

Afslutningsrapport

Early events i *Lactococcus lactis* som
mål for aktivitet og syrningsforløb

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2004-60

Maj 2004



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet:
**"Early events" i *Lactococcus lactis* som
mål for aktivitet og syrningsforløb**

Projektperiode: 1.12.1999 - 31.12.2003

Projektdeltagere:

Professor Mogens Jakobsen, Fødevarer mikrobiologi, IFV, KVL, tlf. 3528 3216,
e-mail: moj@kvl.dk (projektleder).

Adjunkt Henrik Siegumfeldt, Fødevarer mikrobiologi, IFV, KVL, tlf. 3528
3286, e-mail: hsi@kvl.dk.

Forskningsassistent Nadja Fog, Fødevarer mikrobiologi, IFV, KVL

Lektor K. Bjørn Rechinger, Fødevarer mikrobiologi, IFV, KVL. (1.12.1999 31.7.2001)

Seniorforsker Mette Boye, Danmarks Fødevarer- og Veterinærforskning

Finansiering:

Mejeribrugets ForskningsFond og Direktoratet for FødevarerErhverv (FØTEK III)

Resumé

Det var projektets overordnede mål at skabe ny basal viden om tidlige begivenheder, ”Early events” i starterkulturer og udvikle hurtigmetoder til bestemmelse af starterkulturers fysiologiske status og forudsigelse af syrningsaktivitet. Projektet har benyttet to forskellige strategier til at belyse ”early events”; en fysiologisk strategi, som primært anvendte fluorescenceteknikker, og en molekylærbiologisk strategi, som skulle belyse protein- og genekspression.

Det overordnede formål med de fluorescerende teknikker var at beskrive kulturernes fysiologiske tilstand på enkeltcelleniveau, og belyse hvorledes celler med forskellig fysiologisk tilstand bidrager til det samlede resultat, f.eks. syrningshastighed. Intracellulær pH (pH_i) blev bestemt med Fluorescence Ratio Image Microscopy (FRIM) som et mål for den enkelte celledes fysiologiske tilstand. Målinger med FRIM af intracellulær pH kan give et meget hurtigt resultat (<30 min) der beskriver, hvor stor en proportion af cellerne, der er hhv. levende og døde.

Det overordnede formål med den molekylærbiologiske strategi var at undersøge, om der er gener eller proteiner, som bliver udtrykt præferentielt når kulturen bliver eksponeret for et vækstmiljø, dvs. ved podning i mælk. Kan der evt. identificeres ét eller flere enzymer/proteiner, som er udtrykt tidligt under syrnings af mælk, kan disse danne basis for en hurtigmetode til beskrivelse af kulturens fysiologiske tilstand og forudsigelse af syrningsforløb. Proteinekspressionen i *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ 157 blev undersøgt ved hjælp af to-dimensionel gelelektroforese (2D-PAGE), og allerede i den tidlige nølefasen var antallet af nysyntetiserede proteiner omkring 230. En stor del af de identificerede proteiner var involveret i omdannelsen af glukose, i proteinsyntese, og i nukleinsyreomdannelse.

Analysen af den tidlige genekspression i *L. lactis* blev foretaget med det formål at bekræfte proteinekspressionsstudierne samt at opnå en endnu bredere viden om intracellulære begivenheder i kulturens tidligste faser. Ekspressionsstudiet blev udført ved anvendelse af microarray teknologi, og der blev produceret microarrays med oligonukleotid DNA-prober som repræsenterede 40 gener. Flere af generne involveret i purin- og pyrimidin-omdannelse blev opreguleret kraftigt, og på grundlag af disse resultater valgtes enzymet adenylosuccinate synthetase (ASS), kodet af genet *purA*, til afprøvning i et videre modelforsøg. Både gen- og proteinekspressionsniveauet var forhøjet i den tidlige vækstfase, og ASS er desuden et velundersøgt enzym med tilgængelige metoder til aktivitetsmålinger.

Et modelforsøg blev udført for at undersøge, om mængden af nydannet ASS kan anvendes som en indikator for syrningsaktivitet. Resultaterne af dette forsøg indikerer, at man også vha. et enzym-kit kan opnå en god forudsigelse af syrningshastigheden.

Projektet har vist, at det er muligt at forudsige den fysiologiske status af starterkulturer ved hjælp af flere forskellige hurtigmetoder:

- Intracellulær pH i enkeltceller giver den mest detaljerede beskrivelse af en starterkulturs fysiologiske status.
- *Acidification Power Test* (APT) kan forudsige syrningshastigheden af en given kultur. Metoden kræver justering fra kultur til kultur.
- ASS-aktivitet vil kunne udvikles til et kit som vil fortælle, hvorledes kulturen responderer på inokulation i mælk.

English summary

The overall aim of the project was to obtain new basic knowledge about "early events" in starter cultures and to develop rapid methods to describe the physiological state of starter cultures, in order to predict the fermentation performance. The project used two different strategies to investigate the early events; a physiological strategy that primarily relied on fluorescence techniques, and a molecular strategy to elucidate gene and protein expression.

The aim of the fluorescent techniques was to describe the physiological state of starter cultures on a single cell level, and to examine how cells with varying physiological state contributes to e.g. fermentation performance. Intracellular pH (pH_i) was determined with Fluorescence Ratio Image Microscopy (FRIM) as a measure of the physiological state of individual cells. Measurements of pH_i with FRIM can be used to reliably predict the proportion of live and dead cells within 30 min.

The aim of the molecular strategy was to investigate whether specific genes or proteins are preferentially expressed upon exposure to a new growth environment, i.e. inoculation in milk. Potential enzymes/proteins may then form the basis of a rapid method to describe the physiological state of starter cultures and predict fermentation performance.

