

Afslutningsrapport

Fermentering af mælk, kortlagt ud fra fysiologiske ændringer i
Lactococcus lactis, undersøgt ved DNA-mikroarray og
proteomanalyse

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2007-91

August 2007



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond for FØTEK-samarbejdsprojektet:

**Fermentering af mælk, kortlagt ud fra fysiologiske ændringer i *Lactococcus lactis*, undersøgt ved DNA-mikroarray og proteomanalyse
2002-2006**

Projektleder: Lektor Mogens Kilstrup
Center for System Mikrobiologi
BioCentrum-DTU
Bygning 301
2800 Kgs. Lyngby
Tlf: +45 4525 2528
Fax: +45 4593 2809
E-mail: mki@biocentrum.dtu.dk

Indholdsfortegnelse

	side
Forord	3
1. Medarbejdere	4
2. Resumé af det samlede projekt	5
3. Engelsk sammendrag/English Summary	6
4. Introduktion	7
4.1. Baggrund	7
4.2. Problemstillingen	8
4.3. Modelsystemet	8
4.4. Proteom og transkriptom, to nødvendige begreber	9
4.5. Proteomanalyser	10
4.6. Transkriptomanalyser	11
4.7. ”Data mining”	11
5. Resultater og diskussion	12
5.1. Ny teknik til isolering af bakterier fra ost og koaguleret mælk	12
5.2. Konstruktion af DNA-array	12
5.3. Opgradering af 2-dimensionel gel elektroforese og analyseprogram	13
5.4. Forenklet teknik til måling af GTP, GDP, ATP og ADP-niveauer i celler	13
5.5. Forkulturens indflydelse på laktokokkernes mælkefermentering	13
5.6. Mælkefermentering med eksponentielt voksende forkultur i SA medium	15
5.7. Laktokokkernes sansning af mælkefermenteringsprocessen.	18
5.8. Tegn på energimangel - Hvordan sanser laktokokker, at de har opbrugt sukker?	22
5.9. Tegn på purinmangel - Hvordan sanser laktokokker, at de har opbrugt puriner?	23
5.10. Tegn på aminosyremangel – Hvordan sanser laktokokker mupirucintilsætning?	25
5.11. Tegn på oxidativ stress – Hvordan sanser laktokokker mitomycin C tilsætning?	26
5.12. Tegn på bakteriofagstress – Hvordan sanser laktokokker bakteriofagangreb?	27
6. Samlet konklusion	29
7. Referencer (hele rapporten)	29
8. Publikationer og præsentationer	30
9. Forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og evt. forskerophold ved andre institutioner	31
10. Samarbejdsrelationer nationalt og internationalt	31
11. Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribruget	31
12. Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter	31

Forord

I denne afslutningsrapport præsenteres et samarbejdsprojekt mellem BioCentrum-DTU og Mejeri-brugets ForskningsFond, med Lektor Mogens Kilstrup fra Center for System Mikrobiologi, Bio-Centrum-DTU som projektleder. Projektet startede medio 2002 til ultimo 2006. Medarbejderne på projektet ønsker at takke Mejeribrugets ForskningsFond og Den Danske Forsknings- og Innovationsstyrelse for økonomisk støtte til projektet. Vi vil også takke Styregruppen og Mejeriforeningen for opbakning og diskussioner, der har været under projektforsløbet.

1. Medarbejdere

Lektor Mogens Kilstrup, Center for System Mikrobiologi, BioCentrum-DTU, Bygning 301, 2800 Kgs. Lyngby. Tlf: +45 45 25 25 28, Fax: +45 4593 2809, E-mail: mki@biocentrum.dtu.dk (Projektleder)

Lektor Ib Søndergaard, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU, Bygning 221, 2800 Kgs. Lyngby. Tlf: +45 4525 27 33, Fax: +45 4588 4922, E-mail: ibs@biocentrum.dtu.dk

Ljiljana Nesic (AC-TAP, ingeniør), Sektion for Levnedsmiddelproteiner, BioCentrum-DTU, Bygning 224, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby
e-mail: lnes@biocentrum.dtu.dk

Morten Ejby Hansen (ph.d.-studerende), Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU Bygning 301, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby
Tlf: 45 25 25 27, e-mail: mej@biocentrum.dtu.dk

2. Resumé af det samlede projekt

Under mælkesyrebakteriers fermentering af mælk sker der en gradvis ændring af cellernes omgivelser fra et aminosyrefattigt neutralt miljø til et surt miljø med overskud af små peptider fra kasein, som cellen kan nedbryde til aminosyrer. Projektet har været fokuseret på, om ændringerne i omgivelserne bliver sanset af mælkesyrebakterien *Lactococcus lactis*, medens den fermenterer. Dette er interessant, fordi vi derved har mulighed for at opdage, om der påtvinges bakterien alvorlige stressfaktorer i fermenteringsprocessen, som med fordel kunne fjernes. Måden, hvorpå vi har påvist bakteriernes sansning, er via de ændringer i cellernes genudtryk, som vi har kunnet detektere med de nye post-genomiske teknikker, DNA-mikroarray og proteomanalyse. DNA-mikroarray- og proteomanalyser er velegnede, da de kan kvantificere mængden af henholdsvis mRNA og proteiner fra alle cellens individuelle gener. For at kunne komme med kvalificerede gæt på, hvilke ændringer i omgivelserne cellerne har oplevet, måtte vi efterfølgende påvise sammenhænge mellem kendte, definerede stressformer og de medførte ændringer i genudtryk.

Et omfattende forsøg, som er det vigtigste delprojekt i hele forløbet, blev iværksat i duplikat, med podning af rekonstitueret skummetmælk med *L. lactis* fra hver sin eksponentielt voksende modersyrene. Herefter blev der taget prøver til proteinmærkning og RNA-oprensning samt bestemmelse af celleantal og pH. Efterfølgende blev de radioaktivt mærkede proteiner adskilt på 2D-geler, og syntesehastigheden af de individuelle proteiner blev bestemt. Ligeledes blev RNA-prøverne analyseret for mængden af mRNA fra alle cellens gener ved hjælp af DNA-mikroarrayanalyse. De sidste analyser blev foretaget i samarbejde med Dr. Jan Kok fra Universitetet i Groningen i Holland. På det nuværende tidspunkt af vores analyser, tyder resultaterne på, at mælkefermentering er en blid proces, hvis vi ellers skal fæste lid til laktokokkernes reaktionsmønster. Der fremkom ikke de store og pludselige ændringer i genudtryk, som man ellers ville have forventet, hvis cellerne under fermenteringen blev udsat for alvorlige stressbetingelser. Dog kunne vi detektere, at cellerne undervejs blev udsat for svage påvirkninger i form af oxidativ stress, syrestress og proteindenaturering. En meget interessant observation relaterer sig til GAPDH-trinnet i glykolysen, hvor *L. lactis* har to enzymer, hvor det ene (GapA) normalt er nedreguleret, og det andet (GapB) er ekstremt højt udtrykt. I de sidste faser af fermenteringen efter nedsyrningen skifter mængdeforholdet mellem de to enzymer, samtidig med at GapA-proteinets størrelse og ladning ændres. Dette tyder på både stressregulering og modificering af GapA.

Analyserne af mælkefermenteringerne blev muliggjort af, at der i projektet blev udviklet en metode til oprensning af rene bakterieceller fra ost og koaguleret mælk. En sådan metode har aldrig eksisteret før. Denne simple metode anvender opløsning af geler med guanidinium-chlorid, hvor mælkesyrebakterier efterlades fysisk intakte, så deres proteiner og RNA kan analyseres.

For at identificere de mindre ændringer i laktokokkernes genudtryk blev en række definerede stressbetingelser analyseret med enten DNA-mikroarrayanalyser, proteinmærkning eller begge dele, for at opnå metaboliske tegn på de specifikke stressomstændigheder.

Tegnene på energimangel blev identificeret ved vækst af bakterierne i overskud af aminosyrer og vitaminer, men med begrænset indhold af glukose. En alternativ metode var at anvende glukoseanalog, 2-deoxy-glukose. Til analysen af disse omstændigheder blev der i dette projekt udviklet en simplificeret metode til bestemmelse af ATP, ADP, GTP og GDP-indholdet i bakterier. Dette arbejde viste, at energisult blev sanset meget specifikt, og at kun et enkelt protein blev produceret i forøgede mængder. Dette protein er formodentlig involveret i beskyttelse af ribosomer mod inaktivering.

Mælk indeholder ikke puriner, som bruges i syntesen af ATP og GTP. Da det vides, at *L. lactis* har et delvist krav for disse forbindelser, identificerede vi også de metaboliske tegn på purinmangel. Denne analyse, som blev foretaget i samarbejde Novozymes, gav meget interessante resultater, som tydede på, at hurtig syrning også kan medføre GTP-mangel. Denne konklusion mangler dog at blive verificeret.

Tegnene på oxidativ stress blev identificeret ved hjælp af et antibiotikum, mitomycin-C, som danner oxygenradikaler, når det er blevet aktiveret inde i cellen. Denne analyse, som involverede brug af en bakteriofag-baseret indikator for DNA skader samt en *trmA* mutant med ændret regulering af chaperone gener, viste, at oxidativ stress medfører et unikt respons, hvor både den intakte ClpB chaperone og en mindre trimmet udgave opreguleres. I *trmA* mutanten blev det intakte ClpB protein yderligere opreguleret, men ikke den trimmede udgave.

Aminosyremangel bliver sanset af bakterier på flere måder. Den mest generelle sansning sker i det såkaldte stringent respons, som kan simuleres ved hjælp af et antibiotikum, mupirocin. Analysen af aminosyrestress viste meget tydelige ændringer af syntesen for en lang række proteiner, som dog ikke er identificeret endnu.

Bakteriofagangreb er en vigtig trussel mod laktokokkernes performance i mejeriindustrien. For at kunne genkende de tegn på bakteriofagangreb, som vi kan observere i laktokokkens genudtryk, gennemførte vi en række omfattende forsøg på både mRNA- og proteomniveau, med bakteriofagen TP901-1 og *L. lactis* subsp *cremoris* 3107. På vores skræddersyede DNA mikroarray havde vi allerede inkluderet prober for hele faggenomet, så vi kunne sammenholde fremkomsten af de fysiologiske tegn med faserne i bakteriofagens livscyklus. Vi observerede en interessant sammenhæng mellem de sene faser i bakteriofagens drab af laktokken og dennes genudtryk.

Samlet konklusion. Dette projekt har omfattet et studie af *L. lactis* genudtryk under mælkefermentering for at kortlægge bakteriens sansning af dens omgivelser. Hvis laktokokkerne havde responderet kraftigt på et givent tidspunkt under fermenteringen, kunne denne viden have dannet grundlag for optimeringer i processen, som kunne have medført en hurtigere syrning. Dette blev ikke observeret, og resultaterne tyder på, at syrningsprocessen foregår uden de store forhindringer undervejs. I slutningen af syrningsprocessen, hvor mediet er blevet så surt, at bakterievæksten ophører, sanser bakterierne det stressede miljø; men her vil der kun være en mejerimæssig fordel ved at optimere processen, hvis slut-pH ønskes ændret.

Som spin-off fra projektet kan nævnes: 1) En ny teknik til oprensning af mælkesyrebakterier fra ost og mælkekoagulat, 2) en forenklet teknik til bestemmelse af ATP, ADP, GTP og GDP, 3) En vel-fungerende high-throughput 2D-gel facilitet, 4) En mulig forbindelse mellem høj glycolytisk flux og GTP mangel, 5) En mulig forbindelse mellem energimangel og ribosomstabilitet og 6) viden om *L. lactis* sansning af energi-, purin-, oxidativ- og aminosyrestress og dens indvirkning på bakteriens genudtryk.

3. English Summary

While lactic acid bacteria ferment milk, the environment of the bacteria undergoes a gradual change from a neutral environment poor in amino acids to an acidic environment with plenty of available peptides from casein that can be broken down to amino acids. The project has focused on whether the changes in environment are sensed by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* while it is growing in milk. This is interesting because we thereby have the possibility to reveal if the bacte-

rium is experiencing harsh and stressful conditions that should be removed. The way that we have analyzed the bacterial sensing is via the changes in the gene expression patterns that we can detect by the post-genomic techniques DNA microarray transcriptomics and proteomics. Transcriptomics and proteomics techniques are adequate methods because they can quantify the levels of mRNA's and proteins from all genes in the cell simultaneously. To be able to make qualified guesses or interpretations of the environmental changes the bacteria had experienced, we had to identify the connections between known stress conditions and the resulting changes in gene expression.

A comprehensive experiment, which was the most important task in the project, was performed in duplicate, by inoculation of reconstituted skimmed milk with *L. lactis* from an exponentially growing milk culture. Samples were withdrawn for labeling of proteins and RNA extraction as well as for determination of cell count and pH. Subsequently, the radioactive proteins were separated on 2D-gels and the proteome synthesis rates were determined. RNA samples were quantified for all mRNA levels using DNA microarray analysis. The latter analysis was performed in collaboration with Dr. Jan Kok at the University of Groningen in the Netherlands. At the present stage of our investigations, the results suggest that milk fermentation is a fairly gentle process when evaluating the lactococcal reaction pattern. No drastic changes in gene expression occurred as you might have anticipated if the cells were shocked during fermentation. We detected many indications, however, that the cells were subjected to weaker influences in the form of oxidative, acid and denaturing stresses throughout the process. A very interesting observation is related to the GAPDH step in glycolysis where *L. lactis* has two enzymes; one (GapA) is normally down regulated and the other (gapB) is expressed to extremely high levels. In the last phases of the fermentation, after the acidification, the levels of the two isoenzymes change, concomitant with a change in charge and size of GapA. This points at both stress regulation and modification of GapA.

The analysis of the milk fermentation was made possible by a method for purification of bacteria from cheese and coagulated milk. Such a method has never been proposed before. The method uses solubilization of casein gels with guanidinium chloride, where bacteria are left physical intact for proteomic or transcriptomic analysis.

To identify the minor changes in the lactococcal gene expression pattern, a number of defined stress conditions were analyzed by either proteomics, transcriptomics, or both. The stress conditions analyzed were: energy depletion, purine depletion, oxidative and DNA damage stress (mitamycin C), general amino acid depletion stress (stringent response induced by mupirocin), and bacteriophage induced stress.

4. Introduktion

Som introduktion til denne rapport gives først et overblik over baggrunden for projektet, derefter ideerne bag valg af metode, begrundelse for valg af modelstammen samt informationer omhandlende mejerirelevante stressrespons i *Lactococcus lactis*.

