

Nye veje til optimeret ostekvalitet – ”smal talk og funktionelle komponenter”





DATO: 1. juni 2010

Slutrapport

for forsknings- og udviklingsprojekter med tilskud fra Innovationsloven

1. Projekttitle: Nye veje til optimeret ostekvalitet – ”smalltalk og funktionelle komponenter”

2. Direktoratets j.nr.: 3414-05-01130

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

Mejeribrugets Forskningsfond

Landbrug & Fødevarer, Agro Food Park 15, 8200 Århus N, tlf: 3339 4665, e-mail: pmn@lf.dk

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

Professor Lene Jespersen, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, tlf. 35283230, fax. 35333214, e-mail: lj@life.ku.dk

Søren K. Lillevang, Arla Foods amba, Skanderborgvej 277, 8260 Viby J, tlf: 8938 1000, fax: 8628 1691, e-mail: sklv@arlafoods.com

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

Alle relevante oplysninger skal fremgå af selve slutrapporten.

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

Direktoratet for FødevareErhverv
Udviklingskontoret
Kampmannsgade 3
1780 København V

juli 2001

Professor Lene Jespersen, Institut for Fødevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, tlf. 35283230, fax. 35333214, e-mail: lj@life.ku.dk

Søren K. Lillevang, Arla Foods a.m.b.a., Skanderborgvej 277, 8260 Viby J, tlf: 8938 1000, fax: 8628 1691, e-mail: sklv@arlafoods.com

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

Postdoc Klaus Gori, Institut for Fødevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, Frederiksberg C, tlf. 35283284, fax. 35333215, e-mail: klg@life.ku.dk

Videnskabelig assistent Peter Boldsen Knudsen, Institut for Fødevidenskab, Fødevaremikrobiologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, Frederiksberg C, tlf. 31242203, fax. 35333215, e-mail: pbk@hotmail.com

7. Projektets start- og slutdato: 1. juli 2005 - 30. juni 2010

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

A. Sammendrag af projektets formål:

Formålet med projektet var at undersøge, hvorvidt mejerirelevante mikroorganismer er i stand til at kommunikere i form af quorum sensing. Dette blev undersøgt for såvel bakterier og mejerirelevante gær. For mejerirelevante mikroorganismer, hvor quorum sensing blev påvist, blev det undersøgt, hvorledes mejerirelevante miljøfaktorer påvirker evnen til at producere signalstoffer af relevans for mikrobiel kommunikation. For at afklare om quorum sensing har betydning for ostefremstilling blev relevante kulturers produktion af signalstoffer undersøgt i ostemodellsystemer.

B. Projektets resultater og konklusion:

Gennem projektet blev det for første gang vist, at mange mejerirelevante mikroorganismer producerer signalstoffer. Kitbakterier producerer det generelle bakterielle signalstof autoinducer-2 (AI-2) (Gori *et al.* 2010b). For flere af de undersøgte kitbakterier blev det vist, at mejerirelevante miljøfaktorer som lav pH og høje NaCl koncentrationer stimulerer AI-2 produktionen, og det er derfor sandsynligt at quorum sensing i kitbakterier er med til at styre væksten af disse bakterier under forhold, hvor pH er lavt og NaCl koncentrationen er høj, som det er tilfældet under produktion af for eksempel overflademodnede oste. Kitbakterierne producerer ikke kun AI-2 i flydende medier men ligeledes på faste ostesubstrater. Til understøttelse af disse resultater blev det i samarbejde med et KU-LIFE finansieret projekt vist, at probiotiske *Lactobacillus* spp. ligeledes producerer AI-2, og at der er stor variation i mæng-

den af producerede signalstoffer mellem forskellige probiotiske stammer. Stigningen i AI-2 produktion blev påvirket negativt ved forudgående adaptation til syre, hvilket tyder på at netop AI-2 er involveret i regulering af vækst og overlevelse ved lavt pH. Ekspressionen af *luxS* (det ansvarlig gen for AI-2 aktivitet) blev bestemt ved qRT PCR og kunne korreleres til AI-2 aktiviteten i de undersøgte *Lactobacillus* spp (Moslehi-Jenabian *et al.* 2009). Screening af kitbakteriers produktion af peptid-lignende signalstoffer resulterede i identifikation af en stamme af hver af arterne *Staphylococcus warneri* og *Staphylococcus epidermidis* med en speciel høj aktivitet mod *Listeria* spp. (Gori *et al.* 2010c).

