

# Afslutningsrapport

Karakterisering og optimering af gærs etablering og vækst på overflademodnede oste

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2006-73

*Marts 2006*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet:

# **Karakterisering og optimering af gærs etablering og vækst på overflademodnede oste**

**Projektperiode:**

1.12.2001 - 31.12.2005

**Projektdeltagere :**

**Lektor Lene Jespersen**, Fødevaremikrobiologi, IFV, KVL, tlf. 3528 3230, e-mail: [lj@kvl.dk](mailto:lj@kvl.dk)  
(Projektleder)

**Lektor Nils Arneborg**, Fødevaremikrobiologi, IFV, KVL, tlf. 3528 3266, e-mail: [na@kvl.dk](mailto:na@kvl.dk)

**Ph.D. Studerende Klaus Gori**, Fødevaremikrobiologi, IFV, KVL, tlf. 3528 3293, e-mail:  
[klg@kvl.dk](mailto:klg@kvl.dk)

**Ph.D. Studerende Henrik Dam Mortensen**, Fødevaremikrobiologi, IFV, KVL, tlf. 3528 3293, e-mail: [hdm@kvl.dk](mailto:hdm@kvl.dk)

**Arla Foods amba**, Rørdrumvej 2, 8220 Brabrand

**Teamleder Søren Lillevang**

**Finansiering :**

Mejeribrugets Forskningsfond og Direktoratet for Fødevareerhverv (FØTEK III)

## Resumé

*Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*) anses for at være den gærart, der har størst betydning i relation til produktion af overflademodnende oste, dels grundet artens evne til at nedbryde laktat og dels høje salttolerance. I dette projekt blev væksten af *D. hansenii* (typestammen CBS 767 og mejeriisolatet D 18335) undersøgt i vækstmedie tilsat 0, 4, 8 og 12% (w/v) NaCl. Stigende nølefasen og faldende væksthastigheder blev observeret med stigende NaCl-koncentrationer. Produktion og akkumulering af glycerol under NaCl-stress blev målt. For de to *D. hansenii* stammer blev stigende intracellulære koncentrationer af glycerol observeret. *DhGPD1* kodende for glycerol-3-phosphat dehydrogenase involveret i første trin i glyceroldannelsen i *D. hansenii* er tidligere rapporteret, mens *DhGPP2* kodende for glycerol-3-phosphatase involveret i andet trin i glyceroldannelsen i *D. hansenii* blev identificeret i dette projekt. Udfra resultaterne opnået i indeværende projekt kan det konkluderes at den høje NaCl-tolerance for *D. hansenii* dels skyldes induktion af generne *DhGPD1* og *DhGPP2* men i lige så høj grad evnen til at tilbageholde glycerol inde i cellen.

Proteomet for *D. hansenii* blev undersøgt med 2-D PAGE og 47 proteiner blev identificeret med MALDI-TOF MS resulterende i det første 2-D kort for *D. hansenii*. Indflydelsen af NaCl på *D. hansenii* proteomet blev undersøgt. Proteinsyntesen blev kraftigt påvirket ved tilsætning af NaCl, da den gennemsnitlige inkorporeringshastighed af L-[<sup>35</sup>S]methionin indenfor de første 30 min efter tilsætning af 8 and 12% (w/v) NaCl kun var 7 og 4% af den gennemsnitlige inkorporeringshastighed af L-[<sup>35</sup>S]methionin i celler ikke tilsat NaCl. Flere nysyntetiserede proteiner blev observeret på 2-D gelene heriblandt glycerol-3-phosphatase (Gpp2p), som er involveret i glycerol produktion. Endvidere blev adskillige proteiner induceret/represseret efter tilsætning af NaCl. Inducerede proteiner var enzymer involveret i øverste del af glykolysen og glycerol dissimilering, mens represserede proteiner var enzymer i nederste del af glykolysen, reaktionerne hen mod Krebs cyklus og syntesen af aminosyrer. Endvidere var nogle varmekok proteiner induceret, mens andre blev represserede ved tilsætning af NaCl.

Endvidere blev ammoniak produktionen for en række mejerirelevante gær undersøgt. Ammoniak produktionen varierede blandt de undersøgte gær og var afhængig af den tilgængelige kulstofkilde. Det tyder på, at *D. hansenii* anvender ammoniak som signalmolekyle, som rapporteret for flere gær arter.

Der er blevet indkørt et forsøgsdesign anvendeligt til bestemmelse af adhæsion af *D. hansenii*.

Designet gav reproducerbare resultater og viste store stammeforskelle i adhæsionen af *D. hansenii*

til faste modelsubstrater. *D. hansenii* stammen D 18335 havde højeste adhæsionshastighed og dette kan være en medvirkende forklaring på denne stammes dominerende egenskaber observeret under industriel fremstilling af overflademodnede oste. Adhæsionen kunne korreleres til forskelle i stammernes overfladeegenskaber. Vores undersøgelser indikerer, at optimal adhæsion finder sted når gærstammens overflade er moderat hydrofob og besidder en høj affinitet for at donere elektroner til en anden overflade. De adhæsive *D. hansenii* stammers adhæsion kan også korreleres mod deres cellestørrelse, da denne er bestemmende for cellernes sedimentationshastighed og dermed også bestemmende for hvor mange celler der kommer i kontakt med den faste overflade. Ændringer i cellearealer og intracellulær pH ( $\text{pH}_i$ ) af *D. hansenii* stammerne CBS 767 og D 18335 blev undersøgt vha. mikroskopi teknikker. Resultaterne viste at begge stammerne skrumpede 30-35 % pga. cellulært vandtab efter 8 % (w/v) NaCl-stress. D 18335 var i modsætning til CBS 767 i stand til at opretholde  $\text{pH}_i$  homeostase efter vandtabet. Denne evne kunne være med til at forklare stammens efterfølgende meget hurtige initiering af vækst i forhold til CBS 767. D 18335's evne til at opretholde  $\text{pH}_i$  homeostase formodes at skyldes tilstedeværelsen af intracellulære bufferstoffer med en gennemsnitlig  $\text{pK}_a$  værdi meget tæt på stammens optimale  $\text{pH}_i$ . Resultaterne opnået i dette projekt har øget forståelsen for overflademodnede ostes mikrobiologi og herunder anvist nye veje for udvælgelse af starterkulturer og propagering. Endvidere har projektet vist, at der i mejeribruget foregår en meget vigtig naturlig selektion af de tilstedeværende mikroorganismer og at de bedst egnede starterkulturer derfor kan findes i produktionsmiljøet.

## Summary

*Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*) is the most important yeast species related to production of surface ripened cheeses due to its ability to assimilate lactate as well as its high NaCl-tolerance. The growth of *Debaryomyces hansenii* (the type strain CBS 767 and the dairy isolate D 18335) was determined in growth media with 0, 4, 8 and 12% (w/v) NaCl. Increasing lag phases and decreasing maximum specific growth rates was observed with increasing concentrations of NaCl. The production and accumulation of glycerol during NaCl-stress was determined. For the two *D. hansenii* strains increasing intracellular concentrations of glycerol were observed with increasing concentrations of NaCl. *DhGPD1* encoding glycerol-3-phosphat dehydrogenase involved in the first step of glycerol production in *D. hansenii* has earlier been reported, while *DhGPP2* encoding glycerol-3-phosphatase involved in the second step of glycerol production was identified in this project. High intracellular concentrations of glycerol were due to induction of the genes *DhGPD1* and *DhGPP2* in combination with the ability to retain glycerol, intracellularly.

The proteome of *D. hansenii* was investigated by 2-D PAGE and 47 proteins were identified by MALDI-TOF MS resulting in the first 2-D map of *D. hansenii*. The influence of NaCl on the *D. hansenii* proteome was investigated. The protein synthesis was strongly influenced by addition of NaCl as the average incorporation rate of L-[<sup>35</sup>S]methionin within the first 30 min after addition of 8 and 12% (w/v) NaCl was only 7 and 4% of the average incorporation rate of L-[<sup>35</sup>S]methionin in cells not added NaCl. Several proteins were only synthesised in the presence of NaCl e.g. glycerol-3-phosphatase (Gpp2p), which is involved in glycerol production. Furthermore, several proteins were induced/repressed in the presence of NaCl. Induced proteins were enzymes involved the upper part of glycolysis and glycerol dissimilation, whereas repressed proteins were enzymes involved in the lower part of glycolysis, routes towards Krebs cycle and biosynthesis of amino acids. Some heat proteins were induced, while others were repressed.

Furthermore, the ammonia production of several yeast species of interest for the dairy industry was investigated. The ammonia production varied between the investigated yeast species and was dependent of the carbon source. In addition, strains of *D. hansenii* seem to use ammonia as signal molecule as reported for several other yeast species.

An experimental set-up to estimation of the adhesion of *D. hansenii* was introduced. The set-up generated results that were reproducibly and showed large differences in adhesion within different strains of *D. hansenii* to a solid model substrate. The fact that the *D. hansenii* strain D 18335 had the highest adhesion velocity could explain the observed dominating properties, this strain

possessed in industrial production of surface ripened cheese. It was possible to correlate the observed adhesion with the different strains surface physicochemical properties. Our results indicate that optimal adhesion was observed when the cell surface was moderate hydrophobic and possessed a high affinity to donate electrons in interactions with another surface. The adhesion of three adhesive *D. hansenii* strains could also be correlated with their average cell size. The latter determines the sedimentation velocity of cells and thereby the number of cells reaching the solid surface.

Changes in cell areas and intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) of the *D. hansenii* strains CBS 767 and D18335 was examined by microscopy techniques. The results showed that both strains shrink about 30-35 % after 8 % (w/v) NaCl-stress due to loss of cellular water. D 18335 was able to maintain  $\text{pH}_i$  homeostasis after the water loss whereas CBS 767 was not. The ability to retain  $\text{pH}_i$  homeostasis could be a part of the explanation of D 18335 subsequently fast initiation of growth. We suggest that D 18335 are able to retain homeostasis due to intracellular buffering compounds that have an average  $\text{pK}_a$  value very close to the strains optimal  $\text{pH}_i$ .

The results obtained in this project have added new knowledge to the microbiology of surface ripened cheeses i.e. primarily in the selection of starter cultures and propagation. In addition, the results have shown that an important selection of micro organisms takes place at the cheese production facilities, and thus the most suitable starter cultures are present in these environments.

## 1. Baggrund

Gær har en væsentlig betydning ved fremstilling af en række forskellige ostetyper. Specielt for overflademodnede oste er etablering og vækst af gær af overordnet betydning for det efterfølgende modningsforløb. En række forskellige gærarter er rapporteret til at være involveret i overflademodning af ost, men generelt anses *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*) for at have størst betydning grundet artens høje salttolerance samt evne til at nedbryde laktat. Traditionelt foregår overflademodning af ost ved en spontan fermentering, hvor gæren er naturligt forekommende i produktionsmiljøet. Der er imidlertid en stigende interesse for at anvende stammer af *D. hansenii* og andre gærarter som starterkulturer med det formål at opnå et mere ensartet og kontrolleret ostemodningsforløb. Foreløbige resultater udført i samarbejde med Arla Foods som led i et tidligere samarbejdsprojekt under Mejeribrugets ForskningsFond ("Fysiologisk og molekylærbiologisk karakterisering af gær i ost") har vist, at der under ostemodningen forekommer en mikrobiel succession mellem flere forskellige stammer af *D. hansenii*, og at den tilførte starterkultur ikke altid er i stand til at etablere sig i produktionsmiljøet.

Ved produktion af overflademodnede oste forekommer en række mikrobielle stressfaktorer så som høj saltkoncentration, lav vandaktivitet, lavt pH, begrænset tilgang af fermenterbare kulstofkilder etc. Gærens evne til at etablere sig og vokse på overfladen af ost vil derfor i høj grad afhænge af, hvorledes gæren er i stand til at overleve og tilpasse sig de enkelte stressfaktorer. En række undersøgelser er udført for at afklare betydningen af forskellige stressfaktorer på gær. Generelt mangler der dog for *D. hansenii* basale undersøgelser, der beskriver mekanismerne bag tilpasningen til disse stressfaktorer. Sekventering af genomet for en række gærarter samt udviklingen af teknikker til adskillelse og identifikation af cellulære proteiner (2-dimensional polyakrylamid gel elektroforese; 2-D PAGE) har imidlertid givet en ny mulighed for at studere gærs samlede proteinekspresion og dermed sammenligne proteinmønstre for gær dyrket under forskellige vækstbetingelser.

På trods af at størsteparten af vore fermenterede levnedsmidler, herunder overflademodnede oste, er faste levnedsmidler, er der kun yderst begrænset viden tilgængelig vedrørende samspillet mellem faste overflader og mikroorganismer. I hvilket omfang gær adhærer til faste overflader, og hvilken betydning det har for gærens vækst, er ukendt, og egentlige studier over adhæsion af *D. hansenii* synes ikke at være udført.

Efter at adhæsionen af den enkelte gær-celle til den faste overflade er foregået skal cellen tilpasse sig det nye vækstmiljø, før aktiv fermentering, og hermed vækst og kolonidannelse, kan starte. For overflademodnede oster vedkommende består dette nye vækstmiljø af lavt pH samt høj saltkoncentration med tilsvarende lav vandaktivitet til følge. Den enkelte gær-celle skal tilpasse sig sine nye omgivelser tilpas hurtigt for at den efterfølgende fermentering kan foregå tilpas effektivt. Efter adhæsion til en fast overflade gennemgår gær-cellen en række intracellulære, fysiologiske ændringer ("early events"), der formodes at forberede gæren til en efterfølgende hurtig og effektiv fermentering. En bedre forståelse af sammenhængen imellem disse "early events" og den efterfølgende vækst på faste overflader vil være af stor betydning for at kunne forudsige fermenteringsegenskaberne af gær i produktionen af overflademodnede oster.

## 2. Formål

Overordnet er projektets formål at afdække de væsentligste miljøfaktorer af betydning for adhæsion og vækst af gær på overfladen af ost samt at beskrive mekanismerne bag. Specifikt vil der blive særlig lagt vægt på indflydelsen af NaCl på gærs adhæsion og vækst på faste overflader samt gærs samspil med øvrige mikroorganismer. Projektet vil tage udgangspunkt i anvendelsen af *D. hansenii*.