4.1. Baggrund

Mælkesyrebakterien *L. lactis* bliver i stor udstrækning benyttet som primær starterkultur i fermenterede mejeriprodukter, hvor dens vigtigste funktion er at omdanne af mælkesukker til mælkesyre. Imidlertid er fermenteringsprocessen ikke så simpel, som den umiddelbart kunne lyde, da mælkesyrebakterier kræver en mængde næringskilder, som skal være tilgængelige på de rigtige tidspunkter.

Hvis mælkesyrebakterierne havde vokset i flere millioner år i en stabil niche, som det er tilfældet for de fleste bakterier, ville der ikke have været tvivl, om at de havde opnået en perfekt tilpasning til mælke mediet. Men alt tyder på, at opsamling af mælk er et menneskeligt kulturfænomen, som opstod med husdyrholdet for omkring ti tusinde år siden, hvorfor mælkesyrebakterierne ikke har haft så lang tid til at tilpasse sig. Man kunne forestille sig, at mælkesyrebakterier havde haft spildt mælk fra pattedyr som de tidligste nicher, men den lille mængde af mælk, der bliver spildt under digningen og de store afstande mellem mælkespildet, må have været et meget dårligt grundlag for tilpasningen. En mere oplagt mulighed er, at mælkesyrebakterier har levet af søde frugter, hvor deres fermentative stofskifte kan have udgjort en stor fordel i forhold til konkurrerende bakterier. Der er således meget, der tyder på, at mælkesyrebakterier ikke har haft tid til at tilpasse sig fuldstændig til mælke mediet. Menneskets indgriben med forædling af gode mælkesyre kulturer gennem de ti tusind år med husdyrhold har dog haft en positiv effekt, men det har aldrig været undersøgt, i hvor høj grad mælkesyrebakterierne har været tilpasset. Dette projekts mål var at undersøge, hvorvidt processen kunne optimeres endnu mere.

Mælke mediet er potentiel et meget rigt medium, men hvor mælkesukkeret og de fleste vitaminer er umiddelbart tilgængelige, kræver tilførslen af de nødvendige aminosyrer, at mælkeproteinet kasein bliver nedbrudt af proteaser, som bakterierne selv producerer. Det vil sige, at i starten af fermenteringsprocessen, hvor der ikke er så mange bakterier vil der ikke blive nedbrudt så meget kasein. Man kan derfor forudsige, at der kan opstå situationer med underskud af aminosyrer under en normal mælkefermentering, hvis der ikke podes med nok modersyre. Men i modsætning til denne situation, kunne man senere i forløbet tænke sig, at nedbrydningen af kasein gik så hurtigt, at cellen ville kunne ophobe aminosyrer, hvis den ikke havde mekanismer til at stoppe optagelsen.

4.2. Problemstillingen

Som det blev forklaret ovenfor, vil det være af stor vigtighed for mejeriindustrien at få opklaret, om mælkesyrebakterien *L. lactis* er fuldt tilpasset til vækst i mælk, eller om der findes faser i syrningsprocessen, hvor bakterien oplever mælke mediet som stressende og derfor ikke opererer med fuld effektivitet. Hvis sådanne omstændigheder kunne identificeres, er det af stor vigtighed at opklare, hvilke typer af stress, det drejer sig om, så disse eventuelt kan elimineres.

4.3. Modellsystemet

For at kunne angribe problemstillingen, som den er blevet beskrevet ovenfor, ville det være en fordel, hvis vi kunne læse *L. lactis*'s tanker. I stedet for tankelignende processer har bakterier imidlertid et meget veludviklet sanseapparat, som kan opfange signaler om en lang række potentielt farlige tilstande. Ofte optager sådanne reguleringsmæssige systemer over en fjerdedel af den samlede informationsmængde i genomet, så de har været meget vigtige for arternes overlevelse. Sanseapparatet er koblet til et regulatorisk netværk af proteiner og RNA-molekyler, som modificerer cellens metabolisme til større resistens mod den truende fare. Ændringerne kan ske på flere niveauer. Den hurtigste måde en bakterie kan gennemføre den fysiologiske tilpasning på, er ved modificering af de aktive (eller inaktive) proteiner i metabolismen ved nedbrydning af proteinerne eller ved påsætning af hæmmende eller aktiverende kemiske grupper. En lidt langsommere metode, som dog er den dominerende metode blandt bakterier, anvender ændringer af genudtryk. Hvis resistensen mod en potentielt farlig stressomstændighed kan forøges ved hjælp af et givent protein, vil de regulatoriske netværk forøge udtrykket af det gen som koder for proteinet. Som eksempel kan nævnes, at hvis *L. lactis* udsættes for omstændigheder, hvor en stor del af dens proteiner denatureres, vil mængden af disse proteiner signalere til det regulatoriske netværk, at der er brug for chaperoner til at hjælpe

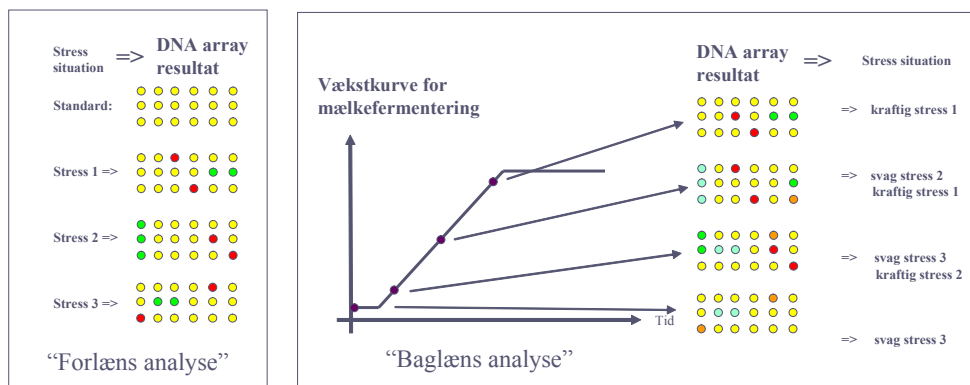
proteinerne tilbage i deres aktive form. Dette sker ved at en blokering af chaperone-genernes udtryk, som findes under normale omstændigheder, bliver ophævet. Herefter bliver der produceret en mængde chaperone-specifikt mRNA (messenger RNA) som derefter bruges til syntese af en stor mængde chaperone-protein. Dette er blevet undersøgt i det tidligere MFF projekt ”varmeshok i *Lactococcus lactis*”. Årsagskæden i eksemplet ovenfor er således:

Denaturerende stress => denaturerede proteiner => højt niveau af chaperone-mRNA => hurtig syntese af chaperone-protein => højt niveau af chaperone-protein.

I dette projekt forsøger vi at vende årsagskæden om, så vi får følgende forudsigelse:

Højt niveau af chaperone-protein → hurtig syntese af chaperone-protein → højt niveau af chaperone-mRNA :→ denaturerede proteiner :→ denaturerende stress

I den direkte årsagskæde betyder pilen (=>) ”medfører”, men i den omvendte kæde betyder ”kolon-pilen” (→) ”er tegn på”. Inden for stressforskningen er der almindelig enighed om, at et højt niveau af stress-mRNA eller stressprotein, eller en hurtig syntese af stressprotein, er et tegn på, at cellen har været udsat for stress. Det betyder, at den omvendte årsagskæde, altså tegnfølgen, er anvendelig til forudsigelser. I praksis betyder det, at vi ved at måle syntesen af hvert protein og mængden af hvert mRNA i cellen vil kunne tolke tilbage og få indikationer på, hvordan cellens omgivelser var, da prøverne blev taget. Denne metode har vi prøvet at anskueliggøre i nedenstående figur 1.



Figur 1. Tydning af metaboliske tegn på forskellige stressomstændigheder. I den forlæns analyse identificerer vi de metaboliske tegn på kendte stressomstændigheder (her eksemplificeret ved et DNA-arrayresultat). Hvis et af disse tegn identificeres i den baglæns analyse, kan vi bruge det som indicie på, at cellen har oplevet den pågældende stressomstændighed.

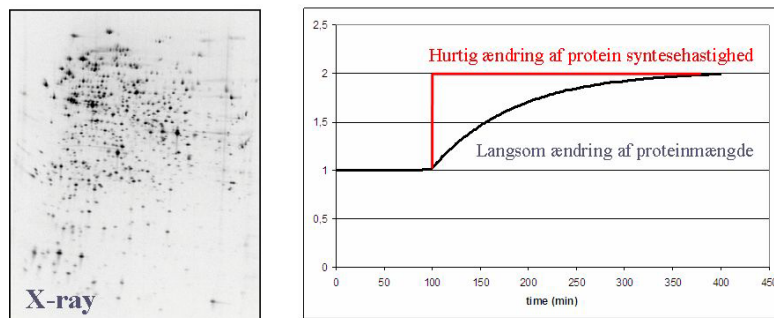
4.4. Proteom og transkriptom, to nødvendige begreber

I projektet har vi valgt at anvende proteomanalyseteknikken til at kvantificere syntesehastigheden af de enkelte proteiner i cellen. Begrebet ”proteomanalyse” dækker over en række sammenhørende teknikker, hvorved cellens samlede indhold af proteiner kan analyseres i et enkelt eksperiment. Efter at ordet ”genom” blev accepteret som en betegnelse for samlingen af alle cellens gener, blev det klart at sådanne fællesbetegnelser er nødvendige, når en celleds overordnede funktion skal beskrives. Begreberne er således helt uundværlige i den fremtidige system-mikrobiologi. Derfor opstod begreberne ”en celleds proteom” for samlingen af alle cellens proteiner og ”en celleds transkriptom” for samlingen af alle cellens genetiske transkripter. Transkriptomet står altså i praksis for samlingen af cellens mRNA. Vi arbejder tillige med begreberne ”proteomsyntese” for syntesen af de individuelle

proteiner i proteomet, ”proteomsyntese­hastighed” for syntese­hastigheden af de individuelle protei­ner i proteomet og ”proteomsammensætning” for mængderne af de enkelte proteiner i proteomet.

4.5. Proteomanalyser

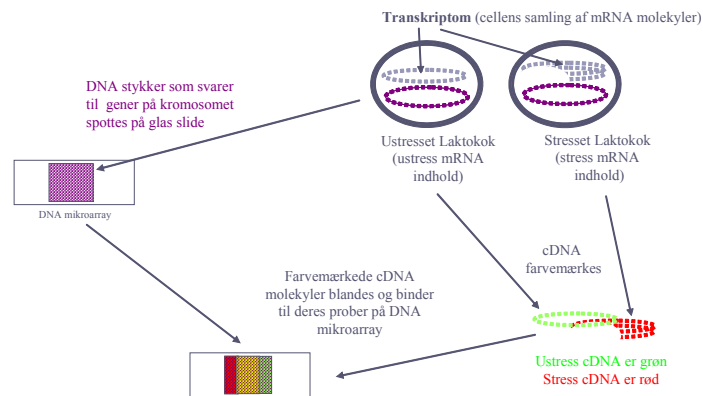
I vores proteomanalyser valgte vi primært at analysere proteomsyntese­hastigheden, og ikke pro­teomsammensætningen. Dette gjorde vi ved at mærke alle nydannede proteiner med radioaktive aminosyrer i en 10 minutters puls. Derved bliver mængden af radioaktivitet i hvert protein et mål for dets syntese­hastighed [1]. Efter mærkningen blev cellerne slået i stykker og proteinerne ekstra­heret og adskilt ved 2-dimentional gelelektroforese. På de tørrede geler, som måler omkring 25 x 30 cm, har vi derefter målt radioaktiviteten i hver af de adskilte proteinpletter ved hjælp af en STORM phosphor imager (se figur 2).



Figur 2. forskellen mellem analyser af proteinmængde og syntese­hastighed. Ved ana­lyser af protein mængde farves gelerne med coomassie brilliant blue og mængden af farve i hver plet måles. Ved analyser af syntese­hastigheden mærkes alle nydannede proteiner med radioaktive aminosyrer, og kvantificeres derefter med en phosphorimager. Den sorte sværtning af pletterne angiver mængden af radioaktivitet der blev inkorporeret på ti mi­nutter, altså syntese­hastigheden.

Da vi ikke kendte placeringen af de forskellige proteiner på gelerne, og da proteomanalysen kun er brugbar, hvis vi kan relatere proteinpletter med de gener på kromosomet, som de var udtrykt fra, fik vi identificeret en lang række proteiner ved hjælp af massespektrometri. Her skulle vi klippe pletter ud af gelerne og derefter fordøje dem med proteasen, trypsin. Ved hjælp af massespektrometri kunne vi herefter, i samarbejde med Peter Roepstorff’s gruppe på Odense Universitet, bestemme den nøjagtige størrelse af de nedbrudte proteinstykker og dermed identificere proteinerne.

4.6. Transkriptomanalyser



Figur 3 Analyser af mRNA-niveauer (transkriptomanalyse) ved DNA-mikroarray analyse. Hver mRNA-molekyle (grå farve) er kodet af et gen på kromosomet (violet farve). DNA-array'et er opbygget af prober for hvert gen (violet), bestående af DNA fra det indre af genet. Disse prober kan danne en dobbeltspiral (hybridisere = danne et hybrid) med farvemærket cDNA fra samme gen, men ikke med andet cDNA. Analysen består i, at mRNA, der er oprenset fra bakterier, som har groet under to forskellige omstændigheder, bruges til at syntetisere henholdsvis rødt og grønt cDNA. Ved at blande de to cDNA opløsninger på DNA-array'et vil cDNA for hver gen blive fanget af den specifikke probe. Ved at måle mængden af rød og grøn farve i hver spottet probe, kan man indirekte måle forholdet mellem mRNA fra hvert gen i de to omstændigheder.

I transkriptomanalysen anvendte vi RNA, som var oprenset fra kulturerne på forskellige tidspunkter. Proceduren er den almindelige DNA-mikroarray-metode for transkriptomanalyse af bakterier (se figur 3). Ved hjælp af et DNA-syntetiserende enzym, revers transkriptase, som kan syntetisere en DNA-kopi af en RNA-kæde, producerede vi DNA-kopier (cDNA) fra alle mRNA-molekylerne. Ved at anvende et fluorescerende substrat i reaktionen kunne vi producere forskelligt farvede cDNA-kopier for forskellige vækstomstændigheder. Forholdet mellem mRNA-niveauerne for hvert enkelt gen kunne herefter analyseres ved at blande forskelligt farvet cDNA for to forskellige vækstomstændigheder, og separere de forskellige cDNA-typer ud på et DNA-mikroarray. DNA-arrayet indeholdt prober for hver af de individuelle gener, spottet i små pletter med radius på ca. 1/10 mm. Et komplet array for *L. lactis* indeholdt ca. 6.000 spots, da alle prober var spottet i tripliket. Kvantificeringen af de to farveintensiteter i de fluorescensfarvede pletter skete med et automatisk fluorescens mikroskop, som skannede hele arrayet i høj opløsning. Herefter blev dataserierne normaliseret ved hjælp af bioinformatiske teknikker, så de kunne sammenlignes indbyrdes.