Protein expression in *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ 157 was investigated by two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE). Very soon after inoculation, the number of newly synthesized proteins was 230. A large part of the identified proteins was involved in glucose conversion, protein synthesis and nucleic acid metabolism. Analysis of early gene expression in *L. lactis* was performed to verify the protein expression results, and, in addition, to obtain a wider knowledge regarding intracellular events in the early stages of growth. Gene expression was performed using micro array technology, and micro arrays were constructed with oligo-nucleotide DNA probes representing 40 genes. Several genes involved in purine and pyrimidine conversion was pronouncedly induced, and based on these results the enzyme adenylosuccinate synthetase (ASS), coded by the gene *purA*, was selected for validation in a model experiment. Both gene and protein expression was markedly elevated in the early growth phase, and ASS is furthermore an enzyme with a known mechanism and with available methods for activity measurements.

A model experiment was performed to investigate whether the amount of newly synthesized ASS can be used as an indicator of fermentation performance, and the results suggest that it is possible to use an enzyme kit to predict the fermentation performance.

The project has revealed that it is possible to predict the physiological status of starter cultures using several rapid methods:

- Intracellular pH in single cells provides the most detailed description of the physiological status of a starter culture.
- *Acidification Power Test* (APT) can predict the fermentation performance of a given culture. The method requires adjustment from strain to strain.
- ASS-activity can be developed to an enzyme kit, which can describe the response of a culture after inoculation in milk.

1. Formål og baggrund

Det var projektets overordnede mål at skabe ny basal viden om tidlige begivenheder, ”Early events” i starterkulturer og udvikle hurtigmetoder til bestemmelse af starterkulturers fysiologiske status og forudsigelse af syrningsaktivitet. ”Early events” kan defineres som intracellulære begivenheder, der finder sted før egentlige substratændringer i fermenteringsvæsken er målbare, som kulturens umiddelbare reaktion på eksponering for et nyt miljø, f.eks. ved start af en fermentering og som første del af lag-fasen.

En detaljeret forståelse af sammenhængen mellem kulturernes aktivitet, tidlig genekspression, tidlig proteinsyntese og evnen til at opretholde homeostase som et udtryk for kulturens fysiologiske status, var derfor nødvendig.

Med anvendelse af *Lactococcus lactis* som modelorganisme var det projektets specifikke formål:

- At vurdere intracellulær pH som et udtryk for kulturens syrningsaktivitet og på det grundlag udvikle en hurtigmetode.
- At identificere tidligt udtrykte gener og proteiner og på det grundlag udvikle en hurtigmetode
- Udvikling af DNA-teknologi til opnåelse af et hidtil ukendt detaljeret billede af starterkulturens aktivitet.

Samlet skulle disse studier tillige føre til en forståelse for starterkulturens aktivitet på det molekylære niveau.

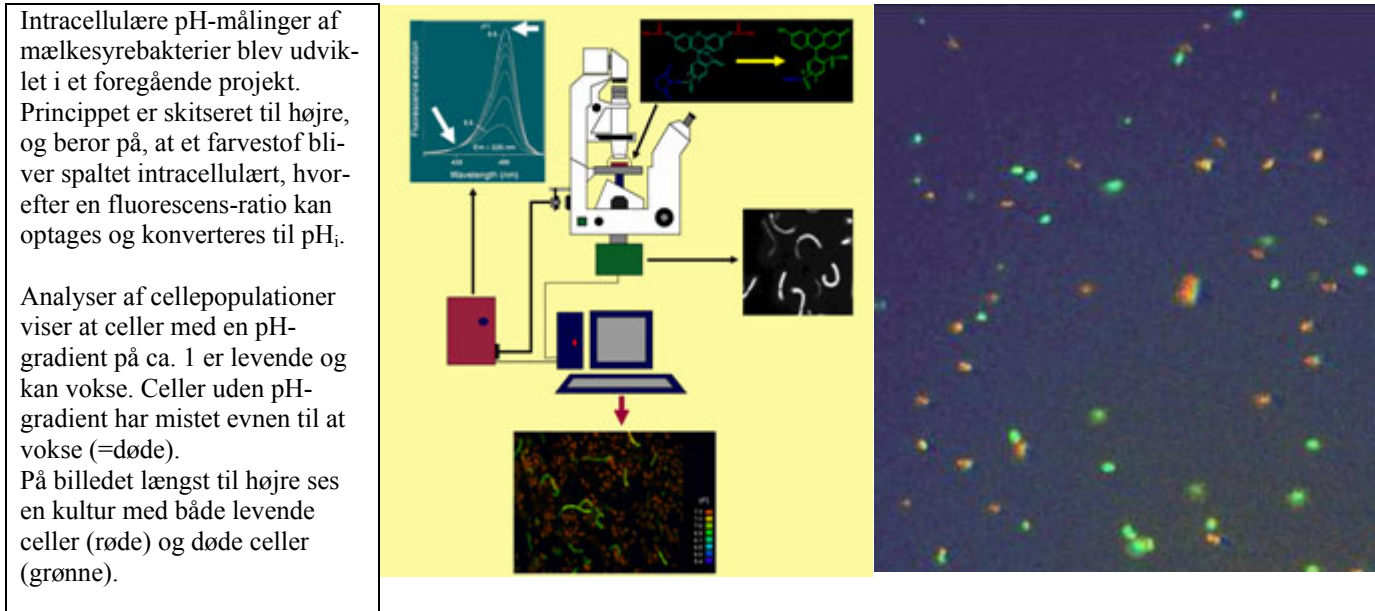
2. Resultater

Projektet har benyttet to forskellige strategier til at belyse ”early events”, en fysiologisk strategi, som primært anvendte fluorescenceteknikker, og en molekylærbiologisk strategi som skulle belyse protein- og genekspression. For at validere om de nye teknikker kunne bruges i praksis, blev disse teknikker sammenholdt med traditionelle metoder som kimtalsanalyser og bestemmelse af syrningshastighed.