Specifikt kan projektets formål sammenfattes i følgende hovedpunkter:

- Undersøgelse af ekspressionen af gener relateret til vækst under NaCl-stress
- Undersøgelse af proteinekspressionen samt identifikation af NaCl-følsomme proteiner
- Undersøgelse af adhæsionen til faste overflader
- Undersøgelse af betydningen af NaCl for intracellulære events i *D. hansenii* i flydende medie og på faste overflader
- Undersøgelse af vækst på faste overflader og sammenholdning med vækst i flydende medie
- Undersøgelser af signalstoffer til koordination af væksten ved tilstedeværelsen af andre mikroorganismer



### 3. Resultater

#### 3.1. Glycerol som ”compatible solute” i *D. hansenii*

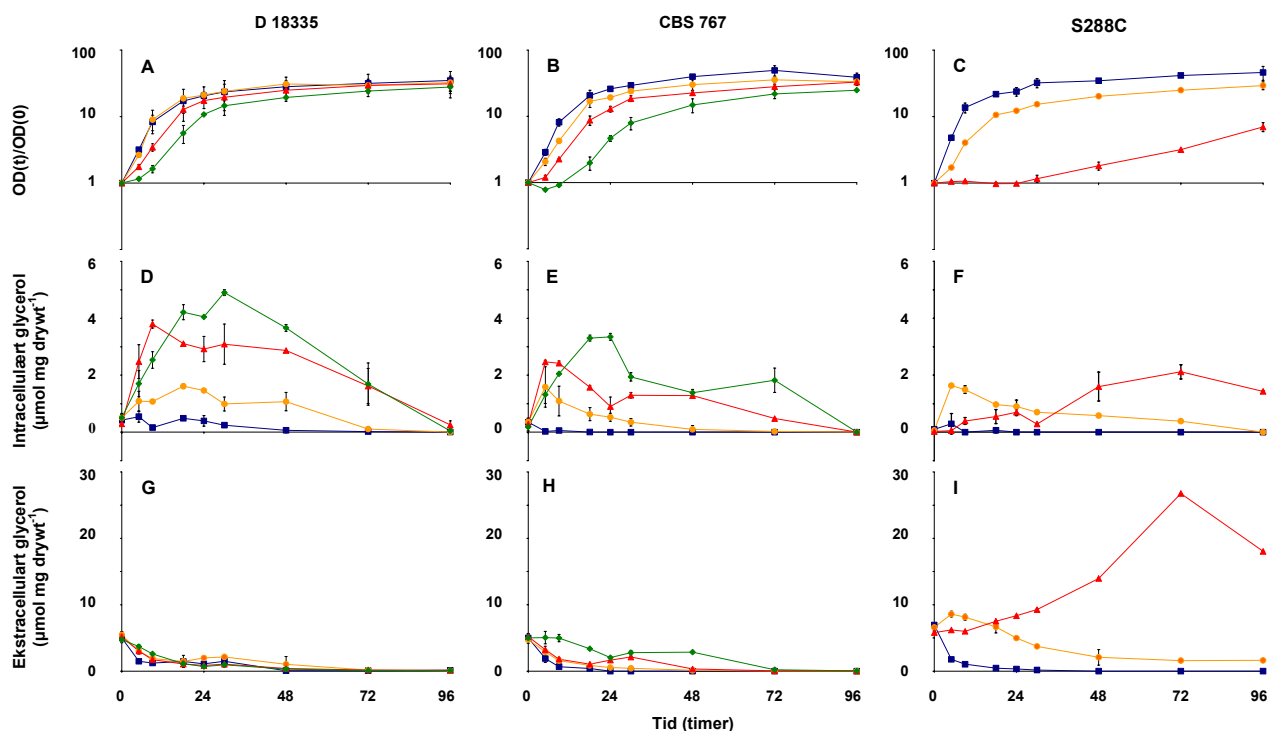
##### 3.1.1. Detektion af intra- og ekstracellulært glycerol

Både for *D. hansenii* og *S. cerevisiae* er glycerol rapporteret til at være den vigtigste ”compatible solute” under NaCl-stress. Når en gærcele udsættes for NaCl-stress, skrumper den på grund af tab af vand til de ekstracellulære omgivelser. Ved at danne ”compatible solutes” nedsættes vandaktiviteten inde i cellen, hvorved en del af det tabte vand optages og volumen genvindes. Koncentrationen af intra- og ekstracellulært glycerol blev bestemt i to *D. hansenii* stammer (mejeriisolatet D 18335 og typestammen CBS 767) og *S. cerevisiae* stammen (S288C) ved hjælp af high performance liquid chromatography (HPLC). Vækst samt produktion og akkumulering af glycerol blev undersøgt i løbet af et fermenteringsforløb på 96 timer i vækstmedie tilsat henholdsvis 0, 4, 8 og 12% (w/v) NaCl.

Vækst blev observeret i alle eksperimenter med de to *D. hansenii* stammer, selvom nølefasen steg og væksthastigheden faldt med stigende koncentrationer af NaCl (Fig. 1A-B). D 18335 udviste højere NaCl-tolerance sammenlignet med CBS 767, især i vækstmedie med 12% (w/v) NaCl. Nølefasen for D 18335 steg fra 1 til 5 timer, når koncentrationen af NaCl steg fra 0 til 12% (w/v) NaCl, mens nølefasen for CBS 767 steg fra 1 til 10 timer. *S. cerevisiae* (S288C) voksede ikke i vækstmedie med 12% (w/v) NaCl, og nølefasen i vækstmedie 8% (w/v) NaCl var 23 timer (Fig. 1C).

For de to *D. hansenii* stammer blev glycerol produktion og akkumulering observeret, når NaCl var til stede i vækstmediet. Fig. 1C-D viser, at D 18335 akkumulerede højere koncentrationer af glycerol i forhold til CBS 767, hvilket kan forklare stammeforskelle med hensyn til NaCl-tolerance. *S. cerevisiae* (S288C) akkumulerede mindre mængder af glycerol sammenlignet med de to *D. hansenii* stammer (Fig. 1E).

Fig. 1G-H viser, at for både D 18335 og CBS 767 blev der observeret faldende koncentrationer af ekstracellulært glycerol, når NaCl var tilstede, mens *S. cerevisiae* (S288C) producerede stigende ekstracellulære koncentrationer af glycerol, når NaCl var tilstede.



**Figur 1.** Vækst (A+B+C), ændringer i intracellulært (D+E+F) og ekstracellulært (G+H+I) glycerol for *Debaryomyces hansenii* stammerne (D 18335 and CBS 767) og *Saccharomyces cerevisiae* stammen (S288C) i medie med 0-12% (w/v) NaCl. ■ 0% (w/v) ● 4% (w/v) ▲ 8% (w/v) ◆12% (w/v) NaCl.

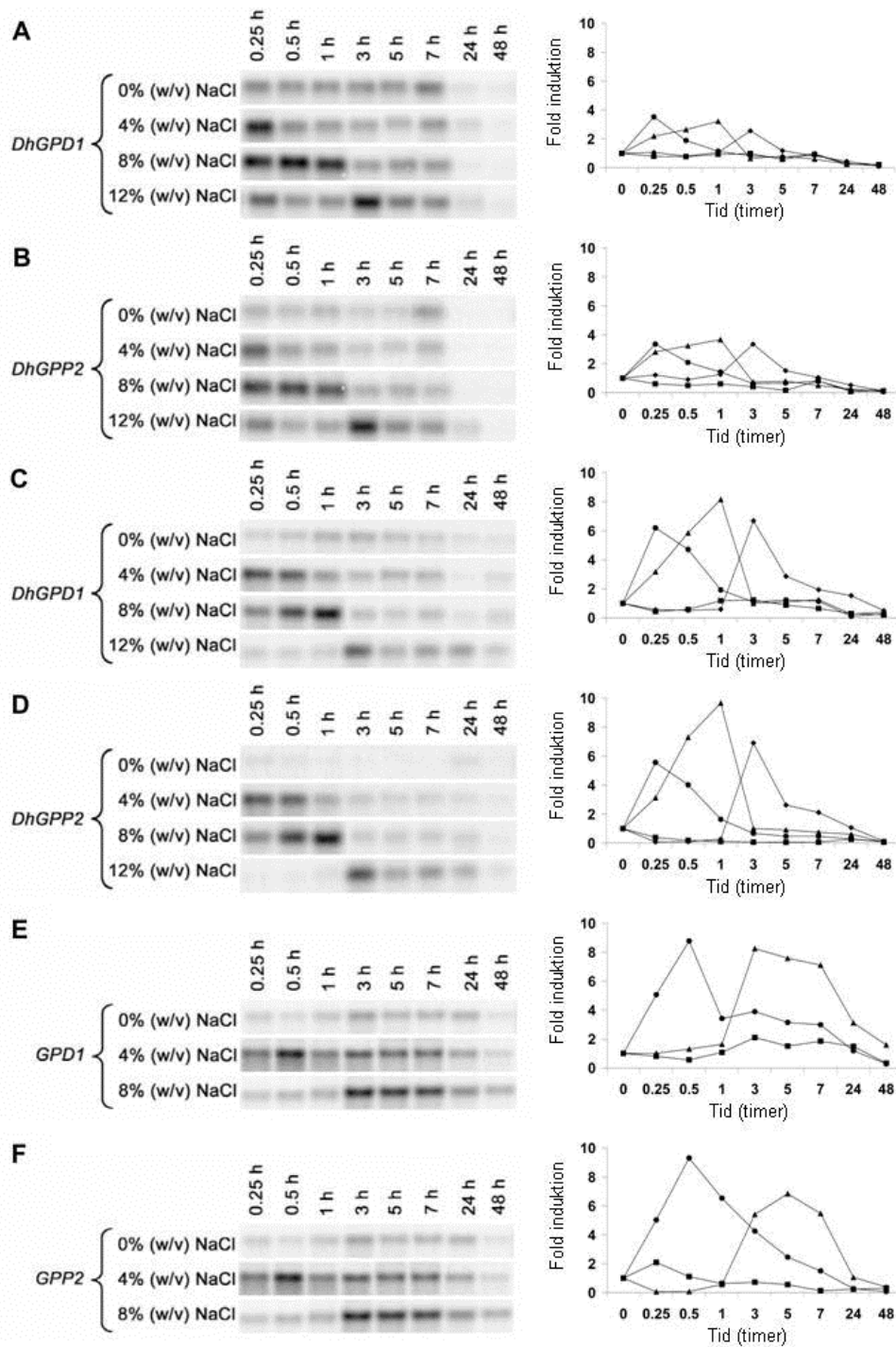
### 3.1.2. Detektion af *DhGPD1* og *DhGPP2* under NaCl-stress

I *S. cerevisiae* koder generne *GPD1* og *GPP2* for henholdsvis glycerol-3-phosphat dehydrogenase og glycerol-3-phosphatase, som begge er centrale enzymer i syntesen af glycerol, der er af væsentlig betydning for evnen til modstå NaCl-stress. *DhGPD1* er sekventeret i *D. hansenii* og er tidligere vist at blive induceret, når NaCl er tilstede. Med undtagelse af en open reading frame (ORF), der koder for en sekvens bestående af 95 aminosyrer med 48% identitet til *S. cerevisiae* Gpp2p, er der ikke rapporteret nogle putative glycerol-3-phosphataser i *D. hansenii*. I dette projekt blev det vist, at den ORF, der koder for 95 aminosyrer, bliver induceret, når NaCl er tilstede, hvilket sammen med den høje identitet til *S. cerevisiae* Gpp2p, viser, at den undersøgte ORF koder for *D. hansenii* *DhGPP2*. Specifikke prober rettet mod både *DhGPD1* og *DhGPP2* blev fremstillet og anvendt til at studere genekspressionen af de to gener ved Northern blotting. Ekspressionen blev undersøgt i vækstmedie tilsat henholdsvis 0, 4, 8 og 12% (w/v) NaCl. Prøver blev udtaget i løbet af

et fermenteringsforløb på 48 timer samt af inokulum, og RNA blev ekstraheret. Ekspressionen af både *DhGPD1* og *DhGPP2* blev opreguleret i begge *D. hansenii* stammer, når NaCl var til stede i vækstmediet, mens ingen opregulering af de to gener blev observeret i vækstmedie med 0% (w/v) NaCl (Fig. 2A-D). Opregulering af de to gener i D 18335 var 2-4 gange, mens opreguleringen af de to gener i CBS 767 var 6-10. Til sammenligning blev ekspressionen af *GPD1* og *GPP2* i *S. cerevisiae* undersøgt, hvilket viste, at de to gener blev opreguleret 7-10 gange i 4 og 8% (w/v) NaCl (Fig. 2E-F). Opreguleringsperioden og tiden til maksimal opregulering steg med stigende NaCl-koncentrationer. For de to *D. hansenii* stammer blev maksimal ekspression observeret efter 15 min. i 4% (w/v) NaCl, 1 timer i 8% (w/v) NaCl og 3 timer i 12% (w/v) NaCl. Maksimal ekspression af *GPD1* og *GPP2* i *S. cerevisiae* blev observeret efter 1 time i 4% (w/v) NaCl og 3 timer i 8% (w/v) NaCl. Sammenholdt med glycerolmålingerne synes evnen til at akkumulere glycerol vigtigere end evnen til at opregulere *DhGPD1* og *DhGPP2* med hensyn til høj NaCl-tolerance i gær.

### 3.1.3. Delkonklusion

*DhGPP2*, der koder for *D. hansenii* glycerol-3-phosphatase under NaCl-stress, er identificeret. *D. hansenii* producerer og akkumulerer glycerol som "compatible solute", når NaCl er tilstede. Høje intracellulære koncentrationer af glycerol skyldes dels opregulering af generne *DhGPD1* og *DhGPP2*, som er involveret i glycerol produktion, og især en god evne til at tilbageholde glycerol inde i cellen.



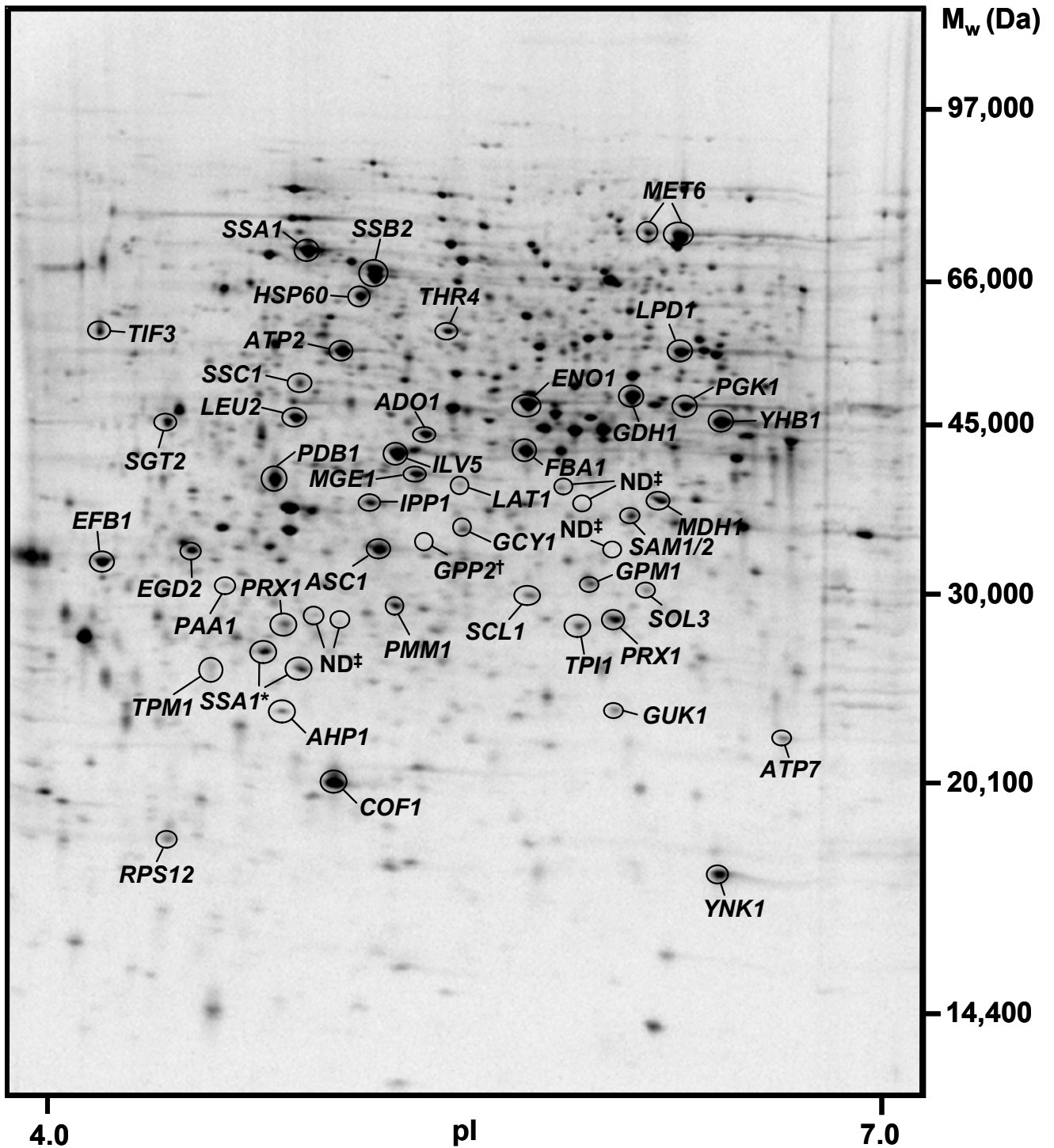
**Figur 2.** Northern blotting analyse af *DhGPD1* og *DhGPP2* for to stammer af *Debaryomyces hansenii* (D 18335 og CBS 767) og *GPD1* og *GPP2* for *Saccharomyces cerevisiae* stammen (S288C) i vækstmedie med forskellige koncentrationer af NaCl. A-B: CBS 767; C-D: CBS 767; E-F: S288C. Koncentrationer af NaCl: ■ 0% (w/v), ● 4% (w/v), ▲ 8% (w/v) og ◆ 12% (w/v).