4.7. "Data mining"

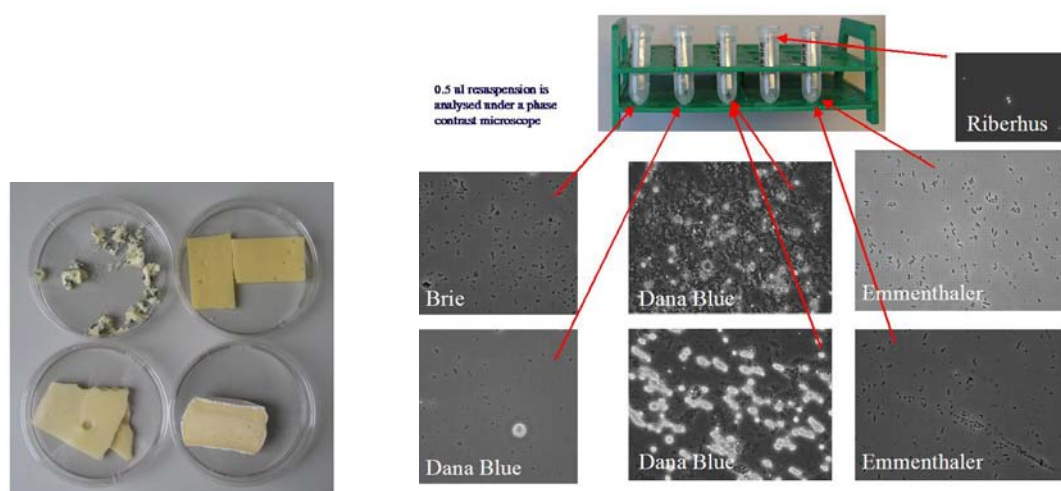
Outputtet fra proteom- og transkriptomanalyserne var som beskrevet data, der beskrev forholdet mellem genudtryk fra to vækstomstændigheder. Fra proteomanalysen fik vi data om proteinsyntese-hastigheder, der stammede fra både kendte og ukendte gener, medens transkriptomanalyserne gav data om mRNA-niveauer fra et udvalg eller alle de kendte gener i bakterien. Det største arbejde, som formentlig aldrig vil kunne færdiggøres i nogen proteom- eller transkriptomanalysen, er det man bioinformatisk kalder for "data-mining", eller på Dansk "data-minering"; nemlig udgravningen af de små guldklumper af ny viden, der gemmer sig i de enorme bjerge af data, som er skabt.

5. Resultater og diskussion

I det følgende findes detaljerede beskrivelser af resultater opnået for de enkelte punkter i projektet.

5.1. Ny teknik til isolering af bakterier fra ost og koaguleret mælk

Under mælkefermentering sker der en koagulering af mælkemediet, som tidligere har umuliggjort proteom- og transkriptomanalyser. I dette projekt udviklede vi en meget simpel metode til isolering af bakterier fra koaguleret mælk eller endog ost (se figur 4), som gør analyserne uproblematiske. Metoden er beskrevet i et manuskript ”Fractionation of lactic acid bacteria from casein gels and mature cheese for proteome and RNA analysis” som snart vil blive sendt ind til tidsskriftet *Proteomics*.

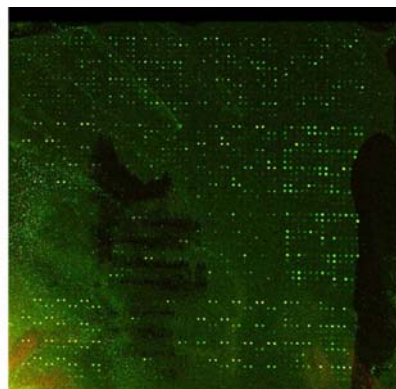


Figur 4. Oprensning af bakterier fra ost. Osten blev opløst i en blanding af sprit og guanidinium chlorid i vand. Efter centrifugering ved lav hastighed fremkom der en tåget mellemfase, som indeholdt rene bakterier. Efter vask kunne disse mikroskoperes (højre panel) eller anvendes til proteomanalyse. Metoden kunne anvendes på alle fermenterede mælkeprodukter, og er her vist for brie, Danablue, Riberhus og Emmentaler.

5.2. Konstruktion af DNA-array

Vi har i projektet anvendt både et mindre skræddersyet DNA-mikroarray, som vi konstruerede i samarbejde med Allan Nielsen på Novozymes, og et fuldt genom DNA-mikroarray, som vi fik lov at benytte i samarbejde med Jan Kok på Universitetet i Groningen. Det skræddersyede array blev brugt i analyserne af purinmangel stress og bakteriofagstress, hvor alle eksperimenterne blev udført på Novozymes, henholdsvis af dem og os. Der blev brugt en stor del af projektets ressourcer på at konstruere og indkøbe en udvidet version af arrayet i vores eget laboratorium. Desværre viste det sig, at det var umuligt at få procedurene optimeret til produktion af højkvalitets data uden en array scanner i huset. Efterfølgende har vi hørt fra både Novozymes og Christian Hansen A/S at en *in-house* scanner er absolut nødvendig i optimeringsfasen. En sådan scanner koster næsten en halv million kroner, så det var uden for rækkevidde. I figur 5 ses et af de bedste billeder fra det nye array.

Figur 5. Skræddersyet DNA-mikroarray. Arrayet indeholder prober for 557 gener i tripliket, inklusive prober for ribosomal RNA (rRNA). Det viste array blev brugt til at analysere RNA fra to identiske omstændigheder. Pletterne er alle gule, da de indeholder lige meget rød og grøn fluorescerende farve.



5.3. Opgradering af 2-dimensionel gel elektroforese og analyseprogram

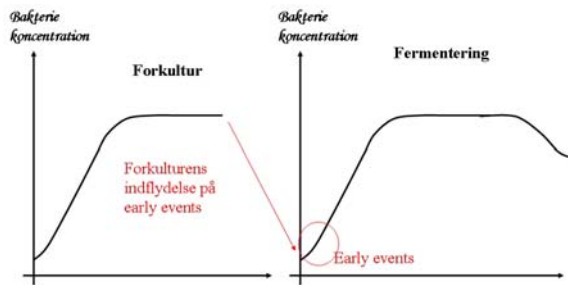
Ved projektets start rådede vi over et ældre udstyr til 2D gelelektroforese, hvor hver gel kostede over fem hundrede kroner i anskaffelse. I starten af projektet blev dette udstyr udskiftet med et moderne *high-throughput* system med billige hjemmelavede geler. Denne opgradering har været til stor gavn for institutionen. Samtidig fik vi gennem LMC finansieret en editor (35.000 kr.) til det førende 2D-gelanalyse-program, Progenesis.

5.4. Forenklet teknik til måling af GTP, GDP, ATP og ADP-niveauer i celler

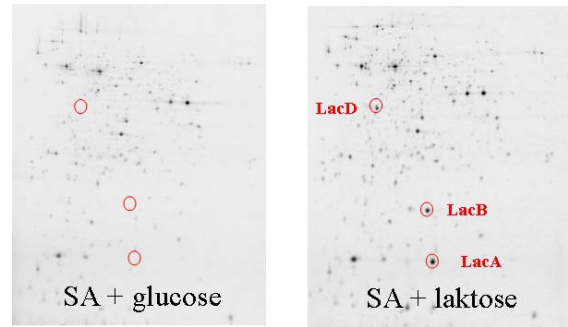
Til vores analyser af energimangelstress og purinmangelstress havde vi brug for en hurtigere og enklere metode til samtidig bestemmelse af niveauerne af nukleotiderne GTP, GDP, ATP og ADP inde i cellerne. Vi foretog flere forenklinger af den oftest anvendte teknik, hvor cellerne mærkes med radioaktiv fosfat, og de radioaktive nukleotider derefter bliver adskilt ved tyndtlags kromatografi (TLC). Vi konstruerede en mikropipette til oprensning af nukleotiderne på aktivt kul, hvorefter TLC adskillelse var meget enklere.

5.5. Forkulturens indflydelse på laktokokkernes mælkefermentering

Den vigtigste fase i projektet var påvisningen af, hvordan laktokokkerne sanser mælkefermenteringen. Imidlertid vidste vi, at forkulturen var meget vigtig i forhold til de fysiologiske ændringer i starten af mælkefermenteringen, de såkaldte *early events*. Det ses afbildet i figur 6. Vi besluttede i projektet at arbejde med efterkommere af stammen MG1363, som vi tidligere havde undersøgt for stressresistens i samarbejde med MFF. Denne stamme blev transformeret med et plasmid fra mejeristammen NCDO712, som muliggjorde vækst med laktose som energikilde. På figur 7 ses proteinsyntesemønstret i resulterende stamme ME310, når den gror på henholdsvis glukose og laktose. Det ses tydeligt, at laktose inducerer dannelsen af fire proteiner i forhold til vækst på glukose. Disse proteiner er senere identificeret som LacA, LacB og LacD-enzymene i tagatose-nedbrydningsvejen, hvis gener findes på det indførte plasmid.

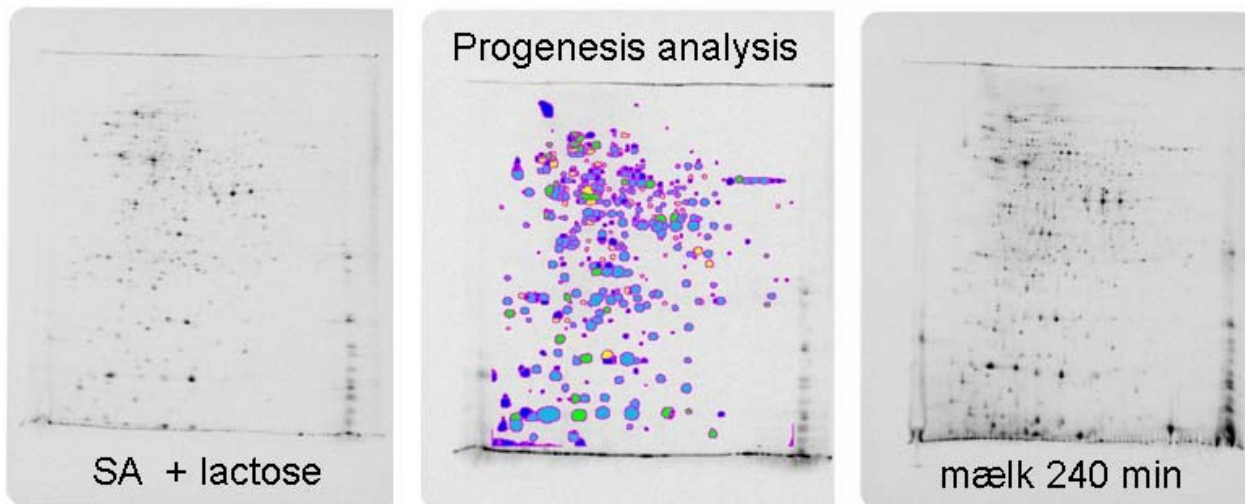


Figur 6. Grafisk fremstilling af forkulturens indflydelse på de tidlige fysiologiske ændringer.



Figur 7. Laktoseinduktion af LacA, LacB og LacD - enzymerne i tagatose-nedbrydningsvejen i *L. lactis* ME310.

Stammen ME310 blev anvendt i alle forsøg med fermentering af mælk. Fra egne og publicerede studier af mælkefermenteringer [2,3] var vi klar over, at mælk ikke indeholder puriner, og at purin-tilsætning forøger væksten af laktokokker. Derfor forventede vi, at der kunne være forskelle på laktokokkernes sansning af de første faser i mælkefermenteringen, hvis de kom fra en forkultur, henholdsvis med og uden supplement af puriner. Dette ses i figur 9. Ændringen i mønsteret af proteinsyntese-hastigheder mellem 5 og 10 minutter efter overførsel til mælk så meget forskellig ud, alt efter om forkulturen havde været tilsat puriner eller ej. Dette er meget interessant, da vi her kunne udlede forskellige tegn i cellens proteomsyntese på en begivenhed, der var foregået i fortiden. Dette aspekt blev dog ikke analyseret videre, men det var godtgjort at forkulturen har en stor indvirkning på den efterfølgende mælkefermentering. I figur 8 kan det ses, hvor stor en forskel der kunne detekteres i proteomsyntese-hastigheden mellem SA medium med laktose og mælk

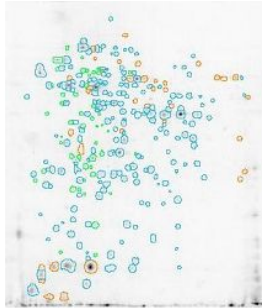


Figur 8. Progenesis-analyse af forskellene i proteomsyntese-hastigheden mellem SA medium og mælk. I midten af de to geler med radioaktiv sværtning ses resultatet en sammenligning ved hjælp af analyseprogrammet, Progenesis.