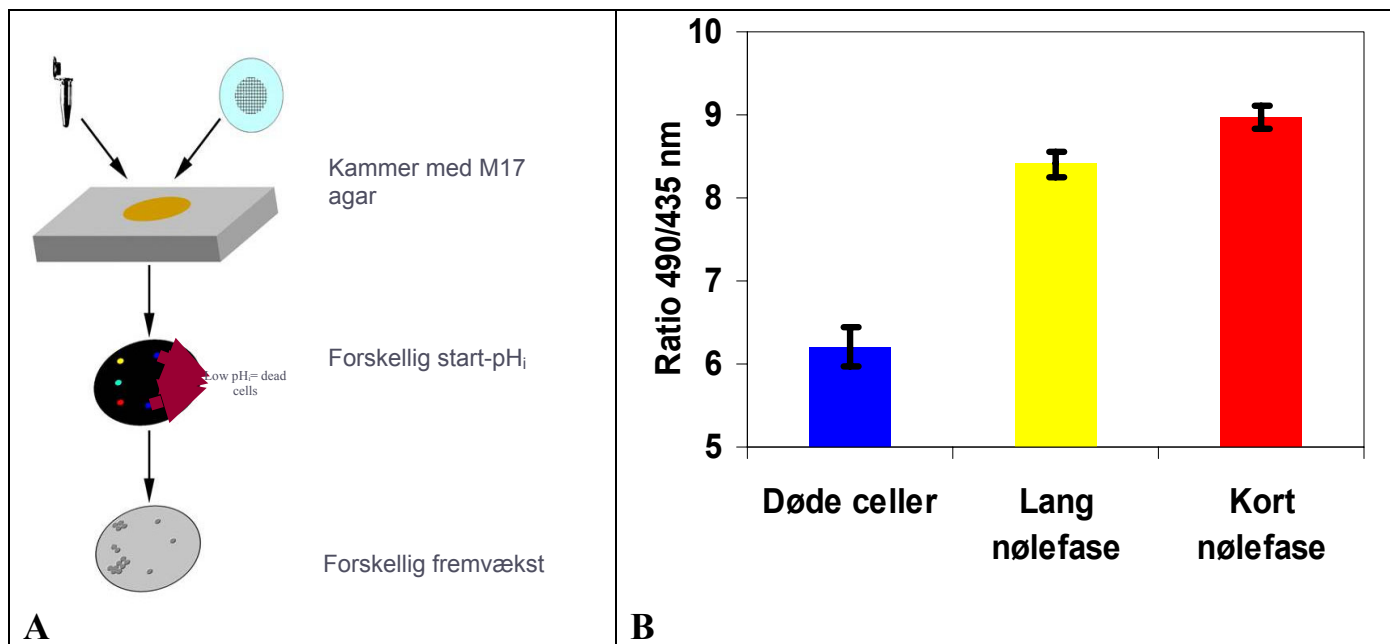
2.1 Fluorescerende teknikker

Det overordnede formål med de fluorescerende teknikker var at beskrive kulturernes fysiologiske tilstand på enkeltcelleniveau, og belyse hvorledes celler med forskellig fysiologisk tilstand bidrager til det samlede resultat, f.eks. syrningshastighed. Intracellulær pH (pH_i) blev bestemt med Fluorescence Ratio Image Microscopy (FRIM) som et mål for den enkelte celledes fysiologiske tilstand (Figur 1). Størstedelen af de gennemførte studier til måling af pH_i hviler på farvning med fluorescerende prober som tilsættes til en celled suspension. Der er imidlertid tilfælde hvor denne fremgangsmåde ikke er brugbar, f.eks. i vækstofforsøg, hvor farvestoffet langsomt fortyndes i forbindelse med vækst. I de senere år har der derfor været fokus på et naturligt fluorescerende protein (GFP), idet man vha. forskellige metodikker kan få celler til at udtrykke dette protein, hvorved de bliver fluorescerende. I projektet har vi udviklet en metode til at inkorporere et plasmid med en pH-følsom variant af GFP i flere forskellige

bakterier, således at man kan lave kontinuerede målinger af pH_i i enkeltceller. Publikationen (Olsen *et al.*, 2002) som beskriver denne metode, var den første som beskrev en pH-følsom GFP inkorporeret i mikroorganismer.



danne en mikrokoloni. Det fremgik, ikke overraskende, at antallet af døde celler i en frysetørret kommerciel starterkultur var meget højere end i en frossen.



Figur 2: Måling af tid til fremvækst. (A) Eksperimentelt design. (B) Celler med kort nølefase har en svagt højere intracellulær pH til start sammenlignet med celler med en længere nølefase. Alle celler der vokser vil bidrage til CFU; men i fermenteringer i flydende systemer vil celler med kort nølefase komme til at dominere populationen, så derfor giver FRIM også her et mere detaljeret billede end CFU. Ratio 490/435 nm er et indirekte udtryk for pH_i, som stiger med stigende ratio.

Målinger med FRIM af intracellulær pH kan give et meget hurtigt resultat (<30 min) der beskriver hvor stor en proportion af cellerne der er hhv. levende og døde. Metoden kan også nemt kombineres med et traditionelt tællekammer, hvis absolutte koncentrationer er påkrævet, og derved opnås et meget nuanceret billede af kulturens viabilitet.