## 3.2. Proteom analyse af *D. hansenii*

### 3.2.1. Karakterisering af proteomet for *D. hansenii*

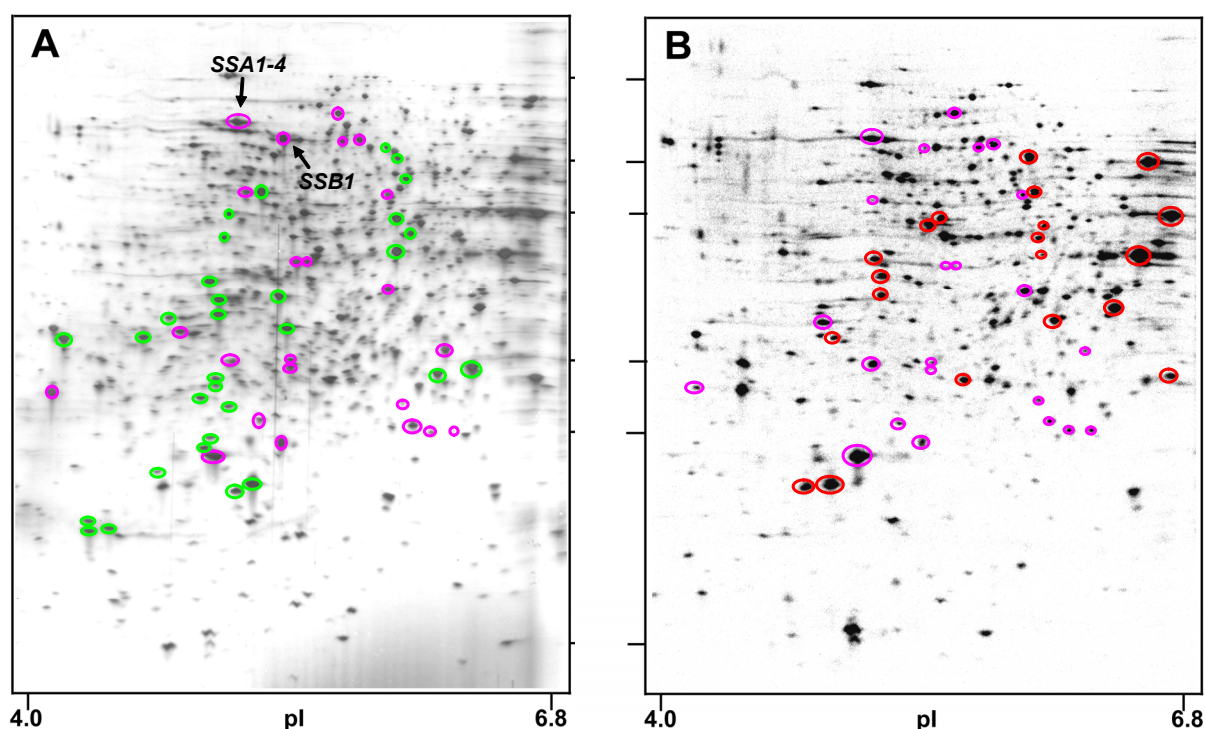
Proteomet for typestammen af *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* (CBS 767) blev undersøgt med 2-dimensional polyakrylamid gel elektroforese (2-D PAGE). CBS 767 blev opformeret til eksponentiel vækstfase ( $OD_{600nm} = 0,60$ ), hvorefter proteiner blev mærket med L- $[^{35}S]$ methionin og ekstraheret. Efter elektroforese blev gellerne sølvfarvet og derefter lagt på fosforscreens. Efter 4-6 dage blev spots detekteret ved hjælp af en phosphorImager (STORM 840), og det digitaliserede billede efter scanning blev analyseret med programmet ImageMaster™ 2D Platinum. Det var muligt at detektere et gennemsnit på 738 radioaktive proteiner på gellerne. Proteomet for *D. hansenii* var karakteriseret med proteiner med en molvægt mellem 6 og 100 kDa, men de fleste proteiner havde en molvægt mellem 30 og 80 kDa. Størstedelen af *D. hansenii* proteinerne havde en pI mellem 5.0 og 6.5 (undersøgte interval: 4-7). Et 2-D PAGE mønster for radioaktive proteiner fra *D. hansenii* (CBS 767) er vist i Fig. 3.

Flere metoder blev forsøgt til identifikation af proteiner fra 2-D geler. Først blev der foretaget en sammenligning med kendte protein mønstre herunder 2-D kortet for *Saccharomyces cerevisiae*, hvorpå mere end 400 proteiner er identificeret. Dog var det ikke muligt at detektere identiske mønstre for de to gær. Endvidere blev proteinekspressionen af *D. hansenii* og *S. cerevisiae* sammenlignet ved hjælp af kombinerede geler. Prøver blev udtaget efter 16 timer svarende til eksponentiel vækstfase. Proteiner fra *S. cerevisiae* blev mærket med 3 gange normal mængde L- $[^{35}S]$ methionin, mens proteiner fra *D. hansenii* forblev umærkede. Ved kørsel af gelen blev 25% mærket *S. cerevisiae* protein og 75% ikke-mærket *D. hansenii* protein påsat, hvilket resulterede i en sølvfarvet gel med primært *D. hansenii* proteiner og en scannet gel med udelukkende *S. cerevisiae* proteiner. Ved sammenligning af sølvfarvet og scannet gel blev proteiner fælles for de to gær samt proteiner syntetiseret udelukkende i den ene af de to gær identificeret (Fig. 4). Et antal proteiner fra *D. hansenii* blev fundet til at co-migrere med proteiner for *S. cerevisiae*. Da en række proteiner fra *S. cerevisiae* er navngivet var det muligt ud fra disse navne at navngive en række af de co-migrerende proteiner fra *D. hansenii*, herunder enkelte heat shock proteiner. Endvidere blev et antal proteiner fundet til at være specifikke for de to gær.



**Figur 3.** 2-D kort for *D. hansenii* (typestammen CBS 767). Proteiner fra eksponentielle celler i YNB medie uden NaCl blev mærket med L-[<sup>35</sup>S]methionin og ekstraheret. Protein spots blev identificeret med MALDI-TOF MS. \*: Protein fragmenter; †: Proteiner kun induceret i adaptionsperioden til 8% (w/v) NaCl og ‡: Proteiner, der ikke er identificeret (ND), men er stærkt induceret i adaptionsperioden til 8% (w/v) NaCl.

Derudover blev matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight spectrometry (MALDI-TOF) efterfulgt af masse spektroskopi (MS) anvendt til protein identifikation, hvilket dog kræver et fuldt sekventeret genom for at få en succesfuld identifikation. Da projektet begyndte, var genomet for *D. hansenii* kun sekventeret i begrænset omfang (20%), hvilket vanskeliggjorde identifikationen af *D. hansenii* proteiner. I juli 2004 blev genomet for *D. hansenii* frigivet og er nu tilgængelige på <http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php>. Dette medførte, at 47 protein spots blev navngivet (Fig. 3). Identifikation af protein spots blev udført i samarbejde med Michel Hébraud, Plate-forme Protéomique, INRA, Frankrig.

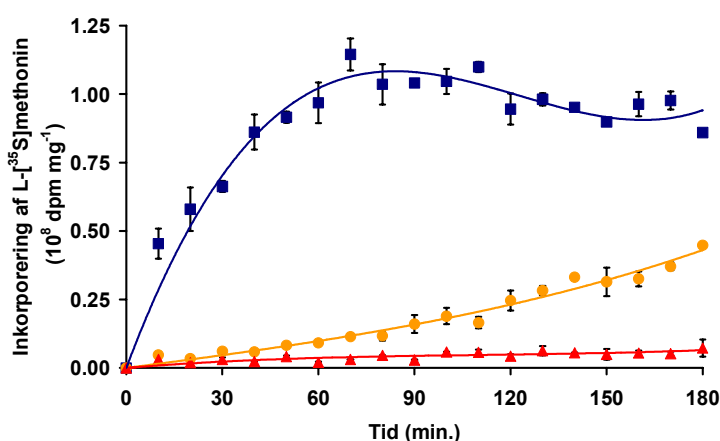


**Figur 4.** Co-2-D gel elektroforese mønstre af proteiner fra *Debaryomyces hansenii* (CBS 767) og L-[<sup>35</sup>S]methionin mærkede proteiner fra *Saccharomyces cerevisiae* (S288C). A, Sølvfarvet co-elektroforese gel med *D. hansenii* proteiner. B, Radioaktive proteiner fra *S. cerevisiae*. Pink cirkel: co-migrerende proteiner. Grøn cirkel: karakteristiske *D. hansenii* proteiner. Rød cirkel: karakteristiske *S. cerevisiae* proteiner.

### 3.2.2. Inkorporeringen af L-[<sup>35</sup>S]methionin

Proteinsyntesen blev bestemt ved at undersøge inkorporeringen af L-[<sup>35</sup>S]methionin i løbet af 90 min efter tilsætning af 0, 8 og 12% (w/v) NaCl til eksponentielle celler ( $OD_{600nm} = 0,6$ ) (Fig. 5). Inkorporeringen af L-[<sup>35</sup>S]methionin blev målt ved hjælp af scintillationstælling. Inkorporeringen blev beregnet som dpm pr. mg tørstof. I medie uden NaCl blev L-[<sup>35</sup>S]methionin inkorporeret med en gennemsnitlig inkorporeringshastighed på  $2,4 \times 10^6$  dpm  $mg^{-1} min^{-1}$  i løbet af de første 30 min.

efter tilsætning af L-[<sup>35</sup>S]methionin, mens den gennemsnitlige inkorporeringshastighed mellem 30 og 60 min. var  $1,1 \times 10^6$  dpm  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Inkorporeringen af L-[<sup>35</sup>S]methionin stoppede efter 84 min. med et niveau på  $1,1 \times 10^8$  dpm  $\text{mg}^{-1}$ . Både 8 og 12% (w/v) NaCl påvirkede inkorporeringen af L-[<sup>35</sup>S]methionin. I medie med 8% (w/v) NaCl blev L-[<sup>35</sup>S]methionin inkorporeret med en gennemsnitlig inkorporeringshastighed på  $1,6 \times 10^5$  dpm  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  i løbet af de første 30 min svarende til 7% af inkorporeringshastigheden i medie ikke tilsat NaCl. Derefter steg inkorporeringshastigheden til  $4,1 \times 10^5$  dpm  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  efter 180 min. I medie med 12% (w/v) NaCl blev L-[<sup>35</sup>S]methionin inkorporeret med en gennemsnitlig inkorporeringshastighed på  $8,8 \times 10^4$  dpm  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  i løbet af de første 30 min svarende til 4% af inkorporeringshastigheden i medie ikke tilsat NaCl. Derefter steg inkorporeringshastigheden til inkorporeringshastighed  $1,8 \times 10^5$  dpm  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  efter 180 min.



**Figur 5.** Inkorporering af L-[<sup>35</sup>S]methionin i proteiner fra *Debaryomyces hansenii* (typestammen CBS 767).

### 3.2.3. Indflydelsen af NaCl på proteomet for *D. hansenii*

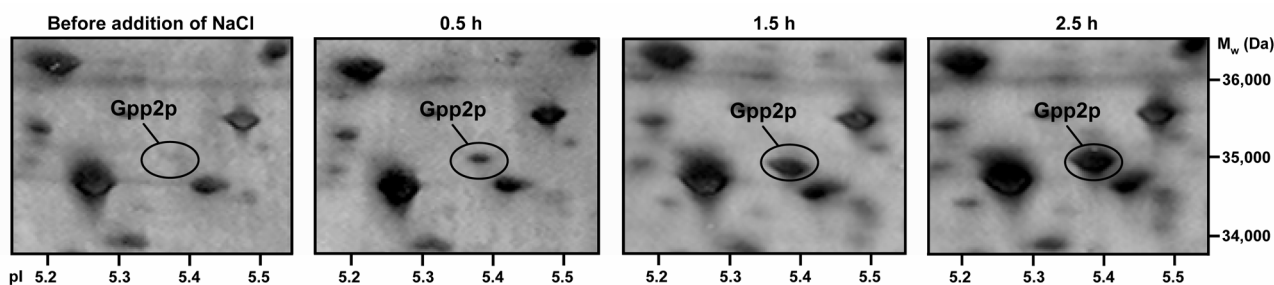
Gæren blev opformeret til eksponentiel vækstfase ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$ ), hvorefter en mængde NaCl svarende 8 og 12% (w/v) NaCl blev tilsat. Prøver blev udtaget før tilsætning af NaCl samt efter 30, 60 og 90 min. efter tilsætning af NaCl. Proteiner blev mærket med L-[<sup>35</sup>S]methionin i 30 min. og analyseret med 2-D PAGE. For identificerede proteiner blev fold induktioner/repressioner udregnet. Proteiner, der udviste en fold induktion/repression på 2, blev defineret som NaCl-følsomme proteiner. NaCl-følsomme proteiner er angivet i Tabel 1. Adskillige proteiner blev defineret til at være NaCl-følsomme. De glykolytiske enzymer aldolase (Fba1p) og triosophosphate isomerase (Tpi1p) tilhørende den øverste del af glykolysen blev induceret, når NaCl var tilstede, mens de glykolytiske enzymer enolase (Eno1p) og phosphoglycerate mutase (Gmp1p) tilhørende den



nederste del af glykolysen blev represseret. Endvidere blev pyruvate dehydrogenase beta subunit (Pdb1p) involveret i reaktionerne mod Krebs cyklus represseret. Dette indikerer, at glycerol er vigtig, når NaCl er tilstede, da en højere synteserate af enzymerne i den øverste del af glykolysen kombineret med lavere synteserate af enzymerne i den nederste del af glykolysen og ruten mod Krebs cyklus vil resultere i et højere niveau af dihydroxyacetone phosphat, hvilket vil være nyttigt for glycerol produktionen og dermed resulterer i højere intracellulære koncentrationer af glycerol. Gcy1p (glycerol dehydrogenase), som er involveret i omdannelsen af glycerol til dihydroxyacetone blev induceret, når NaCl var tilstede. Dette indikerer, at det ikke kun er enzymerne involveret i dannelsen af glycerol, men også enzymerne involveret i omdannelsen af glycerol, der har betydning, når NaCl er tilstede. Induktion af Gcy1p kan forklares med en ”fintuning” af glyceroldannelsen.