Forhistorie:
Eksponentiel vækst i SA medium med laktose, puriner og pyrimidiner

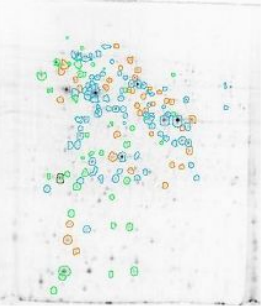
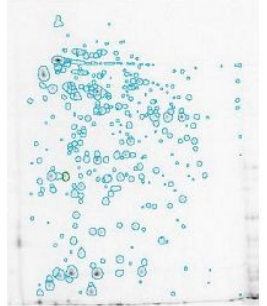


efter 5 min i mælk



efter 10 min i mælk

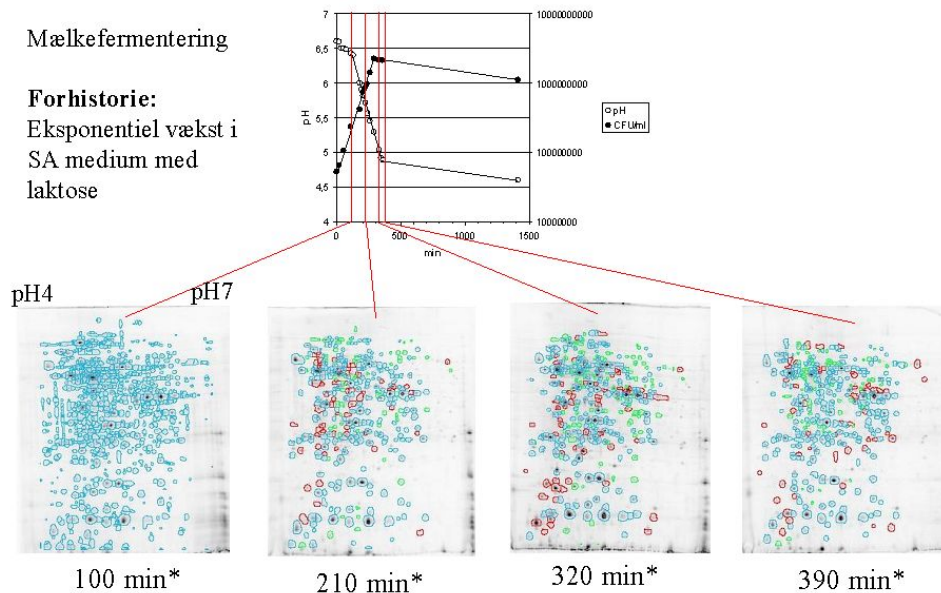
Forhistorie:
Eksponentiel vækst i SA medium med laktose



Figur 9. Forkulturens indvirkning på proteinsyntesehastigheder under mælkefermentering. ME310 blev podet med forkulturer i SA medium med laktose og henholdsvis puriner + pyrimidiner (øverste) eller ingen supplement (nederste). De viste billeder er visualiseringer fra analyseprogrammet Progenesis, hvor de venstre geler (5 min) blev brugt som referencer, medens de højre (10 min) blev sammenlignet for påvisning af stigning (rød omkransning) eller fald (grøn omkransning) i mængden af radioaktivitet. Blå omkransning står for uforandret syntesehastighed. Det ses, at der er stor forskel på fordelingen af op- og nedregulerede proteiner afhængigt af, om forkulturen har været tilsat puriner og pyrimidiner.

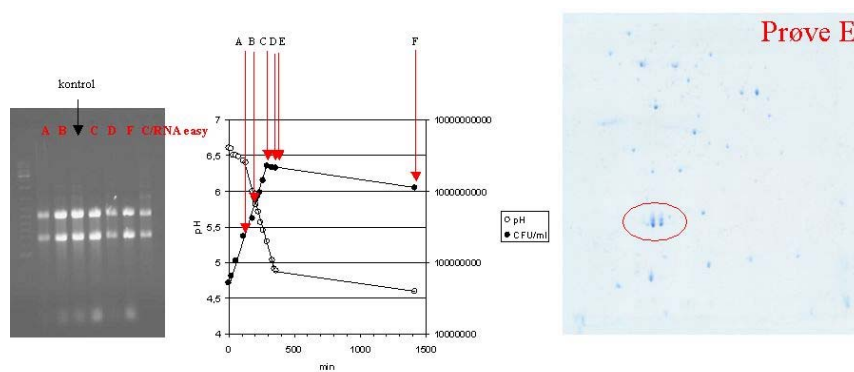
5.6. Mælkefermentering med eksponentielt voksende forkultur i SA medium

Der blev foretaget en række omfattende mælkefermenteringer, podet fra eksponentielt voksende kulturer i SA medium. Der blev udtaget prøver til bestemmelse af celleantal, pH, proteinsyntesehastigheder og RNA-analyser. I figur 9 ses en proteomanalyse af en af fermenteringsreaktionerne.



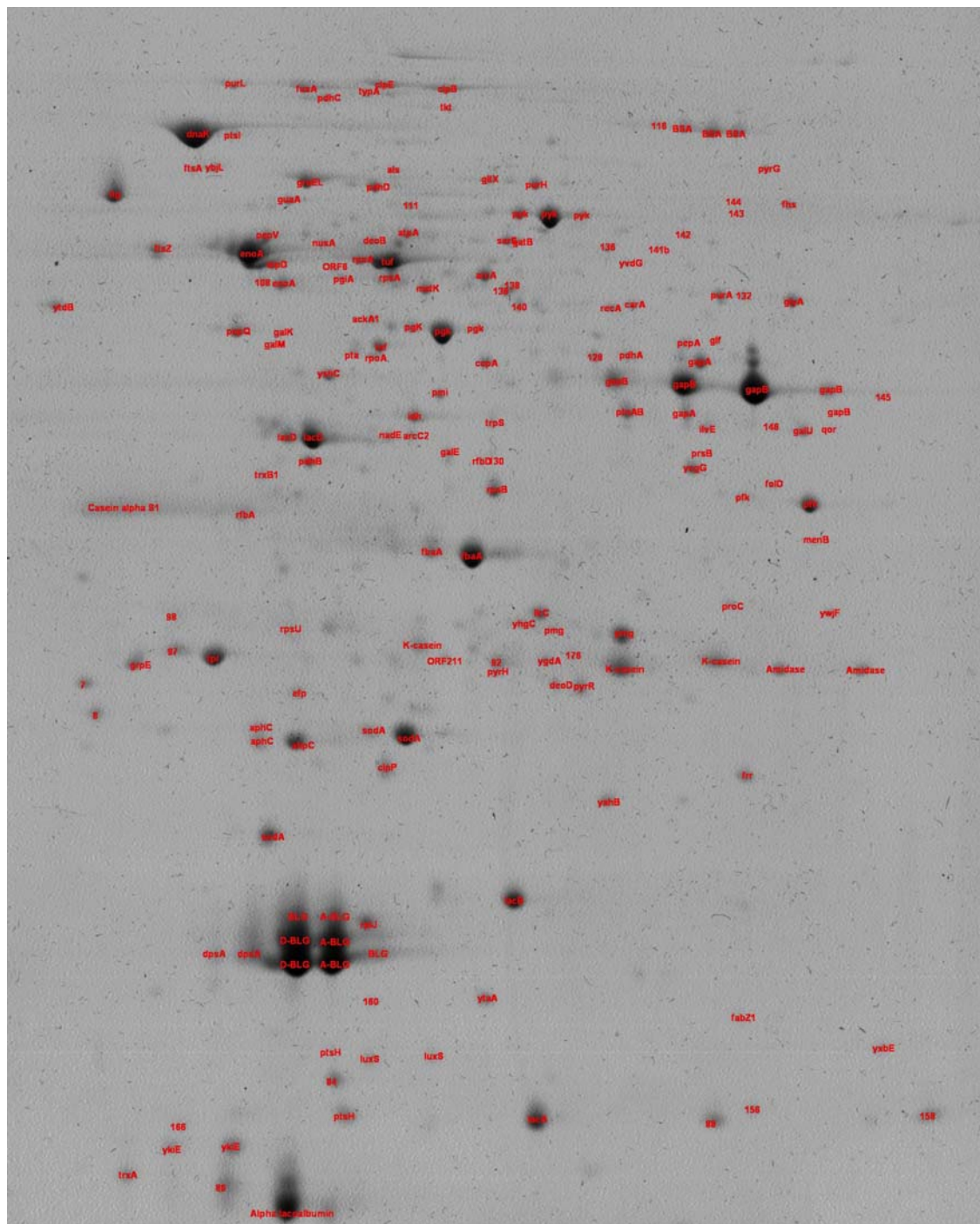
Figur 9. Ændringer i proteomsyntesen under mælkefermentering. En mælkekultur blev podet med eksponentielt voksende ME310 i SA medium med laktose. Sammenhængen mellem tid, pH og celleantal ses i diagrammet for oven. Underenden ses resultatet af proteomanalysen, der viser stigninger (rød omkransning) eller fald (grøn omkransning) i proteinsyntesehastigheden til forskellige tider sammenlignet med 100 minutters prøven. 100 minutters prøven er en god reference, da kulturen der stadig er eksponentielt voksende ved neutralt pH.

I disse tidlige mælkefermenteringer var metoden til ekstraktion af bakterier fra koaguleret mælke-medium lige blevet udviklet. Imidlertid har den fungeret optimalt i alle de omstændigheder, vi har anvendt den på. På figur 10 fremgår det, at oprensningerne af både RNA og protein fungerede perfekt. Normalt er det umuligt at analysere mælkesyrebakteriers proteiner i mælk, da bakteriernes proteiner udgør en meget lille del af den samlede proteinmængde i mælkefermenteringerne, og mælkeproteinerne overskygger billedet totalt. I vores analyser var der ingen dominerende mælkeproteiner, selv om vi blev forbavsede over de tre kraftige proteinpletter, der er vist med en rød omkransning på figur 10. Specielt blev vi forbavsede, da det viste sig, at proteinerne kunne identificeres som forskellige varianter af valleprotein β -lactoglobulin (se figur 11), som er kendt for ikke at fælde ud under mælkesyrningen. Vi var specielt overraskede, da der kun var svage spor af kasein, som måske kunne forventes at fælde ud sammen med bakterierne. Da vi havde vasket cellerne med guanidinium klorid, som opløser næsten alle proteiner, havde vi ikke forventet at se nogen proteiner overhovedet. For at analysere fænomenet i større detaljer tilsatte vi fluorescerende β -lactoglobulin til voksende laktokokker i SA medium med laktose. Efter vask af bakterierne kunne vi med fluorescensmikroskopi detektere laktoglobulinet på overfladen og ikke i bakteriernes indre. Vi har ikke undersøgt fænomenet videre, men vi forestiller os at den stabile binding af β -lactoglobulin må have indvirkning på aspekter af bakteriens funktion.



Figur 10. Oprensning af RNA og proteiner fra isolerede bakterier efter mælkekoagulering. En række prøver til både RNA- og proteinoprensning blev udtaget til tidspunkterne A-F. Ved punkt E var mælken koaguleret. Til venstre ses RNA oprenset fra prøverne og til højre ses mængderne af proteiner i en coomassie-farvet 2D-gel. En rød cirkel er tegnet omkring pletterne for valleprotein β -lactoglobulin som fulgte med under isoleringen af bakterierne.

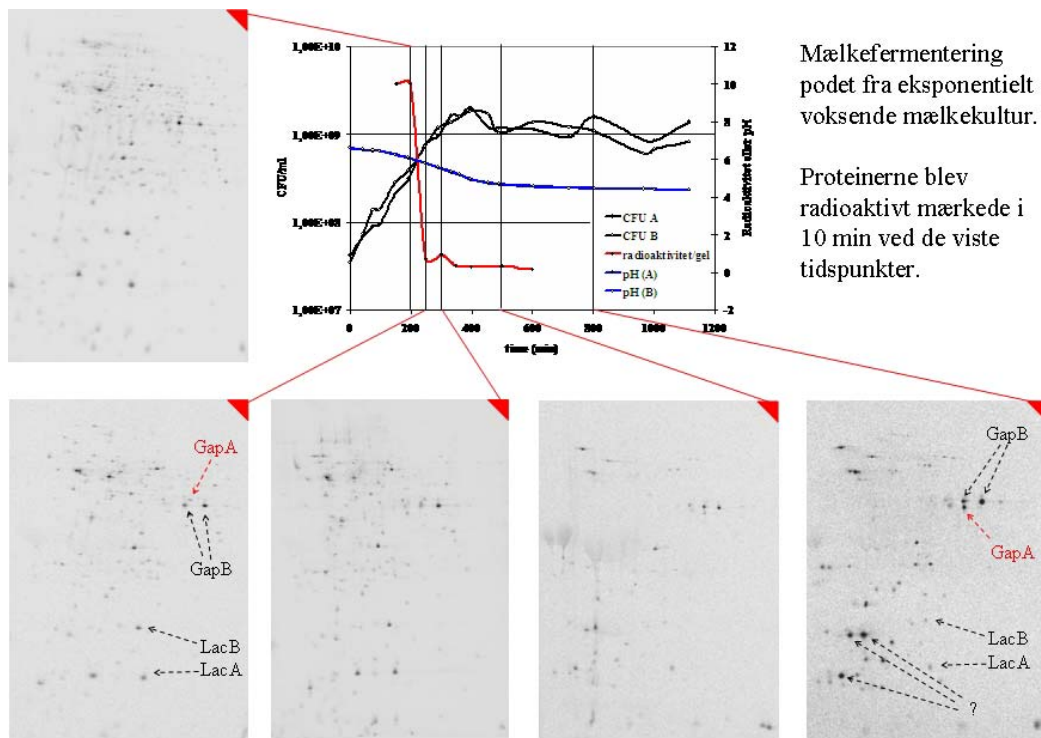
For at identificere eventuelle mælkeproteiner og opnå et oversigtskort over laktokokproteinerne på vores 2D-geler identificerede vi en stor del af de synlige proteiner fra gelen vist på figur 10. Identifikationen blev foretaget af Morten Ejby i Peter Roepstorff's laboratorium på Syddansk Universitet. Her fandt vi alle enzymerne fra glykolysen, hvoraf en del eksisterede i flere isoformer. Mange af disse isoformer skyldes sandsynligvis små fejl i syntesen af proteinerne, men både GapA og GapB-enzymernes mange isoformer og Pgm's to isoformer var lokaliseret i forhold til hinanden på en måde, hvor det var usandsynligt, at det skyldes fejl, men må skyldes tilsigtede eller utilsigtede funktionelle ændringer. Fra publicerede analyser ved vi, at den midterste isoform af GapB er en inaktiv variant, hvor en cystein-gruppe er omdannet til svovlsyrling-gruppe. Mange yderligere proteiner blev identificeret fra de fleste områder af metabolismen såsom chaperoner og stressproteiner, samt enzymer, metabolismen af aminosyrer, sukker, puriner og pyrimidiner.



Figur 11. Identifikation af proteiner ved massespektrometri. Proteinpletterne fra gelen I figur 10 blev skåret ud af gelen, nedbrudt til små peptider med proteasen trypsin, medens de fandtes i gelen, og til sidst blev peptiderne ekstraheret fra gelerne og deres størrelser nøjagtigt bestemt med massespektrometri. Analyserne blev foretaget i Peter Roepstorff's proteinlaboratorium på Syddansk Universitet.

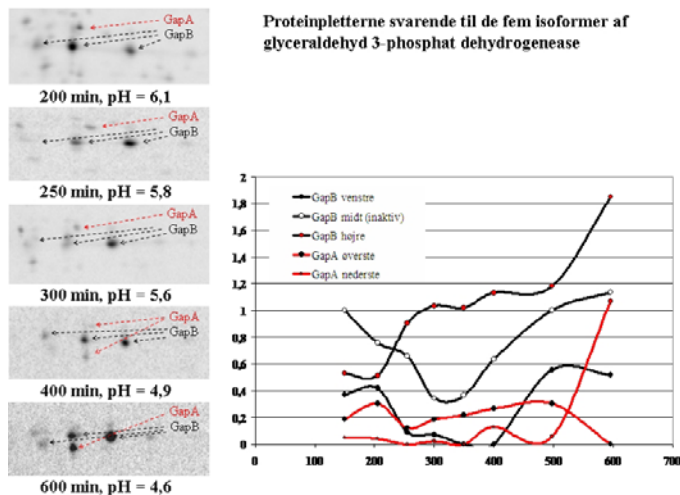
5.7. Laktokokkernes sansning af mælkefermenteringsprocessen.

