

Format rapportage projectinformatie PPS-en Landbouw, water, voedsel

Datum versie: 7 december 2020

Uit projectplan (svp zoveel mogelijk invullen)

1. Projectinformatie

1.1 Organisatie/financiering <i>(keuze maken)</i>	TKI A&F/TKI T&U/WR-PPS/overig
1.2 Projectnummer	AF-15507
1.3 Project titel	Heterogeneity in spores of food spoilage fungi
1.4 Projectleider <i>(naam en emailadres)</i>	Prof Dr HAB Wösten (h.a.b.wosten@uu.nl)
1.5 Startdatum (dd-mm-jjjj)	01-12-2016
1.6 Einddatum (dd-mm-jjjj)	01-09-2021
1.7 MMIP primair <i>(nummer en naam van het MMIP, zie overzicht bijlage 1)</i>	D4: Duurzame en veilige verwerking
1.8 MMIP secundair <i>(deze alleen invullen als er een 2^e MMIP is waar het project aan bijdraagt)</i>	B5 Energiebesparing, -productie en -gebruik

2. Projectomschrijving

2.1 Samenvatting <i>Geef een korte samenvatting van wat het project inhoudt en beoogt. Het gaat om een publiek beschikbare samenvatting (doel, bijdrage aan de missie, op te leveren resultaten in termen van kennis voor doelgroep x en de partners in het project).</i>
<p>Voedselbeschikbaarheid moet met 70% worden verhoogd om de wereldbevolking in 2050 te kunnen voeden. Het terugdringen van voedselbederf na de oogst kan een belangrijke bijdrage leveren aan deze uitdaging. Op dit moment bederft 25% van het voedsel, een aanzienlijk deel door schimmelbesmetting. Schimmelbederf heeft niet alleen invloed op de visuele en organoleptische eigenschappen van voedsel, maar kan ook leiden tot de productie van toxines.</p> <p>Voedselconserveringsmethoden zoals sterilisatie en het toevoegen van zout verminderen bederf enorm. Consumenten geven echter de voorkeur aan minimale bewerking van voedsel om smaak en samenstelling te behouden en gezondheidsrisico's te verminderen, terwijl de industrie wil besparen op kosten om voedsel te verhitten. Dit alles leidt echter tot een verhoogd risico op schimmelbederf. Daarom zijn nieuwe voedselbewerkingsprotocollen nodig.</p> <p>Voedselbederf door schimmels begint vaak met een besmetting met sporen. Deze overlevingsstructuren zijn overvloedig aanwezig in de omgeving zoals in de lucht. Experimentele gegevens wijzen op het bestaan van subpopulaties van sporen met verschillende niveaus van resistentie tegen conserveringsmethoden. Het doel van dit project is om de omvang en onderliggende mechanismen van deze heterogeniteit te bestuderen in de bederfschimmels <i>Aspergillus niger</i>, <i>Paecilomyces variotii</i>, <i>Penicillium roqueforti</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>diastaticus</i>. De rol van de genetische achtergrond, de omgevingscondities en de ontwikkelingstoestand van de sporen en het mycelium die deze sporen produceert zullen worden bestudeerd.</p>

2.2 Doel van het project *Wat gaat het project bijdragen aan de doelen van de KIA, de missies en de MMIP's?*

Het doel van het project is om de omvang en onderliggende mechanismen van heterogeniteit in resistentie tegen stress (zoals pasteurisatie en conserveermiddelen) te bestuderen in sporen van bederfschimmels. Dit moet leiden tot nieuwe inzichten hoe we bederf van voedsel kunnen voorkomen gebruikmakend van methodes die minder energie kosten of het gebruik van chemicaliën verminderen dan wel voorkomen.

2.3 Motivatie *Licht toe waarom dit project passend en nodig is binnen het MMIP*

Voedselconserveringsmethoden zoals sterilisatie en zouttoevoeging voorkomen voedselbederf. Consumenten geven echter de voorkeur aan minimale bewerking van voedsel om smaak en samenstelling te behouden en gezondheidsrisico's te verminderen, terwijl de industrie wil besparen op kosten om voedsel te verhitten. Dit alles leidt echter tot een verhoogd risico op schimmelbederf. Daarom zijn nieuwe voedselbewerkingsprotocollen nodig.