Et fragment af Ssa1p, som tilhører heat shock 70 family og koder for en chaperone i cytosolen, som er nødvendig i forbindelse med varrestress, blev induceret, når NaCl var tilstede. Dette indikerer et overlap mellem NaCl og varme stress. Et andet medlem af heat shock 70 family Ssb1p associeret med ribosomerne og primært involveret i translation blev represseret, når NaCl er tilstede. Endvidere er Hsp60p lokaliseret i mitokondriaerne represseret, når NaCl er tilstede.

Derudover blev en række proteiner kun detekteret til at blive syntetiseret, når NaCl var tilstede. Et af disse nysyntetiserede proteiner var glycerol-3-fosfatase (Gpp2p) (Fig. 6), som tidligere beskrevet er involveret i produktionen af glycerol. Dette understreger betydning af glycerol i forbindelse med adaptation til NaCl.



**Figur 6.** Detektion af glycerol-3-fosfatase i *Debaryomyces hansenii* (typestammen CBS 767).

**Table 1.** NaCl-følsomme proteiner i *Debaryomyces hansenii* (typestammen CBS 767).

Gene/ORF	Gen produkt/beskrivelse	Tid efter tilsætning 8% (w/v) NaCl (h)		
		0.5	1.5	2.5
		Fold induktion/repression		
<b>Energy metabolism</b>				
<i>Glycolysis</i>				
<i>ENO1</i>	Enolase	-1.5	-2.1	-3.0
<i>FBA1</i>	Aldolase	2.6	6.9	6.1
<i>GPM1</i>	Phosphoglycerate mutase	-2.0	-1.3	-1.1
<i>TPI1</i>	Triosephosphate isomerase	2.4	5.0	8.1
<i>Routes towards Krebs cycle</i>				
<i>PDB1</i>	Pyruvate dehydrogenase beta subunit	-4.5	-2.5	-3.2
<b>Biosynthesis of small molecules</b>				
<i>Amino acids</i>				
<i>ILV5</i>	Acetohydroxyacid reductoisomerase	1.6	-2.2	1.9
<i>LEU2</i>	Beta-isopropylmalate dehydrogenase	-2.8	-1.8	-2.3
<i>MET6</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	-2.6	-5.7	-3.9
<i>GHD1</i>	NADP-dependent glutamate dehydrogenase	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
<b>Macromolecules</b>				
<i>Proteins (chaperones)</i>				
<i>HSP60</i>	Heat shock protein 60	-1.4	-4.4	-2.5
<i>SSA1</i>	Heat shock protein of HSP70 family	6.8	2.2	3.6
<i>SSB1</i>	Heat shock protein of HSP70 family	-1.7	-4.3	-2.2
<b>Cellular processes</b>				
<i>Osmotic adaptation</i>				
<i>GPP2</i>	Glycerol-3-phosphatase	-	2.5 <sup>b</sup>	4.1 <sup>b</sup>
<i>GCY1</i>	Glycerol dehydrogenase	4.0	4.0	4.2
<b>Other functions</b>				
<i>ADO1</i>	Adenosine kinase	-2.2	-1.3	1.1
<i>PRX1</i>	Peroxiredoxin	-1.3	3.1	5.5
<i>YHB1</i>	Flavoheмоglobin	-7.3	-8.7	-7.1

<sup>a</sup> Proteiner ikke detekteret i løbet af de første 3 timer efter tilsætning af NaCl

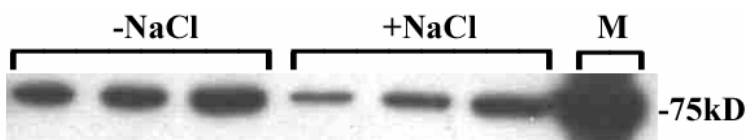
<sup>b</sup> Til beregning af fold induktion er geler efter 0,5 timer anvendt som reference gel.

Det faktum at peroxiredoxin (Prx1p) er induceret, når NaCl er tilstede indikerer at Prx1p ligeledes spiller en rolle i forbindelse med både NaCl-stress og oxidativ stress. Peroxiredoxiner reducerer hydroperoxider under oxidativ stress.

Adskillige biosyntetiske enzymer involveret i syntesen af aminosyrer (Ilv5p, Leu2p and Met6p) var represseret, når NaCl var tilstede. Dette indikerer, at disse processer er nedregulerede når NaCl er tilstede. Endvidere blev NADP-dependent glutamate dehydrogenase (Gdh1p) ikke syntetiseret under adaptation til NaCl. Gdh1p er involveret i omdannelsen af  $\alpha$ -ketoglucerate og ammonium til glutamate, som er en vigtig "compatible solute" i mange bakterie arter. Dette synes ikke at være tilfældet i gær.

### 3.2.4. Yderligere påvisning af NaCl-følsomme proteiner

NaCl-følsomme proteiner blev ligeledes detekteret med Western blotting. Antistoffer rettet mod Hog1p og Hsp70p blev anvendt til påvisning af de to centrale proteiner på 2-D geler ved hjælp af Western blotting. Hog1p er slutproduktet i "high-osmolarity glycerol (HOG) response pathway" og medvirker til en øget produktion af glycerol. Hsp70p er et heat shock protein, der bliver represseret under NaCl-stress. Resultaterne viste, at Hsp70p blev represseret under NaCl-stress (Fig. 7).



**Figur 7.** Detektion af cytosolisk Hsp70p. Der blev påsat henholdsvis 2, 5, 10 µg protein.

Som hos *S. cerevisiae* er lektinlignende overfladeproteiner rapporteret til at være involveret i flokkuleringen af *D. hansenii*. De *FLO*-gener som koder for disse overfladeproteiner i *S. cerevisiae* er forsøgt identificeret i *D. hansenii* ved hjælp af pulse field gel electrophoresis (PFGE) og Southern blotting. Til fremstilling af prober til identifikation af disse *FLO*-gener er sekvenserne for *FLO1*, *FLO5*, *FLO8* og *FLO11* downloaded fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, og prober blev fremstillet for de nævnte *FLO*-gener. Som beskrevet i litteraturen viste Southern blotting, at for *S. cerevisiae* *FLO5* er lokaliseret på kromosom VII, *FLO8* på kromosom V og *FLO11* på kromosom IX. For *D. hansenii* hybridiserede ingen af de fremstillede prober til de adskilte kromosomer. Det må enten betyde at den formodede homologi mellem *FLO*-generne i *S. cerevisiae* og *D. hansenii* ikke er tilstede eller at de undersøgte *FLO*-gener ikke findes i *D. hansenii*.

### 3.2.5. Delkonklusion

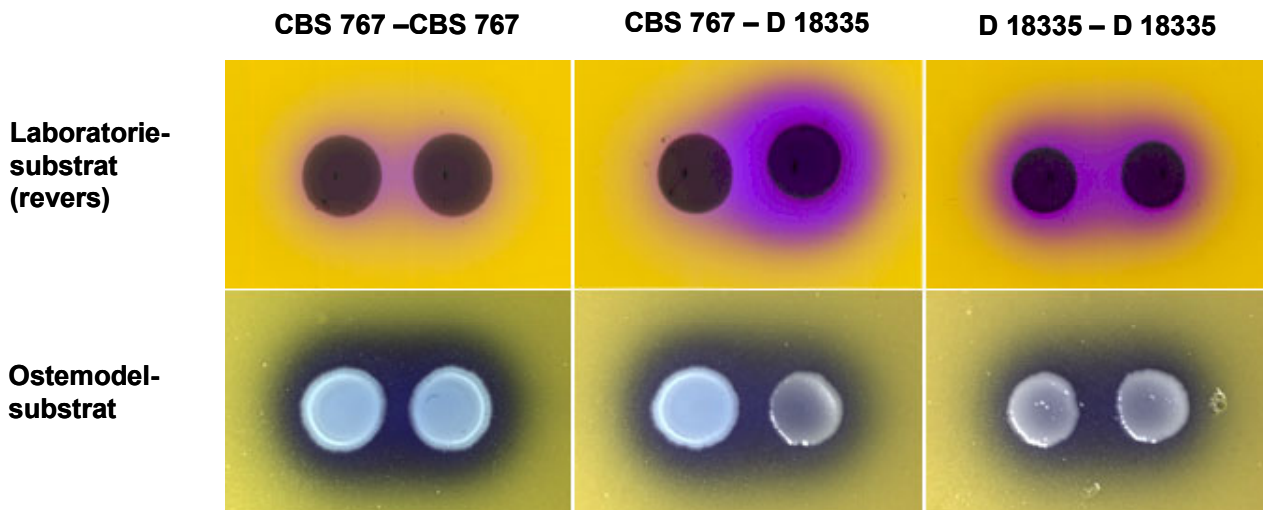
Proteomet for *D. hansenii* er blevet analyseret ved hjælp af 2-D PAGE, og 47 spots blev identificeret med MALDI-TOF MS resulterende i det første publiceret 2-D kort for *D. hansenii*. Indflydelsen af NaCl på proteomet blev undersøgt. Proteinsyntesen var kraftig påvirket af tilsætning af NaCl, da den gennemsnitlige inkorporeringshastighed af L-[<sup>35</sup>S]methionin indenfor de først 30 min efter tilsætning af NaCl kun var 7 og 4% af den gennemsnitlige inkorporeringshastighed af L-[<sup>35</sup>S]methionin i celler ikke tilsat NaCl. Flere nysyntetiserede proteiner blev observeret på 2-D gelerne heriblandt glycerol-3-phosphatase (Gpp2p), som er involveret i glycerol produktion. Endvidere blev adskillige proteiner induceret/represseret efter tilsætning af NaCl. Inducerede proteiner var enzymer involveret i øverste del af glykolysen og glycerol assimilering, mens represserede proteiner var enzymer i nederste del af glykolysen, vejen til Krebs cyklus og syntesen af aminosyrer. Endvidere var nogle heat shock proteiner induceret, mens andre blev represseret ved tilsætning af NaCl.

## 3.3. Ammoniak produktion i *D. hansenii* og andre mejerirelevante gær

### 3.3.1. Ammoniak produktion

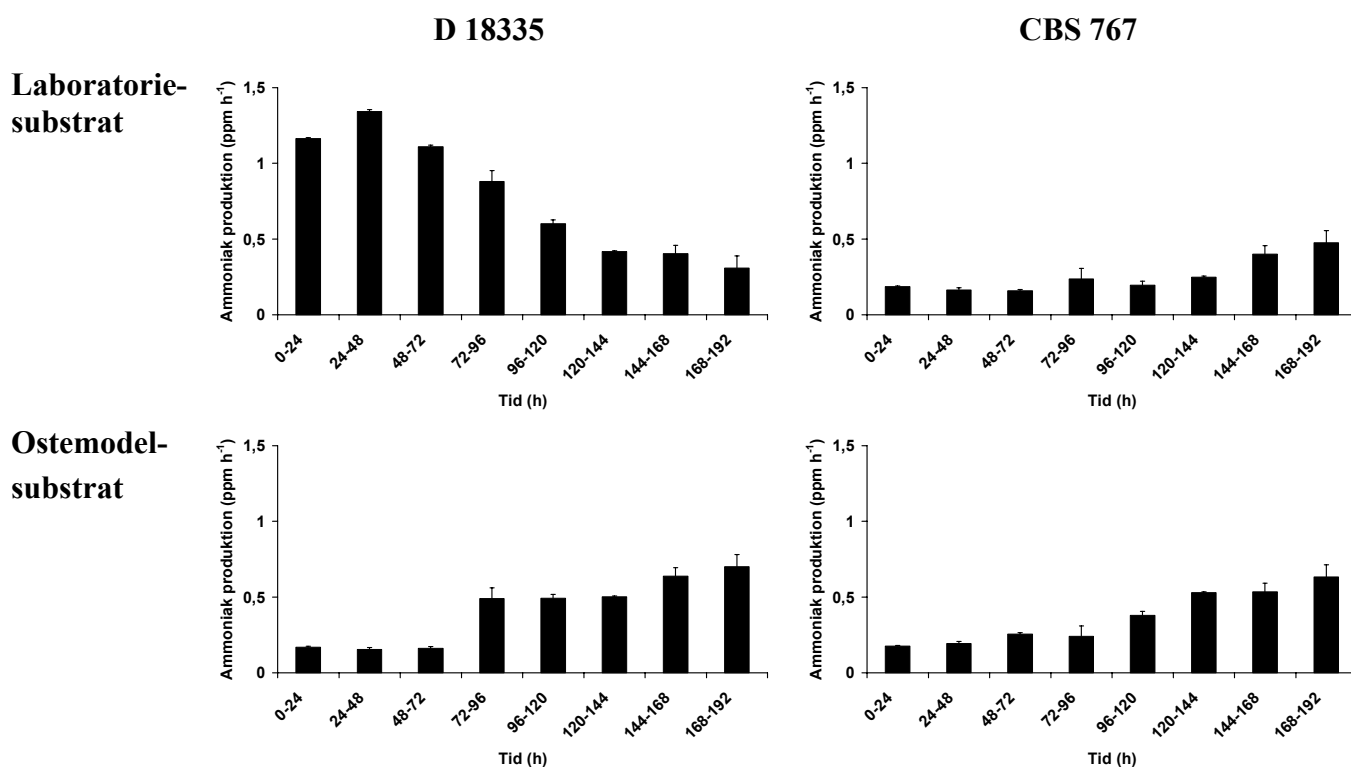
*D. hansenii* er ansvarlig for en pH-stigning på osteoverfladen dels på grund af assimilering af laktat samt produktion af ammoniak. pH-stigningen på osteoverfladen er vigtig for væksten af bakterier som *Brevibacterium linens*. Ammoniak er også vigtig for aromadannelsen i ost. Endvidere er ammoniak rapporteret til at være et generelt signalmolekyle medvirkende til koordinationen af væksten af gær.

