

Afslutningsrapport

Ost – belysning af interaktioner imellem propionsyrebakterier og laktobaciller under ostemodning

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2006-79

November 2006



mejeriforeningen

danish dairy board

Ost, belysning af interaktioner imellem propionsyrebakterier og laktobaciller under ostemodning

Af Lektor Henrik Siegumfeldt, Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole, Institut for Fødevidenskab, Fødevaremikrobiologi

Projektperiode: 1. juli 2002 – 31. december 2005

Sammendrag af projektets formål:

Projektets overordnede formål var at belyse samspillet mellem enkeltceller af en bakteriekultur og en fast rumlig struktur som ost. Da der sædvanligvis er flere forskellige mikroorganismer tilstede i osten, vil det være af stor interesse at fastslå hvorledes placeringen i forhold til andre enkeltceller influerer på vækst og metabolisme, herunder proteolyse, da udgangspunktet for al mikrobiel vækst er den enkelte celle.

Med udgangspunkt i udvalgte stammer af termofile laktobaciller og propionsyrebakterier anvendt til osteproduktion vil det blive belyst hvorledes enkelte bakterieceller eller mikrokolonier interagerer indbyrdes og med den faste matrice. Et modelsystem vil blive udviklet, som vil gøre det muligt at undersøge stammespecifikke interaktioner, og det vil mere specifikt blive undersøgt om metabolismeprodukter fra de termofile laktobaciller bidrager antagonistisk eller synergistisk til væksten af propionsyrebakterier i den umiddelbare nærhed.

Projektets resultater og konklusion:

Kort sammendrag af projektets hovedresultater og konklusioner med henvisning til publikationer.

Projektet forsøgte at foretage kvantitative målinger af ændringer i mikromiljøet omkring bakterieceller i en fast matrice. Der er en meget stor heterogenitet imellem forskellige positioner i det enkelte præparat, og selvom der kan observeres forskelle imellem udvalgte positioner i forskellige kombinationer af bakterier, kan disse resultater sandsynligvis ikke stå alene, hvis man ønsker at prædiktere ostekvalitet. Imidlertid må en af hovedkonklusionerne være at interaktionerne imellem mikroorganismer faktisk kræver at organismene ligger meget tæt, ligesom de ændringer som mikrokolonierne forårsager i den omkringliggende matrix også har en begrænset eller i hvert fald meget langsom udbredelse.

Den udviklede metode gør det imidlertid muligt at dokumentere mikroorganismers påvirkning af en omkringliggende fast matrix, og dette vil muliggøre en hurtig og relativt mere præcis screening af en kulturs evne til at etablere sig i og påvirke en fast matrix end flydende modelsubstrater. Metoden kan ydermere kombineres med afprøvning af ændringer i ostningsproceduren, idet det vil være muligt at undersøge hvorledes f.eks. ændringer i podemængder påvirker distributionen af organismer i ostemassen eller hvordan eftervarmningen påvirker initiering af vækst.

Resultaterne er ved at blive sammenskrevet til en artikel, der beskriver den udviklede farvemetode, og de mulige anvendelsesmuligheder. Artiklen påtænkes at blive indsendt til Journal of Microbiological Methods, idet metoden ikke nødvendigvis er begrænset til brug i ostematricer, men kan appliceres til anvendelse i alle systemer, hvor mikroorganismer vokser og interagerer med en fast matrix.

Projektets faglige forløb:

Gennemgang af projektets forløb og opnåede resultater samt en vurdering af resultaterne i forhold til de oprindeligt opstillede projektplan og milepæle. Der bør tillige være en vurdering af opfyldelse af budget.

Den oprindelige tidsplan for projektet var opdelt i 3 faser som beskrevet i nedenstående gantt diagram.

Projektperiode: 01/07/2002 – 30/06/2004, faseopdeling baseret på kalenderår

Fase	2002	2003	2004	2005
1	xxxxxxx	xxxx		
2		xxx	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	
3				XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Projektet blev forlænget til 31/12 2005, dog uden at medføre væsentlige budgetændringer i forhold til den oprindelige bevilling.