I vore tidligste mælkefermenteringsreaktioner anvendte vi eksponentielt voksende kulturer i SA medium med laktose som forkultur. Denne metode var tydeligvis meget fjern fra mejeriernes udvoksede forkulturer i mælk, og var derfor ikke en ideel modelsituation, hvis vi som planlagt skulle undersøge mejerirelevante omstændigheder. Derfor brugte vi megen tid på at definere omstændighederne, da vi indgik et samarbejde med Dr. Jan Kok's gruppe ved Groeningen Universitet i Holland. Dr. Jan Kok havde inviteret til et samarbejde omkring DNA-arrayanalyser med deres fuldgenom array, da han havde set vores poster med de tidlige mælkefermenteringer på et internationalt møde omkring mælkesyrebakterier (LAB 8). På trods af at det ikke svarer helt til mejeriprocessen, valgte vi at anvende en eksponentielt voksende kultur i mælk som forkultur, for at få så reproducerbare omstændigheder som muligt. På figur 12 kan det ses, at pH-forløbet blev identisk for de to kulturer vi endte med at analysere. Celleantallet var også tæt på at være identisk, men der var dog en forskydning i væksten, der medførte, at vi ikke kunne anvende prøverne som dobbeltbestemmelser. Da vi analyserede den totale proteinsyntesehastighed, så vi en markant nedgang i de prøver, der var udtaget fra omkring pH 4 (figur 12). I de samme prøver observerede vi, at proteinsyntesemønstret ændrede sig markant, men de største ændringer skete dog i den sidste del af fermenteringen. Efter 800 minutter (ca. 13 timer), hvor væksten havde været gået i stå i flere timer på grund af nedsyrningen, stoppede al proteinsyntese og gelerne indeholdt ingen radioaktivitet. Man skal huske på, at det ikke var mængden af protein, der blev målt, da denne formodentlig var konstant gennem hele fermenteringen. Når vi analyserede mængden af RNA, vi kunne ekstrahere gennem fermenteringen, fra et konstant antal celler, så vi den samme mængde på nær et markant fald i RNA omkring 300 til 500 minutter. Dette fald kan relateres til et brat fald i væksthastighed og derefter i antallet af koloniformende bakterier (se figur 14). Sammenfaldet kunne skyldes, at bakterierne i denne fase undergik en stressreaktion, som medførte, at de var sværere at slå i stykker i forbindelsen med RNA-ekstraktionen.



Figur 12. Proteomsyntesen i ME310 under mælkefermentering efter podning med eksponentiel voksende mælkekultur. I diagrammet ses sammenhængen mellem tiden, pH, bakterieantal (CFU) og total proteinsyntesehastighed (radioaktivitet/gel). Lokaliseringen af radioaktive proteinpletter er vist for et udvalg af geler.

To meget interessante observationer er indtil nu gjort ved analyse af gelerne. Som det kan ses af figur 12, induceres der mindst tre små proteiner efter 800 minutter. Disse er vist med spørgsmålstegn, da vi endnu ikke har identificeret dem. Den anden interessante observation er, at der sker et markant skift mellem isoformerne af det glycolytiske enzym glyceralddehyd-3-P dehydrogenase (GapA og GapB) i løbet af fermenteringen (se figur 13). Den inaktive isoform af GapB [4] dominerer under høje pH. Efterhånden som pH falder, overtager den højre GapB-isoform, men efterhånden syntetiseres der store mængder af GapA i den lavmolekylære isoform (nederste), hvor den før blev observeret i en højmolekylær udgave. Vi har endnu ingen færdige forklaringer på, hvad dette betyder, men det antyder kraftigt, at GapA er vigtig under den sene fase af mælkefermenteringen efter nedsyningen.

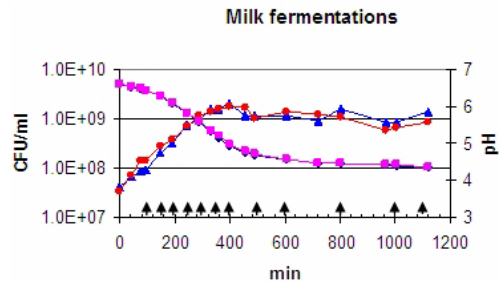


Figur 13. Skift mellem GapA og GapB-isoformer under nedsyning. Udsnittene er hentet fra gelerne i figur 12.

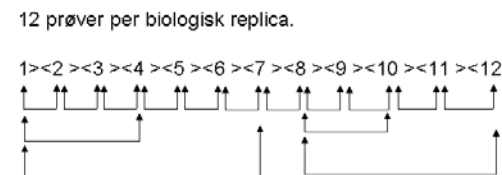
En tilbundsgående transkriptomanalyse af hele mælkefermenteringsforløbet blev muliggjort af samarbejdet med Universitetet i Groningen i Holland, hvor Dr. Jan Kok efter at have færdiggjort sekventeringen af *L. lactis* MG1363 havde konstrueret et fuld-genom DNA mikroarray for stammen. Dette samarbejde muliggjorde, at vi kunne gennemføre alle projektets faser på trods af vores manglende succes med at indføre arrayteknologien uden en array-scanner i vores laboratorium. På figur 14A kan man se tidspunkterne for de mange prøvetagninger til RNA-analysen. Fra hver af de 12 tidspunkter blev udtaget prøver der fra de to parallelle mælkekulturer, isoleret bakterier ved guanidinium-vask, og ekstraheret RNA med varm phenol. I panel B ses alle de mange sammenlignende analyser der blev foretaget (se figur 3 for forklaring). RNA fra hvert tidspunkt blev i to hybridiseringer analyseret sammen med RNA fra henholdsvis det foregående tidspunkt og efterfølgende. Derved opnåede vi relative mRNA-niveauer mellem alle prøver i tidsfølgen. Hvis der ikke var usikkerheder på bestemmelsen af mRNA-niveauerne kunne man derefter i princippet starte med at definere at niveauerne for alle mRNA var 1,0 i den første prøve. Med simpel multiplikation ville man derefter kunne finde alle de efterfølgende niveauer. Desværre er DNA-mikroarrayanalyser så usikre, at fejlene ville akkumulere og ende op med ubrugelige tal. Vi har derfor valgt i denne rapport at definere mRNA-niveauerne i prøve 7 (400 minutter) til 1,0, så der kun skal multipliceres 5 til 6 gange på hver side. Dette punkt er også velvalgt, da hovedparten af ændringerne sker omkring 400 minutter. I det følgende skal man dog huske, at usikkerheden bliver større jo længere prøvetidspunkterne fjerner sig fra 400 minutter. Som check på disse niveauer har vi udført sammenligninger med større spring, for eksempel mellem prøve 1 og 4, mellem prøve 1 og 7, mellem prøve 8 og 10 samt mellem prøve 8 og 12 (se figur 14B). Tilsammen burde disse analyser kunne ende op med en

forståelse af, hvordan laktokokkerne sanser mælkefermenteringen, men på trods af at vi har haft næsten færdige datasæt i over et år, vil der i fremtiden kunne foretages megen yderligere *data-minering*. Indtil nu har vi kun kradset lidt i overfladen, da vore værktøjer til data-mineringen sideløbende er blevet udviklet i Groeningen. Umiddelbart efter sommerferien 2007 vil datasættet blive overdraget til MFF-projektet ”Simpel Bioinformatik”, ledet af Professor Rasmus Bro, som forhåbentlig vil kunne bidrage til en øget forståelse for laktokokkernes sansning.

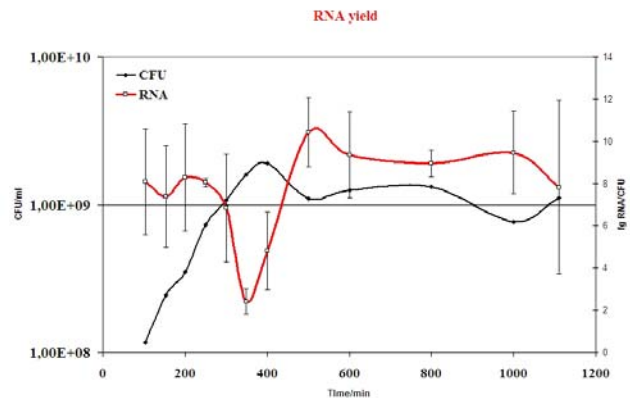
A



B



C

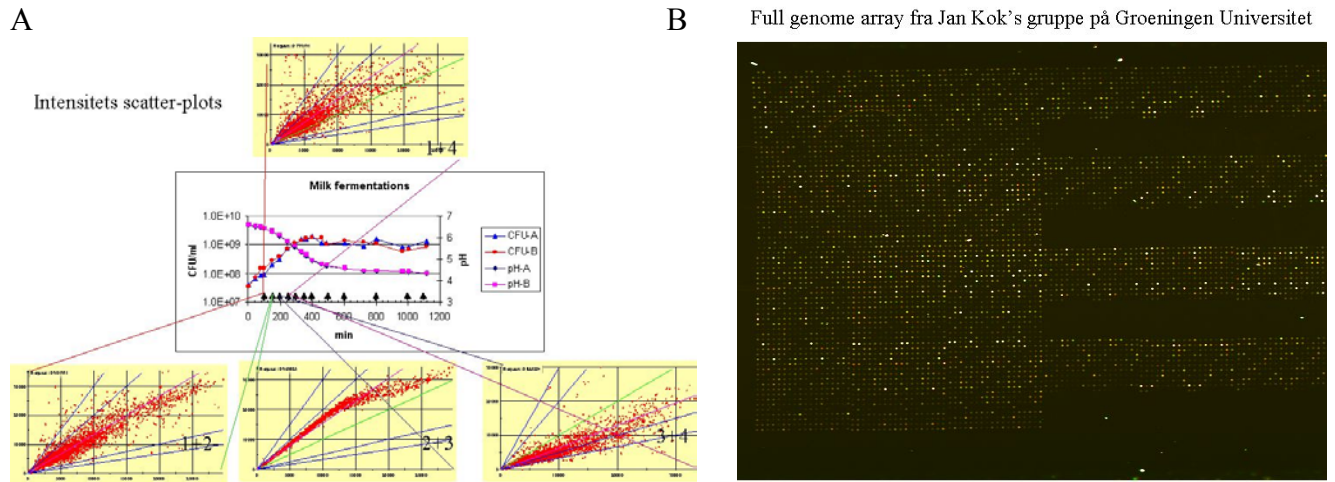


Figur 14. RNA-ekstrahering og analyseprotokol. I panel A ses, hvor RNA-prøverne blev udtaget. I panel B ses, hvordan RNA-prøverne blev analyseret i par. I C ses udbyttet af RNA per celle for de forskellige prøver.

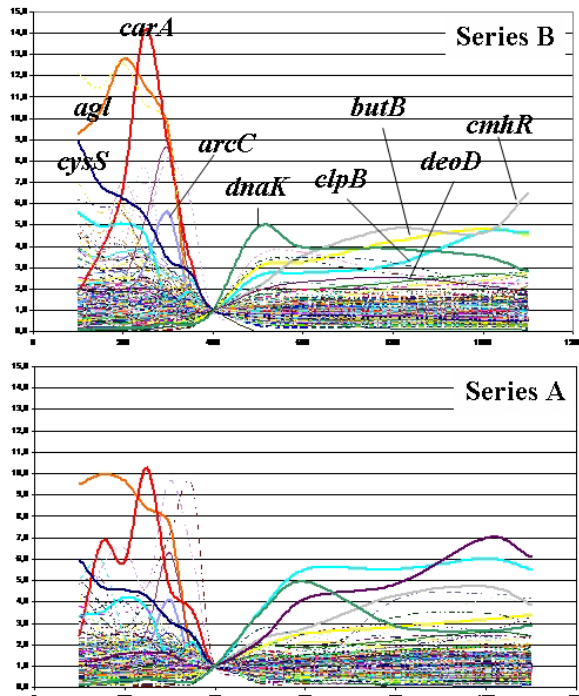
En serie typiske niveauer kan ses i figur 14A, hvor forholdet mellem niveauerne for hvert gen er angivet med en prik i koordinatsystemet. Hvis alle gener var uregulerede, og der ikke var usikkerhed i bestemmelsen, ville prikkerne danne en ret linie gennem (0,0). Bredden af datasværmen i scatter-plottet, som det kaldes, siger noget om usikkerheden i målingerne, og en bøjet kurve tyder på systematiske fejl. De interessante punkter er imidlertid de punkter, der ligger uden for hovedsværmen, da det er de gener, der er specielt kraftigt ændrede. Det er her, vi skal opspore tegnene på, at laktokokkerne har været udsat for skift i deres omgivelser. Da vi endnu ikke har foretaget den endelige data-minering, kan vi kun vise foreløbige resultater.