Ammoniak produktionen blev undersøgt for *D. hansenii* og en række mejerirelevante gær på henholdsvis laboratorie- og ostemodellsubstrat. Kolonier blev podet på henholdsvis laboratorie- og ostemodellsubstrat tilsat pH indikatoren bromkresolblå, der gul ved pH under 5,2 og blå ved pH over 6,8. Ammoniak produktion blev observeret som farveomslag fra gul til blå omkring kolonierne. Fig. 8 viser ammoniak produktionen for D 18335 og CBS 767 på henholdsvis laboratoriesubstrat (GM agar) og ostemodellsubstrat. Ammoniak produktionen varierende for de stammer af *D. hansenii*. D 18335 synes at have den største ammoniak produktion på laboratoriesubstrat, mens CBS 767 synes at have den største ammoniak produktion på ostemodellsubstrat.



**Figur 8.** Ammoniak produktion for kolonier af *Debaryomyces hansenii* (typestammen CBS 767 og mejeriisolatet D 18335) på model- og ostesubstrat.

En metode til kvantitativ bestemmelse af ammoniak blev ligeledes udviklet. En lille skål med HCl, hvori ammoniak blev absorberet, blev placeret under kolonierne. Mængden af absorberet ammoniak blev bestemt med Nessler's reagens og spektrometri. Resultaterne underbygger de kvalitative observationer (Fig. 8). Ammoniak produktionen varierede blandt de undersøgte gær og var afhængig af den tilgængelige kulstofkilde. Fig. 9 viser ammoniak produktionen for enkelt kolonier af D 18335 og CBS 767 på henholdsvis laboratoriesubstrat (GM agar) og ostemodellsubstrat.



**Figur 9.** Ammoniak produktion i *Debaryomyces hansenii* (CBS 767 og D 18335) målt med Nessler's reagens.

### **3.3.2. Ammoniak som signalstof i *D. hansenii***

I ovenstående forsøg var koloniernes produktion af ammoniak retningsbestemt mod nabokolonier (Fig. 8), hvilket tyder på, at *D. hansenii* som andre gær arter producerer og udsender ammoniak som signalmolekyle til at koordinere vækst. Endvidere blev ekspresionen af gener med betydning for ammoniak produktionen afprøvet med Northern blotting uden et egentligt resultat.

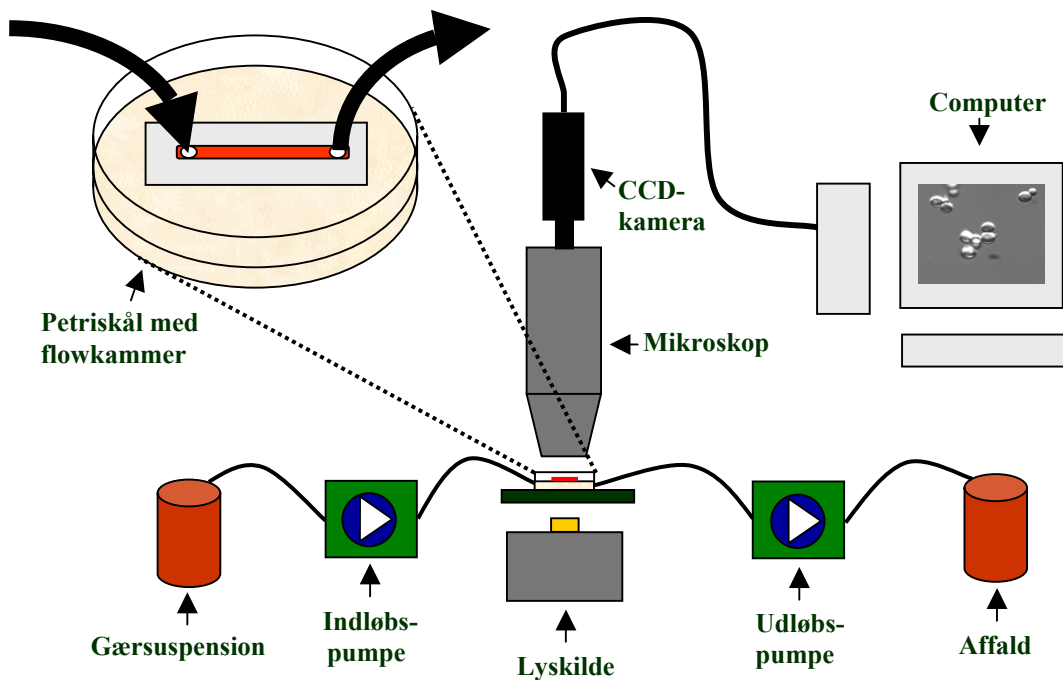
### **3.3.3. Delkonklusion**

Ammoniak produktionen blev undersøgt for en række mejerirelevante gær. Ammoniak produktionen varierede blandt de undersøgte gær og var afhængig af den tilgængelige kulstofkilde. Det tyder på at *D. hansenii* anvender ammoniak som signalmolekyle, som rapporteret for andre gær arter.

### 3.5. Adhæsion af *Debaryomyces hansenii* til faste overflader

#### 3.5.1. Udvikling af forsøgsdesign til adhæsionsbestemmelse

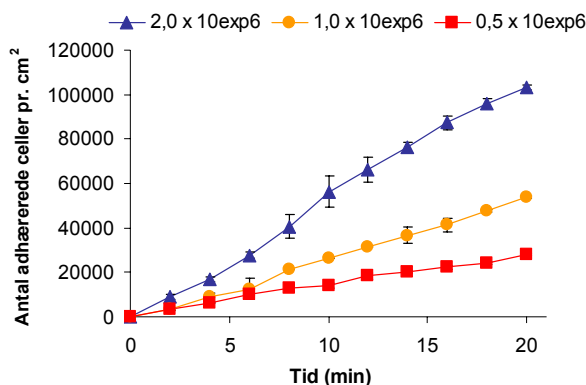
Da *D. hansenii* først skal etablere sig på en osteoverflade før den kan vokse, er en nærmere undersøgelse af denne gærarts adhæsion på faste overflader meget relevant. Man anvender, i dagens osteproduktion, opslemmet kit fra allerede modnede oste samt evt. starterkultur til at kitte (inokulere) og derved starte overflademodningen af friske Danbo oste. Selve kitningen på mejerierne kan foregå i tunnelsystemer, hvor de friske oste børstes og overskylles med kitkulturen. For at ligne virkeligheden mest muligt skulle forsøgsdesignet altså bestå af et flowsystem og ikke et lettere håndterbart statisk system.



**Figur 10.** Forsøgsdesign til bestemmelse af adhæsion af *D. hansenii* på fast overflade

Forsøgsdesignet til bestemmelse af adhæsion er skitseret i Fig. 10. Vha. af dette design var det muligt at bestemme adhæsionen af *D. hansenii* på faste modelsubstrater under flow. Der pumpes en standardiseret mængde gær hen over den overflade man ønsker at bestemme adhæsionen til. Med faste tidsintervaller tages der billeder af overfladen, gennem flowkammeret, og vha. en udviklet software procedure er det efterfølgende muligt automatisk at tælle antallet af adhærerede celler til

hvert tidspunkt. Adhæsionen er vist som antal adhærerede gærceller per overfladeenhed (cm<sup>2</sup>) plottet mod tiden (min) (Fig. 11).



**Figur 11.** Adhæsion af forskellige cellekoncentrationer (antal celler/ml) af *D. hansenii* (CBS 767) på fast 3 % agarose overflade. Data er vist som gennemsnit af dobbeltbestemmelser med tilhørende standardafvigelser.

Ud fra de små standardafvigelser i Fig. 11 kan man se at det er muligt at reproducere adhæsionsresultater i det beskrevne forsøgsdesign. Derudover kan man se at antallet af celler, der adhærer på overfladen er lineær over tiden, og at mængden af celler der flushes igennem kammeret er proportional med antallet af adhærerede celler.

### 3.5.2. Adhæsion af forskellige *D. hansenii* stammer på fast modelsubstrat

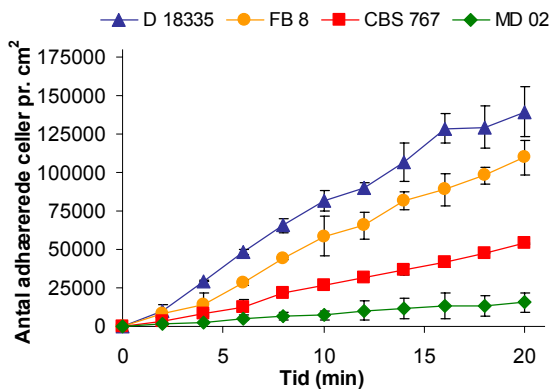
Ved hjælp af det ovennævnte forsøgsdesign blev adhæsionen af fire forskellige udvalgte *D. hansenii* stammer undersøgt på fast agaroseoverflade (Tabel 2).

**Tabel 2.** Baggrundsbeskrivelse af fire udvalgte *D. hansenii* stammer.

<i>D. hansenii</i> stammer	Stammebaggrund
D 18335	Isolat fra Durup Mejeri (K.M. Petersen)
FB 8	Starterkultur (Danisco Cultor Innovation)
CBS 767	Typestamme
MD 02	Starterkultur (Arla Foods Innovation)

Tidligere undersøgelser (Petersen & Jespersen, 2004) udført på Durup Mejeri har vist at stammen D 18335 fuldstændigt udkonkurrerede en anvendt starterkultur (MD02) og var dominerende på ostene efter få dage.



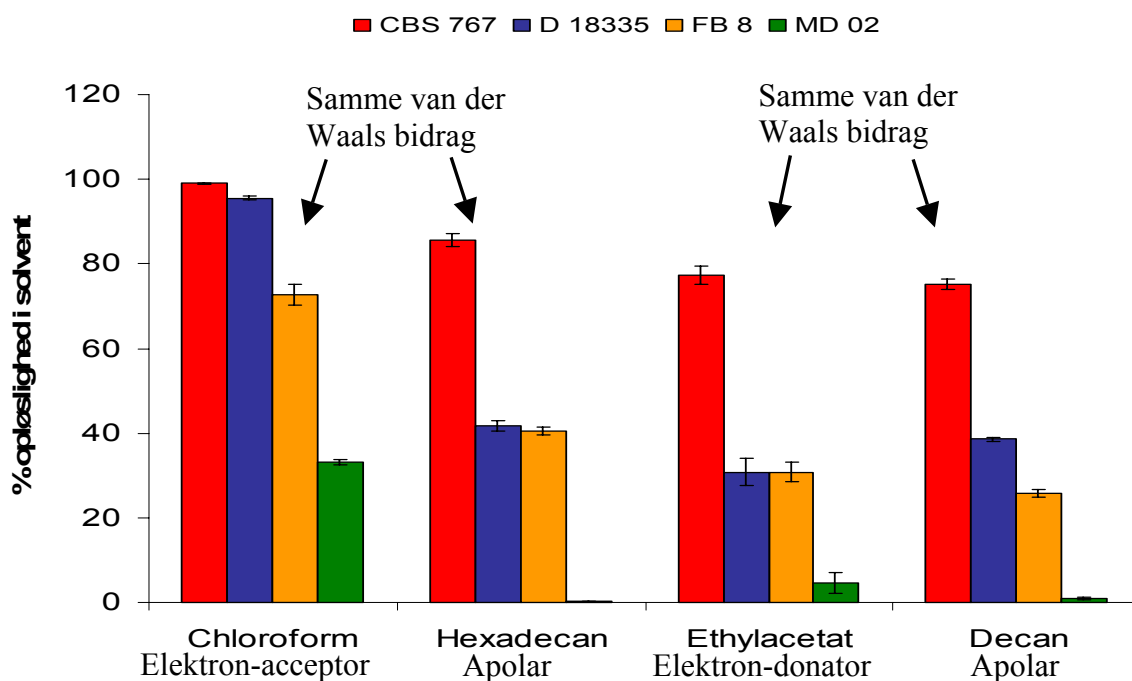


**Figur 12.** Adhæsion af 4 forskellige *D. hansenii* stammer på 3 % agarose. Data er vist som gennemsnit af dobbeltbestemmelser med tilhørende standardafvigelser

I Fig. 12 ses der meget store forskelle på adhæsionen af de forskellige *D. hansenii* stammer. D 18335 meget høje adhæsionshastighed kunne være med til at forklare dens dominerende egenskaber. Den tidligere anvendte starterkultur MD02 adhærer ca. 10 gange dårligere end D 18335.

### 3.5.3. MATS (Microbial Adhesion To Solvents) bestemmelser

For at prøve at forklare de store forskelle i adhæsion blev de 4 stammers overfladeegenskaber undersøgt vha. MATS (Microbial Adhesion To Solvents). MATS består af fire forskellige solventer og når disse blandes med en vandfase kan cellernes opløselighed i de to faser fortælle noget om celleoverfladens hydrofobicitet. Jo større opløselighed cellerne har i de apolare solventer (hexadecan og decan) jo mere hydrofob er deres overflade. Derudover kan man bestemme i hvor høj grad celleoverfladen helst vil donere eller acceptere elektroner under interaktion med en anden overflade. Dette bestemmes ud fra at solventerne består af to par med ens van der Waals kræfter; 1 par (chloroform-hexadecan) og 2 par (ethylacetat-decan). Differencen mellem opløseligheder i det første par beskriver cellernes affinitet for at donere elektroner fra deres overflade i en interaktion. Modsat beskriver en evt. difference mellem det andet par cellernes affinitet til at acceptere elektroner i en interaktion.



**Figur 13.** MATS bestemmelser af 4 *D. hansenii* stammer. Data er vist som gennemsnit af trippelbestemmelser med tilhørende standardafvigelser.

Man kan se ud fra Fig. 13 at typestammen (CBS 767) er den mest hydrofobe stamme af de 4, da ca. 80 % af cellemængden fra vandfasen opløses i de apolare stoffer (hexadecan og decan) efter blanding og efterfølgende separation af faserne. MD 02 er derimod meget hydrofil og kan næsten ikke detekteres i de apolare solventer. De to resterende stammer (D 18335 og FB 8) er moderat hydrofobe. Da det er de sidstnævnte to stammer der adhærerer bedst ser adhæsionen ikke kun ud til at være korreleret med cellernes hydrofobicitet.

Derfor kunne cellernes evne til at donere eller acceptere elektroner i interaktioner indgå i forklaringen af stammernes forskellige adhæsion. Differencerne af de to solvent par er angivet i Tabel 3 og behandlet i det efterfølgende afsnit.

### 3.5.4. Adhæsiionsbestemmelserne korreleret mod overfladeegenskaber og cellestørrelse

I Tabel 3 kan man se de 4 forskellige stammers adhæsiionshastigheder samt differencer fra de føromtalte 2 MATS-par. Derudover er der angivet teoretiske sedimentationshastigheder bestemt ud fra gennemsnitlige cellediametre af de 4 stammer.