Nedenfor er de enkelte projektfaser og deres forventede resultater opsummeret. Efter hver projektfase vil det blive diskuteret hvorledes disse blev opfyldt.

Fase 1: Udvikling af modelost, fastlæggelse af vækstbetingelser samt screening af kulturer.

Det forventede resultat af fase 1 vil være:

En standardiseret "modelost"

Konstruktion/optimering af et simpelt inkubationskammer som forhindrer indtrængen af ilt samtidig med at mikroskopiske analyser er mulige.

En indledende screening af ca. 10 stammer af termofile laktobaciller og ca. 10 stammer af propionsyrebakter vil give 4-6 kombinationer som interagerer forskelligt, og som man derfor kan fortsætte med i fase 2.

Fase 1 blev gennemført tilfredsstillende, idet der blev udviklet et standardiseret setup, hvormed interaktionerne kunne undersøges i mikroskop. Den indledende screening viste sig at være mere besværlig end forventet, hvorfor kommercielle kulturer af begge typer mikroorganismer med forskellig biokemisk aktivitet blev udvalgt til de efterfølgende forsøg.

Fase 2: Afprøvning af prober og udstyr til bestemmelse af mikrobielle interaktioner

Resultatet af fase 2 må forventes at være:

Et antal mikroskopiske metoder som kan benyttes samtidig eller i parallelle forsøg, hvor informationerne fra de samlede analyser vil give et hidtil uset detaljeret billede af hvilke mekanismer der er involveret i vækst og mikrobielle interaktioner på enkeltcelle/mikrokoloniniveau.

Fase 2 blev ligeledes tilfredsstillende gennemført. En metode blev udviklet, som ved hjælp af tre forskellige fluorescerende farvestoffer kunne vise i) vækst af mikroorganismer i substratet, ii) ændringer i pH omkring en mikrokoloni, og iii) proteolytisk aktivitet omkring mikrokolonier. Det skal dog bemærkes at det oprindeligt også var foreslået at anvende autofluorescens fra substratet til at måle ændringer omkring enkeltceller, men på trods af adskillige forsøg på at udvikle dette, var det ikke muligt at applicere succesfuldt. Derimod blev en metode til at manipulere med enkeltceller, en optisk pincet, i samme periode implementeret i vores eksisterende mikroskop-setup. Denne metode gør det muligt at arrangere mikroorganismer i faste mønstre, hvis dette skønnes nødvendigt.

Fase 3: Undersøgelser af mikrobielle interaktioner, dataanalyse og rapportering

Resultatet af fase 3 må derfor forventes at være:

En samlet belysning af stammespecifikke mikrobielle interaktioner imellem termofile laktobaciller og propionsyrebakterier, og specifikke interaktioner med den faste matrice. De rumlige forhold som har indflydelse på disse interaktioner vil blive belyst på enkeltcelle- eller mikrokoloni-niveau, hvilket giver en meget tidlig indikation af hvorledes den videre modning vil forløbe.

Produktion af videnskabelige artikler som beskriver de ovennævnte interaktioner, samt evaluerer de metoder der er blevet udviklet i projektet

Som tidligere nævnt er interaktioner imellem mikroorganismer meget begrænsede med mindre de ligger meget tæt. Dette forklarer selvfølgelig hvorfor ostemodning er en langsom proces, men resultaterne fra projektet giver dog ikke så klare indikationer på stammeforskelle. Selvom dette har begrænset produktionen af videnskabelige artikler er en metodeartikel som beskriver det udviklede setup under udarbejdelse. Det skal desuden bemærkes at arbejdet med at analysere bakterier i faste modelsystemer har afstedkommet yderligere artikler fra vores gruppe, som har draget nytte af den opnåede viden fra dette projekt, selvom de ikke direkte kan tilskrives indeværende projekt.

Overordnet må det dog konkluderes at projektet er forløbet tilfredsstillende, og at resultaterne bidrager til en grundigere forståelse af hvorledes bakterielle interaktioner på enkeltcelleniveau bidrager til ostemodning.

Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:

Projektets betydning for mejeribranchen må væsentligst ses som grundlagsskabende forskning som vil uddybe den videnskabelige forståelse af ostemodning, og hjælpe mejeribranchen med at afhjælpe praktiske problemer i forbindelse med ostemodning generelt. Det udviklede modelsystem kan anvendes til at undersøge andre kombinationer af mikroorganismer, ligesom den udviklede metode til at følge udviklingen af mikrokolonier i en fast matrice kan anvendes generelt.

Fra et videnskabeligt synspunkt er en af hovedkonklusionerne at observerbare interaktioner imellem mikroorganismer kun forekommer når organismene ligger meget tæt, ligesom de ændringer som mikrokolonierne forårsager i den omkringliggende matrix har en meget langsom udbredelse. Den udviklede metode gør det imidlertid muligt at dokumentere mikroorganismers påvirkning af en omkringliggende fast matrix, og dette vil muliggøre en hurtig og relativt mere præcis screening af en kulturs evne til at etablere sig i og påvirke en fast matrix end flydende modelsubstrater. Metoden kan ydermere kombineres med afprøvning af ændringer i ostningsproceduren, idet det vil være muligt at undersøge hvorledes f.eks. ændringer i podemængder påvirker distributionen af organismer i ostmassen eller hvordan eftervarmningen påvirker initiering af vækst. Metoder udviklet i dette projekt vil desuden blive direkte anvendt i et nyt samarbejdsprojekt imellem KVL, DTU og Mejeriforeningen med navnet *Starterkulturers fysiologiske og genetisk status som indikator for modningsforløb i ost*.

For forskningsprojekter suppleres med:

Fødevarer mikrobiologi har et tæt samarbejde med Biocentrum, DTU og Niels Bohr Institutet, KU. Derudover har vi i dette projekt været i kontakt med den danske fødevarerindustri i form af Chr. Hansen A/S, Danisco og Arla Foods.

English Summary

The main purpose of the present study was to understand the interactions between individual bacterial cells and a solid structure such as cheese, as well as the early interactions between individual bacterial cells of different origin. Using thermophile lactobacilli and propionic acid bacteria as starter cultures, a model system has been developed that simultaneously detects growth of individual bacteria as well as pH changes and proteolysis in the surrounding matrix.

The project attempted to assess quantitative changes in the micro environment surrounding individual cells or microcolonies, and the conclusion is that the environment is very heterogenous.