2.2 Molekylærbiologiske teknikker

Det overordnede formål med den molekylærbiologiske strategi var at undersøge, om der er gener eller proteiner som bliver udtrykt præferentielt når kulturen bliver eksponeret for et vækstmiljø, dvs. ved podning i mælk. Kan der evt. identificeres et eller flere enzymer/proteiner, som er udtrykt tidligt under syrning af mælk, kan disse danne basis for en hurtigmetode til beskrivelse af kulturens fysiologiske tilstand og forudsigelse af syrningsforløb.

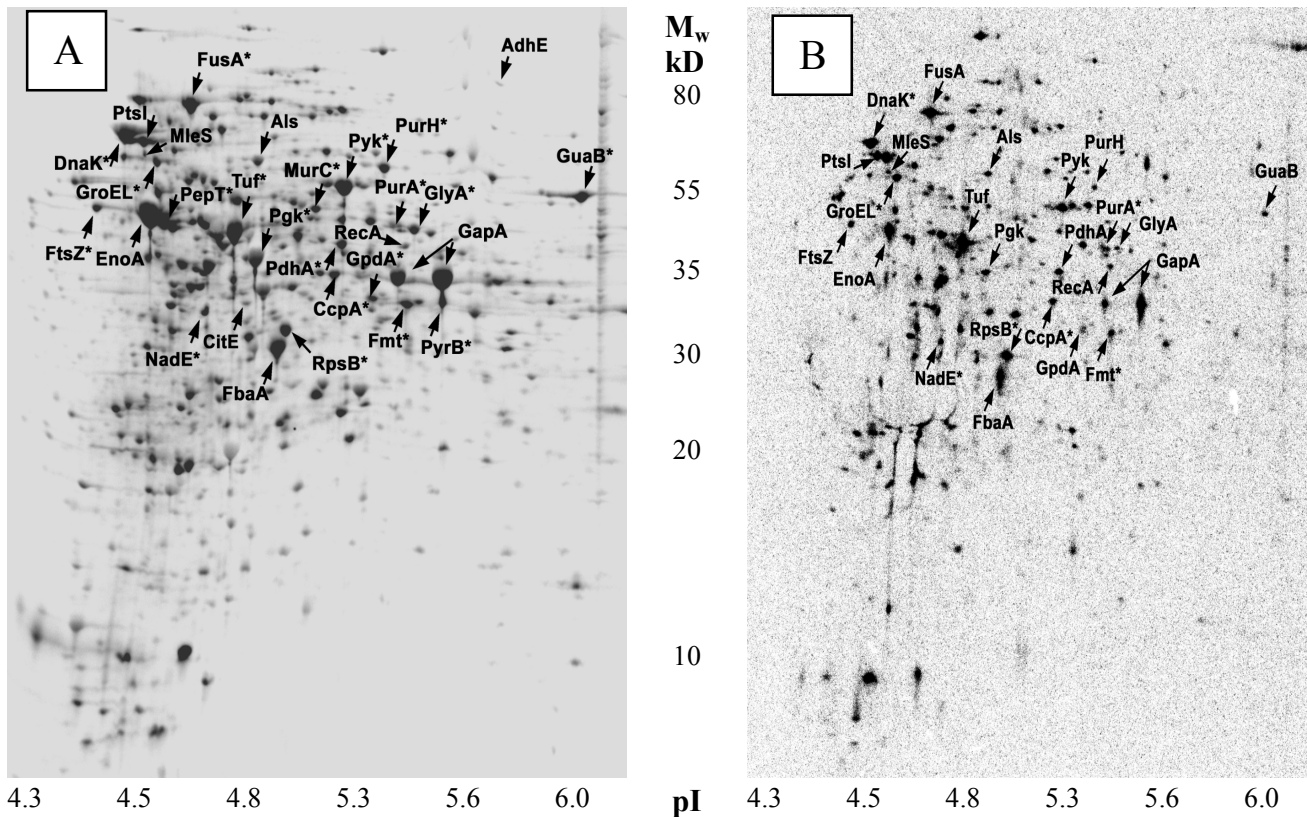
2.2.1 Proteinekspression

Proteinekspressionen i *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ 157 blev undersøgt ved hjælp af to-dimensionel gelelektroforese (2D-PAGE). Formålet var at identificere proteiner, som er kraftigere udtrykt i den

tidlige nøle fase i forhold til den eksponentielle og den stationære vækstfase.

L. lactis blev dyrket i enten syntetisk medium (SA) med tilsætning af 1.0 % glukose eller rekonstitueret skummetmælk (RSM), og proteinsyntesen blev fulgt vha. radioaktiv mærkning med ³⁵S-methionin.

Mærkning i RSM blev begrænset til den tidlige og den eksponentielle faser på grund af vanskeligheder ved at separere cellerne i den stationære fase fra koaglet, som bliver dannet ved lav pH.



Figur 3: Proteinprofiler for den tidlige nølefase af *L. lactis* ssp. *lactis* CNRZ 157 i SA medium (A) and RSM (B). Nysyntetiserede proteiner blev mærket med radioaktiv ³⁵S-methionin og separeret vha. 2D-PAGE. Proteiner som er kraftigt induceret i den tidlige fase er markeret *.

Proteinprofiler svarende til de forskellige vækstoffaser i de forskellige medier blev sammenlignet og proteinerne blev kvantificeret ved at normalisere intensiteten af hver enkelt plet i forhold til den totale intensitet af de analyserede pletter.