2.4 Resultaat *Zo SMART mogelijke beschrijving van de beoogde resultaten van het project. Het gaat om zowel de inhoudelijke resultaten (in relatie tot vraag 2.2) als resultaten zoals bijeenkomsten en rapporten. Geef zoveel mogelijk ook de planning per jaar.*

- Beschrijving van de impact van de genetische achtergrond op variabiliteit in stressresistentie van sporen van bederfschimmels.
- Beschrijving van de impact van groeiomstandigheden op variabiliteit in stressresistentie van sporen van bederfschimmels.
- Beschrijving van de impact van de ontwikkelingstoestand van het mycelium en de sporen op de variabiliteit in stressresistentie van sporen van bederfschimmels.
- Identificatie van moleculen die de kieming van een (sub)populatie sporen van modelschimmels in gang zetten of juist voorkomen.
- Mechanisme(n) die ten grondslag liggen aan de heterogeniteit van sporen met betrekking tot stressresistentie.
- Generieke modellen die groei/geen groeigrenzen en/of kiem- en uitgroeikinetiek beschrijven.
- Proof of concept van een nieuwe behandeling die schimmelbederf voorkomt door middel van een combinatie van milde interventies.

Jaarrapportage 2021

3. Status project

3.1 Status project <i>(keuze maken)</i>	Project is afgerond per augustus 2021
3.2 Toelichting incl. voorziene wijzigingen t.o.v. het oorspronkelijke werkplan	Project is succesvol afgerond

4. Behaalde resultaten

4.1 Korte beschrijving van de inhoudelijke resultaten en hun bijdrage aan het MMIP (zoals beschreven in 2.2)

Aspergillus niger

- Sporen van deletiestammen die geen compatible solutes aanmaken hebben een veel hogere kiemingspercentage bij lage glucose concentraties t.o.v. wild-type sporen. Mogelijk betekent dit dat de compatible solutes bijdragen aan het selecteren van condities waaronder de spore wil kiemen.
- Uit transcriptoom en proteoom data van dormante sporen gecultiveerd bij verschillende temperaturen blijkt dat er een aantal small protective proteïns meer abundant aanwezig zijn in sporen die gecultiveerd zijn bij hoge temperaturen. Deleties zijn gemaakt van 6 genen die coderen voor small protective proteïns. Vijf van de zes deletie stammen zijn niet anders dan wild-type in hun hitte resistentie en compatible solute profiel. Één deletie stam produceert hitte gevoelige sporen, maar deze sporen nemen nog steeds toe in hitte resistentie als ze gecultiveerd zijn bij hogere temperaturen.
- De MIC waarden van sorbic acid voor 100 *A. niger* stammen is bepaald in zowel ice tea als MEB. Hieruit blijkt dat de MIC waardes van *A. niger* stammen tussen 2 mM en 7 mM liggen afhankelijk van stam en medium. MIC waardes zijn gemiddeld ~3.5 mM in MEB en ~3.0 mM in ice tea. Deze waarden zijn vergelijkbaar met *P. variotii* maar beduidend lager dan die van *P. roqueforti*. Uit screens van transcriptiefactor deletiemutanten blijken een aantal transcriptiefactoren betrokken te zijn bij de weak acid resistentie van *A. niger*. Één van deze nieuwe kandidaat genen is transcriptiefactor *warB* waarvan de deletie mutant zeer gevoelig is voor meerdere weak acids. Uit screens met combinatie deletiestammen blijkt dat *sdrA*, *warA* en *warB* een additief effect hebben op de weak acid resistentie van *A. niger*.
- Het aminozuur cysteine remt kieming van sporen, terwijl alanine en proline sporenkieming het sterkst stimuleren

Penicillium roqueforti

- Het uitschakelen van gen *warB* is niet gelukt, dit terwijl we wel deletiestammen hebben verkregen van *kusA* en van een gen dat betrokken is bij melanine biosynthese.
- *P. roqueforti* sporen hebben een complexer medium nodig voor ontkieming dan *A. niger*. In minimaal medium hebben de sporen van *P. roqueforti* kalium nodig voor ontkieming alsemede een koolstofbron. Alanine en arginine induceren van de aminozuren het meest efficiënt kieming, waarbij een maximale kiemingspercentage van 20% wordt verkregen. In het geval van glucose is dit 13%. Uit de resultaten concluderen wij dat *P. roqueforti* op basis van andere eigenschappen (bv. resistentie tegen conserveringszuren, groei op lage temperatuur) een competitief voordeel heeft ten opzichte van andere schimmels.
- Sorbaat resistentie van stammen is vergelijkbaar tussen labmedia en commerciële yoghurt, wat betekent dat onze modelgroeisystemen voorspellend zijn voor de praktijk.
- Sorbaat resistentie correleert met de aanwezigheid van een genencluster. Uit de fylogenetische boom van 34 *P. roqueforti* stammen blijkt echter dat sorbaatresistentie niet clustert met een specifieke 'clade'. Daarnaast hebben we aanwijzingen dat het sorbaat-gerelateerde cluster door middel van horizontale gen overdracht is verkregen en dat het specifiek is voor *P. roqueforti* stammen die geïsoleerd zijn uit bederf-gerelateerde stammen.