For den for mejeriindustrien vigtige gær *Debaryomyces hansenii* blev det vist at denne gær producerer de aromatiske alkoholer phenylethanol, tyrosol og tryptofol tidligere rapporteret til at være signalstoffer i *Candida albicans* og *Saccharomyces cerevisiae* (Gori *et al.* 2010a). Produktionen af aromatiske alkoholer er afhængig af tilgængeligheden af aminosyrer, ammonium, NaCl, temperatur og pH. *D. hansenii* producerer ikke farnesol, en alifatiske alkohol der ligeledes tidligere er rapporteret til at være et signalstof i *Candida albicans* og *Saccharomyces cerevisiae*. Disse signalstoffer menes at være af betydning for gærs evne til at danne biofilm på faste overflader og kan derfor være af relevans under fremstilling af ost. En af de undersøgte *D. hansenii* stammer udviste en speciel stor evne til at danne biofilm, hvilket blev stimuleret af aromatiske alkoholer, mens farnesol hæmmede de to egenskaber. Udover aromatiske alkoholer blev det vist at *D. hansenii* producerer og anvender ammoniak som signalstof til koordination af vækst (Gori *et al.* 2007).

Konklusionen på indeværende projekt er at en lang række af både pro- og eukaryotiske mejerirelevante mikroorganismer producerer en række forskellige signalstoffer, der anvendes til at koordinere vækst og overlevelse i komplekse mikrobielle samfund. Af egenskaber der for mejerirelevante mikroorganismer synes at være under quorum sensing kontrol er vækst og overlevelse under lave pH og høj NaCl koncentration samt evnen at etablere sig på faste overflader, alle egenskaber, der er af betydning under fremstilling af mange mejeriprodukter. Den opnåede viden er ny, og der er derfor behov for yderligere forskning på området. Kendskabet til hvorledes quorum sensing påvirker mikroorganismers vækst og egenskaber synes dog allerede at kunne anvendes til at få en større forståelse for mejerirelevante mikroorganismer evne til at etablere sig og dermed på sigt kan anvendes til optimering af produktionen af en række mejeriprodukter.

C. Projektets faglige forløb:

Projektets overordnede formål blev opfyldt og tilvejebragte helt ny viden omkring intra- og interspecies quorum sensing i komplekse mejerirelevante mikrobiologiske miljøer (Fase 1). Blandt bakterielle signalstoffer var der speciel fokus på gruppen af signalstoffer, som kaldes autoinducer-2 (AI-2). AI-2 aktivitet blev påvist i adskillige kitbakterier og probiotiske stammer af *Lactobacillus* spp. Ydermere blev kitbakterier undersøgt for deres produktion af peptider med quorum sensing egenskaber. Desværre lykkedes det ikke at finde sådanne peptider, men arbejdet resulterede derimod i identifikation af en stamme af hver af arterne *Staphylococcus warneri* og *Staphylococcus epidermidis* med en speciel høj aktivitet mod *Listeria* spp. Også mejerirelevante gær herunder specielt *Debaryomyces hansenii* blev undersøgt for pro-

duktion af signalstoffer. Stammer af *D. hansenii* blev fundet til at producere alkohol-baserede signalstoffer involveret i biofilmdannelse samt ammoniak involveret i koordinationen af vækst. Mejerirelevante miljøfaktorerens betydning for signalstoffer blev undersøgt (fase 3). I flere tilfælde stimulerede lav pH og høje NaCl koncentrationer AI-2 aktiviteten i kitbakterier. Produktionen af alkoholbaserede signalstoffer i *D. hansenii* var ligeledes afhængig af forskellige miljøfaktorer såsom tilgængeligheden aminosyrer, ammonium, NaCl, temperatur og pH. Med hensyn industrielle applikationer (fase 4) blev relevante signalstoffer forsøgt detekteret i ostematricer. AI-2 aktivitet kunne detekteres for kitbakterier voksende på fast ostemodel substrat. Ligeledes blev alkoholbaserede signalstoffer forsøgt detekteret i ostematricer dog uden positiv resultat og det vurderes at der kræves et større udviklingsarbejde for at få teknikker indført der kan bestemme AI-2 i komplekse fødevarematricer. Angående fase 2 omkring funktionelle komponenters betydning for mejeriprodukters organoleptiske kvalitet skulle en specialestuderende have været tilknyttet projektet. Da det ikke var muligt at finde en egnet specialestuderende med interesse for dette område, blev denne fase ikke udført.

