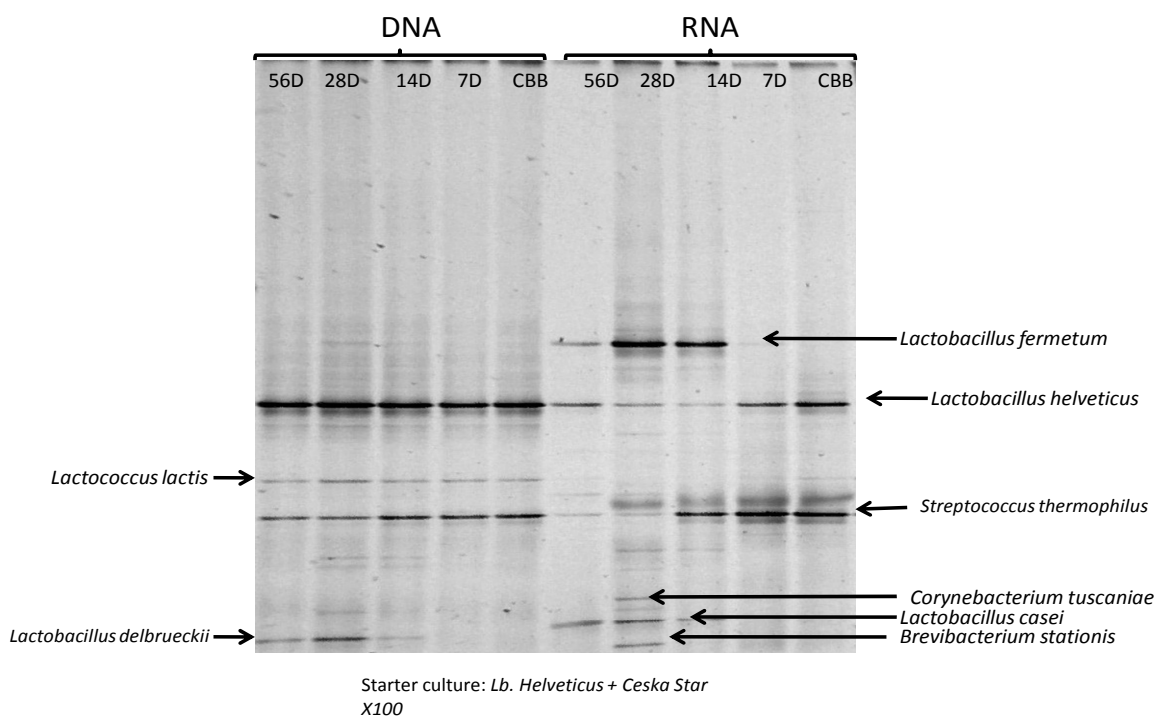


Fig.2 DGGE profiler for DNA og RNA ekstraheret fra prøver taget fra osteproduktion batch 6.2.2 på forskellige trin. (ost før saltning og efter 7, 14, 28 og 56 dages modning). Starterkulturer *Lb. Helveticus* + Ceska Star X100.

Analyse af mikrobiologiske samfund i råmælksoste ved pyrosekventering.

Med det formål at få flere oplysninger om bakteriepopulationerne i rå mælk og i råmælksoste og samtidig kunne validere PCR-DGGE resultaterne blev pyrosekventering taget i anvendelse i projektet. Teknologien blev også set som realistisk og tidssvarende til fremtidige metagenomiske studier. Den erstattede således den planlagte og delvist gennemførte etablering af et klonbibliotek, som var en særdeles arbejdskrævende fremgangsmåde beregnet til preliminare metagenomiske studier i henhold til den oprindelige projektansøgning. PCR amplificeret fra DNA and cDNA ekstraheret fra ost blev analyseret ved pyrosekventering. Resultaterne fra pyrosekventering af prøver fra rå mælk er indeholdt i det følgende afsnit.