I figur 15 og 16 har vi vist niveauerne af de første 500 gener i alfabetisk rækkefølge af de gener som vi kender funktionen af. I alt kender vi funktionen af 1220 af generne på arrayet. I forhold til vores tidligere samarbejde med MFF er det interessant, at den gruppe af varmestressgener, som vi havde fokuseret på i projektet ”Varmechok i *L. lactis*”, bliver opreguleret omkring 400 minutter, når kulturen har nået et pH på 4,9. Fra det tidligere projekt ved vi, at generne *hrcA*, *dnaK* og *grpE* bliver opreguleret, når mange af cellens proteiner denaturerer [1], så vi kan konkludere, at der omkring 400 minutter sker en denaturering af laktokokkernes proteiner, formodentlig på grund af nedsyrningen. Dette synspunkt forsvares af, at genet for ClpB chaperonen ligeledes induceres. Vi synes, at det er meget interessant, at *carA* genet udtrykkes så voldsomt mellem 200 og 300 minutter efter podningen, specielt fordi ingen andre af generne, som er involveret i pyrimidinbiosyntesen er opreguleret. Foruden de viste gener har vi påvist meget stærk opregulering af det universelle stress-gen *uspA* fra 400 minutter og af *pflA*-genet (pyruvat format lyase) gennem hele forløbet, men specielt efter 400 min. Opreguleringen af dette gen signalerer, at al ilt i mælke mediet er ved at være opbrugt, da enzymet kun fungerer under anaerobe forhold. *osmC* genet bliver ligeledes opreguleret efter 400 min, hvilket signalerer osmotisk stress. *trmA*-genet udviser en anderledes regulering, idet

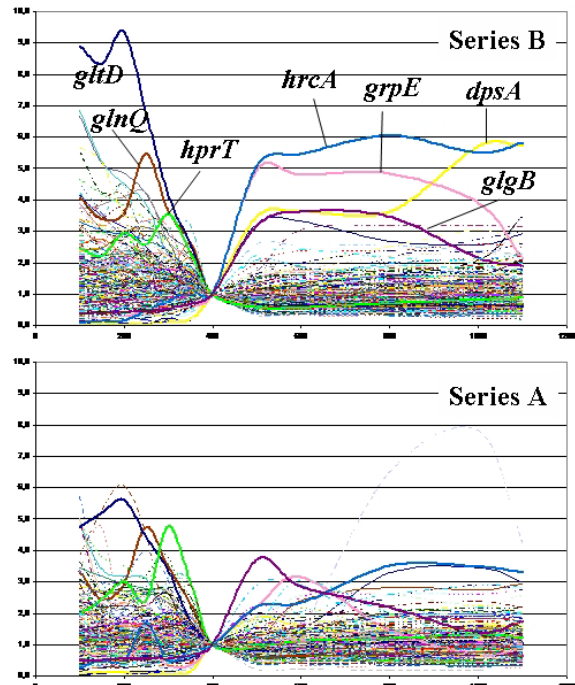
det nedreguleres 95% efter 200 minutter. Dette gen vil blive behandlet under kapitlet, hvor vi undersøger tegn på oxidativ stress. En tilbundsgående analyse af laktokokkernes sansning af mælkefermenteringen vil blive publiceret, så snart alle data foreligger.



Figur 14. DNA-mikroarrayanalyser af mælkefermenteringen. I A ses en samling scatterplots af mRNA-niveauerne for hvert gen i to situationer. Her kan det ses, om der findes meget regulerede gener og om der er metodiske fejl i hybridiseringerne. For hybridisering 2 + 3 er linien krum, hvilket kan reguleres ved en bioinformatisk normalisering. I B ses fluorescensfarverne efter skanning af et DNA-array med to farvede cDNA-prøver bundet. Arealet er cirka en kvadratcentimeter.



Figur 15. mRNA-niveauer for 250 gener (alfabetisk: a-d). Gener, som udviser samme regulering i de to forsøgsserier, er angivet. Farvekoden er den samme for de to serier. mRNA niveauerne er angivet relativt til niveauet ved 400 min.

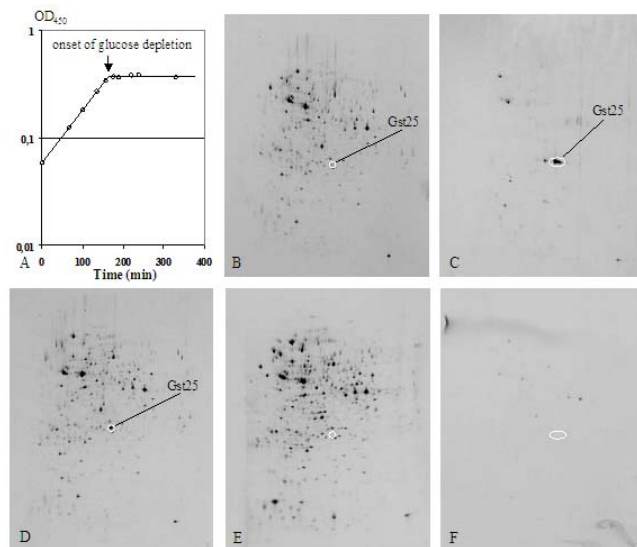


Figur 16. mRNA-niveauer for 250 gener (alfabetisk: d-k). Gener, som udviser samme regulering i de to forsøgsserier, er angivet. Farvekoden er den samme for de to serier. mRNA niveauerne er angivet relativt til niveauet ved 400 min.

5.8. Tegn på energimangel - Hvordan sanser laktokokker, at de har opbrugt sukker i defineret vækstmedium?

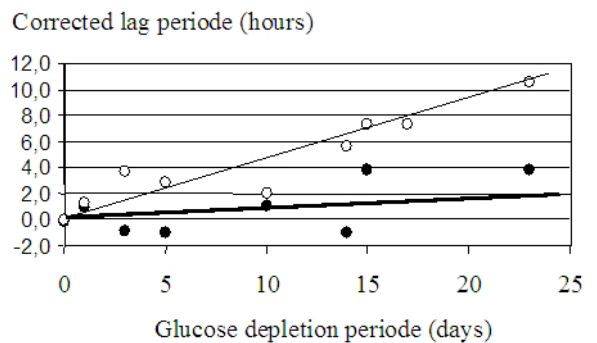
For at kunne tolke baglæns og deducere de mulige stressede forhold under mælkefermenteringen, måtte vi analysere en række definerede stressomstændigheder. Vi forventede ikke, at laktokokker ville opbruge det tilgængelige sukker under syrningsprocessen, men alligevel ønskede vi at kende tegnene på energimangel, da energimangel kunne opstå under andre omstændigheder. Når laktokokker gror i SA medium, med overskud af aminosyrer til proteinsyntesen og acetat til fedtsyreandelen, fandt vi, at glukosemangel får bakterien til at mangle energi, uden at mangle byggestene. Dette er en situation, man ikke kan opnå i mange andre bakterier, da de fleste bakterier har sammenblandet kulstof- og energimetabolismen. Bakteriens ATP- og GTP-niveauer faldt drastisk, og væksten gik fuldstændig i stå (se figur 16). Samtidig blev kun et enkelt protein, Gst25, dannet i større mængder. Når *gstA*-genet blev fjernet ved mutation, blev ingen proteiner dannet efter, at bakterien havde brugt al den resterende sukker. Vi fandt også, at Gst25-proteinet var vigtigt for, at laktokokken kunne komme hurtigt i gang igen med at vokse efter tilsætning af glukose til en sultet kultur (se figur 17).

X



Figur 16 Analyse af MG1363 under glukosemangel.

MG1363 (B, C og D) og *gstA*-derivatet AB25 (E og F) blev vokset i SA medium med begrænset glukose. Ved pilen var glukosen opbrugt og bakterievæksten stoppede abrupt. 2D-gelerne viser proteinsyntesen før (B og E) og efter (C og F) glukosesult. Panel D er en gel, hvor celler svarende til B og C er blandet sammen for at identificere placeringen af Gst25.

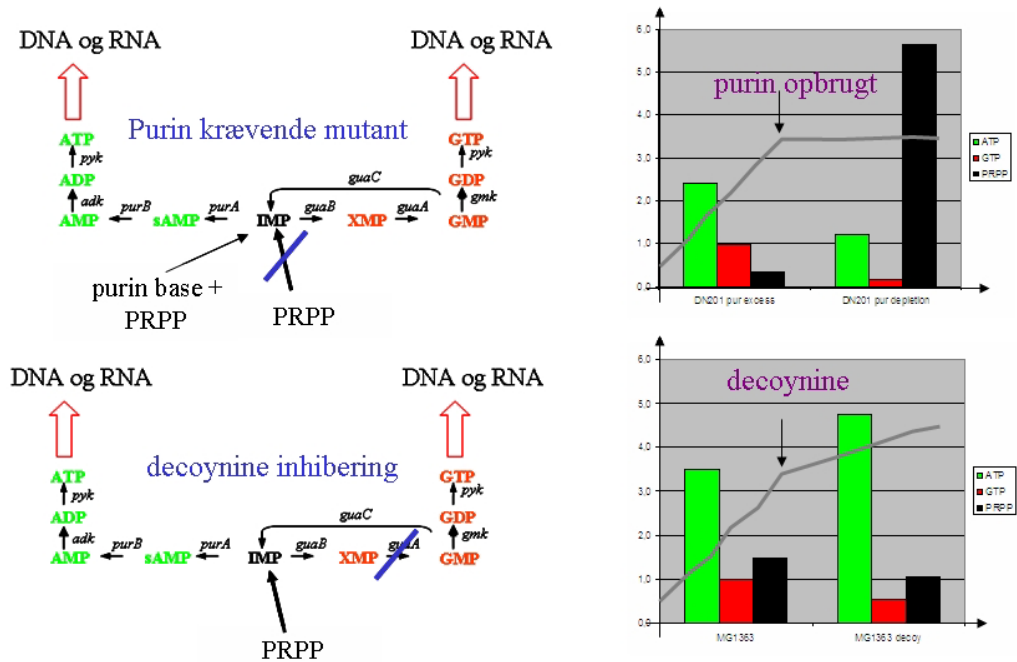


Figur 17 Størrelsen af nølefasen, før væksten begynder, efter tilsætning af glukose til en sultet kultur. Bakterierne har sultet det antal dage der er angivet på den vandrette akse, og den tilhørende nølefase (i timer) ses ad den lodrette akse.

Vi fandt, at *gstA*-genet var det sidste gen i *ctsR-clpC-(gstA)*-operonen, men at *gstA*-genet er reguleret uafhængigt af de andre gener. En region lige før *gstA*-genet viste sig at være vigtig for højt udtryk af genet, men ikke for energistressreguleringen. Ved sammenligninger med kendte proteiner, der minder om Gst25, fandt vi, at proteinet højst sandsynligt er med til at beskytte ribosomer mod nedbrydning under energimangel. Dette arbejde er beskrevet i et manuskript, som snart vil blive indsendt.

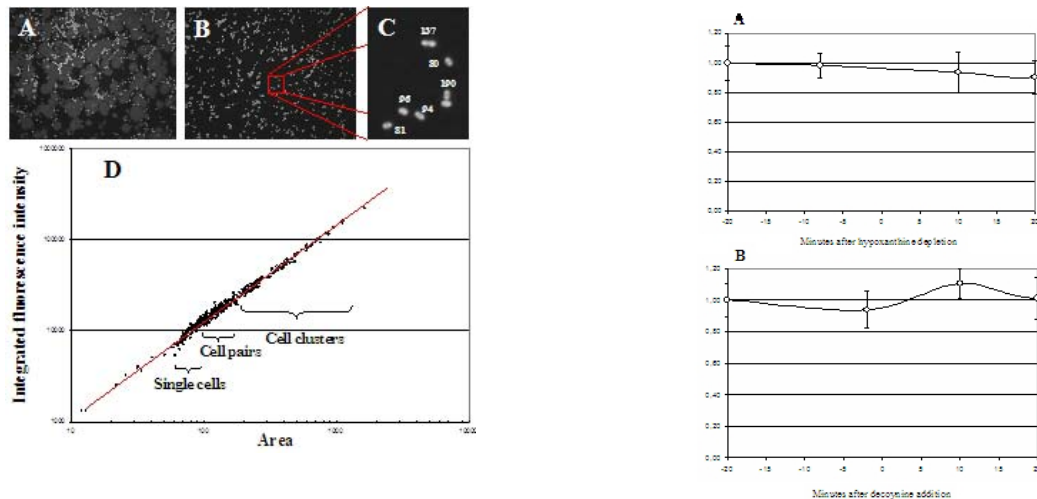
5.9. Tegn på purinmangel - Hvordan sanser laktokokker, at de har opbrugt puriner?

Som vi har beskrevet ovenfor, er der god grund til at tro, at laktokokker kunne blive udsat for mangel på byggestenene til DNA- og RNA-syntesen. Specielt puriner vides at være et godt supplement til mediet, hvis laktokokkerne skal vokse hurtigt [2]. Vi analyserede derfor, hvilke tegn der ville fremkomme, hvis vi sultede bakterierne for puriner. De to metoder, vi anvendte, ses i figur 18.



Figur 18. To metoder til at sulte laktokokker for puriner. Foroven ses effekten af at fjerne tilførslen af purinbaser til en mutant, som ikke selv kan lave puriner. Det ses, at både ATP- og GTP-niveauerne går ned samtidig med, at PRPP-niveauet går op, fordi der bruges mindre til syntesen. For neden ses effekten af at tilsætte antibiotikaet decoynine, som hæmmer dannelsen af GMP. Her går GTP- og PRPP-niveauerne ned, medens ATP-niveauet stiger. Der er her ikke tegn på energimangel.

I dette arbejde anvendte vi vores skræddersyede array, og alle arrayeksperimenter foregik på Novozymes. Vi hybridiserede RNA fra kulturer med purinmangel med RNA fra kulturer med overskud af puriner (før og efter i øverste situation i figur 18). På samme måde sammenlignede vi situationerne før og efter decoynine-tilsætning. For at kunne opnå de rigtige reguleringsfold måtte vi normalisere datasættene med eksterne data, og her brugte vi forskellene i ribosom-RNA. rRNA niveauerne kunne vi både måle mikroskopisk med fluorescensfarvning (se figur 19) og med DNA-arrayanalyser, så vi kunne finindstille arrayresultaterne ved hjælp af data fra mikroskoperingen.



Figur 19. Måling af laktokokkers indhold af ribosomer. Bakterierne blev udtaget fra kulturerne og vasket. Herefter blev deres cellevæg gjort gennemtrængelig, og makromolekylerne inde i cellerne blev kemisk bundet sammen. En fluorescerende probe mod ribosomernes RNA, som dem der findes på DNA-mikroarrayet blev tilsat, og bandt sig til ribosomerne. Efter vask blev den bundne fluorescensfarve målt med et fluorescensmikroskop (venstre). Mængden af ribosomer per celle blev målt til at være næsten konstant under begge typer purinsult (højre).

Vi fandt, at den generelle purinmangel (øverst i figur 18) medførte opregulering af *purC*, *purF*, *purH*, *purM*, *fhs*, *fold*, *udp* og *cysK*, medens decoyinine-tilsætning opregulerede en helt anden samling gener, nemlig *noxE*, *guaB*, *pyrDa* og *guaA* (se figur 20). Den første samling gener kender vi fra vores tidligere analyser af PurR-regulatorproteinet, men de sidste gener var en overraskelse. Der er dog en vis fornuft i, at cellen opregulerer alle generne under GTP-mangel, da de ville medføre, at der bliver dannet mere GTP. NoxE-proteinet er en NADH-oxidase, som kan danne det NAD⁺. der er brug for til GuaB-reaktionen (se nederst figur 20). Vi forestiller os, at denne reguleringsmekanisme er beregnet til at opregulere GTP-syntesen under forhold, hvor NADH/NAD⁺ forholdet er højt, så der mangler NAD⁺ til GuaB-reaktionen. Dette vil blive undersøgt i MFF-samarbejdsprojektet ”Starterkulturers fysiologiske og genetiske status som indikator for modningsforløbet i ost”.