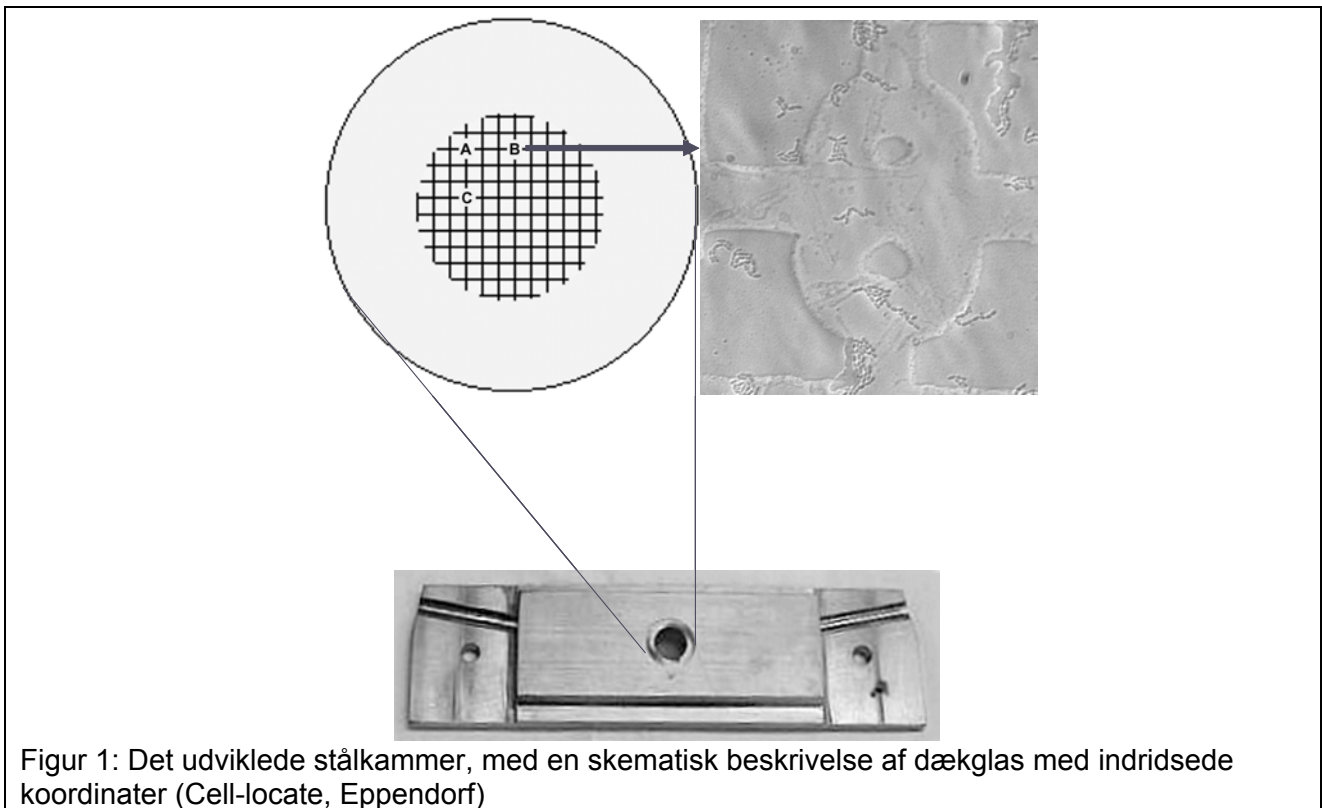
One of the main conclusions is that individual cells only interact if they are situated very close, as the proteolysis and pH changes have a very narrow range around the cells. The developed method allows for a deeper understanding of the cheese maturation, and at the same time, the method lends itself easily to other applications where bacteria interact with semi-solid food structures.

Redegørelse for projektets perspektiver:

Da projektet må anses for at være grundlagsskabende forskning, er der ikke forventninger om specifikt udviklede produkter i forbindelse med projektet. Imidlertid forventes det at den udviklede metode til at følge modningsforløbet omkring mikrokolonier vil kunne anvendes til at producere ensartede oste af høj kvalitet.

Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater:

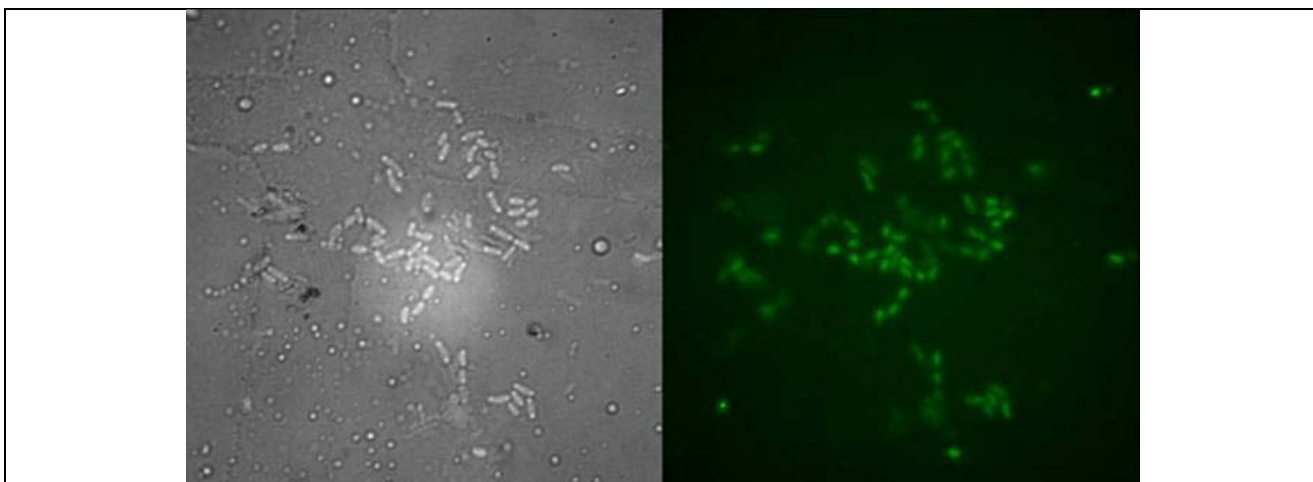
Et rustfrit stålkammer blev designet i samarbejde med et andet projekt på afdelingen. Kammeret kan temperaturkontrolleres imens det er monteret på et inverteret mikroskop, og efter et substrat eller en osteprop er monteret i kammeret kan overfladen podes, hvorefter kammeret kan forsegles lufttæt med et dækglas (figur 1).