Tidlige proteiner som i gentagne tilfælde blev induceret kraftigt, blev sammen med udvalgte konstitutivt kraftigt udtrykte proteiner identificeret ved hjælp af N-terminal sekvensanalyse eller massespektroskopi. Identiteten af i alt 32 proteiner blev bestemt, og heriblandt blev 20 proteiner påvist som kraftigere udtrykt i den tidlige fase (fire uafhængige 2D-PAGE analyser.). Figur 3 viser eksempler på 2D-proteinprofiler af den tidlige vækstoffase af *L. lactis* vokset i SA og RSM. Resultater af kvantificering af proteinekspression er præsenteret i Tabel 2.

Et syntetisk medium (SA) viste sig at være et acceptabelt alternativ til RSM, idet 2D-proteinprofilen var meget ens, samtidig med at de praktiske problemer med RSM (koagulering) blev undgået.

Sammenligning af ekspressionen i SA og RSM viste en god korrelation for 15 af de 20 proteiner (Tabel 2). De sidste 5 proteiner, som ikke korrelerede så godt kan enten skyldes forskelle i medierne, eller at tilstedeværelsen af høje koncentrationer af mælkeproteiner i 2D-gelerne, hvilket overbelaster gelerne og påvirker migrationen af de bakterielle proteiner.

Tabel 2: Proteinekspression i *L. lactis* ssp. *lactis* CNRZ 157 i den tidlige fase under vækst i syntetisk medium (SA) og rekonstitueret skummet mælk RSM) bestemt vha. 2D-PAGE analyse

Protein ^a	Molvægt, kDa	pI	Induktionsgrad		
			SA		RSM
			Lag/Exp	Lag/Stat	Lag/Exp
PurA	47.3	5.41	4.0 ± 1.7	High	4.2 ± 1.6
GuaB	52.9	5.95	1	3.1 ± 0.1	1
PyrB	34.6	5.52	3.7 ± 1.2	2.9 ± 0.4	Uncertain
PurH	57.3	5.40	1	4.0 ± 1.2	1
GroEL	57.2	4.65	12.2 ± 4.5	1	2.73 ± 0.62
DnaK	64.9	4.62	2.3 ± 0.7	0.4 ± 0.2	5.7 ± 2.2
FusA	77.9	4.57	1	High	1
Tuf	43.2	4.74	1	5.3 ± 1.1	1
Fmt	35.1	5.49	24.3 ± 10.9	5.8 ± 3.6	4.7 ± 2.8
RpsB	28.5	5.08	2.8 ± 0.8	5.2 ± 1.3	2.7 ± 0.8
FtsZ	44.0	4.37	1	4.5 ± 1.8	1
MurC	50.1	5.26	5.7 ± 3.3	High	Uncertain
Pgk	42.1	5.06	0.3 ± 0.1	7.5 ± 2.3	0.6 ± 0.2
Pyk	54.3	5.27	0.4 ± 0.1	7.9 ± 3.2	1
GpdA	37.1	5.45	23.2 ± 8.4	7.4 ± 3.8	1
PdhA	41.3	5.18	1.8 ± 0.3	3.3 ± 1.2	2.0 ± 0.7
PepT	46.0	4.76	1	5.4 ± 2.6	1
GlyA	44.8	5.45	1	5.0 ± 1.7	1
CcpA	36.8	5.17	1	7.9 ± 3.3	2.8 ± 0.8
NadE	30.3	4.92	4.95 ± 1.34	High	3.10 ± 0.22

Molekylvægt og pI er teoretiske værdier bestemt vha. ExpASY tools (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html);

Induktionsgraden ± standardafvigelse blev beregnet som forholdet imellem normaliserede volumener i nølefasen i forhold til hhv. eksponentiel fase (lag/exp) eller stationær fase (lag/stat). Forhold imellem 0,5 og 2 er angivet som "1". "High" betyder at signalet i nølefasen var betydeligt højere end i stationær fase, men svært at kvantificere pga. det lave niveau i stationær fase. "Uncertain" betyder at pletten ikke kunne identificeres entydigt.

Som klargjort ved 2D-PAGE analyse begyndte proteinsyntesen kort efter podningen. Allerede i den tidlige nølefase var antallet af nysyntetiserede proteiner omkring 230. En stor del af de identificerede proteiner var involveret i omdannelsen af glukose. De udgjorde 21-23 % af den samlede radioaktivitet. Desuden udgjorde proteiner involveret i proteinsyntese 10-13 % og nukleinsyreomdannelse 4 % af den samlede radioaktivitet.

2.2.2 Genekspression

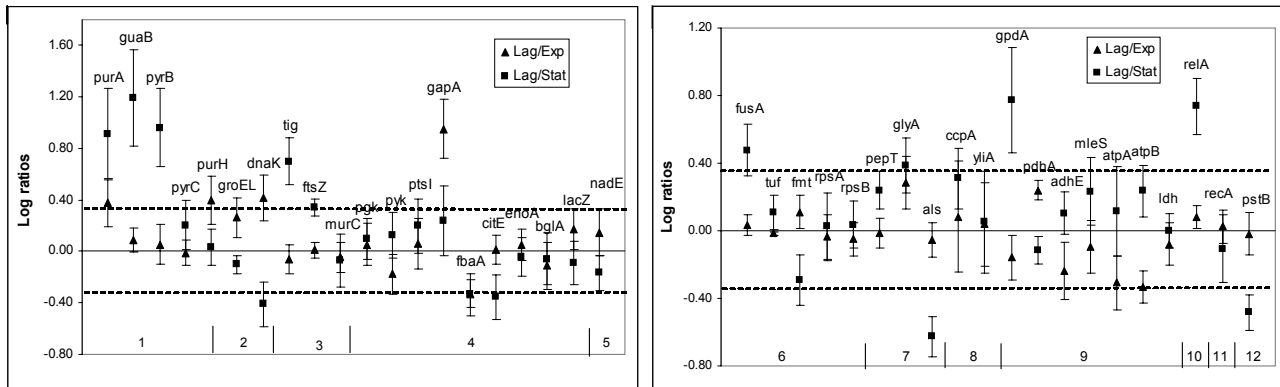
Analysen af den tidlige genekspression i *L. lactis* blev foretaget med det formål at bekræfte proteinekspresionsstudierne samt at opnå en endnu bredere viden om intracellulære begivenheder i kulturens tidligste faser.