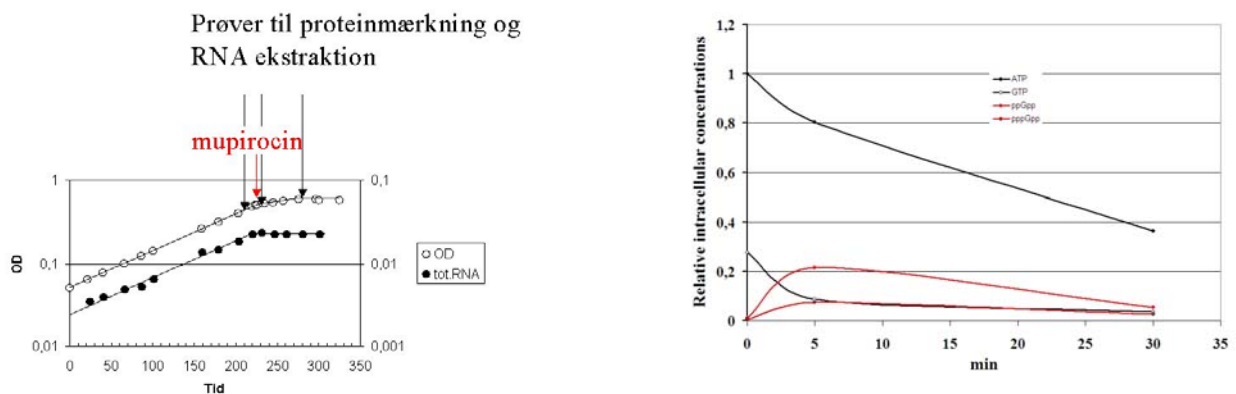
gen	Purin mangel (p)	Decoyinine stress (p)	Genetisk organisation
<i>purC</i>	12 (0.06)	0.3 (0.03)	<i>purCSQLF</i>
<i>purF</i>	26 (0.1)	0.2 (0.01)	<i>purCSQLF</i>
<i>purH</i>	15 (0.1)	0.4 (0.003)	<i>hprT-purH</i>
<i>purM</i>	10 (0.07)	0.4 (0.008)	<i>purMN</i>
<i>fhs</i>	3.9 (0.05)	0.6 (0.07)	<i>fhs</i>
<i>fold</i>	2.2 (0.14)	0.5 (0.09)	<i>fold-xseAB</i>
<i>udp</i>	19 (0.1)	0.2 (0.001)	<i>udp</i>
<i>cysK</i>	2.4 (0.12)	1.2 (0.6)	<i>metC-cysK</i>

Figur 20. DNA-mikroarrayanalyse af purinmangel og decoyinine-stress. Tallene angiver forskellene i cellulære mRNA-niveauer mellem situationen og en referencesituation. Referencen til purinmangel er en kultur med overskud af puriner. Referencen til decoyinin-stress er en kultur uden purintilsætning.

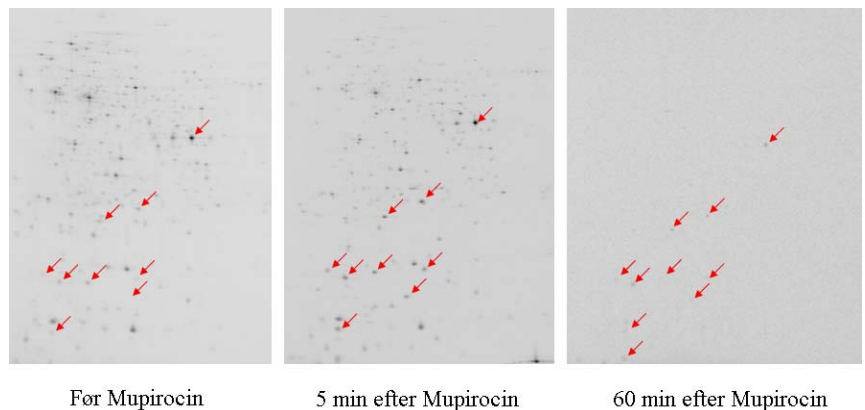
gen	Purin mangel (p)	Decoyinine stress (p)	Genetisk organisation	Reaktion
<i>noxE</i>	1.8 (0.2)	3.7 (0.01)	<i>noxE-ssbA</i>	$\text{NADH} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$
<i>guaB</i>	0.2 (0.0001)	3.0 (0.09)	<i>guaB</i>	$\text{IMP} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{XMP} + \text{NADH}$
<i>pyrDa</i>	0.7 (0.2)	2.5 (0.06)	<i>pyrDa</i>	$\text{DHO} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{O} + \text{NAD}^+$
<i>guaA</i>	0.3 (0.001)	2.0 (0.1)	<i>guaA</i>	$\text{XMP} + \text{gln} \leftrightarrow \text{GMP} + \text{glu}$

5.10. Tegn på aminosyremangel – Hvordan sanser laktokokker mupirucintilsætning?

Når bakterier opbruger alle aminosyrerne i mediet, kan de sanse manglen på to forskellige måder. Der findes reguleringsmekanismer, som direkte kan måle mængden af de enkelte aminosyrer, så der kun reageres på de aminosyrer, der mangler. Hvis denne mekanisme ikke sikrer, at der er nok aminosyrer til at holde proteinsyntesen i gang, vil en mere grundlæggende mekanisme træde i kraft og stoppe cellevæksten, indtil tilførslen starter igen. Denne mekanisme, som kaldes for stringent responset, anvender en sensor på ribosomerne, som kan måle, om budbringer-RNA (tRNA) kommer med aminosyrer [5]. Hvis tRNA-molekylerne kommer tomhændet til ribosomerne, vil sensoren begynde at danne et alarmstof, ppGpp. Dette stof hæmmer en række forskellige processer, som medfører nedlukning af cellens maskineri. Vi har benyttet en enkel teknik til at danne tomhændede tRNA-molekyler uden at sulte bakterierne. Ved tilsætning af antibiotikaet mupirocin vil et af de enzymer, som sætter aminosyrer på tRNA, blive hæmmet, og tomhændede tRNA-molekyler vil blive ophobet i cellerne. På figur 21 til venstre er det tydeligt, at mupirocin får cellevæksten til at stoppe, og til højre er det tydeligt, at ppGpp og pppGpp (røde kurver) akkumuleres. På figur 22 er det klart, at mupirocintilsætning medfører opregulering af en uidentificeret samling proteiner, som, når de er identificeret, vil kunne bruges som tegn på generel aminosyremangel.



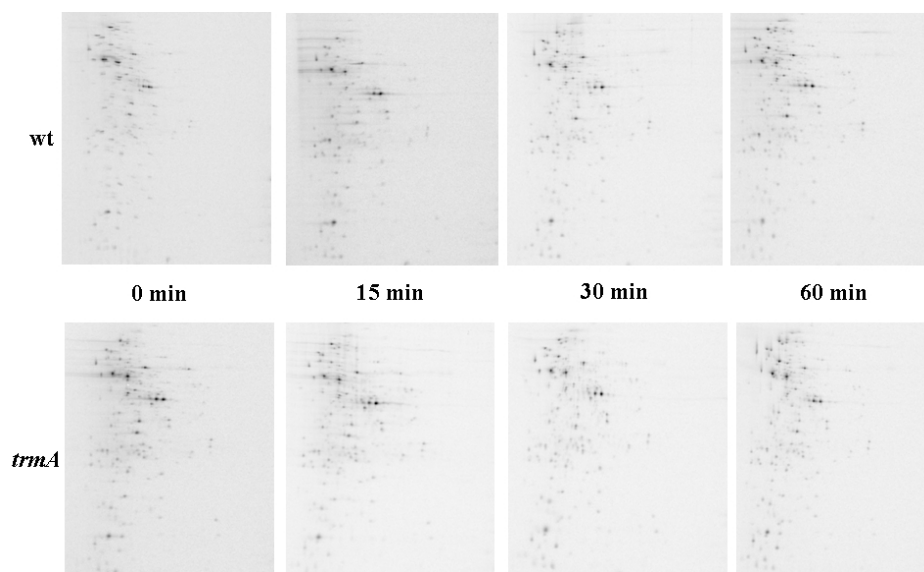
Figur 21. Væksthæmning, RNA-syntese og akkumulering af alarmstoffet ppGpp efter mupirucintilsætning. Venstre panel: *L. lactis* MG1363 blev vokset i SA medium med glukose. Ved pilen blev der tilsat mupirocin, som hæmmer isoleucin-tRNA dannelsen. Den optiske densitet og mængden af RNA i kulturen ses som funktion af tiden. Højre panel: ATP, GTP, ppGpp og pppGpp niveauerne i cellen efter mupirocintilsætning.



Figur 22. Proteomsyntese før og efter mupirocintilsætning. En række proteiner, som udviser forøget syntese-hastighed er vist med pile.

5.11. Tegn på oxidativ stress – Hvordan sanser laktokokker mitomycin-C tilsætning?

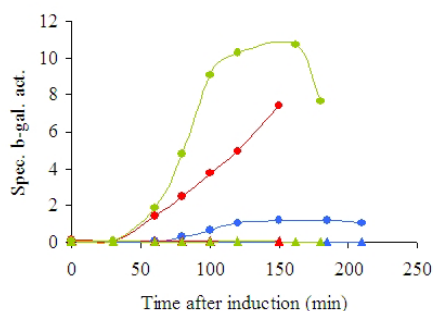
Oxidativ stress kan opstå på mange måder. Rent kemisk kan der i vækstmediet foregå den såkaldte Fenton-reaktion, hvor molekylært ilt reagerer med jern-ioner i vandet og producerer hydrogenperoxyd. I cellens stofskifte kan superoxyd og hydrogenperoxid dannes i mange oxidationsreaktioner, selvom det for det meste sker i forbindelse med den oxidative fosforylering, som laktokokker ikke kan foretage. Vi har i projektet anvendt en indirekte metode til at skabe toksiske ilt-produkter som hydrogenperoxyd og superoxyd. Det bakterieproducerede antibiotikum mitomycin C bliver optaget af bakterier og aktiveret af bakteriens enzymer til et reaktivt stof, som danner toksiske ilt-forbindelser og DNA-skader. Vi observerede en kraftig væksthæmning ved mitomycin C tilsætning, men effekten på proteomsyntesen var ikke så markant, hverken for vildtype-bakterierne eller for en mutant i det regulatoriske *trmA* gen [6] (se figur 23).



Figur 23. Proteomsyntese før og efter tilsætning af mitomycin C. Det radioaktivt mærkede proteom er vist for vildtype (øverst) og en mutant som er ændret i det regulatoriske *trmA* gen (nederst).

De anvendte bakteriestammer havde imidlertid en biosensor fra bakteriofagen TP901-1 indbygget. Det drejede sig om en genfusion mellem bakteriofagens lytiske PL promoter, som træder i kraft, hvis bakteriens DNA bliver skadet, og medfører, at bakteriofagen multiplicerer sig og dræber bakterien. Et højt udtryk fra PL-promotoren er derfor et tegn på, at bakteriens DNA er skadet.

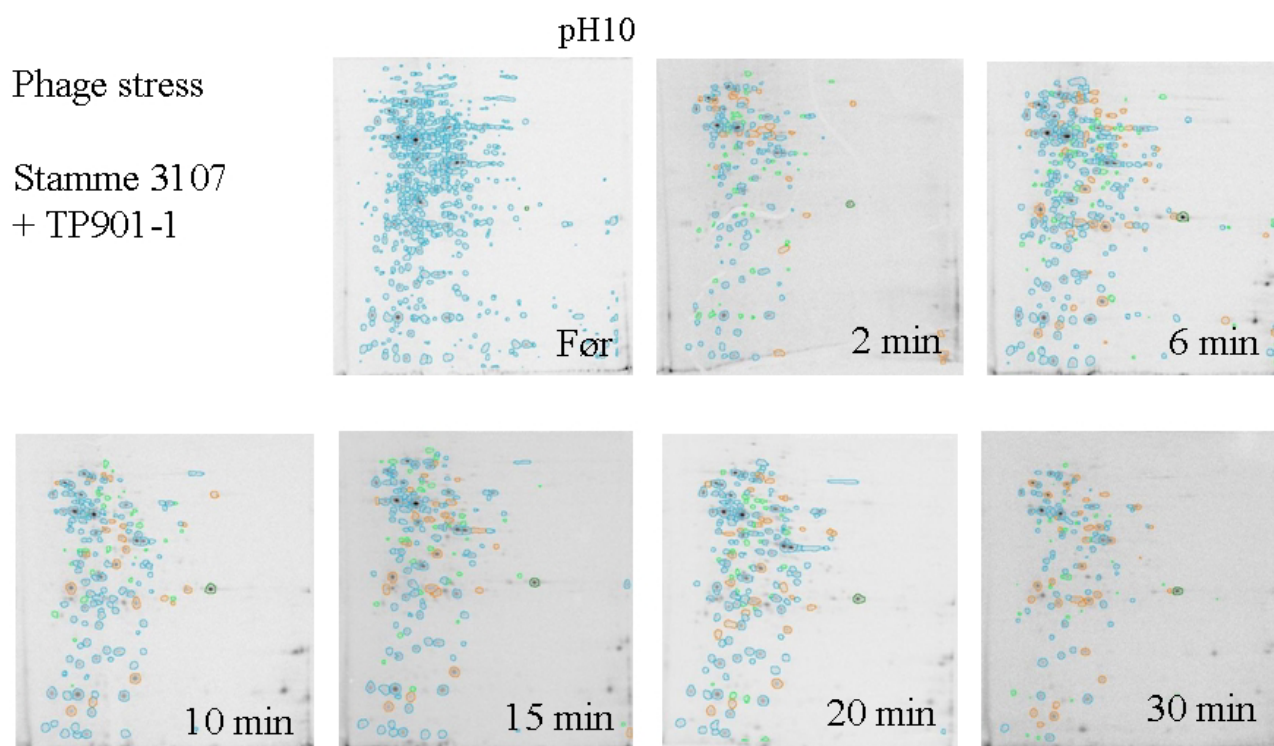
På figur 24 kan det ses, at PL-promotoren bliver kraftigt induceret med mitomycin C i *trmA* mutanten (grønne og røde cirkler), og i højere grad end vildtypen (blå cirkler). Der er ingen udtryk fra PL-promotoren uden mitomycin C (trekanter). Dette kunne tyde på, at mitomycin C-tilsætning giver DNA-skader, men ikke så mange oxidative skader som kan sanses af bakterien. Vi ser frem til at få analyseret de mange RNA-prøver, vi udtog.