Figur 1: Det udviklede stålkammer, med en skematisk beskrivelse af dækglas med indridsede koordinater (Cell-locate, Eppendorf)

Det er ikke trivielt at mikroskopere ost, da overfladen er meget heterogen, og da tykkelsen af osten umuliggør gennemlysning; må man forlade sig på refleksionsteknikker hvis fluorescerende prober ikke anvendes. Indledende studier blev udført på forskellige mikroskoper for at få en indikation om hvilke egenskaber modelsystemet skulle have. Det blev forsøgt at placere færdig ost i kammeret, på en sådan måde at ostematrixen ligger tæt op ad dækglasset, men det var ikke muligt at danne en flade som kunne mikroskoperes tilfredsstillende. Det blev derfor besluttet at fortsætte med et agar-baseret modelsubstrat, som samtidig havde den fordel at det var mere gennemskinneligt.

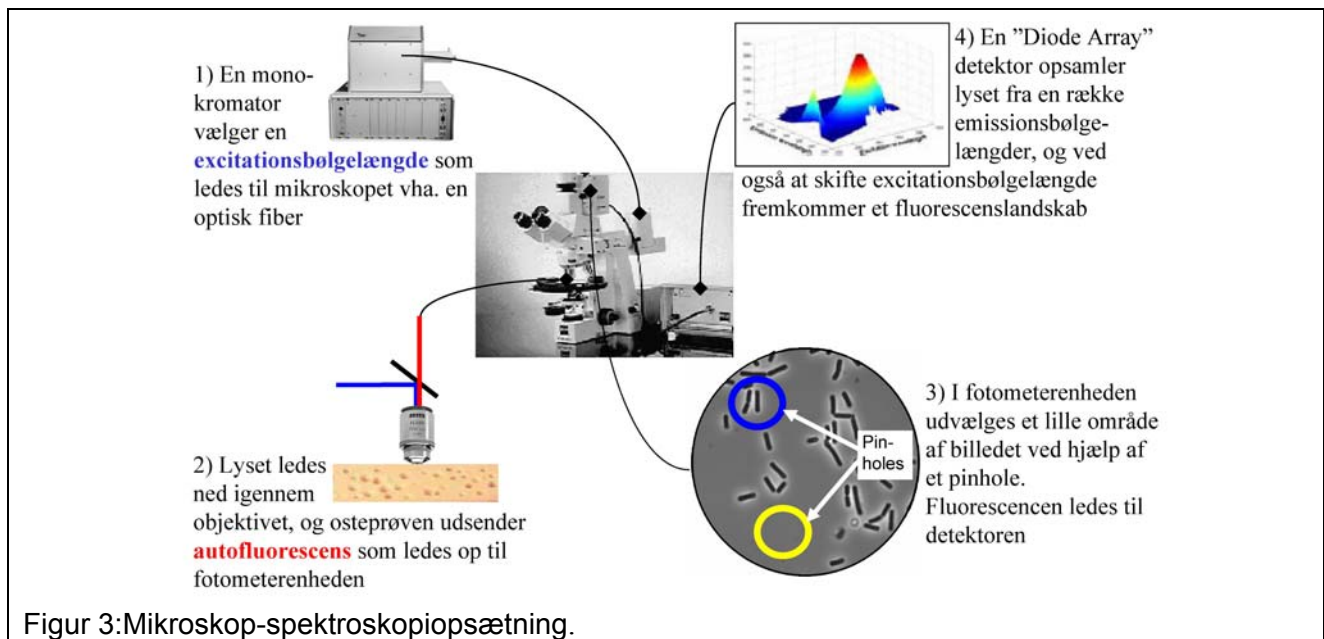
Det var imidlertid stadig overordentligt besværligt at genfinde ufarvede celler i disse modelsystemer, og forskellige farvningsmetoder blev derfor afprøvet. Ved at farve podedkulturen, opnår vi kraftig fluorescens i de tilsatte celler men næsten ingen fluorescens i de resulterende datterceller. I projektbeskrivelsen overvejede vi muligheden for at inkorporere GFP i cellerne for at følge dattercellerne; men dette ville være meget tidskrævende, og forsøg i vores laboratorium har vist at GFP ikke bliver tilfredsstillende udtrykt under de anaerobe forhold som ligner vores forsøgsbetingelser. Indledningsvis farvede vi cellerne med CFDA-SE, som vi har benyttet til pH-målinger tidligere og et orange farvestof (Celltracker Orange fra Molecular Probes). Et eksempel på farvning med CFDA-SE er vist i figur 2.