De opnåede sekvenser ved analyse af bakterielt DNA og RNA fra råmælksoste efter blev sammenholdt med sekvenser fra 16S rDNA and cDNA biblioteker og det blev bekræftet at de dominerende bakterier i råmælksoste tilhører slægterne *Streptococcus*, *Lactococcus* og *Lactobacillus*. I de 22 undersøgte osteprøver udgjorde slægten *Streptococcus* henholdsvis 9.1 til 93.5 and 31.1 til 99.2 % af de læste sekvenser i 16S rDNA og cDNA bibliotekerne. For alle sekvenser med homologi til slægten *Streptococcus* blev det ved MG-RAST identifikation vist at det drejede sig om *S. thermophilus*. I oste fra to produktioner udgjorde *Lactococcus* 6.2 til 32.6 og 0.8 til 68.2 % de læste sekvenser ifølge 16S rDNA og cDNA sekvensering. Her blev *Lactococcus lactis* anvendt som starterkultur. I modsætning hertil viste resultaterne fra to andre produktioner hvor *L. lactis* ikke anvendtes som starterkultur, en forekomst af *Lactococcus* svarende til henholdsvis 1.1 til 2.3 and 0.1 til 1.7 % af de læste sekvenser. Der var i alle tilfælde tale om *L. lactis*. I oste fra to produktioner, udgjorde *Lactobacillus* henholdsvis 0.3 til 23 and 0 til 22.2 %. Mere end 95% af de aflæste sekvenser til artsbestemmelsen var *Lb. nodensis* (starterkultur) mens de resterende blev identificeret som *Lb. casei* og *Lactobacillus tuceti*. I en anden ost blev omkring 99 % af sekvenserne henført til *Lactobacillus* identificeret som *Lactobacillus Plantarum* (starterkultur). I de sidste produktioner blev henholdsvis 59.4 til 87.6 og 13.1 til 43.8 % af de læste sekvenser i henhold til 16S rDNA and cDNA bibliotekerne henført til *Lactobacillus*. Af disse blev 95-99 % identificeret som *Lb. helveticus* (starterkultur) og de resterende som *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* (starterkultur) og *Lb. fermentum*. *Corynebacterium* påvistes både i 16S rDNA og cDNA bibliotekerne i praktiske taget alle undersøgte osteprøver i niveauer svarende til henholdsvis 0,1 til 2.7 and 0,1 til 3.3 % af alle læste sekvenser. Andre bakterier som *Brevibacterium*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Halomonas* og *Staphylococcus* blev påvist lejlighedsvist i osteprøver og i lave niveauer under 1%. *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Vagococcus*, *Weissella* og *Enterococcus* også ind imellem påvist i lignende lave niveauer.

Vækst og overlevelse af patogene bakterier i råmælksost undersøgt ved pyrosekventering og kvantitativ PCR (qRT)-PCR

Med det formål at undersøge betydningen af syrnings – og modningskulturer, temperaturforhold ved eftervarmning af ostemælken samt syrningshastighed for vækst og overlevelse af patogene bakterier blev der fremstillet oste under de betingelser der er vist i Tabel 1. Som det ses af tabellen blev ostene eftervarmet ved henholdsvis 39°C og 50°C, i begge tilfælde i 2 min. De tilhørende syrningsforløb svarede i begge tilfælde til en lag periode på 2 timer medens tiden til et fald i pH fra 6,7 til 5,4 var henholdsvis 8 timer ("langsom syrning") og 4 timer ("hurtig syrning") for eftervarmning ved 39°C og 50°C. For hver temperatur fremstilledes 4 ostninger med forskellige blandinger af bakterier, som vist i Tabel 1. Blandingerne indeholdt bl.a. *Brevibacterium. linens* og *Microbacterium lacticum* tilsat som modningskulturer og *Eschericia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* tilsat som modelorganismer for patogener.

Den mikrobiologiske mangfoldighed i rå mælk og de fremstillede oste blev analyseret ved pyrosekventering, som beskrevet i ovenstående. Starter- og modningskulturer samt modelorganismerne for de udvalgte patogener blev bestemt ved qRT-PCR.

Tabel 1. De otte batches af råmælksost, som blev eftervarmet ved henholdsvis 39°C og 50°C og tilsat forskellige blandinger af bakterier inklusive starter, modnings bakterier samt modelorganismer for aktuelle patogener.

