

De Onderzoeksgroep

Industriële Microbiologie en Voedingsbiotechnologie (IMDO)

nodigt U graag uit op de openbare verdediging van het proefschrift van

ir. David Van der Veken

ter behaling van de graad van Doctor in de Bio-ingenieurswetenschappen

Ontrafeling van het ecologische functioneren van een anticlostridiale *Mammaliococcus sciuri*-stam met het oog op zijn toepassing als vleesstartercultuur

Promotor:

Prof. Dr. ir. Frédéric Leroy

De verdediging heeft plaats op

vrijdag 21 april 2023 om 17h00

in **Auditorium D.0.08** op de Campus Humanities, Sciences and Engineering van de Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Elsene

en zal worden gevolgd door een receptie.

Samenstelling van de jury

Prof. Dr. Steven Ballet (VUB, Voorzitter)
Prof. Dr. ir. Jo Van Ginderachter (VUB, Secretaris)
Prof. Dr. Bruno Pot (VUB)
Prof. Dr. Joske Ruytinx (VUB)
Prof. Dr. ir. Chris Michiels (KU Leuven)
Dr. Monique Zagorec (INRAE, Nantes, Frankrijk)
Prof. Dr. ir. Frédéric Leroy (VUB, Promotor)

Curriculum vitae

David Van der Veken studeerde af als Master of Science in de Bio-ingenieurswetenschappen – Chemie en Bioprocestechnologie – aan de Vrije Universiteit Brussel (VUB) in 2017. In datzelfde afgestudeerde jaar, startte hij zijn doctoraatsonderzoek in de Onderzoeksgroep Industriële Microbiologie en Voedingsbiotechnologie (IMDO) onder begeleiding van Prof. Dr. ir. Frédéric Leroy, met de financiële steun van de Onderzoeksraad van de VUB en Flanders' FOOD (BotulinSafe-project). Zijn onderzoek behandelde de karakterisatie van microorganismen die chemische bewaarmiddelen in gefermenteerde vleeswaren kunnen vervangen, met de focus op de inhibitie van de voedselpathogeen *Clostridium botulinum*. David Van der Veken is co-auteur van twaalf wetenschappelijke artikels gepubliceerd in peer-reviewed internationale tijdschriften, waaronder vier als eerste auteur. Hij nam deel aan twee nationale wetenschappelijke conferenties met twee mondelinge presentaties. Gedurende zijn PhD, was hij ook verantwoordelijk voor de coördinatie van practica en voor de begeleiding van drie Masterproefstudenten.

Abstract van het doctoraatsonderzoek

Vandaag worden gefermenteerde vleeswaren grotendeels geproduceerd op industriële schaal en met het gebruik van starterculturen. Doorgaans maken nitriet- en/of nitraat-gebaseerde pekelzouten een integraal deel uit van de recepturen, aangezien hun gebruik belangrijke technologische eigenschappen met zich mee brengt zoals kleurvorming en microbiologische stabiliteit. Het gebruik van deze chemische bewaarmiddelen is echter onder druk komen te staan, omdat ze mogelijk in verband worden gebracht met de vorming van kankerverwekkende stoffen en colorectale kanker. Een uitfasering binnen de industrie dringt zich dus op, vooral in het kader van *clean-label* trends.

Deze doctoraatsstudie onderzocht daarom het potentieel gebruik van Gram-positieve katalase-positieve kokken (GKK) om de antibacteriële activiteit van pekelzout te vervangen. De focus werd gelegd op de voedselpathogeen *Clostridium botulinum*. Om de selectie van een bacteriële stam met anticlostridiale activiteit mogelijk te maken werd een grote GKK-stammencollectie gescreend. Een GKK-stam (*Mammaliococcus sciuri* IMDO-S72) werd hieruit geselecteerd omwille van zijn capaciteit om *C. botulinum* te inhiberen. Na het sequencen en de *de novo*-assembleren van het genoom van *M. sciuri* IMDO-S72 bracht genoomontginning een plasmide-geassocieerde biosynthetische genencluster (BGC) aan het licht die verantwoordelijk was voor het antibacteriële fenotype. Het product van deze BGC werd structureel geïdentificeerd als micrococcin P1. Gebruik makende van vergelijkende (patho)genomica werd besloten dat *M. sciuri* IMDO-S72 een laag cytolytisch potentieel heeft en vrij is van virulentie- en antibioticaresistentie-geassocieerde mobiele genetische elementen, met uitzondering van een plasmide-geëncodeerde *ica* cluster, wat zijn veiligheid als mogelijke startercultuurkandidaat ondersteunde.

Om de ecologische functionering van deze stam/soort verder te onderzoeken, werd een RNA-seq workflow met succes opgericht en geïmplementeerd. Genen die betrokken zijn in nitraat-gebaseerde respiratie werden gekenmerkt door een sterke opregulatie onder anaerobe condities via de regulatorische controle van het zuurstofgevoelige twee-component systeem NreBC. In de aanwezigheid van zuurstof waren azijnzuur en gluconzuur de voornaamste geproduceerde metabolieten door *M. sciuri* IMDO-S72, waarbij een snelle omschakeling naar melkzuurproductie werd waargenomen als reactie op dalende zuurstofniveaus. Amino-zuren vertegenwoordigden belangrijke alternatieve koolstofbronnen, waarvan de afbraakproducten waarschijnlijk gebruikt werden om de azijnzuurcyclus te voeden onder aerobe condities.

Tot slot onthulde de toepassing van *M. sciuri* IMDO-S72 als starter cultuur in nitraat/nitriet-vrije gefermenteerde salami's een gelimiteerde capaciteit om te prolifereren in deze levensmiddelenmatrix, vooral bij sterke verzuringscondities. Gebruik makende van challengetesten met atoxigene proteolytische *C. botulinum* stammen, werd er geen additioneel anticlostridiaal effect door *M. sciuri* IMDO-S72 waargenomen. Deze resultaten wezen er verder ook op dat de anticlostridiale rol die typisch toegeschreven wordt aan nitraat/nitriet in gefermenteerde vleeswaren overroepen lijkt. Meer onderzoek is echter nodig om deze resultaten verder te onderbouwen, gezien de ernst van botulisme, en om uitsluitel te geven over de *in-situ* productie van toxines door deze pathogeen.