Figur 2: Lysfelt og fluorescensbillede af bakteriekulturen viser at praktisk talt alle celler bliver farvet med det fluorescerende farvestof CFDA-SE.

Sideløbende med disse forsøg, forsøgte vi at kigge på proteolyse omkring enkeltceller vha. to kits der udsender hhv. grøn og rød fluorescens ved tilstedeværelse af proteolytiske enzymer. Ingen af disse kit gav fremragende fluorescens; men det blev besluttet at fortsætte med det røde kit, dels fordi autofluorescensen erfaringsmæssigt aftager med stigende bølgelængde, og dels fordi dette ville gøre det muligt at måle andre parametre med et grønt signal.

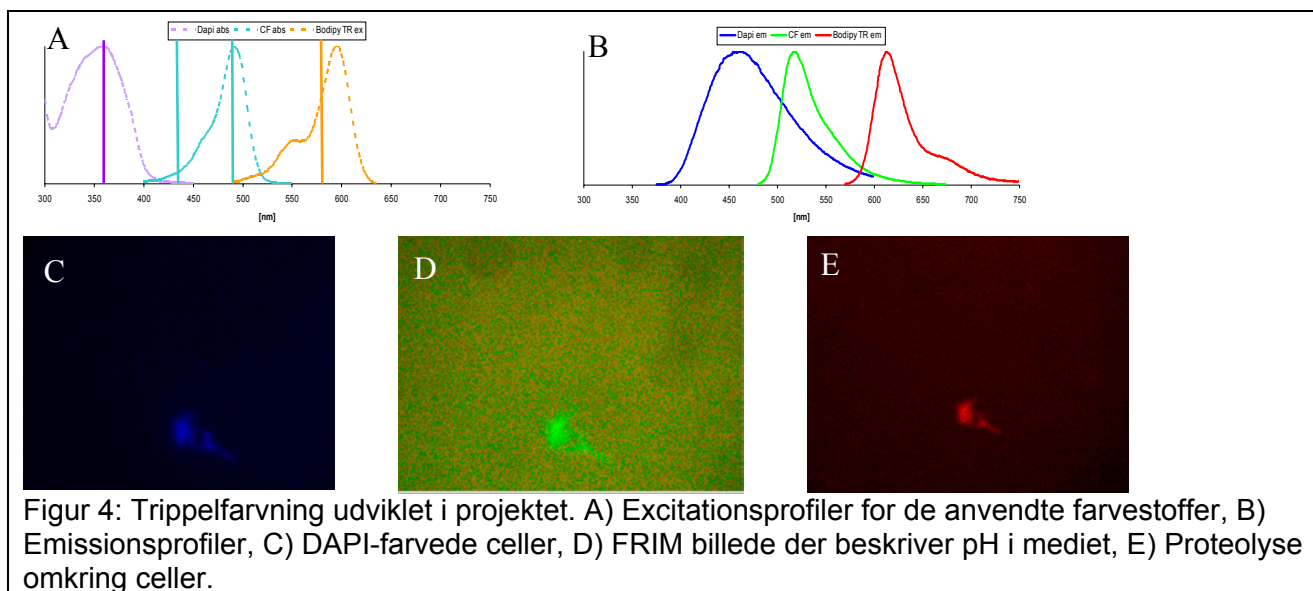
Sideløbende med disse forsøg var vi gået i gang med at undersøge om vi kunne måle autofluorescens igennem mikroskopet. I vores forskningsgruppe havde det længe været et ønske at kunne måle hele fluorescensspektre på mikroskopiske områder, bl.a. for at kunne kombinere resultaterne med kemometriske analyser. I denne forbindelse er det især interessant at man kan måle osteopper makroskopisk med denne metode, og ud fra resultaterne beskrive hvor moden osten har været, uden nogen form for farvning eller behandling af osten. I samarbejde med levnedsmiddelteknologi-gruppen på Institut for Fødevarevidenskab tilsluttede vi derfor en monokromator og en diode array detektor til et af vore fluorescensmikroskoper, som skitseret i nedenfor (figur 3).