**Tabel 3.** Adhæsionshastighed, MATS og sedimentation af 4 forskellige *D. hansenii* stammer.

<i>D. hansenii</i> stammer	Adhæsion	MATS		Sedimentation	
	Adhæsionshastighed [celler·cm <sup>-2</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Chloroform – Hexadecan [%]	Ethylacetat– Decan [%]	Gnm. Celle- diameter [µm]	Sed. hastighed [µm·s <sup>-1</sup> ]
D 18335	7325 (± 750)	53,9	-7,8	4,4 (± 0,5)	1,19
FB 8	5725 (± 680)	32,3	4,9	3,9 (± 0,6)	0,91
CBS 767	2540 (± 360)	13,5	2,1	3,2 (± 0,8)	0,62
MD 02	790 (± 460)	33,0	3,7	3,4 (± 0,6)	0,70

Man kan se i Tabel 3 at differencen mellem det første MATS-par (chloroform-hexadecan) er væsentligt større end det andet par (ethylacetat-decan). Det vil sige at cellerne i langt højere grad vil donere end acceptere elektroner i interaktioner. Der er korrelation mellem de tre adhæsive stammer evne til at donere elektroner og deres adhæsion. Vi mener at grunden til at MD 02 adhærer meget dårligt selv om den har en ret stor evne til at donere elektroner er dens meget hydrofile (polare) overflade. Dette gør at MD 02 er fuldstændigt hydreret af vandmolekyler og derfor ikke kan interagere med en anden overflade.

Tyngdekraften kan påvirke adhæsionsresultaterne fra det anvendte forsøgsdesign. Når en stor celle flushes igennem kammeret vil den sedimentere hurtigere end en lille celle. Det betyder at hvis der er forskel i den gennemsnitlige størrelse af to gærstammer vil der også være forskel i hvor mange celler der rammer overfladen og derved har muligheden for at adhærere. I Tabel 3 kan man se at den mest adhæsive stamme (D 18335) også er den største og derved også den stamme med den hurtigste sedimentationshastighed. Man kan ligeledes se at der er en korrelation mellem de tre mest adhæsive stammer og deres tilhørende sedimentationshastighed.

Både stammernes evne til at donere elektroner fra deres overflade og deres sedimentationshastigheder kan altså korreleres mod adhæsionen, og vi kan ikke med sikkerhed sige hvilken af disse der er vigtigst. Dette ville kræve at man kunne udelukke tyngdekraften hvilket ikke kan lade sig gøre i det anvendte forsøgsdesign. Dette kunne dog lade sig gøre ved anvendelse af en såkaldt ”optisk pincet”. Da en sådan pincet er ved at blive indkøbt på vores afdeling vil et sådant forsøg være muligt i fremtiden.

### 3.5.5. Indflydelsen af *Brevibacterium linens* på adhæsionen af *D. hansenii*

Når de friske oste kittes vil der også være store mængder bakterier tilstede i den anvendte viskevæske. Bakterierne indgår i modningen af ostene og en af de vigtigste af disse er *Brevibacterium linens*. Derfor er det interessant at undersøge hvorledes tilstedeværelsen af bakterier påvirker adhæsionen af *D. hansenii* til en fast overflade.

**Tabel 4.** Adhæsion af *D. hansenii* (CBS 767) under flush med forskellige cellekoncentrationer af *B. linens* (B1) på 3 % agaroseoverflade.

	Adhæsionshastighed [celler·cm <sup>-2</sup> ·min <sup>-1</sup> ]
10 <sup>6</sup> <i>D.hansenii</i> /ml (kontrol)	2540
10 <sup>6</sup> <i>D.hansenii</i> /ml + 10 <sup>6</sup> <i>B. linens</i> /ml	2375
10 <sup>6</sup> <i>D.hansenii</i> /ml + 10 <sup>7</sup> <i>B. linens</i> /ml	2205
10 <sup>6</sup> <i>D.hansenii</i> /ml + 10 <sup>8</sup> <i>B. linens</i> /ml	1530

Dette er meget præliminært og bør undersøges yderligere men ud fra resultaterne i Tabel 4 ser det ud til at adhæsion af *D. hansenii* mindskes ved stigende cellekoncentration af *B. linens*. Dog ser det ud til at det først er når der er 100 gange flere bakterier end gær, at adhæsionen af *D. hansenii* inhiberes væsentligt. Bakterierne var for små til at kunne ses direkte i forsøgsdesignet men efterfølgende mikroskopi med højere forstørrelse viste at bakterierne adhærerede til overfladen ligesom gærene. Der blev ikke observeret nogen adhæsion af bakterier på gærene. Inhiberingen af adhæsion af CBS 767 skyldes formodentligt konkurrence med bakterierne om adhæsionspladserne på overfladen.

### 3.5.6. Adhæsion af *D. hansenii* på osteoverflade

Forsøgsdesignet blev forsøgt anvendt på rigtige osteoverflader bestående af frisk usaltet 50+ Danbo ost. Dette viste sig dog ikke uventet at afstedkomme en del vanskeligheder. Det var ikke muligt at anvende lysmikroskopi ved forsøg med ost, pga. meget store lysintensitetsforskelle gennem den komplekse ostemasse uafhængigt af tykkelsen af osteskiverne. Ved anvendelse af en fluorescerende probe (CFDA-SE) og fluorescensmikroskopi var det muligt at detektere gærcellerne. Det viste sig dog at ikke alle gærceller blev farvet i en grad så de kunne detekteres på en osteoverflade der udsender meget autofluorescens (støj). Derudover var osteoverfladen meget ujævn så det var nødvendigt at tage billeder i flere fokusplaner hvilket besværliggjorde detektionen og øgede usikkerheden betragteligt. Samlet set er det, som minimum, nødvendigt med en optimering af brug af fluorescerende prober hvis forsøgsdesignet skal anvendes på rigtig ost.

### 3.5.7. Delkonklusion

Det lykkedes at indkøre et forsøgsdesign der reproducerbart kunne bestemme adhæsionen af *D. hansenii* på en fast overflade under flow. Resultaterne viste store stammeforskelle i adhæsionen af *D. hansenii* på modelsubstrater. Yderligere undersøgelser tyder på at optimal adhæsion finder sted når gærstammen har en stor gennemsnitlig cellediameter, en moderat hydrofob overflade og en høj affinitet for at donere elektroner til en anden overflade. Dette blev kun korreleret mod adhæsion på modelsubstrater, men kunne sagtens også være gældende på en mere kompleks overflade såsom en ost. Samlet fremhæver resultaterne vigtigheden i at medtage adhæsionsbestemmelser som parameter ved fremtidig udvælgelse af starterkulturer til faste levnedsmidler, herunder overflademodnede oste.

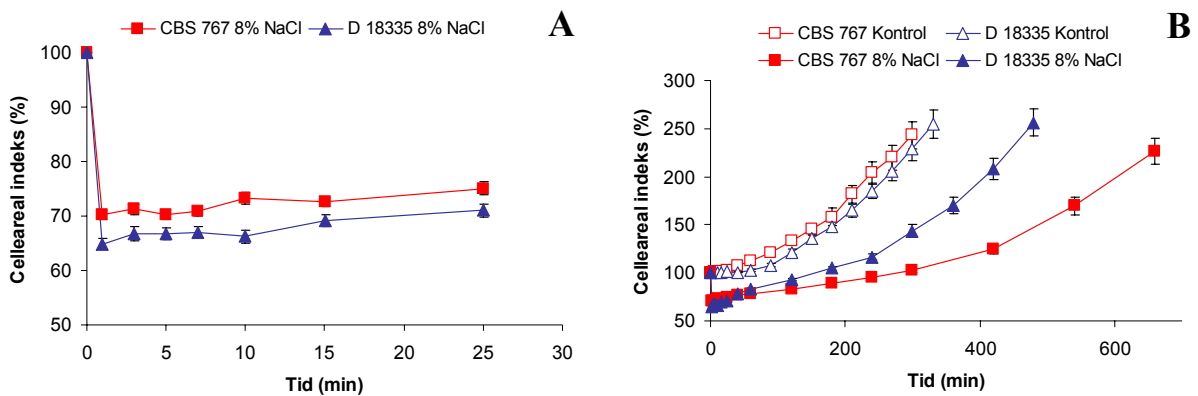
## 3.6. Undersøgelse af NaCl-betydning for intracellulære events i *D. hansenii*

### 3.6.1. Effekten af momentant NaCl-stress på cellediameteren og efterfølgende vækst af *D. hansenii*

Det er selvsagt ikke nok at gæren kan adhærere på ostens overflade. Den skal også være i stand til at vokse hurtigt i et miljø kendetegnet ved relativ lav pH og høj NaCl-koncentration. En større forståelse af *D. hansenii*'s NaCl-tolerance ville kunne hjælpe i fremtidig udvælgelse af gærstammer til starterkulturer. Det blev valgt at fokusere på de 2 *D. hansenii* stammer; D 18335 (osteisolat) og CBS 767 (typestamme). Da D 18335 er isoleret fra en osteproduktion og var dominerende i denne er det forventeligt at denne stamme besidder en høj NaCl-tolerance gennem evolutionsmæssig adaptering.

Når en gær-celle pludselig udsættes for en høj ionkoncentration (i dette tilfælde NaCl) vil gæren skrumpe pga. tab af cellulært vand til omgivelserne indtil ionkoncentrationerne er ens ekstra- og intracellulært.

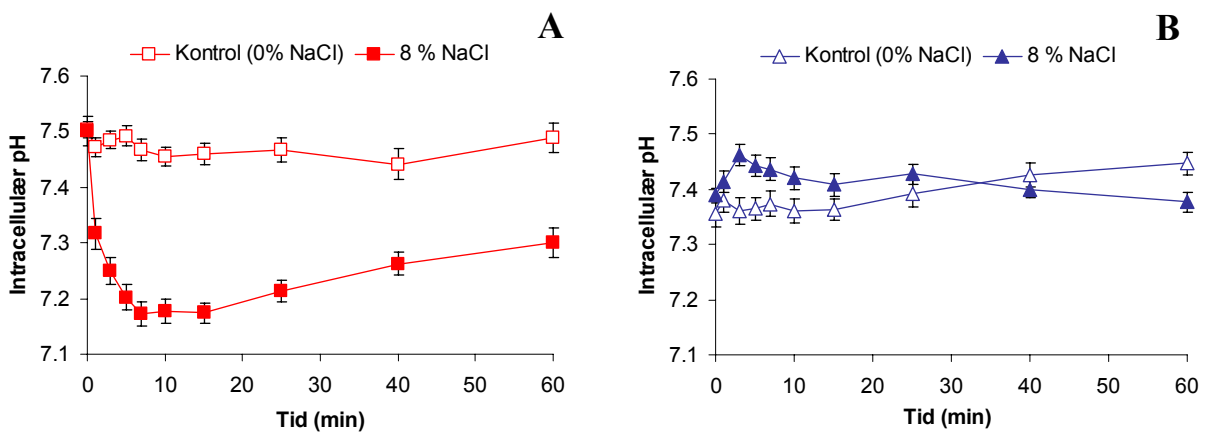
I Fig. 14A kan man se at begge *D. hansenii* stammerne skrumper 30-35 % af deres celleareal, hvilket svarer til ca. 45-50 % af cellernes volumen, inden for et minut når de udsættes for 8 % (w/v) NaCl. D 18335 skrumper lidt mere end CBS 767 men som man kan se i Fig. 14B begynder D 18335 at vokse væsentligt hurtigere end CBS 767 i 8 % (w/v) NaCl.



**Figur 14.** Gennemsnitlige cellearealer af *D. hansenii* CBS 767 og D 18335 udsat for momentant 8 % NaCl (A og B) og 0 % NaCl (B). Data er vist som gennemsnit af minimum 40 celler med tilhørende standard error mean værdier

### 3.6.2 Effekten af momentant NaCl-stress på intracellulær pH ( $pH_i$ ) i *D. hansenii*

I Fig. 15A og B kan man se udviklingen i intracellulær pH ( $pH_i$ ) på de samme celler som er præsenteret i Fig. 14. I Fig. 15A kan man se at  $pH_i$  falder fra ca. 7,50 til 7,15 i CBS 767 efter det cellulære tab af vand. I Fig. 15B kan man derimod se at D 18335 er i stand til at opretholde  $pH_i$  homeostase selv om den skrumper i samme grad som CBS 767 (Fig. 14A).



**Figur 15.** Intracellulær pH ( $pH_i$ ) af *D. hansenii* CBS 767 (A) og D 18335 (B) i kontrol (åbne symboler) og 8 % (w/v) NaCl (lukkede symboler) introduceret ved  $t = 0$ . Data er vist som gennemsnit af minimum 40 celler med tilhørende standard error mean værdier

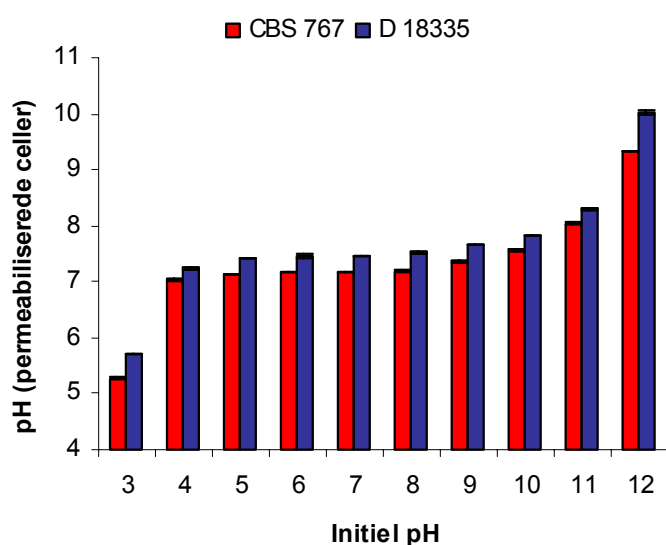
Observationer tidligere i litteraturen har vist en korrelation mellem en gærpopulations evne til at opretholde  $pH_i$  homeostase og længden af den efterfølgende nølefasen efter syrestress. Noget tilsvarende ser ud til at være gældende for *D. hansenii* efter NaCl-stress. Evnen til at opretholde  $pH_i$

homeostase kunne være en del af forklaringen på D 18335 hurtige efterfølgende vækst under NaCl-stress sammenlignet med CBS 767.

Spørgsmålet er så hvordan D 18335 er i stand til at opretholde  $pH_i$  homeostase efter det kraftige vandtab som NaCl forårsager, og som tidligere forsøg med gær (og bakterier) har vist resulterer i en forsurening af  $pH_i$ . Forsøg med sorbitol i stedet for NaCl gav samme  $pH_i$  respons i de to *D. hansenii* stammer hvilket udelukker at D 18335 i højere grad end CBS 767 udtrykte en specifik  $Na^+/H^+$  transporter der kunne udsende protoner under optag af  $Na^+$ .

### 3.6.3. Bestemmelse af intracellulær bufferkapacitet i *D. hansenii*

Vi undersøgte også cellernes intracellulære bufferkapacitet men de viste sig at være meget ens i de to stammer (data ej vist). Der var dog en forskel og det var at de to stammer havde maksimal bufferkapacitet ved to forskellige pH-niveauer. Dette er illustreret i Fig. 16.



**Figur 16.** pH-værdier målt i celleduspensioner af 15 mg celledørstof af hhv. *D. hansenii* CBS 767 og D 18335 efter permeabilisering i 70 % ethanolopløsninger med forskellige start pH-værdier.