Projektet blev forlænget indenfor det oprindelige budget (udgiftsneutralt). Den primære grund til forlængelserne var, at den ansatte postdoc på projektet havde orlov for at arbejde på relaterede projekter. Størstedelen af midlerne til eksternt bistand blev konverteret til drift, da det ikke var muligt at finde egnede samarbejdspartnere, og det blev besluttet selv at udføre analyserne i samarbejde med Institut for Systembiologi, Center for Mikrobiel Bioteknologi, Danmarks Tekniske Universitet, hvor en forskningsassistent blev ansat i 4 mdr.

D. For samarbejdsprojekter med flere projektparter redegøres yderligere for:

Der har været tale om et tæt integreret samarbejde parterne imellem i overensstemmelse med arbejdsdelingen som fastlagt i den godkendte ansøgning.

E. Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:

Projektet har for første gang påvist at mejerirelevante mikroorganismer producerer signalstoffer af betydning for vækst og overlevelse. Tidligere har denne viden kun eksisteret for patogene mikroorganismer og været anvendt i kliniske miljøer. Med den nu opnåede viden er det vist at quorum sensing er et signalsystem, der er generelt udbredt blandt såvel pro- som eukaryotiske mikroorganismer. Manglende viden omkring quorum sensing og signalstoffers betydning under produktion af fødevarer som for eksempel mejeriprodukter kan medføre, at den mikrobielle population i/på fødevarer ikke udvikler sig som ønsket – dette kan medfører dårlig kvalitet, øget spild, forkortet holdbarhed eller i værste fald fremvækst af uønskede fordærmelsesmikroorganismer eller patogene bakterier. På baggrund af den i projektet opnåede viden er det oplagt, at det forsat forsknings- og innovationsmæssigt arbejdes på at afklare, hvorledes mejerierne/fødevarerindustrien aktivt kan anvende den nye viden til en bedre og mere optimal fødevarerproduktion.

F. For forskningsprojekter suppleres med:

Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer:

Under arbejdet med påvisning af alkoholer som quorum sensing molekyler i mejerirelevante gær blev der indledt et samarbejde med lektor Kristian Fog Nielsen, Institut for Systembiologi, Center for Mikrobiel Bioteknologi, Danmarks Tekniske Universitet.

Redegørelse for forskeruddannelse herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationeringer:

PhD studerende Micol Purrotti fra Department of Animal and Human Biology, University of Turin, var tilknyttet projektet i seks måneder. Micol Purrotti arbejdede primært med påvisning af autoinducer-2 (AI-2) produktion i kitbakterier.

Arbejdet med AI-2 og anvendelsen af de udviklede metoder blev endvidere anvendt i et KULIFE finansieret PhD-projekt med titlen "Interactions between probiotics, enteropathogenic microorganisms and the intestinal microbiota", udført af Salomeh Moslehi-Jenabian.

Resume på engelsk:

The present project has for the first time shown that dairy-relevant microorganisms produce quorum sensing molecules used for regulation of several physiological traits. Smear bacteria were found to produce the general bacterial signalling molecule autoinducer-2 (AI-2), and even for some strains, the AI-2 production was found to be stimulated by dairy-relevant stress conditions including low pH and high NaCl concentrations. Furthermore, AI-2 activity was determined for smear bacteria when grown on solid cheese model substrate. Strains of probiotic *Lactobacillus* spp. were also found to produce AI-2, though strain variation was found. In general, acid stress stimulated the production of AI-2 in *Lactobacillus* spp. However, the stimulation was negatively influenced by acid adaptation. Expression of *luxS* (the responsible gene for AI-2 production) was determined by qRT PCR and could be correlated to AI-2 activity of the investigated strains of *Lactobacillus* spp. Screening of peptid-like signalling molecules resulted in identification of one strain of each of the species *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus epidermidis* with particular high anti-listerial activity. The dairy-important yeast *Debaryomyces hansenii* was found to produce the aromatic alcohols phenylethanol, tyrosol and tryptophol earlier reported as signalling molecules in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The production of aromatic alcohols was dependent on the availability of amino acids, ammonium, NaCl, temperature and pH. *D. hansenii* did not seem to produce the aliphatic alcohol farnesol also previously reported to be a signalling molecule in *C. albicans* and *S. cerevisiae*. One of the investigated *D. hansenii* strains showed particular abilities to form biofilm which was slightly stimulated by aromatic alcohols and inhibited by farnesol. Furthermore, *D. hansenii* was found to produce and use ammonia as signalling molecule for coordination of growth. Knowledge on quorum sensing systems in dairy-relevant microorganisms may be use for optimisation of the production of dairy products.