Ekspressionsstudiet blev udført ved anvendelse af microarray teknologi. Ved anvendelse af RFDD blev der påvist 7 forskellige gener, som var differentielt udtrykte i den tidlige fase: Fire gener kodede for en gruppe af ribosomale proteiner, to gener var involveret i proteinsyntese og transport og et enkelt gen kodede for en transkriptionel regulator. Uheldigvis var der ingen af disse gener som kodede for enzymer eller andre proteiner der kunne bruges til udvikling af en testmetode til vurdering af aktiviteten af *L. lactis*. Desuden var udbyttet i form af differentielt udtrykte gener meget lavere end forventet.

Publicering af *L. lactis* genomet under projektet gjorde det muligt at forlade RFDD-metoden og fortsætte genekspressionsstudierne vha. microarray teknologi. Der blev produceret microarrays med oligonukleotid DNA prober som repræsenterede 40 gener (Tabel 2). DNA proberne blev valgt udefra RFDD- og 2D-PAGE resultater samt på basis af litteratur studier af hvilke proteiner der kunne formodes at have et højt ekspressionsniveau og/eller være differentielt udtrykt. Der er også udviklet en metode som omfattede præparation og mærkning af target cDNA samt hybridisering af mærket cDNA til microarrays. Dette blev gennemført i samarbejde med seniorforsker Mette Boye, Danmarks Fødevarer- og Veterinærforskning, som også stillede udstyr til rådighed.

Relativ genekspression blev bestemt ved at udregne forholdene mellem intensiteter af de enkelte signaler normaliserede til totale intensitetsaflysninger. Middelværdier af log-transformerede forhold beregnet i fire uafhængige eksperimenter er vist i Figur 4.

Forskelle i ekspressionsprofiler mellem den tidlige fase og den stationære fase var mest tydelig. Flere af generne involveret i purin- og pyrimidinomdannelse blev opreguleret mere end 8 gange (*guaB*, *pyrB* og *purA*). Et antal af generne, nemlig *purA*, *purH*, *gapA*, *glyA* og *pdhA*, blev desuden induceret mere end 2 gange i den tidlige nølefasen sammenlignet med den eksponentielle vækstfase.



Figur 4: Genekspression bestemt vha. microarrays. Relativ genekspression præsenteret som log transformerede ratios af signalintensiteter målt i den tidlige fase i forhold til den eksponentielle (Lag/Exp) og den stationære fase (Lag/Stat). Gennemsnitsværdier fra fire uafhængige eksperimenter og standardafvigelser er vist. De stiplede linier afgrænser 2-fold forskel i ekspressionen. Gener er grupperet efter deres funktion: 1 - nukleotidbiosyntese; 2 - posttranslational modificering; 3 - celledeling; 4 - kulhydrat metabolisme; 5 - co-enzymetabolisme; 6 - translation; 7 - aminosyremetabolisme; 8 - transkription; 9 - energiproduktion og -omdanning; 10 - signaltransduktion; 11 - DNA replikation og rekombination; 12 - ion transport.

En god overenstemmelse imellem tidlig gen- og proteinekspression blev konstateret for PurA, GuaB, GroEL, DnaK, FusA, FtsZ, PepT, CcpA, and GlyA.