Monokromatoren kunne udsende lys fra 300 til 650 nm med en båndbredde på 10 nm, og den valgte detektor kunne detektere emission i området 300-1100 nm. Det er ikke altid muligt at forudsige hvilke objektiver der giver det bedste resultat, og det blev derfor besluttet at undersøge hhv. et 10x fluar og et 100x ultrafluar objektiv for at afklare hvilken forstørrelse det gav det mest brugbare resultat (primært med henblik på at optimere signal/støjforholdet og reproducerbarhed). Disse analyser blev indledningsvis udført på færdig ost, da formålet alene var at bestemme hvordan udstyret skulle sættes op. Brug af UltraFluar objektivet som er specielt designet til at lade UV-lys passere gav de bedste signaler; men de opnåede fluorescenslandskaber var ikke tilfredsstillende, især fordi det ikke var muligt at få et brugbart emissionssignal under 340 nm, pga. absorption i de forskellige glasdele. Dette betød samtidig at det bedste bud på mål af proteolyse (som var tryptofans primære autofluorescens) ikke kunne måles ved denne metode. Det blev også forsøgt at excitere prøven fra siden for at minimere absorptionen, men også her blev signalet for svagt. Det blev herefter besluttet at det ikke var formålstjenligt at fortsætte med denne analysemetode.

Det var som ovenfor nævnt muligt at følge væksten af bakterierne i et modelsystem ved at farve pokedkulturen, hvorefter man kunne registrere præparatets position og derefter forsøge at genfinde mikrokolonien vha. positionen. Imidlertid viste en anden metode sig meget anvendelig, idet man ved at blande et DNA-specifikt farvestof (SYTO) i mediet opnåede en meget fin fluorescens i cellerne uden at udsætte dem for en indledende farvning. Princippet i metoden er at farvestoffet ikke fluorescerer før det binder til DNA; men da det er fuldt permeabelt, vil det trænge igennem cellevæggen og farve cellerne. Fordelen ved denne metode er at datterceller også bliver farvet efterhånden som de dannes, hvorfor det er muligt at måle "nølefase" og i hvert fald den initiale væksthastighed. Døde celler farves også, og herved får man altså information om positionen af alle de bakterier som er til stede, samtidig med at man kan registrere om de vokser og hvor hurtigt de deler sig (for de første delinger). Denne metode er overraskende simpel; men så vidt det kan vurderes har denne metode ikke tidligere været anvendt til at undersøge vækst i faste substrater. Det viste sig at en anden DNA farve, DAPI, som fluorescerer blå, også

kunne anvendes, og derved havde vi stadig den grønne kanal ledig. Derfor blev det besluttet at anvende det blå DNA-farvestof DAPI til at følge bakterievæksten, samtidig med grøn carboxyfluorescein (for ekstracellulær pH) og det røde proteolysekit som består af kasein med rød fluorescensmærkning. Denne trippelfarvning af mediet giver mulighed for at følge alle tre parametre samtidig (figur 4).