Ost batchnummer	Eftervarmningstemperatur	Tilsatte bakterier
16-3-1	39 °C	<i>Lactococcus lactis</i> L005
16-3-2	39 °C	<i>Lactococcus lactis</i> , L005, <i>Escherichia coli</i> ATCC 43888, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 og <i>Listeria innocua</i> 073.002 (mix 1)
16-3-3	39 °C	<i>Lactococcus lactis</i> , L005, <i>Brevibacterium linens</i> 004-0001 og <i>Microbacterium lacticum</i> M009 (mix 2)
16-3-4	39 °C	<i>Lactococcus lactis</i> , L005, <i>Brevibacterium linens</i> 004-0001, <i>Microbacterium lacticum</i> M009, <i>Escherichia coli</i> ATCC 43888, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 og <i>Listeria innocua</i> 073.002 (mix 3)
16-4-1	50 °C	<i>Lactococcus lactis</i> L005 og <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BGP-2
16-4-2	50 °C	<i>Lactococcus lactis</i> L005, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BGP-2, <i>Escherichia coli</i> ATCC 43888, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 og <i>Listeria innocua</i> 073.002 (mix 1)
16-4-3	50 °C	<i>Lactococcus lactis</i> L005, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BGP-2, <i>Brevibacterium linens</i> 004-0001 og <i>Microbacterium lacticum</i> M009 (mix 2)
16-4-4	50 °C	<i>Lactococcus lactis</i> L005, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BGP-2, <i>Brevibacterium linens</i> 004-0001, <i>Microbacterium lacticum</i> M009, <i>Escherichia coli</i> ATCC 43888, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 og <i>Listeria innocua</i> 073.002 (mix 3)

I den rå mælk blev påvist 117 and 53 bakteriearter med oprindelse i henholdsvis 16S rDNA og cDNA. *Streptococcus thermophilus* udgjorde gennemsnitlig 45 % og 48 % af alle sekvenser fra henholdsvis 16S rDNA and cDNA. De resterende streptokok arter udgjorde mindre end 0.1 % og inkluderede *Streptococcus suis*, *Streptococcus parauberis* og *Streptococcus mitis*. *Lactococcus lactis* var den næsthypigste art og udgjorde i gennemsnit henholdsvis 20.6 % og 22.8 % af alle læste sekvenser fra 16S rDNA and cDNA. De resterende laktokokker var *Lactococcus piscium* og *Lactococcus chungangensis*, der udgjorde mindre end 0.1 % af sekvenserne. *Lactobacillus* udgjorde samlet henholdsvis 8 % og 3,7 % domineret af *Lactobacillus helveticus* og *Lactobacillus rhamnosus*. Andre bakterier udgjorde 1-5% af alle læste sekvenser fra DNA and RNA ekstraheret fra den rå mælk og omfattede *Aerococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mariomonas*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* og *Staphylococcus*. Andre bakterier udgjorde mindre end 1 % af alle læste sekvenser.

I de fire oste fremstillet med eftervarmning ved 39°C ,batches 16-3-1, 2, 3 and 4 (Tabel 1, langsomt syrningsforløb), var *L. lactis*, der blev tilsat som starterterkultur, den dominerende bakterie i hele proces forløbet. Den udgjorde tidligt i forløbet 49 til 97 % og sent i forløbet 70 til 92 % af alle sekvenser læst for henholdsvis 16S