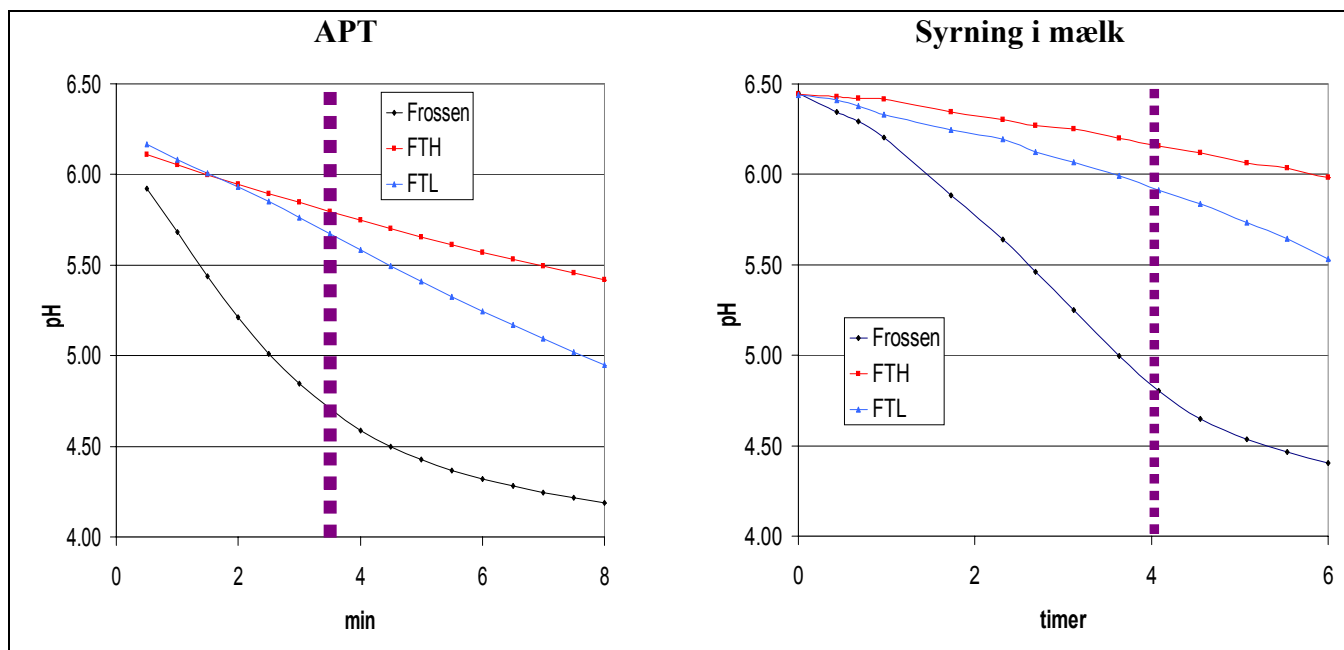
På grundlag af disse resultater valgtes enzymet adenylosuccinate synthetase (ASS), kodet af genet *purA*, til afprøvning i et videre modelforsøg. ASS var kraftigere udtrykt i den tidlige nølefasen i både syntetisk medium (SA) og rekonstitueret skummet mælk (RSM). Proteinekspressionsniveauet var opreguleret mere end 4 gange i forhold til både eksponentiel og stationær fase. Genekspressionen var også forhøjet i begge tilfælde; mere end 2 gange i forhold til eksponentiel fase og mere end 8 gange i forhold til stationær fase. Ydermere er ASS et velundersøgt enzym med tilgængelige metoder til aktivitetmålinger. Enzymet katalyserer omdannelsen af inosinmonofosfat til adenylosuccinate, det første trin i biosyntesen af adenin nukleotider.

2.3 Validering af hurtigmetoder

Som beskrevet i Tabel 1 er der en overordentlig god sammenhæng imellem antallet af kolonidannende enheder (CFU) og antallet af celler, der opretholder en pH-gradient bestemt ved FRIM (pH_i-måling). Denne metode vil derfor være at foretrække til forudsigelse af syrningsforløb; men hvis den skal udvikles til brug på mejerier, vil det sandsynligvis kræve udvikling af et lille robust flowcytometer med dobbelt excitation, som hurtigt og præcist vil kunne kvantificere antallet af både levende og døde celler. Selvom denne metode derfor ville være et naturligt førstevalg, har vi i projektet også valideret de to andre hurtigmetoder, APT og ASS-metoden.

2.3.1 Sammenligning af Acidification Power Test (APT) og syrningshastighed

Acidification Power Test (APT) er en simpel test, som i al sin enkelthed bygger på måling af syredannelsen i vand med tilsat laktose, og metoden kræver derfor kun et pH-meter. Da et stort antal aktive celler vil give et hurtigt pH-fald kan man altså estimere det totale antal aktive celler. Metoden var oprindeligt udviklet til gær, og efter visse modifikationer vil den kunne finde generel udbredelse i mejeribrug. Tidligere forsøg med APT viste at metoden gav gode prædiktioner af syrningsaktiviteten af meget syretolerante starterkulturer (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Ved undersøgelse af *L. lactis* er det nødvendigt at afkorte analysetiden fra 10 min til 3-4 min, idet det er den lineære syreproduktion i APT som kan korreleres til den lineære syreproduktion i en traditionel syring (Figur 5). Hvis man først aflæser APT efter 10 min, bliver forskelle imellem aktive kulturer og mindre aktive kulturer udjævnet, fordi syreproduktionen også i aktive kulturer nedsættes ved lavt pH. Konklusionen må derfor være at APT giver brugbare resultater, hvis man kender starterkulturens syrefølsomhed, og bruger samme stamme.



Figur 5: Sammenligning af APT og syrningshastighed. Hvis man sammenligner syreproduktionen efter ~3,5 min i APT, korrelerer det med syrningsforløbet efter ~4 timer. Bestemmelsen af APT bør foretages på det tidspunkt hvor en sund starterkultur begynder at blive så påvirket af sin egen syreproduktion af syredannelseshastigheden mindskes. Kulturerne er de samme som omtalt i Tabel 1, hvor FTL og FTH er henholdsvis frysetørret "let" og frysetørret "hårdt".

2.3.2 Afprøvning af adenylosuccinate syntetase som en fysiologisk indikator af kulturens aktivitet (ASS-Metoden)

Et modellforsøg blev udført for at undersøge om mængden af nydannet (ASS) kan anvendes som en indikator for syrningsaktivitet.

Celler med en høj viabilitet bestemt ved kimtal blev igen fremstillet via nedfrysning ved -80 °C mens en kultur med lavere viabilitet igen blev opnået ved en frysetørring af de frosne celler. Som det ses i Tabel 3 er der ca. en fire-fold reduktion i både kimtal og ASS aktivitet, og pH-faldet under syring i RSM er voldsomt reduceret i prøven med lav viabilitet/aktivitet. Resultaterne af dette forsøg indikerer derfor, at man også vha. et enzym-kit kan opnå en god forudsigelse af syrningshastigheden.

Tabel 3: Sammenligning af kimtal og aktivitet af adenylosuccinate syntetase (ASS)

Kulturer	Viabilitet (kimtælling)	Activitet af ASS μmol/min per mg protein	pH i RSM efter 5 timer
Frossen	$8.32 \cdot 10^8$	68	5.75
Frysetørret	$2.25 \cdot 10^8$	15	6.20

3. Konklusion

Resultaterne af projektet har vist, at det er muligt at forudsige den fysiologiske status af starterkulturer ved hjælp af flere forskellige hurtigmetoder.