G. Redegørelse for projektets perspektiver:

Basal viden om intra- og interspecies kommunikation for en række mejerirelevante bakterier og gær vil give mulighed for at forstå og påvirke den måde, hvor forskellige mikroorganismer kommunikerer. Ved regulering af quorum sensing er det muligt at påvirke mikroorganismers

vækst og teknologiske egenskaber, hvormed mejeriprodukternes spisekvalitet, holdbarhed og sikkerhed kan forbedres. Ved tilsætning af stoffer, som inhiberer quorum sensing, vil man kunne forhindre vækst af uønskede mikroorganismer herunder fordærvelse og sygdomsfremkaldende bakterier. Modsat kan man ved tilsætning af såkaldt pro-quorum sensing stoffer, anvende quorum sensing til at få de ønskede mikroorganismer herunder starterkulturer til at vokse hurtigere og få dem til at gøre mere af det de er gode til eksempelvis aromadannelse. Således kan man eksempelvis få en fedtfattig ost til at smage af mere. Manglende forståelse for mikrobiel kommunikation kan medføre, at starterkulturer ikke klarer sig så godt som forventet i de komplekse mikrobielle samfund, der ofte findes i mejeriprodukter. Anvendelse af viden om quorum sensing kan dermed på sigt medføre at vi i højere grad kan producere og anvende starterkulturer optimalt.

H. Projektets økonomiske forløb:

Som beskrevet C så blev størstedelen af midlerne til ekstern bistand konverteret til drift, da det ikke var muligt at finde egnede samarbejdspartnere, og det blev besluttet selv at udføre analyserne i samarbejde med Institut for Systembiologi, Center for Mikrobiel Bioteknologi, Danmarks Tekniske Universitet. Ellers ingen ændringer til det opstillede budget udover at projekt som nævnt blev forlænget, uden at der blev tilført ekstra økonomiske midler.

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

Peer-reviewed publikationer

Gori K. P.B. Knudsen, K.F. Nielsen, N. Arneborg og L. Jespersen. (2010a). Alcohol production and their role in adhesion and biofilm formation of *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Research. In preparation.

Gori K., S. Moslehi-Jenabian, M. Purrotti og L. Jespersen. (2010b). Activity of autoinducer-2 (AI-2) in bacteria from surface ripened cheeses. Journal of Dairy Science. Submitted.

Gori K., C. Mortensen og L. Jespersen. (2010c). A comparative study of the anti-listerial activity of smear bacteria. International Dairy Journal. Accepted.

Moslehi-Jenabian S., K. Gori og L. Jespersen. (2009). AI-2 Signalling is upregulated by low pH stress in *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM. International Journal of Food Microbiology. 135:295-302.

Gori K., H.D. Mortensen, N. Arneborg og L. Jespersen. (2007). Ammonia production and its possible role as a mediator of communication among *Debaryomyces hansenii* strains and other cheese relevant yeast species. Journal of Dairy Science. 90:5032-5041.

Nationale publikationer

Gori K. og L. Jespersen. (2010). Når mikroorganismer snakker godt sammen, bliver osten bedre. Bioteknologi – med fremtidens muligheder i hænderne. Temahæfte 2010. Side 16-17.

Gori K. og L. Jespersen. (2009). Kommunikation er vejen til bedre ostekvalitet. Mælkeritidende. Nr. 2. 23. januar 2009. Side 32-35.

Hvordan kommunikerer celler? Mejeriforeningens Årsberetning 05/06.

Jespersen, L. og S. Lillevang.(2005). Gode oste kræver starterkulturer. Nyt fra LMC, no. 4

Præsentationer ved internationale kongresser

Gori K. og L. Jespersen (2010). The language of cheese ripening cultures. Australian Journal of Dairy Technology. World Dairy Summit. 8-11. November 2010. Auckland, New Zealand. Mundtlig præsentation og poster.