Man kan se i Fig. 16 at begge stammer har et område mellem pH 7 og 8 hvor de bufferer bedst, men at permeabiliserede celleduspensioner af D 18335 konstant havde lidt højere pH-værdier end CBS 767. Ligevægtsområdet kan betegnes som cellernes intracellulære  $pK_a$  ( $pK_{a,i}$ )-værdier og ligger for CBS 767 på pH 7,1-7,2 mens det for D 18335 er på 7,4-7,5. Sammenholder man dette med  $pH_i$  bestemmelserne kan man se at  $pK_{a,i}$  og optimal  $pH_i$  er ens for D 18335 men ikke for CBS 767 hvor

$pK_{a,i}$  ligger lavere end  $pH_i$ . Dette kan så igen forklare hvorfor  $pH_i$  falder i CBS 767 men ikke i D 18335.  $pK_{a,i}$  bestemmes primært af aminosyrer med frie sidekæder indeholdende ioniserbare grupper med forskellige  $pK_a$  værdier. Vores resultater indikerer at de to *D. hansenii* stammer syntetiserer bufferstoffer (proteiner) med så forskellige aminosyresammensætninger at den gennemsnitlige  $pK_{a,i}$  værdi er forskellig.

#### **3.6.4. Delkonklusion**

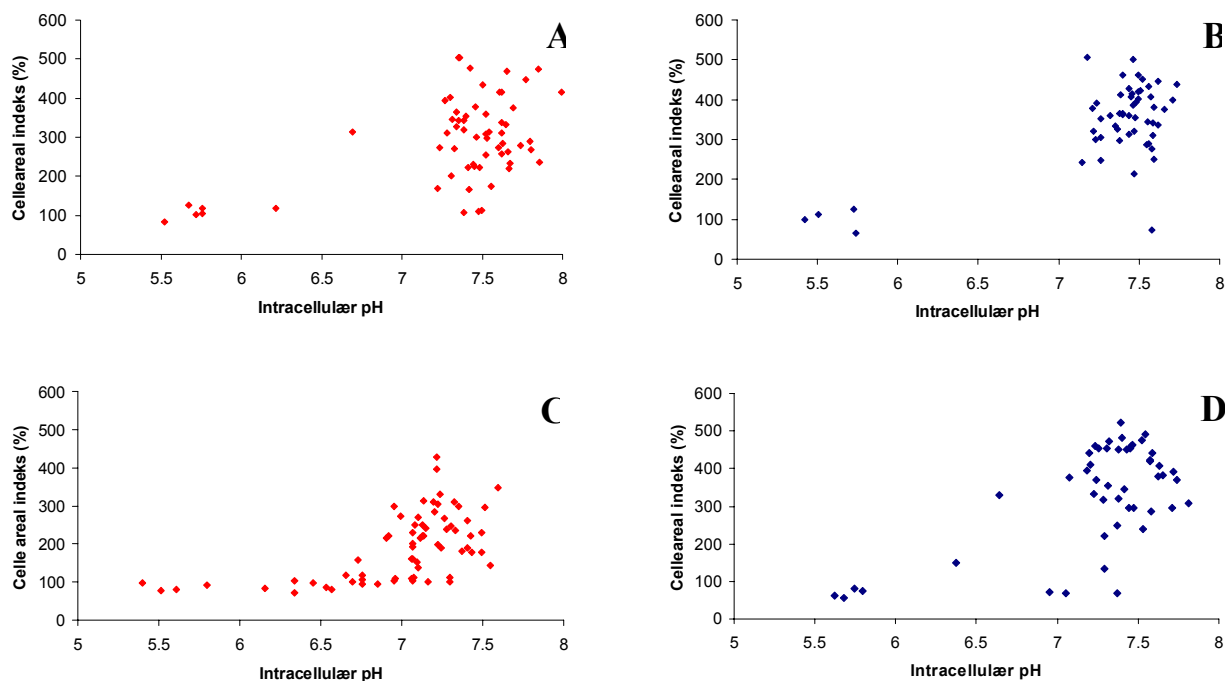
Både *D. hansenii* CBS 767 og D 18335 skrumper 45-50 % af deres startvolumen umiddelbart efter momentant 8 % (w/v) NaCl-stress, men kun D 18335 er i stand til at opretholde  $pH_i$  homeostase. Denne evne kunne være med til at forklare D 18335 meget hurtigere efterfølgende vækst ved saltstress. Vores resultater indikerer at D 18335 evne til at opretholde  $pH_i$  homeostase skyldes intracellulære bufferstoffer med en gennemsnitlig  $pK_a$  værdi meget tæt på stammens optimale  $pH_i$ . Da D 18335 er et osteisolat kan denne evne formodentligt tilskrives mange års adaptation til et miljø med høje NaCl-koncentrationer.

### **3.7. Sammenligning af NaCl-indflydelse på intracellulære events og vækst af *D. hansenii* på fast og i flydende substrat**

#### **3.7.1. Undersøgelse af en eventuel korrelation mellem $pH_i$ og vækst på enkeltcelleniveau**

Under afsnit 3.6 blev det beskrevet hvordan et fald i  $pH_i$  for CBS 767 populationen kunne korreleres med stammens efterfølgende langsomme vækst. I Fig.17 kan man se væksten (% CAI) for enkeltceller af CBS 767 og D 18335 plottet mod cellernes respektive  $pH_i$  værdier.





**Figur 17.** Celleareal indeks (CAI) plottet mod  $pH_i$  af *D. hansenii* CBS 767 (A,C) and D 18335 (B,D) celler på fast YPG substrat med 0 % (w/v) NaCl (A,B) og 8 % (w/v) NaCl (C,D). CAI-værdierne er bestemt forskellige tider efter inokulering; A og B efter 510 min, C efter 780 min og D efter 660 min.

Alle  $pH_i$ -værdierne i Fig. 17 er bestemt 10 min efter inokulering på de faste overflader. Man kan se at i alle eksperimenterne er der 4-5 celler med meget lav  $pH_i$  (omkring 5,5). Da forsøgene er udført på substrat med pH 5,3 vil det sige at disse celler har mistet deres pH-gradient og ganske sikkert er døde, hvilket understøttes af at ingen af cellerne er i stand til at vokse.

Det er gældende for begge gær at de absolutte  $pH_i$  værdier for celler med intakte pH-gradienter er meget heterogene og ikke er korreleret mod cellernes efterfølgende vækst. En celle med  $pH_i$  på f.eks. 7,1 kan sagtens vokse hurtigere end en celle med  $pH_i$  på 7,6. Det samme gør sig gældende i flydende substrater.

Derudover kan man i Fig. 17 se hvordan  $pH_i$  også på fast substrat falder for hele CBS 767 populationen når den inokuleres på fast YPG med 8 % (w/v) NaCl (Fig. 17C) og sammenlignes med 0 % (w/v) NaCl (Fig. 17A). Ligesom i flydende substrat (Fig. 17B) er D 18335 i stand til at opretholde  $pH_i$  homeostase på fast substrat indeholdende 8 % NaCl (Fig. 17D). De gennemsnitlige  $pH_i$  værdier for alle celler der i stand til at vokse kan samlet ses i Tabel 5. De meget ens gennemsnitlige  $pH_i$  værdier opnået fra de samme gærstammer på fast og i flydende substrat

understøtter den i afsnit 3.5 omtalte hypotese om intracellulære bufferstoffer med forskellige gennemsnitlige  $pK_a$  værdier i de to *D. hansenii* stammer.

**Tabel 5.** Gennemsnitlige  $pH_i$  værdier (10 min) af alle voksende *D. hansenii* CBS 767 og D 18335 celler på fast og i flydende YPG substrat med 0 og 8 % (w/v) NaCl.

YPG	0 % (w/v) NaCl		8 % (w/v) NaCl	
	CBS 767	D 18335	CBS 767	D 18335
Fast	7,51 ± 0,03	7,45 ± 0,02	7,17 ± 0,03	7,41 ± 0,03
Flydende	7,46 ± 0,02	7,40 ± 0,03	7,18 ± 0,04	7,42 ± 0,02

### 3.7.2. Sammenligning af viabilitet og vækst af *D. hansenii* på fast og i flydende substrat

I Tabel 6 kan man se at 6-12 % af cellerne ikke har nogen initial pH-gradient, og en gær-celle der ikke har nogen pH gradient må formodes at være død. Dette er altså bestemt før nogen form for stress og indikerer at en sen eksponentiel *D. hansenii* propageringskultur har en viabilitet på 88-94 % i rigt medie under optimale vækstbetingelser. Derudover kan man se i Tabel 6 at under 10 % af cellerne ikke er i stand til at gro efter 8 % NaCl-stress. Den eneste kombination hvor der er stor andel celler, med initiale pH-gradienter, der ikke vokser er CBS 767 celler inokuleret på fast YPG med 8 % (w/v) NaCl. Sidstnævnte forhold ser med andre ord ud til at være den eneste kombination med en udtalt letal effekt, men kun på CBS 767 stammen.

**Tabel 6.** Procentvis andel af celler med/uden initiale pH-gradienter og med/uden evnen til efterfølgende at vokse af *D. hansenii* CBS 767 og D 18335 på fast og i flydende YPG substrat med 0 og 8 % (w/v) NaCl.

Stamme	YPG	% (w/v) NaCl	Ingen initial pH-gradient <sup>a</sup> (%)	pH-gradient - Ingen vækst <sup>b</sup> (%)
CBS 767	Fast	0	8	7
		8	6	30
	Flydende	0	8	7
		8	12	9
D 18335	Fast	0	7	2
		8	8	6
	Flydende	0	9	8
		8	7	3

<sup>a</sup> pH-gradient < 0,5

<sup>b</sup> Vækst < 120 % CAI

Sammenligner man tiderne til et gennemsnitligt CAI på 200 % i Tabel 7 kan man se at begge *D. hansenii* stammerne både med og uden 8 % (w/v) NaCl vokser langsommere på fast overflade end i flydende medie. Der er en tydelig additiv effekt af fast overflade og NaCl på væksten af begge *D.*

*hansenii* stammerne. Det vil sige at kombinationen af fast overflade og NaCl ikke har nogen synergistisk effekt på væksten af hverken den salt-tolerante (D 18335) eller den ikke salt-tolerante (CBS 767) gærstamme.

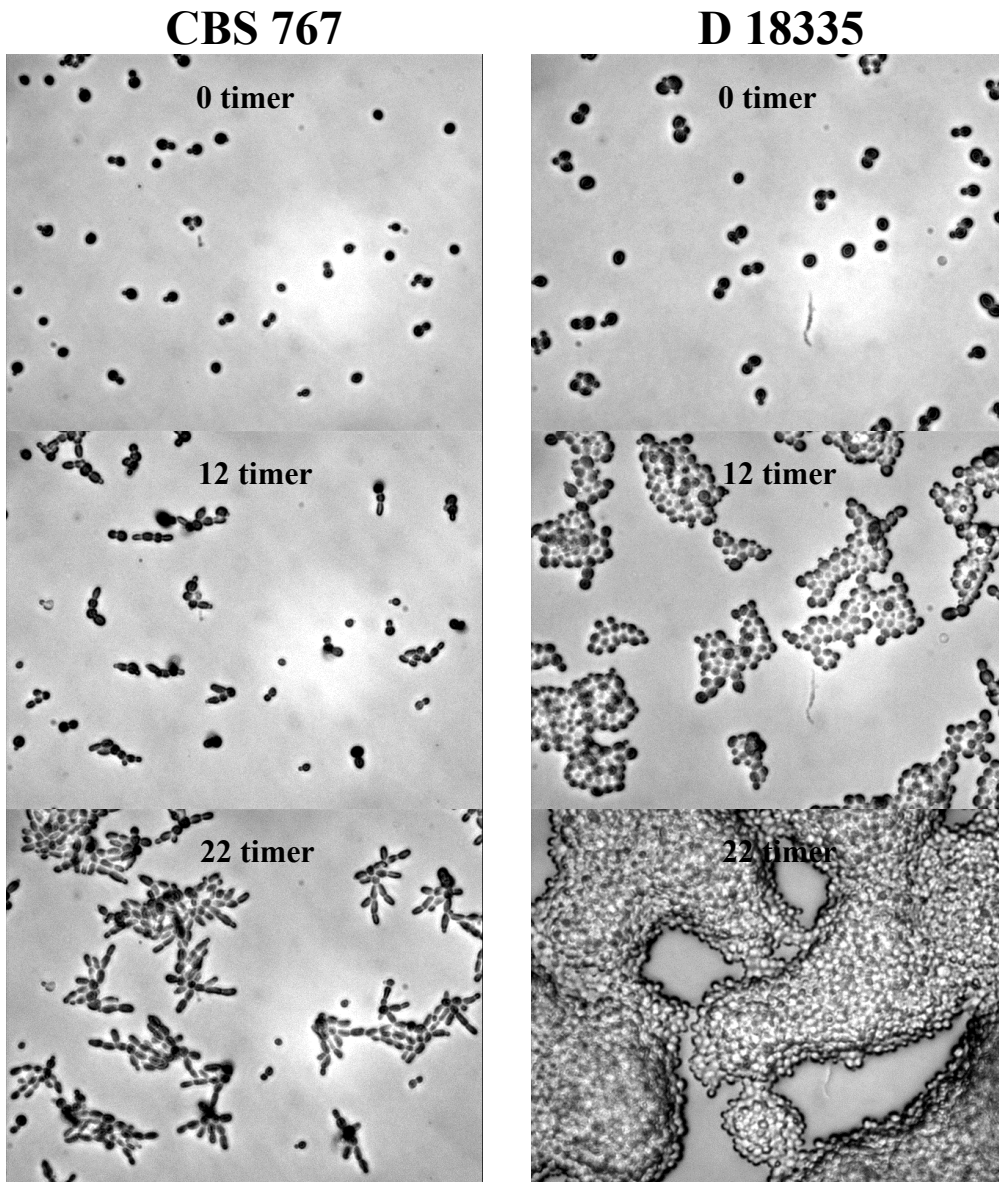
**Tabel 7.** Tid (min) til et gennemsnitlig celleareal Indeks (CAI) på 200 % af *D. hansenii* CBS 767 og D18335 celler på fast og i flydende YPG substrat med 0 og 8 % (w/v) NaCl.

YPG	0 % NaCl		8 % NaCl	
	CBS 767	D 18335	CBS 767	D 18335
Fast	338 ± 13	320 ± 8	709 ± 24	391 ± 11
Flyd.	226 ± 10	259 ± 12	480 ± 22	292 ± 15

De forskellige pH<sub>i</sub> værdier (Tabel 5) efter 8 % (w/v) NaCl ser kun ud til at kunne forklare væksthastighederne mellem de to stammer og ikke hvorfor begge stammer vokser langsommere på fast end i flydende substrat. Der må være en yderligere inhiberende faktor.

Vi mener ud fra vores forsøgsopsætning at kunne udelukke forskelle i ilttilgængelighed så derfor er den mest oplagte forklaring er at næringsstofferne diffunderer langsommere i fast substrat end i flydende og derved optages langsommere af gærcellen. Dette er dog en teoretisk betragtning og bør undersøges nærmere. En anden teoretisk forklaring kunne simpelthen være at en gærcelle på en fast overflade kun kan optage næringsstoffer over den del af celleoverfladen der har direkte kontakt med den faste overflade, hvorimod en celle i flydende substrat kan optage næringsstoffer over hele celleoverfladen.

