

## **ABSTRACT**

### **ENGLISH**

The conventional use of coagulase-negative staphylococci (CNS) as starter cultures in raw fermented meat products contributes to cured colour development and a desirable flavour. The aim of this study was to further explore the functional potential of this metabolically heterogeneous bacterial group in view of process optimization. Within a collection of 86 CNS strains from 17 different species, a diversity of arginine-converting pathways was demonstrated. More than half of the strains employed the arginine deiminase pathway to utilize arginine as an alternative, meat-associated energy source under microaerobic conditions, although several of these strains switched to arginase activity under aerobic conditions. Only one strain, *Staphylococcus haemolyticus* G110, displayed nitric oxide synthase (NOS) activity, converting arginine into citrulline and nitric oxide in the presence of oxygen. Since nitric oxide is the responsible agent for the cured colour generation in fermented meats (nitrosomyoglobin), the latter strain was tested as a potential starter culture in fermented meat models to replace the usual curing with nitrate and/or nitrite salts. Curing salts are under scrutiny due to their potential negative effects on human health. Although suggested in literature as a promising strategy, the present study indicated that the use of NOS-positive starter cultures to generate clean-label products meets severe technological bottlenecks. Phenotypic NOS activity was not only a very rare trait, the candidate strain was also systematically outcompeted by the background microbiota. Even with the conventional curing with nitrate, the issue of competitiveness was shown to be crucial for colour development as nitrate reductase activity differed strongly between species and strains. Next, a kinetic analysis of arginine and glucose co-metabolism by three selected CNS strains was carried out in the presence or absence of aeration, leading to a better understanding of the ecological versatility and competitiveness of CNS within different ecosystems. Finally, the use of a potential CNS starter culture strain, *Staphylococcus sciuri* I20-1, to ensure food safety in fermented meat products in the absence of nitrate and nitrite was evaluated. The results showed that the use of bacteriocin-producing CNS offers interesting opportunities to combat *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in fermented meats, although more research is needed to ensure adequate *in situ* success.

## DUTCH

De gebruikelijke toepassing van coagulase-negatieve stafylokokken (CNS) als starterculturen voor de productie van rauwe gefermenteerde vleeswaren leidt in de regel tot een gewenste kleurontwikkeling en tot smaak en aroma. De bedoeling van deze studie was om het functioneel potentieel van deze metabolisch zeer diverse bacteriële groep verder te verkennen om het vleesfermentatieproces verder te optimaliseren. In een collectie van 86 CNS-stammen behorende tot 17 verschillende species werd een verscheidenheid aan arginineconverterende metabolische paden gevonden. Meer dan de helft van de stammen maakte onder microaerobe omstandigheden gebruik van het argininedeiminasepad om voordeel te halen uit de aanwezigheid van arginine, een alternatieve, vleesgeassocieerde energiebron. Meerdere van die stammen gingen echter over tot arginaseactiviteit wanneer aerobe condities werden opgelegd. *Staphylococcus haemolyticus* G110 vertoonde als enige stam stikstofmonoxidesynthaseactiviteit (nitric oxide synthase, NOS), waarbij arginine werd gemetaboliseerd tot citrulline en stikstofmonoxide in de aanwezigheid van zuurstof. Gezien stikstofmonoxide ook verantwoordelijk is voor de kleurvorming van gefermenteerde vleeswaren (nitrosomyoglobine) werd deze stam getest als potentiële startercultuur in vleesfermentatiemodellen, met de bedoeling om the gebruikelijke behandeling met nitraat- en/of nitrietzouten te vervangen. Het gebruik van deze zouten ligt immers onder vuur omdat ze mogelijk negatieve effecten op de menselijke gezondheid zouden kunnen uitoefenen. Hoewel in de wetenschappelijke literatuur gesuggereerd wordt dat het gebruik van NOS-positieve starterculturen een interessante strategie zou kunnen vormen om “clean label”-producten te genereren toonde deze studie aan dat er nog belangrijke technologische problemen te overwinnen zijn. Fenotypische NOS-activiteit was niet alleen een zeldzame eigenschap, de kandidaatstam werd ook systematisch verdrongen door de achtergrondmicrobiota. Zelfs tijdens conventionele behandeling met nitraat bleek dat bacteriële competitiviteit in de vleesomgeving essentieel is voor de kleurontwikkeling gezien nitraatreductaseactiviteit sterk varieerde tussen CNS-species en -stammen. Vervolgens werd voor drie geselecteerde CNS-stammen een kinetische analyse uitgevoerd van het co-metabolisme van arginine en glucose in de aan- en afwezigheid van beluchting, wat bijdroeg tot het beter begrijpen van de ecologische veelzijdigheid en competitiviteit van CNS in verschillende ecosystemen. Finaal werd ook een potentiële CNS-startercultuur, *Staphylococcus sciuri* I20-1, uitgetest om de voedselveiligheid van gefermenteerde vleeswaren te kunnen garanderen in de afwezigheid van nitraat en nitriet. De resultaten toonden aan dat het gebruik van een bacteriocineproducerende CNS-stam interessante mogelijkheden biedt om *Clostridium botulinum* en *Staphylococcus aureus* in gefermenteerde vleeswaren te bestrijden, hoewel meer onderzoek vereist is om voldoende *in situ*-succes te bekomen.