Gori K. P.B. Knudsen, K.F. Nielsen, N. Arneborg og L. Jespersen. (2010). Production of alcohols and their role in biofilm formation and sliding motility of the dairy-important yeast *Debaryomyces hansenii*. 4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi 1 - 4. juni 2010, Rotterdam, The Netherlands. Mundtlig præsentation og poster

Moslehi-Jenabian S., K. Gori og L. Jespersen. (2009). Quantitative expression analysis of the *luxS* gene after exposure to low pH in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactobacillus rhamnosus* GG. FEMS 2009. 3rd Congress of European Microbiologists. "Microbes and Man – interdependence and future challenges". 28. juni - 2. juli 2009. Gøteborg, Sverige. Poster.

Moslehi-Jenabian S., K. Gori og L. Jespersen. (2009). AI-2 signalling is upregulated by low pH stress in *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM. The 21st International ICFMH Symposium. "Evolving Microbial Food Quality and Safety". 1- 4. september 2008. Aberdeen, Skotland. Mundtlig præsentation og poster.

Gori K. og L. Jespersen. (2007). Activity of autoinducer two (AI-2) in bacteria isolated from surface ripened cheeses. 3rd ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria (CCCB). 7-10. oktober 2007. Austin, Texas, USA. Poster.

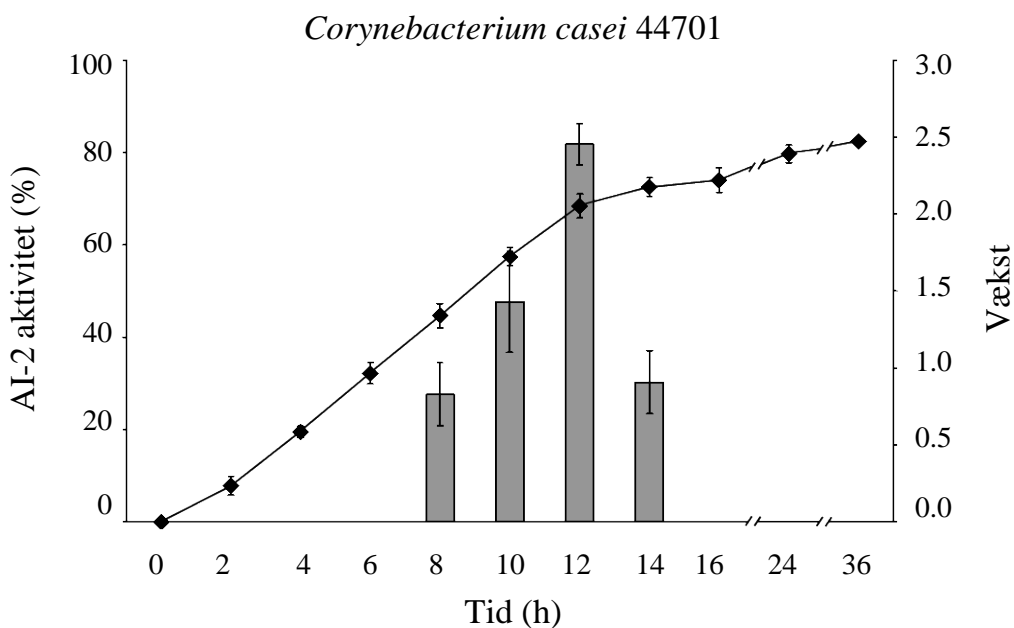
J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater (maks. 5 A4-sider):

Autoinducer-2 (AI-2) signalering i kitbakterier

Gruppen af bakterielle signalstoffer, som betegnes autoinducer-2 (AI-2), spiller en speciel rolle, da AI-2s er de eneste ikke-arts specifikke signalstoffer produceret af både Gram positive og negative bakterier. Som for så mange andre signalstoffer, så er AI-2 signalering indtil nu primært blevet undersøgt i patogene bakterier. AI-2 er blevet påvist at kontrollere patogeniteten af *Escherichia coli* 0157:H7 og *Vibrio cholerae*, toksinproduktion i *Clostridium perfringens* og biofilm dannelse i *Listeria monocytogenes*. AI-2s produceres ved en spontan omdannelse af 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedion, hvis produktion er katalyseret af enzymet AI-2 synthase, som kodes af *luxS*. I mere end 100 prokaryoter er *LuxS* genet påvist. Forskellige bakteriearter anvender forskellige former for AI-2. Mens *Vibrio harveyi* anvender AI-2 indeholdende et bor-atom, så er AI-2 hos *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium AI-2 uden

bor. Dels på grund af ustabilitet samt strukturmæssige nuancer, er det vanskeligt at detektere AI-2. Den gængse måde at påvise AI-2 på er derfor at anvende et biologisk assay, hvor der måles på evnen til at stimulere bioluminescens (reguleres af AI-2) i *Vibrio harveyi*.