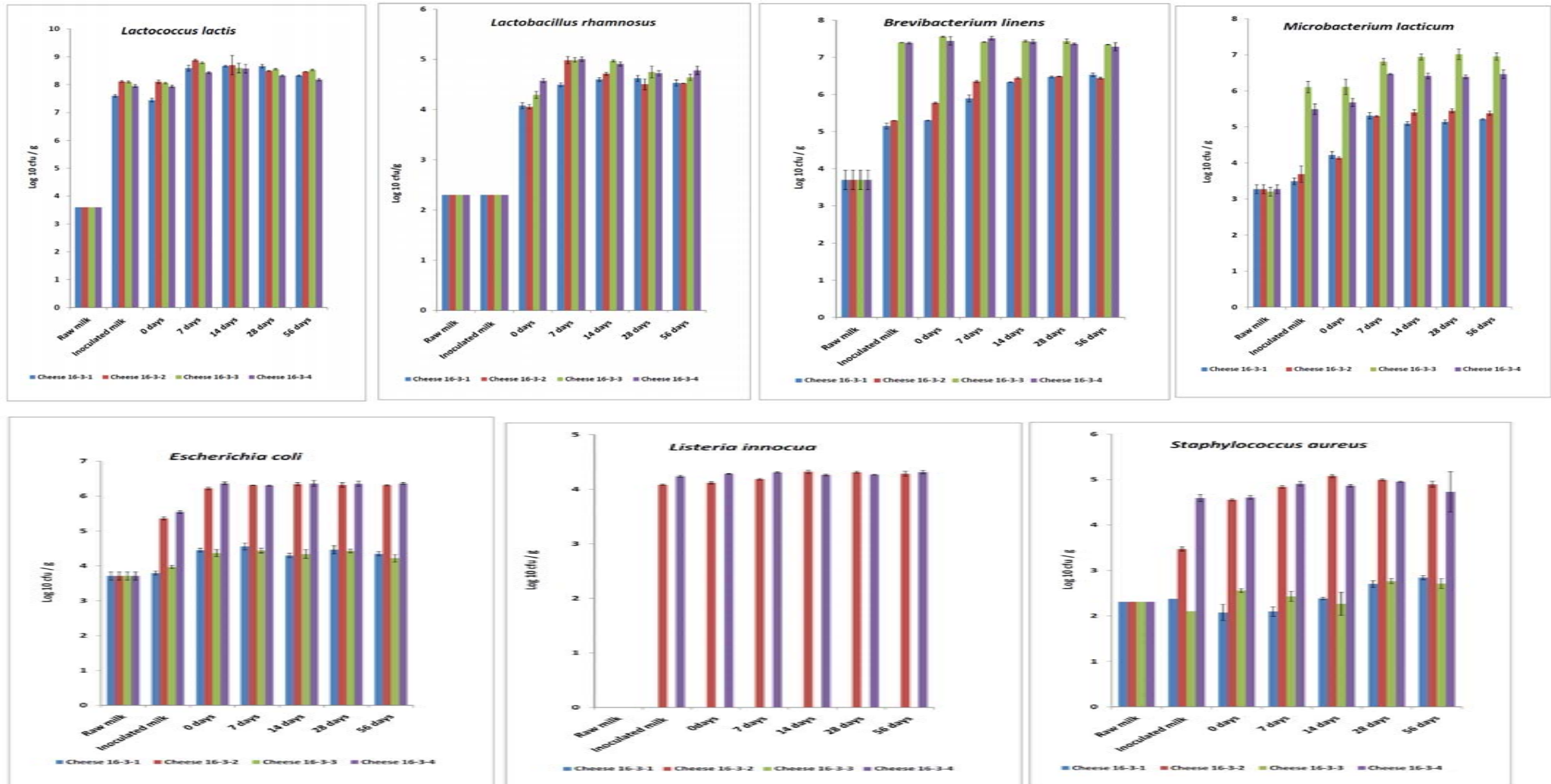


Fig. 3. Mængder af *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Brevibacterium linens*, *Microbacterium lacticum*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* og *Staphylococcus aureus* bestemt ved kvantitativ realtids-PCR (QRT-PCR) af DNA ekstraheret fra råmælk, inokuleret mælk, ost 16-3, 1, 2, 3 og 4 ved 0, 7, 14, 28 og 56 dage efter modning.

rDNA and cDNA . De øvrige bakterier, som var tilstede både i læsninger af 16S rDNA and cDNA inkluderede *St. thermophilus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *B. linens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Methylobacterium sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* og *Staphylococcus xylosus*. *Escherichia coli* blev også påvist i såvel DNA som RNA ekstraheret fra mælk og ost og dette uafhængigt af om den var tilsat eller ikke. Dens forekomst var dog tæt på 0.1 % i mælk og oste, hvor den ikke var tilsat men ca. 10 % når den er tilsat. Det skal bemærkes at efter tilsætning af *E. coli* observeredes en stigning efter 7 dage, som et tegn på vækst. Modsat blev modelorganismene *S. aureus* and *L. innocua* observeret i ekstraheret DNA fra mælk og ost men ikke i RNA, hvilket indikerer at disse modelorganismer er inaktive og formentlig er gået til grunde under de herskende betingelser i ostemælk og ost. Andre bakterier som *Lc. chungangensis*, *Lb. helveticus*, *Lb. coryniformis* og *Lb. acidipiscis* blev kun observeret i sekvenser fra 16S rDNA og ikke i cDNA hvilket indikerer, at de er metabolisk inaktive.