Den meget langsomme vækst af CBS 767 på fast substrat indeholdende 8 % (w/v) NaCl kunne også skyldes at gæren skifter fra unicellular til pseudohyfe cellemorfologi hvilket må formodes at være tidskrævende. Dette er også rapporteret i litteraturen for andre gær under forskellige former for stress og en mulig forklaring er at gæren ved pseudohyfe vækst hurtigere prøver at bevæge sig væk fra det område hvor der er en stressfaktor tilstede. I Fig. 18 er der to billedrækker der illustrerer det ovenstående. Udover at man meget tydeligt kan se forskellene i væksthastighed mellem de to gærstammer kan man også se at CBS 767 begynder at danne pseudohyfer hvorimod D 18335 opretholder unicellular cellemorfologi. Hvilket er endnu en indikation af at D 18335 er mere tolerant overfor 8 % (w/v) NaCl end CBS 767.



**Figur 18.** *D. hansenii* CBS 767 og D 18335 voksende på fast YPG overflade med 8 % (w/v) NaCl.

### 3.7.3. Delkonklusion

Mellem 5-10 % af cellerne fra de to undersøgte *D. hansenii* stammer formodes at være døde under optimale propageringsforhold. Denne andel var ligeså stor som mængden af celler der døde/ikke vokser efter 8 % NaCl-stress, med undtagelse af CBS 767 på fast substrat hvor ca. 30 % af cellerne døde. Det sidstnævnte fremhæver at man ikke direkte kan overføre fysiologiske data stammende fra flydende substrater til også at være gældende på faste overflader. Der er observeret en additiv effekt af den faste overflade og 8% (w/v) NaCl for væksten af begge *D. hansenii* stammerne.

## 4. Konklusion

De vigtigste resultater kan punktvis opsummeres som følgende:

- *D. hansenii* GPP2 er indetificeret. *D. hansenii* producerer og akkumulerer glycerol under NaCl-stress. Høje intracellulære koncentrationer af glycerol skyldes induktion af generne *DhGPD1* og *DhGPP2* samt en god evne til at tilbageholde glycerol.
- Proteomet blev undersøgt med 2-D PAGE og 47 proteiner blev identificeret med MALDI-TOF MS resulterende i det første 2-D kort for *D. hansenii*. Indflydelsen af NaCl på *D. hansenii* proteomet blev undersøgt. Blandt nysyntetiserede proteiner under NaCl-stress blev glycerol-3-phosphatase (Gpp2p) identificeret. Endvidere blev adskillige proteiner induceret/represseret ved tilsætning af NaCl. Inducerede proteiner var enzymer involveret i øverste del af glykolysen og glycerol dissimilering, mens represserede proteiner var enzymer i nederste del af glykolysen, reaktionerne mod Krebs cyklus og syntesen af aminosyrer. Endvidere blev nogle heat shock proteiner induceret, mens andre blev represseret ved tilsætning af NaCl.
- Ammoniak produktionen af *D. hansenii* og andre mejerirelevante gær blev bestemt med Nessler's reagens. Ammoniak produktionen varierede for de undersøgte gær og var afhængig af den tilgængelige kulstofkilde. Dette indikerer, at *D. hansenii* anvender ammoniak som signalmolekyle som andre gærarter.
- Adhæsionen af *D. hansenii* på faste substratoverflader kan bestemmes reproducerbart ved hjælp af det udviklede flowsystem. Der blev observeret store stammeforskelle i adhæsion og disse kunne korreleres til forskelle i stammernes størrelse samt overfladeegenskaber. Gærstammer med en moderat hydrofob celleoverflade og en høj evne til at donere elektroner fra celleoverfladen udviste de største adhæsionsevner.
- NaCl påvirker ikke væksten af *D. hansenii* osteisolat D 18335 i nær så høj grad som typestammen CBS 767. Begge stammerne skrumper det samme efter momentant 8 % (w/v) NaCl-stress, men kun D 18335 er i stand til at opretholde pH<sub>i</sub> homeostase. Dette kan skyldes, at D 18335 producerer andre intracellulære bufferstoffer end CBS 767.
- Vækst af *D. hansenii* på faste substratoverflader foregår i alle sammenhænge langsommere end i flydende substrater. Forskelle i specielt væksthastigheder understreger at fysiologiske data fra flydende substrater ikke altid kan overføres til faste overflader.

## 5. Perspektivering

Det er muligt at undersøge proteomet for *D. hansenii* med 2-D PAGE. Efter at genomet for *D. hansenii* er fuldstændig sekventeret, er det ligeledes muligt at identificere protein spots med MALDI-TOF MS. I dette projekt blev 47 proteiner identificeret med MALDI-TOF MS og dermed blev det første 2-D kort for *D. hansenii* publiceret. En udbygning af 2-D kortet for *D. hansenii* vil medføre yderligere viden om proteinsammensætningen i *D. hansenii* og åbne for nye muligheder herunder opklaring af hidtil ukendte proteiners funktionalitet. Proteomeanalyser giver viden om den endelige produkt dannelse (proteinet) og kan anvendes til at opnå information om forskellige stressfaktorer f.eks. NaCl-stress. Adskillige NaCl-stressproteiner er identificeret i dette projekt, men med den nye viden om proteomet for *D. hansenii* vil det også være muligt at opnå viden om hvorledes denne NaCl-tolerante gær reagerer på andre stressfaktorer som temperatur, pH og tilgængeligheden af forskellige kulstofkilder.

Indeværende projekt har vist at adhæsion er en væsentlig parameter ved udvælgelse af starterkulturer til faste levnedsmidler. Det er oplagt at indkøre de udførte på rigtige osteoverflader efter en optimering af især anvendelsen af fluorescerende prober til at detektere gærcellerne med. Anvendelse af en optisk pincet ville kunne udelukke tyngdekraftens indflydelse på adhæsionsbestemmelserne og man kunne derved bestemme den egentlige bindingskraft mellem en gær celle og en fast overflade.

En større forståelse for hvad der sker med en *D. hansenii* gær celle når den kommer fra en flydende suspension til en fast overflade ville kunne anvendes i strategier til øget kontrol af ostemodningsprocessen, da de opnåede resultater viste, at det ikke var muligt direkte at overføre viden opnået i flydende vækstmedie til faste overflader

Det har tidligere været diskuteret hvilken betydning ammoniak produktion har i relation til ostemodning. Det er her vist, at stammer af *D. hansenii* producerer forskellige koncentrationer af ammoniak. Betydningen af ammoniak i relation til dets rolle med hensyn til pH stigningen på osteoverfladen og som signalmolekyle bør videre undersøges. Ved at karakterisere signalstoffer og de egenskaber, som de styrer, er det muligt på sigt muligt at optimere disse og dermed få eksempelvis en forbedret modningsproces.

Projektet har tilført ny viden til brug for udvælgelse af *D. hansenii* stammer med henblik på anvendelse som starterkultur til produktion til overflademodnede oste. Denne viden består både af en ny indsigt i forskellige *D. hansenii* stammers adhæsion til faste overflader og ikke mindst det både fysiologiske og molekylære respons på høje NaCl-koncentrationer. Nogle af de relevante kriterier i fremtidig udvælgelse af *D. hansenii* starterkulturer kunne derfor være: Høj adhæsionsevne (moderat hydrofob til hydrofob celleoverflade), høj NaCl-tolerance (evne til at opretholde pH<sub>i</sub> homeostase, høj produktion og akkumulering af glycerol) og hurtig adaptation til inokulation på en fast overflade. Yderligere kunne den opnåede viden anvendes af mejeribrugets til at optimere propagering af starterkulturer. Ved at medtage vigtige forhold som høj NaCl-koncentration vil kulturerne være forberedt på forholdene på ostene, hvormed optimal vækst kan opnås. Projektet viser endvidere, at det ved udvælgelse af starterkulturer er vigtigt at tage udgangspunkt i det aktuelle produktionsmiljø, idet der netop her sker en naturlig selektion, således at de mest optimale starterkulturer findes her.

## **6. Relationer til andre mejeriprojekter**

Projektet har forbindelse til et afsluttet projekt på IFV medfinansieret af Mejeribrugets ForskningsFond: ”Fysiologisk og molekylærbiologisk karakterisering af gær i ost” (01.01.99-31.05.04) med Mogens Jakobsen som projektleder og til et nyligt igangsat projekt ligeledes på IFV medfinansieret af Mejeribrugets Forskningsfond: ”Nye veje til optimeret ostekvalitet- ’small talk’ og funktionelle komponenter” (01.10.05-30.09.08) med Lene Jespersen som projektleder.

## **7. Samarbejdspartnere**

Dr. Michel Hébraud, Plate-Forme Protéomique, UR QuaPA - Equipe Microbiologie, INRA site de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France, Tlf: 33 (0)4.73.62.46.70, Fax: 33 (0)4.73.62.42.68, e-mail: [hebraud@clermont.inra.fr](mailto:hebraud@clermont.inra.fr)

## 8. Publikationer

### Internationale publikationer

Gori K., Mortensen H.D., Arneborg N. and Jespersen L. (2005). Expression of the *GPD1* and *GPP2* orthologues and glycerol retention during growth of *Debaryomyces hansenii* at high NaCl concentrations. *Yeast* 22: 1213-1222

Mortensen H.D., Gori K., Jespersen L. and Arneborg N. (2005). *Debaryomyces hansenii* strains with different cell sizes and surface physicochemical properties adhere differently to a solid agarose surface. *FEMS Microbiology Letters* 249: 165-170

Mortensen H.D., Gori K., Siegumfeldt H., Nissen P., Jespersen L. and Arneborg N. (2006). Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hansenii* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. In press

Mortensen H.D., Gori K., Siegumfeldt H., Jespersen L. and Arneborg N. (2006). Relationship between growth and initial pH gradients of individual cells of *Debaryomyces hansenii* as influenced by NaCl and solid substrate. *Letters in Applied Microbiology*. Submitted

Gori K., Hebraud H., Mortensen H.D., Arneborg N., Chambon C. and Jespersen L. (2006). Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to increased NaCl concentrations. *FEMS Yeast Research*. Submitted

### Nationale publikationer

Mortensen, H.D., Gori, K., Arneborg, N. og Jespersen, L. (2002). Gærs etablering og vækst på overflademodnede oste, Mælkeritidende, 115. årgang, nr. 15

Gori K., Mortensen, H.D., Arneborg N. og Jespersen L. (2005). Produktion og akkumulering af glycerol i gær under NaCl-stress, *Dansk Kemi*

Gori, K., Mortensen, H.D., Arneborg, N. og Jespersen, L. (2002). Optimering af starterkulturer af *D. hansenii* til mejeriindustrien, Mælkeritidende, under udarbejdelse

### Præsentationer ved internationale kongresser

Petersen, K.M, Gori, K., Jensen, N.M. og Jespersen, L. (2002). Proteomic analysis on the yeast *Debaromyces hansenii*, Danish Biotechnology Conference VIII: Functional Genomics, 23. til 24. maj, Munkebjerg, Vejle, Danmark. (Poster)

Gori K., Mortensen, H.D., Arneborg N. og Jespersen L. (2003). Transfer of proteomic knowledge from *Saccharomyces cerevisiae* to *Debaryomyces hansenii*. XXI International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, 7. til 12. juli, Göteborg, Sverige. (Poster)



Mortensen, H.D., Gori, K., Jespersen, L. og Arneborg, N. (2003). The effect of surface composition and growth phase on the adhesion of *Debaryomyces hansenii* onto solid agar surfaces. 2nd circular, ISSY23 Conference, 26. til 29. august, Budapest, Ungarn. (Poster)

Gori K., Mortensen, H.D., Arneborg N. og Jespersen L. (2004). Regulation of *GPD1* and *GPP2* in *Debaryomyces hansenii* grown at high NaCl concentrations. International Congress on Yeasts, 15. til 20. august 2004, Rio de Janeiro, Brasilien. (Poster)

Gori K., Mortensen, H.D., Arneborg N. og Jespersen L. (2005). The influence of glycerol production and cellular accumulation in the industrial important yeast *Debaryomyces hansenii* when grown at high NaCl concentrations. LMC Congress, 9. til 10. marts, Lyngby, Danmark. (Poster)

Mortensen H.D., Gori K., L. Jespersen og N. Arneborg. (2005). *Debaryomyces hansenii* strains with different cell sizes and surface physicochemical properties adhere differently to a solid agarose surface. XXIVth International Specialised Symposium on Yeast, 28. september - 2. oktober 2005, Valencia, Spanien. (Poster)

Jakobsen M. og Jespersen L. (2004). Novel microorganisms in dairy products. Food Micro 2004. 19th International Symposium. The international Committee on Food Microbiology and Hygiene, 12 til 16 september, Portoroz, Slovenien. (Foredrag)

Jespersen L. (2006). Molecular characterisation of yeast physiology during cheese maturation. Food Micro 2006. The 20th International ICFMH Symposium. Food safety and food biotechnology: diversity and global impact. 29. august - 2. september 2006, Bologna, Italien (Foredrag)

### **Videnskabelige afhandlinger**

Gori, K. (2006). Ph.D. afhandling ”Characterisation of the protein- and gene expression in *Debaryomyces hansenii* related to microbial stress factors of relevance for cheese ripening” (under udarbejdelse)

Mortensen, H.M. (2006). Ph.D. afhandling ”Characterization of adhesion and growth of *Debaryomyces hansenii* on solid surfaces” (afleveret)

### **Specialeprojekter**

Sørensen G.H. (2002). Indflydelse af salt og kulstofkilde på gærvækst på fast overflade

Agerholm L. (2004). Bestemmelse af plasmamembran  $H^+$ -ATPasens aktivitet hos *Debaryomyces hansenii* og *Saccharomyces cerevisiae* udsat for akut NaCl-stress

### **Bachelorprojekter**

Koefoed L.M. (2003). Indflydelse af salt og kulstofkilde på vækst af *Saccharomyces cerevisiae* og *Debaryomyces hansenii* i flydende medier

Larsen S. & Jensen T. (2005). Intra- og interspecies kommunikation ("small talk") mellem *Debaryomyces hansenii* og *Brevibacterium linens*

### **Temaprojekter**

Jensen A. og Sørensen M. (2003). Indflydelsen af NaCl på proteinekspressionen i *Debaryomyces hansenii*

### **9-points opgaver:**

Arribas B.M. (2003). The influence of NaCl on the growth of *Debaryomyces hansenii*

### **Laborantelevprojekter**

Sørensen S.K. (2004). Dannelse af glycerol i *Debaryomyces hansenii* under NaCl-stress.

Johansen M.R. (2005). Påvisning af celle til celle kommunikation på overflademodnede oste.

## **9. Øvrige medarbejdere og studerende**

### **Medarbejdere:**

Laborant Bettina Nordbo

Laborant Marina Kryger Hansen

Laborantelev Sanni Kallestrup Sørensen

Laborantelev Majbritt Raddich Johansen

Laborantelev Søs Inger Nielsen

### **Studerende:**

Specialestuderende Gerda Hejsel Sørensen

Specialestuderende Lone Aggerholm

Bachelorstuderende Lene Munch Koefoed

Bachelorstuderende Stine Larsen

Bachelorstuderende Terese Jensen

Eramusstuderende Berta Miguelañez Arribas

Temastuderende Anne Jensen

Temastuderende Marie Sørensen