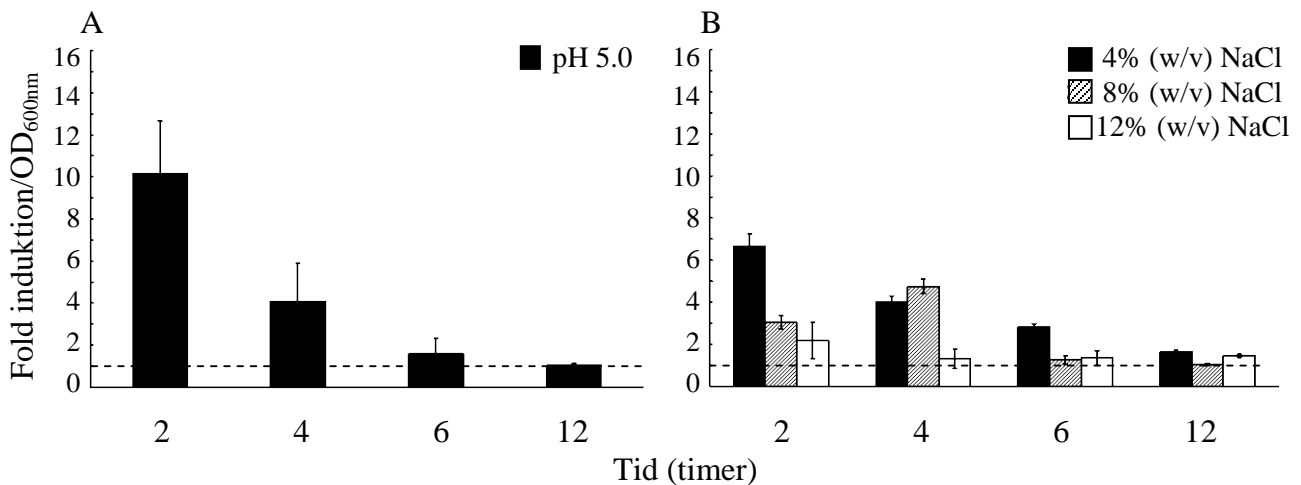
Kitbakteriers evne til at producere AI-2 aktivitet blev undersøgt ved at fremstille supernatanter af kitbakterierne og undersøge deres evne til at stimulere bioluminescens i *V. harveyi*. AI-2 aktivitet blev for første gang påvist i supernatanter fra *Arthrobacter nicotianae* (20123), *Corynebacterium ammoniagenes* (20305 and 20306), *Corynebacterium casei* (44701), *Microbacterium barkeri* (20145), *Microbacterium gubbeenense* (15944) og *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* (15097). Modsat var det ikke muligt at detektere AI-2 aktivitet i supernatanter fra *Brevibacterium casei* (20657) og *Brevibacterium linens* (9174, BL1, BL2, BL3 and M18). For de bakteriestammer hvori AI-2 aktivitet blev påvist, blev AI-2 produktionen fundet til at være væksthase afhængig, da AI-2 aktiviteten steg i løbet af eksponentiel væksthase for at nå maksimum ved skiftet mellem eksponentiel væksthase og stationær væksthase, hvorefter AI-2 aktiviteten forsvandt. AI-2 produktion under vækst er illustreret for *C. casei* (44701) i Figur 1.



Figur 1. Autoinducer-2 (AI-2) aktivitet (vist som søjler) for *Corynebacterium casei* (44701) bestemt med *Vibrio harveyi* (BB170) bioluminescens assay. Vækstkurven er inkluderet for at illustrere, at AI-2 aktiviteten er væksthase afhængig. (♦) Vækst ($\log(\text{OD}_{600\text{nm}}(t)/\text{OD}_{600\text{nm}}(0))$), t refererer til tiden.