Paecilomyces variotii

- Er is gekeken naar de invloed van kaliumsorbaat, natriumbenzoaat, de citraatbuffersterkte, sucrose concentratie, en hittebehandeling en de interacties daartussen in groei van 20 stammen in een voedingsproduct.
- Als je naar de fenotypische verschillen tussen stammen kijkt is er een correlatie tussen hitte resistentie en trehalose concentratie en tussen hitte resistentie en sporen grootte

<ul style="list-style-type: none"> • Hitte resistentie van dormante sporen neemt toe naarmate de cultivatie temperatuur tijdens sporulatie toeneemt. In deze verschillende condities is er geen correlatie te vinden tussen hitte resistentie en trehalose concentratie of hitte resistentie en sporen grootte. • Er is een relatie tussen de hiteresistentie van een stam en de fylogenie. De hitte resistente stammen clusteren in een boom van geconcateneerde unieke orthologe genen. • Een genome wide association study en een RNA-sequencing studie hebben tot een lijst kandidaatgenen geleid die mogelijk betrokken zijn bij hiteresistentie.
4.2 Deliverables (bijeenkomsten en andere output, die niet benoemd wordt in 4.3 en 4.4)
Nvt
4.3 Communicatie (lijsten)
4.3.1 Wetenschappelijke artikelen en hun doi (<i>Digital Object Identifiers</i>)
<ul style="list-style-type: none"> • Seekles SJ, Teunisse PPP, Punt M, van den Brule T, Dijksterhuis J, Houbraken J, Wösten HAB, Ram AFJ. Preservation stress resistance of melanin deficient conidia from <i>Paecilomyces variotii</i> and <i>Penicillium roqueforti</i> mutants generated via CRISPR/Cas9 genome editing. <i>Fungal Biol Biotechnol.</i> 2021 Apr 2;8(1):4. doi: 10.1186/s40694-021-00111-w. • Ijadpanahsaravi M, Punt M, Wösten HAB, Teertstra WR. Minimal nutrient requirements for induction of germination of <i>Aspergillus niger</i> conidia. <i>Fungal Biol.</i> 2021 Mar;125(3):231-238. doi: 10.1016/j.funbio.2020.11.004. • Suiker IM, Arkesteijn GJA, Zeegers PJ, Wösten HAB. Presence of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>diastaticus</i> in industry and nature and spoilage capacity of its vegetative cells and ascospores. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2021 Jun 2;347:109173. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109173.
4.3.2 Rapporten/artikelen in vakbladen
<ul style="list-style-type: none"> • van den Brule, E Then, J Dijksterhuis. The preservative effect of sorbate and benzoate on various <i>Paecilomyces variotii</i> strains in ice tea. Internal report for Pepsico and Unilever. 2021
4.3.3 Overige communicatie-uitingen (inleidingen/posters/radio-tv/social media/workshops/beurzen)
<ul style="list-style-type: none"> • IM Suiker. Heterogeneity between and within strains of the beer spoilage yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subspecies <i>diastaticus</i> Proefschrift Universiteit Utrecht.
4.4 Overige resultaten: technieken, apparaten, methodes
<ul style="list-style-type: none"> • Een methode is ontwikkeld om kieming van sporen online te volgen en te analyseren.
4.5 Projectwebsite: geef het adres van de projectwebsite (indien beschikbaar)
<ul style="list-style-type: none"> • nvt

Eindrapportage

5. TRL bij afsluiting van een project

Technology Readiness Level (TRL) van de technologie bij afsluiting van het project. Er zijn twee indicatoren die verschillen in detailniveau. Vul zo mogelijk het detailniveau in. Als dat niet mogelijk is, vul dan de hoofdcategorie in.

5.1 Hoofdcategorie (<i>keuze maken</i>)	Fundamenteel onderzoek
--	------------------------

5.2 Detailcategorie bij start van het project (<i>in cijfers, nummer van de betreffende categorie, zie bijlage voor toelichting</i>)	Geen TRL
5.3 Detailcategorie bij afsluiting van het project	TRL4 (betreft identificatie van stammen van bederfschimmels die resistent of gevoelig zijn voor stress (zoals hitte en conserveermiddelen). Met deze stammen kan de industrie betere voorspellingen doen wat de houdbaarheid is van een product na een bepaalde behandeling.