I de oste , som blev eftervarmet ved 50°C (hurtigt syrningsforløb) og hvor både *Lc. lactis* og *Lb. rhamnosus* blev tilsat (Tabel 1) var de dominerende bakterier igennem hele modningsforløbet *St. thermophilus*, *Lc. lactis*, *Lb. casei* og *Lb. rhamnosus*. *E. coli* opførte sig som beskrevet i ovenstående efter varmebehandling af ostemælken ved 39°C. Der var dog tale om ringere vækst og forekomst i lavere niveauer, når ostemælken blev eftervarmet ved 50°C. Modelorganismene *S. aureus* og *L. innocua* opførte sig ligeledes som beskrevet for eftervarmning ved 39°C, dvs. ingen vækst og hurtig indtræden af en metabolisk inaktiv tilstand, formentlig inaktivering og drab.

Antallet af tilsatte starterkulturer og modelorganismene for ostebårne patogener blev bestemt for ostemælk og under modningsforløbet ved qRT-PCR. De opnåede resultater fremgår af Fig 3. De hviler på analyse af DNA ekstraheret fra ostemælk og oste, som blev eftervarmet ved 39°C. *Lc. lactis* og *Lb. rhamnosus* optrådte naturligt i den rå mælk i niveauer i størrelsesordenen henholdsvis 10^4 cfu/g og 10^2 cfu/g. For *Lc. lactis* der også blev anvendt som starterkultur opnåedes et niveau af størrelsesordenen 10^9 cfu/g i osten, medens populationen af *Lb. rhamnosus* steg til ca. 10^5 cfu/g under modningsforløbet. Antallet af modningskulturene *B. linens* og *M. lacticum* var henholdsvis ca. 5×10^3 cfu / g og ca. 2×10^3 cfu/g i den rå mælk. Et tal som øgedes med en faktor tusind til ti tusinde i de oste. hvor disse kulturer blev tilsat som modningskulturer. Med hensyn til de tilsatte modelorganismer *E. coli*, *L. innocua* and *S. aureus*, så blev *E. coli* fundet i niveauer på ca. 3.7×10^3 i oste hvor de ikke var tilsat og op til 2.4×10^6 cfu/g i oste hvor de var tilsat. Det er værd at bemærke at *E. coli* har haft mulighed for vækst i de undersøgte oste. *Listeria. innocua* optrådte i et antal på ca. 2×10^4 cfu/g i oste, hvor de var tilsat. *Staphylococcus aureus* blev påvist i den rå mælk i et antal på ca. 2×10^2 cfu/g og efter tilsætning på niveauer i størrelsesordenen 5×10^4 cfu/g i ost.

Resultaterne peger på, at det blandt patogenerne virulente *E. coli*, toksin producerende *S. aureus* og *L. monocytogenes* er førstnævnte som udgør en risikofaktor for de råmælksoste, som er undersøgt i indeværende projekt.

Antallet af de pågældende bakterier blev også bestemt ved qRT-PCR rettet mod RNA ekstraheret fra ostemælk og råmælksost (resultater ikke vist). For alle bakterier med undtagelse af *L. innocua* og *S. aureus* svarede de relative ændringer under modningsforløbene til de ændringer der blev observeret i mængden af bakterier bestemt ved qRT-PCR rettet mod DNA. Groft sagt betyder det at de bakterier, som påvises er aktive og i live. Det gælder ikke for *L. innocua* og *S. aureus* som ikke kunne detekteres i ekstraheret RNA. Den simple forklaring vil være at disse bakterier ikke længere er i live.

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

Mogens Jakobsen, Professor, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi,
Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

Mogens Jakobsen

den

2/5/12