Indflydelsen af mejerirelevante miljøfaktorer på autoinducer-2 (AI-2) blev undersøgt i vækstmedier, hvor miljøfaktorerne optrådte. Som beskrevet tidligere blev supernatanter fremstillet, og produktionen af AI-2 blev bestemt ved at undersøge supernatanternes evne til at stimulere produktionen af bioluminescens i *V. harveyi* (BB170). For *C. casei* (44701), *M. gubbeenense* (15944) og *S. equorum* subsp. *linens* (15097) blev AI-2 aktiviteten stimuleret ved lavt pH (pH 5.0) (Figur 2A). Ligeledes blev der observeret en stimulering af AI-2 aktiviteten for *C. casei* (44701), *M. gubbeenense* (15944) og *S. equorum* subsp. *linens* (15097) ved

tilsætning af 4 og 8% (w/v) NaCl, mens ingen stimulering af AI-2 produktionen blev observeret ved tilsætning af 12% (w/v) NaCl (Figur 2B).



Figur 2. Indflydelsen af miljøfaktorer på autoinducer-2 (AI-2) aktiviteten i *Corynebacterium casei* (44701). *C. casei* (44701) blev opformeret til sen eksponentiel væksthase og derefter udsat for A) lav pH og B) høje NaCl koncentrationer. Den stiplede linje repræsenterer kontrollen.

For at undersøge kitbakteriers AI-2 aktivitet i deres naturlige miljø, blev et fast ostemodellsubstrat indeholdende Danbo ost udviklet. Indledningsvist blev ostesubstratets indflydelse på AI-2 undersøgt med *V. harveyi*. Ekstrakter af ostesubstrat blev fundet til at mindske bioluminescens i *V. harveyi* stammen, hvilket indikerer en inhiberende effekt på AI-2. Samme inhiberende effekt blev observeret når kitbakteriers supernatanter med AI-2 blev blandet med ekstrakter lavet af ostesubstrat. Trods ostesubstratets inhiberende effekt var det muligt at detektere signifikante niveauer af AI-2 aktivitet, når kitbakterierne voksede på ostesubstrat.

Autoinducer-2 (AI-2) aktivitet i probiotiske bakterier

Arbejdet med AI-2 aktivitet i kitbakterier ledte til undersøgelse af AI-2 aktiviteten i to mejerirelevante probiotiske bakterier (*Lactobacillus rhamnosus* GG og *Lactobacillus acidophilus* NCFM). Under standard betingelser (pH 6,5) havde *L. rhamnosus* GG AI-2 aktivitet, mens ingen AI-2 aktivitet blev fundet for *L. acidophilus* NCFM. Dog blev der fundet AI-2 aktivitet for begge bakterier ved pH stress (pH>5.0). Dette tyder på, at AI-2 er involveret i de to bakteriers respons til syrestress. Stigningen i AI-2 produktion blev fundet til at blive påvirket negativt ved adaptation til syrestress hvilket yderligere bekræfter AI-2s betydning for overlevelse og vækst under syrestress. Modsat for kitbakterierne, for hvilke der eksisterer meget lidt viden er deres genom, er *luxS* genen (det ansvarlige gen for AI-2 produktion) kendt for en række *Lactobacillus* spp., hvilket gør det muligt at følge genekspressionen under forskellige betingelser. Ekspression af *luxS* (det ansvarlige gen for AI-2 aktivitet) blev bestemt ved qRT PCR og kunne korreleres til AI-2 aktiviteten i de undersøgte stammer.

Peptider som signalstoffer

Kitbakterier blev screenet for deres anti-listerielle aktivitet med henblik på at finde signalstoffer med peptidstruktur involveret i bacteriocinproduktion. Desværre lykkedes det ikke at finde sådanne signalstoffer. Til gengæld resulterede arbejdet i identifikation af en stamme af hver af arterne *Staphylococcus warneri* og *Staphylococcus epidermidis* (begge isolerede fra overflademodnede oste) med en speciel høj aktivitet mod *Listeria* spp. De to *Staphylococcus* stammer producerede inhiberings-zoner 4-32 gange større end dem produceret af *B. linens* stammer. Inkubation med proteolytiske enzymer fjernede den anti-listerielle aktivitet, hvilket indikererede, at den anti-listerielle aktivitet skyldtes bacteriocin produktion. De potentielle bacteriociner blev bestemt til at være varmestabile samt have en M_w større end 30 kDa. Stammer af *B. linens* varierede med hensyn til anti-listeriel aktivitet. Anti-listeriel aktivitet bør være en teknologisk parameter, der bliver taget højde for ved selektion af starterkulturer. Endelig viste resultaterne, at der er en mulighed for produktion af bacteriociner fra *Staphylococcus* spp., som kan tilsættes til fødevarer.