6 Status project bij afronding

Status project (<i>keuze maken</i>)	Het project is afgerond conform de oorspronkelijk scope. Alle mijlpalen zijn behaald.
--	---

7 Output over het hele project

		aantal
7.1	Aantal gerealiseerde wetenschappelijke publicaties <i>gepubliceerde artikelen in peer-reviewed journals</i>	7
7.1 lijst	<ul style="list-style-type: none"> van den Brule T, Punt M, Teertstra W, Houbraken J, Wösten H, Dijksterhuis J. The most heat-resistant conidia observed to date are formed by distinct strains of <i>Paecilomyces variotii</i>. <i>Environ Microbiol.</i> 2020 Mar;22(3):986-999. doi: 10.1111/1462-2920.14791. van den Brule T, Lee CLS, Houbraken J, Haas PJ, Wösten H, Dijksterhuis J. Conidial heat resistance of various strains of the food spoilage fungus <i>Paecilomyces variotii</i> correlates with mean spore size, spore shape and size distribution. <i>Food Res Int.</i> 2020 Nov;137:109514. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109514. Punt M, van den Brule T, Teertstra WR, Dijksterhuis J, den Besten HMW, Ohm RA, Wösten HAB. Impact of maturation and growth temperature on cell-size distribution, heat-resistance, compatible solute composition and transcription profiles of <i>Penicillium roqueforti</i> conidia. <i>Food Res Int.</i> 2020 Oct;136:109287. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109287. Seekles SJ, Teunisse PPP, Punt M, van den Brule T, Dijksterhuis J, Houbraken J, Wösten HAB, Ram AFJ. Preservation stress resistance of melanin deficient conidia from <i>Paecilomyces variotii</i> and <i>Penicillium roqueforti</i> mutants generated via CRISPR/Cas9 genome editing. <i>Fungal Biol Biotechnol.</i> 2021 Apr 2;8(1):4. doi: 10.1186/s40694-021-00111-w. 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Ijadpanahsaravi M, Punt M, Wösten HAB, Teertstra WR. Minimal nutrient requirements for induction of germination of <i>Aspergillus niger</i> conidia. <i>Fungal Biol.</i> 2021 Mar;125(3):231-238. doi: 10.1016/j.funbio.2020.11.004. • Suiker IM, Arkesteijn GJA, Zeegers PJ, Wösten HAB. Presence of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>diastaticus</i> in industry and nature and spoilage capacity of its vegetative cells and ascospores. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2021 Jun 2;347:109173. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109173. • IM Suiker. Heterogeneity between and within strains of the beer spoilage yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subspecies <i>diastaticus</i> Proefschrift Universiteit Utrecht. 	
7.2	Aantal verwachte wetenschappelijke publicaties Wij verwachten nog 3 proefschriften en nog een 7 tal publicaties van hoofdstukken uit deze proefschriften	
7.2 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • Zie 7.2. 	
7.3	Aantal gerealiseerde niet-wetenschappelijke publicaties	
7.3 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • nvt. 	
7.4	Aantal aangevraagde patenten	
7.4 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • nvt. 	
7.5	Aantal verleende licenties	
7.5 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • nvt. 	
7.6	Aantal prototypes	
7.6 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • nvt. 	
7.7	Aantal demonstrators	
7.7 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • nvt. 	
7.8	Aantal spin-offs/ spin-outs	
7.8 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • nvt. 	
7.9	Aantal nieuwe of verbeterde producten/ processen/diensten geïntroduceerd 5	
7.9 lijst	<ul style="list-style-type: none"> • Een collectie van stammen van <i>A. niger</i> die verschillen in resistentie voor hitte en conserveermiddelen. • Een collectie van stammen van <i>P. roqueforti</i> die verschillen in resistentie voor hitte en conserveermiddelen. • Een collectie van stammen van <i>P. variotii</i> die verschillen in resistentie voor hitte en conserveermiddelen. • Een collectie van stammen van <i>S. diastaticus</i> die verschillen in resistentie voor hitte en conserveermiddelen. 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Een monitoring en analysemethode is opgezet om kieming van schimmelsporen te vervolgen in de tijd gebruikmakend van een oCelloScope 	
--	---	--

8 Impact

Impact betreft het verhaal van het project: een kwalitatieve omschrijving van hoe het project heeft bijgedragen aan de missies en/of het realiseren van economische kansen. Geef aan wat er met de ontwikkelde kennis/tools uit het project wordt gedaan. Geef een toelichting op de (bredere) bijdrage van het project aan de maatschappelijke uitdaging, zoals verwoord in 1.4b. De genoemde impact kan bijvoorbeeld betrekking hebben op:

- Producten, concepten, kennis e.d. die door de partners in de praktijk worden toegepast (nu of op afzienbare termijn)
- een aansprekend voorbeeld dat onder de output (paragraaf 7) gerapporteerd is;
- (nieuw) inzicht in randvoorwaarden (buiten kennis&innovatie) die nodig zijn om de missiedoelen te realiseren (denk aan financiering, regelgeving, communicatie, etc).
- het bereiken van (nieuwe) partners en het versterken van opgebouwde netwerken;
- verbinding met (praktijkgericht) onderwijs en andere wijzen van disseminatie;

Geef een link naar de website van het project, video of infographic (indien van toepassing).

Beschrijf de impact van het project, geef evt. ook een link naar de website van het project, een video of infographic (indien van toepassing)

In het verleden bestudeerde de industrie bederf met een beperkt aantal schimmelstammen. Uit ons project is naar voren gekomen dat er een enorme variatie is aan stress resistentie tussen stammen; denk aan resistentie tegen organische zuren of tegen hitte. Met onze collecties en de beschikbaar gekomen genomen kan de industrie nu veel beter bepalen wat het effect van een bepaalde behandeling zal zijn om voedselbederf tegen te gaan. Zo kan men het effect bepalen van een mengsel van stammen die verschillen in resistentie of kan men uitgaan van de meest resistente stam. Daarnaast hebben we methodes opgezet / geïmplementeerd om resistentie van schimmels te bepalen. Deze methodes bleken ook te werken onder semi-industriële condities.

Bijlage 1 MMIP's

KIA: Landbouw, water en voedsel	
MMIP	A1 Verminderen fossiele nutriënten, water en stikstofdepositie
	A2 Gezonde, robuuste bodem en teeltsystemen gebaseerd op agro-ecologie en zonder schadelijke emissies naar grond- en oppervlaktewater
	A3 Hergebruik zij- en reststromen
	A4 Eiwitvoorziening voor humane consumptie uit (nieuwe) plantaardige bronnen
	A5 Biodiversiteit in de kringlooplandbouw
	B1 Emissiereductie methaan veehouderij
	B2 Landbouwbodems, emissiereductie lachgas en verhoging koolstofvastlegging

B3 Vermindering veenoxidatie veenweide
B4 Verhoging vastlegging koolstof in bos en natuur
B5 Energiebesparing, -productie en -gebruik
B6 Productie en gebruik van biomassa
C1 Klimaatbestendig landelijk gebied voorkomen van wateroverlast en watertekort
C2 Klimaatadaptieve land- en tuinbouwproductiesystemen
C3 Waterrobuust en klimaatbestendig stedelijk gebied
C4 Verbeteren waterkwaliteit
D1 Waardering van voedsel
D2 Gezonde voeding een makkelijke keuze
D3 Veilige en duurzame primaire productie
D4 Duurzame en veilige verwerking
E1 Duurzame Noordzee
E2 Natuur-inclusieve landbouw, visserij en waterbeheer in Caribisch Nederland
E3 Duurzame rivieren, meren en intergetijdengebieden
E4 Overige zeeën en oceanen
E5 Visserij
F1 Verduurzamen en kostenbeheersing uitvoeringsprojecten waterbeheer
F2 Aanpassen aan versnelde zeespiegelstijging en toenemende weersextremen
F3 Nederland Digitaal Waterland
F4 Energie uit water
ST1 Smart Agri-Horti-Water-Food
ST2 Biotechnologie en Veredeling

Bijlage 2 TRL-categorieën

De detailcategorieën bestaan uit:

TRL 1 – basisprincipes zijn geobserveerd en gerapporteerd

TRL 2 – technologisch concept en/of toepassing is geformuleerd

TRL 3 – kritische functie of karakteristiek is analytisch en experimenteel bewezen

TRL 4 – component of experimenteel model is gevalideerd in laboratoriumomgeving

TRL 5 – component of experimenteel model is gevalideerd in relevante omgeving

TRL 6 – systeem/subsysteem model of prototype is gedemonstreerd in een relevante omgeving

TRL 7 – prototype van het systeem is gedemonstreerd in een operationele omgeving

TRL 8 – daadwerkelijk systeem is compleet en gekwalificeerd door test en demonstratie

TRL 9 – daadwerkelijk systeem is bewezen door succesvol operationeel bedrijf