- Intracellulær pH i enkeltceller giver den mest detaljerede beskrivelse af en starterkulturs fysiologiske status. Metoden er imidlertid så kompliceret at den sandsynligvis ikke kommer til at blive implementeret på de enkelte mejerier før et dedikeret apparat bliver udviklet (f.eks. et flowcytometer). Derimod kunne man forestille sig at anvende metoden på større centrale laboratorier, og under optimering af starterkulturproduktion.
- APT kan forudsige syrningshastigheden af en given kultur. Metoden kræver justering fra kultur til kultur.
- ASS-aktivitet vil kunne udvikles til et kit, som vil fortælle hvorledes kulturen responderer på inokulation i mælk. Dette er selvfølgelig endnu tættere på virkeligheden; men udover disse muligheder har protein- og genspressionsarbejdet generelt belyst, at nukleinsyremetabolisme er en vigtig tidlig begivenhed, når *L. lactis* podes i mælk.

Det konkluderes, at de overordnede mål for projektet er opfyldt, og ny viden om fysiologi, gen- og proteinekspression i *L. lactis* er blevet genereret til fordel for dansk mejeribrug generelt.

4. Perspektivering

Projektet har tilført ny viden om hvilke intracellulære parametre der har betydning for aktiviteten af en starterkultur. Der er fremkommet resultater og udviklet metoder, som med få justeringer kan anvendes

af mejeribruget, og implementeres på ethvert mejeri. Derudover belyser målingerne af intracellulær pH, at kulturproducenterne ofte leverer kulturer med mange både levende og døde celler. Ved anvendelse af gær til ølproduktion, anses døde celler for en kvalitetsforringende faktor, og det kunne sandsynligvis være af interesse for mejeribruget at belyse hvorvidt tilstedeværelsen af mange døde celler også i mejeriprodukter har en negativ indflydelse på den endelige produktkvalitet.

5. Relationer til andre mejeriprojekter

Projektet er en videreførelse af et tidligere FØTEK-projekt på KVL omhandlende ”early events i starterkulturer”. Derudover har projektet forbindelse til mange igangværende projekter om brug af *L. lactis* som er medfinansieret af Mejeribrugets ForskningsFond. De igangværende projekter er alle med til at klarlægge hvilken betydning, starterkulturens fysiologiske status har for kvaliteten af det færdige produkt, ligesom forskellige tiltag til kvalitetsoptimering bliver undersøgt.

6. Samarbejde

Microarrays:

Mette Boye, Seniorforsker
Danmarks Fødevare- og Veterinærforskning
Bülowsvej 27, 1790 Kbh. V
mbo@dfvf.dk

Design af DNA-prober

Henrik Bjørn Nielsen, Ph.D.
Center for Biologisk sekvensanalyse, BioCentrum-DTU
Kemitorget, Bygning 208, 2800 Lyngby

ASS-Metoden

Per Nygaard, Professor
Molekylærbiologisk Institut
Øster Farimagsgade 2 A
1353 København K

7. Publikationer

Internationale publikationer

Olsen, K.N., Budde, B.B., Siegumfeldt, H., Rechinger, K.B., Jakobsen, M., Ingmer, H. (2002)
Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy
Appl. Envir. Microbiol (68) 4145-4147.

Shabala, L., Budde, B.B., Ross, T., Siegumfeldt, H., McMeekin, T. (2002) Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. *Int. J. Food Microbiol.* (75) 89-97.

Shabala, L., Budde, B.B., Ross, T., Siegumfeldt, H., Jakobsen, M., McMeekin, T. (2002) Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability revealed by a novel combination of fluorescence microscopy and microelectrode ion-selective techniques. *Appl. Envir. Microbiol* (68) 1794-1802.

Fang, W., Siegumfeldt, H., Budde, B.B., Jakobsen M. (2004) Osmotic Stress Leads to Decreased Intracellular pH of *Listeria monocytogenes* as Determined by Fluorescence Ratio-Imaging Microscopy. *Appl. Envir. Microbiol* (70) 3176-3179.

Yansanjav, A., Siegumfeldt, H., Jespersen, L., Vancanneyt, M., Swings, J., Hollerová, I., Leisner, J.J. (2004) Detection of resistance of lactic acid bacteria to a mixture of the hop analogue compounds tetrahydroiso- α -acids by noninvasive measurement of intracellular pH. *J. Appl. Microbiol.* (96) 1324-1332.

Internationale publikationer under udarbejdelse

Fog, N., Boye, M., Siegumfeldt, H., Jakobsen, M. () Profiles of gene and protein expression upon inoculation of *Lactococcus lactis* in a new rich growth environment.

Siegumfeldt, H., Shabala, L., Rechinger, K.B., Jakobsen, M. () Regulation of pH_i in lactic acid bacteria upon exposure to organic acids and ionophores.

Nationale publikationer

Mælkeritidende (2002) 4

Videnskabelige afhandlinger

Undersøgelse af en hurtigmetode til viabilitetsbestemmelse i Lactococcus lactis subsp- lactis.

Bachelorprojekt af Mikkel Dreyer

Development of Restriction Fragment Differential Display PCR technique for investigation of "early" gene expression in Lactococcus lactis ssp. Lactis CNZR157.

Specialeprojekt af Nadja Fog.

8. Studerende

Specialestuderende Nadja Fog

Bachelorstuderende Mikkel Dreyer

Levnedsmiddelteknikerpraktikant Katja Rytgård