Alkohol-baseret quorum sensing i *Debaryomyces hansenii*

Gær producerer ligeledes signalstoffer, selvom dette ikke er undersøgt i høj grad som hos bakterier. Alkohol-baseret quorum sensing er den bedst undersøgte form for quorum sensing undersøgt i gær. Aromatiske alkoholer som phenylethanol, tyrosol og tryptofol samt den alifatiske alkohol farnesol er tidligere vist at være involveret i biofilmdannelsen hos *Candida albicans* og *Saccharomyces cerevisiae*. De nævnte alkoholer blev undersøgt for deres eventuelle quorum sensing egenskaber i den mejeri-vigtige gær *Debaryomyces hansenii*. *D. hansenii* blev fundet til at producere de aromatiske alkoholer, selvom de fundne alkoholkoncentrationer var lavere sammenlignet med både *C. albicans* og *S. cerevisiae* (Tabel 1). Yderligere blev den aromatiske alkohol produktion for *D. hansenii* fundet til at være yderst afhængig af tilgængeligheden af aminosyrer, ammonium, NaCl, pH og temperatur. Farnesol produktion blev ikke detekteret for de undersøgte *D. hansenii* stammer. Blandt de undersøgte *D. hansenii* stammer, så udviste type stammen af *D. hansenii* CBS767 en speciel evne med hensyn til biofilmdannelse. Phenylethanol, tyrosol og tryptofol stimulerede svagt biofilmdannelse af *D. hansenii* CBS767, mens farnesol inhiberede biofilmdannelsen af *D. hansenii* CBS767.

Tabel 1. Aromatisk alkohol produktion for tre stammer af *D. hansenii* (type stammen CBS 767 samt mejeriisolaterne D18335 og MD02). Vækst blev foretaget i Yeast Nitrogen Base (YNB) indeholdende 2% glukose og 50 mM L-prolin. Til sammenligning er produktionen af aromatiske alkoholer vist for *C. albicans* (CBS 8758) og *S. cerevisiae* (CBS 1171).

Stamme	Alkohol koncentration (μM)		
	Phenylethanol	Tyrosol	Tryptophol
<i>Debaryomyces hansenii</i>			
CBS767	3.58 ± 0.17	2.10 ± 0.15	0.064 ± 0.0096
D18335	4.46 ± 0.38	1.28 ± 0.077	0.44 ± 0.054
MD02	4.63 ± 0.61	3.49 ± 0.051	0.20 ± 0.052
<i>Candida albicans</i>			
CBS8758	107 ± 15	49.5 ± 6.3	5.57 ± 1.37

Saccharomyces cerevisiae

CBS1171 11.5 ± 1.1 9.44 ± 0.39 0.096 ± 0.041

Ammoniak som signalstof i *Debaryomyces hansenii*

Udover alkohol-baseret quorum sensing så blev det vist at gær kommunikerer ved hjælp af ammoniak, når de vokser på faste overflader. På faste overflade vil ammoniak-signalet medføre at kolonier vokser væk fra hinanden, således at de vokser i den retning hvor der er mest næring og dermed sikrer overlevelse trods ringe næringsforhold. I et tidligere projekt "Karakterisering og optimering af gærs etablering og vækst på overflademodnede oste" blev det vist, at stammer af den mejerivigtige gær *D. hansenii* ligeledes producer og anvender ammoniak som signalstof. I indeværende projekt blev der yderligere fokuseret på ammoniak som signalstof i *D. hansenii*. Både på glycerolmedium (GM) (tidligere anvendt til påvisning af ammoniak som signalstof) og på osteagar blev retningsbestemt ammoniak-signalering observeret for tre stammer af *D. hansenii*. Endvidere blev det vist, at dobbeltkolonier generelt producerede mere ammoniak i forhold til enkelt kolonier. Dette var dog mest udtalt på GM substrat og kun i mindre omfang på ostepsubstrat.

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

Lene Jespersen, Professor, Institut for Fødevarevidenskab, Fødevaremikrobiologi,
Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

_____ den _____

Søren K. Lillevang, Arla Foods amba, Skanderborgvej 277, 8260 Viby J

_____ den _____

Pia M. Nissen, Mejeribrugets ForskningsFond, L&F, Agro Food Park 15, 8200 Århus N

_____ den _____