Samtidig med dette arbejde blev en "optisk pincet" indbygget i vores eksisterende mikroskop setup. Denne teknik benytter laserlys ved 1064 nm (som ikke kan ses med det blotte øje) til at fastholde celler, hvorefter det automatiserede krydsbord benyttes til at flytte præparatet. Når cellen er placeret korrekt blokeres laserlyset for at frigøre cellen. Det har været forsøgt at benytte den optiske pincet til at placere laktobaciller og propionsyrebakterier i definerede afstande. Imidlertid blev det vurderet at denne fremgangsmåde ville være for tidskrævende, hvis et stort antal celler skal placeres og analyseres.

Trippelfarvningen blev afslutningsvis blevet afprøvet på fire kombinationer af laktobaciller og propionsyrebakterier. Forsøgene viste at det var muligt at følge cellevækst og ændringer i matricens pH på en tilfredsstillende måde, hvorimod kaseinnedbrydningen ikke er entydig, idet signalet er meget svagt, og derfor meget støjfyldt. Laktobacillerne vokser betydeligt hurtigere end propionsyrebakterierne, hvorfor laktobacillerne blev tilsat i en mindre mængde laktobaciller. Men den podede laktobacillus kommer hurtigt til at dominere lokalt selv om den globalt er podet i et meget lille antal, fordi propionsyrebakterierne ikke vokser særlig hurtigt, og det betyder at forskelle imellem disse stammer er ret utydelige. En yderligere udfordring var den meget store heterogenitet i prøverne, og selvom der kan observeres forskelle imellem udvalgte positioner i forskellige kombinationer af bakterier, kan disse resultater sandsynligvis ikke stå alene, hvis man ønsker at prædiktere ostekvalitet.

En af hovedkonklusionerne fra projektet må være at interaktioner imellem mikroorganismer faktisk kræver at organismene ligger meget tæt, ligesom de ændringer som mikrokolonierne forårsager i den omkringliggende matrix også har en begrænset eller i hvert fald meget langsom udbredelse.

Den udviklede metode gør det imidlertid muligt at dokumentere mikroorganismers påvirkning af en omkringliggende fast matrix, og dette vil muliggøre en hurtig og relativt mere præcis screening af en kulturs evne til at etablere sig i og påvirke en fast matrix end flydende modelsubstrater. Metoden kan ydermere kombineres med afprøvning af ændringer i ostningsproceduren, idet det vil være muligt at undersøge hvorledes f.eks. ændringer i podemængder påvirker distributionen af organismer i ostmassen eller hvordan eftervarmningen påvirker initiering af vækst.

De ovennævnte resultater er ved at blive sammenskrevet til en artikel, der beskriver den udviklede farvemetode, og de mulige anvendelsesmuligheder. Artiklen påtænkes at blive indsendt til Journal of Microbiological Methods, idet metoden ikke nødvendigvis er begrænset til brug i ostematricer, men kan appliceres til anvendelse i alle systemer, hvor mikroorganismer vokser og interagerer med en fast matrix.

Liste over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet:

Artikler i internationalt anerkendte tidsskrifter, indlæg ved kongresser, symposier o.lign.,

A novel method for simultaneous visualisation of growth of microorganisms and pH changes and proteolysis in the surrounding matrix. Journal of Microbiological Methods (in preparation)

Bio-imaging and adhesion forces between individual microorganisms and food matrices (Oral presentation at Food Micro 2004, august 2004, Portoroz, Slovenia)

Artikler i fagblade

Belysning af interaktioner imellem propionsyrebakterier og laktobaciller under ostemodning (artikel i Mælkeritidende 11, 2003.)

Foredrag

Microscopy in many dimensions (Danisco årsmøde 1/3 2004)

Bioimaging afslører mejerikulturers hemmeligheder foredrag (Foredrag for repræsentanter for den svenske mejeriindustri, maj 2004)