Figur 24. PL promoteraktivitet analyseret med en PL-lacLM fusion. Vildtypen (blå) eller *trmA* mutanten (grøn og rød) blev tilsat mitomycin C ved 0 minutter (cirkler). Trekanterne angiver bakterier, der ikke blev tilsat mitomycin C.

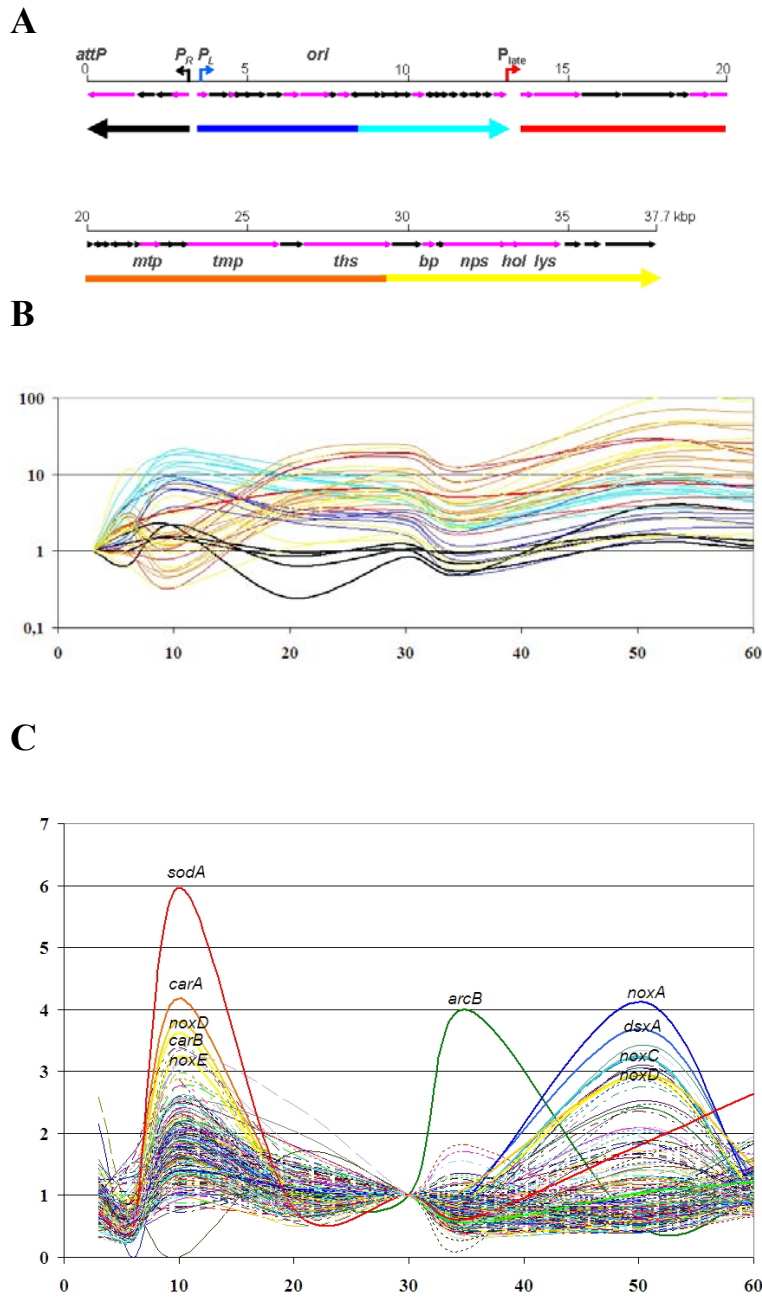
5.12. Tegn på bakteriofagstress – Hvordan sanser laktokokker bakteriofagerangreb?

Angreb af bakteriofager kunne medføre et meget blandet respons fra laktokokker, som var mindst lige så komplekst som sansningen af mælkefermentering. Da laktokokkerne af gode grunde ikke er tilvænnet dødelige angreb af bakteriofager, vil deres sansning af angrebet være afhængig af, hvilke typer stress det forårsager, inden de sprænges af det nyfødte kuld bakteriofager. Da bakteriofagerne skal syntetisere store mængder af både DNA, RNA og protein ud fra bakteriens byggestene, kunne man forvente, at sansningen af både energi, puriner, pyrimidiner og aminosyrer ville være berørt. Vi voksede bakterien 3107, som er vært for bakteriofagen TP901-1 [7], op i SA medium med glukose, hvorefter vi tilsatte cirka fem bakteriofager per bakterie. Så tog vi prøver til proteomsyntesebestemmelse og DNA-arrayanalyser. Bakterierne blev vasket før analysen, så der ikke blev overført bakteriofager fra mediet. I figur 25 kan man se, hvordan laktokokkerne sanser et angreb af bakteriofager. Progenesis analysen viser her opregulerede proteiner som grønne, og nedregulerede proteiner som røde. De meget markante opregulerede proteiner er fagproteiner, som selvfølgelig ikke var til stede før angrebet.



Figur 25. Progenesis-analyse af proteomsyntesen under et TP901-1 bakteriofagangreb af *L. lactis* subsp. *cremoris* 3107.

Da *L. lactis* 3107 er af samme subspecies som MG1363, var det muligt for os at udføre en DNA-mikroarrayanalyse af faginfektionen ved hjælp af vores skræddersyede array. Vi udtog prøver gennem hele forløbet og ekstraherede RNA. Vi valgte at bruge en gennemsnitlig samling mRNA molekyler som reference ved at blande RNA fra et udvalg af prøverne, så alle gener var repræsenteret. Hvis vi havde brugt RNA-prøver fra før bakteriofagangrebet ville vi ikke have referencer til faggenerne. Vores skræddersyede DNA-mikroarray indeholdt et fuldt genom array for bakteriofagen TP901-1. Øverst i figur 26 er organisationen af bakteriofaggenerne på TP901-1 genomet [7]. Plate promotoren går først i gang, når PL promotoren har transkriberet alle generne indtil Plate. Dette er meget tydeligt på arrayanalysen, hvor alle de tidlige gener bliver induceret omkring 3 – 5 minutter efter infektionen, medens de sene gener starter induktionen omkring 10 minutter efter infektionsstart.



Figur 26. Transkriptomanalyse af bakteriofag TP901-1 og *L. lactis* 3107 under infektion. A) Organiseringen af generne på genomet af TP901-1. B) mRNA-niveauer for bakteriofaggenerne under infektion. Farvekoden svarer til farvekoden på genomet. Infektøse fager blev dannet mellem 40 og 50 minutter efter infektion. C) mRNA-niveauer for de ca. 200 bakteriegener på det skræddersyede array.

Det er interessant at opleve, at *sodA* genet induceres sammen med *noxD* og *noxE*, da alle er involveret i oxygenmetabolismen. *carA* og *carB*-generne er involveret i pyrimidinbiosyntesen og har umiddelbart intet med oxidativt stress at gøre. Alle generne induceres samtidig med de tidlige bakteriofaggener. *arcB* genet er involveret i bekæmpelse af syrestress, ved at deiminere aminosyren arginin. Omkring induktionen af de sene bakteriofaggener, hvor man må forvente, at bakteriens metabolisme er helt overtaget til syntese af nye kuld af bakteriofager. Her induceres *noxA*, *noxC* og *noxD*

som alle er involveret i NADH-oxidering. Samlet kunne resultaterne tyde på, at den væsentligste stress, bakterierne sanser under et bakteriofagangreb, er NADH/NAD⁺ ubalance.

6. Samlet konklusion

Vi har været i stand til at vise laktokokkernes sansning af mælkefermenteringsprocessen på både proteomsynteseniveau og transkriptomniveau. Vi har også påvist specifikke tegn i proteomsyntesen og transkriptom sammensætningen på et udvalg af relevante stressomstændigheder. Før sansningen af mælkefermenteringen kan tolkes på baggrund af de kendte tegn, mangler vi imidlertid at identificere en række meget interessante stressinducerede proteiner. Projektet har været ekstremt omfattende og den store mængde data, der er produceret, vil kunne være en kilde til nye erkendelser i mange år fremover.

Studiet har medført to færdige manuskripter til publicering omhandlende teknikken til isolering af bakterier fra ost samt analyse af glukose stress. Herudover har vi skrevet et manuskript, der kun mangler resultaterne fra enkelte, mindre eksperimenter. Resultaterne fra det store mælkefermenteringseksperiment er ved at blive data-mineret, og vi har påbegyndt skrivningen i samarbejde med Jan Kok og Anne de Jong fra Groeningen Universitet .

7. Referencer (hele rapporten)

1. **Kilstrup, M. (2006).** Proteomics of *Lactococcus lactis*, phenotypes for a domestic bacterium. *Methods of biochemical analysis* **49**: 149-178.
2. **Kilstrup, M., Hammer, K., Ruhdal Jensen, P., & Martinussen, J. (2005).** Nucleotide Metabolism and its Control in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 555-590.
3. **Beyer, N.H., Roepstorff, P., Hammer, K. & Kilstrup, M. (2003).** Proteome analysis of the purine stimulon from *Lactococcus lactis*. *Proteomics* **3**: 786-797.
4. **Vido, K., Diemer, H., Van Dorsselaer, A., Leize, E., Juillard, V., Gruss, A. & Gaudu, P. (2005).** Roles of Thioredoxin Reductase during the Aerobic Life of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **187**: 601–610.
5. **Magnusson, L.U., Farewell, A. & Nyström, T. (2005).** ppGpp: aglobal regulator in *Escherichia coli* *TRENDS in Microbiology* **13**: 236-242.
6. **Frees, D., Varmanen, P. & Ingmer, H. (2001).** Inactivation of a gene that is highly conserved in Gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* **41**: 93-103.
7. **Brøndsted, L., Østergaard, S., Pedersen, M., Hammer, K. & Vogensen, F.K. (2001).** Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: Evolution, structure, and genomic organization of lactococcal bacteriophages. *Virology* **283**: 93-109.

8. Publikationer og præsentationer

Mogens Kilstrup (2003). Verden ifølge *Lactococcus*. Mælkeritidende 9:226-230

Færdige manuskripter:

Morten Ejby, Ljiljana Nestic, Xumin Zang, Peter Roepstorff & Mogens Kilstrup* (2007). Fractionation of lactic acid bacteria from casein gels and mature cheese for proteome and RNA analysis. Vil blive indsendt til Proteomics, medio august.

Anne Breüner, Pekka varmanen, Morten Ejby, Karin Hammer & Mogens Kilstrup* (2007). Analysis of a *gstA* deletion mutant, lacking the major glucose starvation protein in *Lactococcus lactis*. Vil blive indsendt til Molecular Microbiology, medio august.

Mogens Kilstrup, Allan K. Nielsen, Marzanna D. Pulka-Amin, Morten Ejby, Stine Jessing, Michael D. Rasmussen, Jan Martinussen & Martin Willemoës (2007). Identification of genes responding to sub-lethal concentrations of decoyinine and investigations of the interplay between purine biosynthesis and glycolysis in *Lactococcus lactis* MG1363. Vil blive indsendt til Microbiology, september.

Manuskripter under udarbejdelse:

Morten Ejby, Anne de Jong, Jan Kok & Mogens Kilstrup (2008). Temporal Proteomic and genome-wide transcriptional patterns of *Lactococcus lactis* MG1363 during fermentation and coagulation of milk (arbejdstitel).

Postere og resultater præsenteret ved kongresser og konferencer:

Morten Ejby, Ljiljana Nestic, Xumin Zang, Peter Roepstorff & Mogens Kilstrup* (2005). Milk fermentation according to *Lactococcus lactis*. **Poster**, 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond am Zee, Holland.

Mogens Kilstrup (2005). Proteome analysis of *Lactococcus lactis* stress responses, with emphasis on glucose starvation. **Invited speaker**, 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond am Zee, Holland.

Morten Ejby, Ljiljana Nestic, Xumin Zang, Peter Roepstorff & Mogens Kilstrup* (2006). Proteomic analysis of *Lactococcus lactis* milk fermentation. **Poster**, LMC mikrobiologikonference, Gl. Averages, Danmark

9. Forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og evt. forskerophold ved andre institutioner

Morten Ejby, ph.d.-rapport ikke indsendt endnu.

Forskerophold på Syddansk Universitet hos professor Peter Roepstorff

Forskerophold på Groeningen Universitet hos Dr. Jan Kok

10. Samarbejdsrelationer nationalt og internationalt

Allan K. Nielsen & Michael D. Rasmussen, Novozymes, Bagsværd, Danmark

Xumin Zang X & Peter Roepstorff, Syddansk Universitet, Odense, Danmark

Anne de Jong & Jan Kok, Groeningen Universitet, Holland

11. Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribrug

Resultaterne fra projektet giver en indsigt i alle de faser af mælkefermenteringen, som kunne virke stressende og produktionsformindskende for laktokokkerne. Vore foreløbige resultater tyder på, at processen ikke indeholder voldsomt stressende elementer udover selve syrnin- gen, som virker væksthæmmende og ødelæggende på bakterierne. Dette er imidlertid en øn- skelig virkning, da drab og autolysering af laktokokkerne er vigtig under modning af ost. Der findes stadig uforklarede ændringer i laktokokkernes væksthastighed under mælkesyr- ningen som kunne tyde på mindre stress påvirkninger, og disse vil vi analysere fortløbende.

Det er af stor vigtighed for mejeribrug at kende deres produktionsorganismer så godt, at man vil kunne forudse bakteriernes reaktioner på ændrede produktionsbetingelser. I relation hertil giver projektet en række indsigter som kunne være til nytte.

Under projektet blev der udviklet en helt ny metode til at isolere intakte bakterier fra ost og mælkegeler. Denne metode har vi vist at være anvendelig til at analysere sammensætningen af bakterieproteinerne i en moden cheddar ost. En sådan metode har været efterlyst i lang tid, men har aldrig eksisteret før.

12. Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Projektet gav en række forudsigelser eller muligheder, som kunne undersøges i andre sam- arbejdsprojekter med MFF.

Vi ville gerne foreslå et muligt samarbejde omkring analyse af laktokokkers sansning af den indespærring i en kaseinmatrix, der sker under løbetilsætning og den efterfølgende modning. Dette projekt er kun muliggjort af vores nye metode til isolering af bakterier fra ost.

Forudsigelsen af, at laktokokker kunne være begrænset i deres GTP-syntese under hurtig syrnin- g på grund af det høje NADH/NAD⁺ forhold, og den følgende mangel på NAD⁺ vil blive berørt i projektet ”Starterkulturers fysiologiske og genetiske status som indikator for modningsforløbet i ost”, hvor vi modulerer udtrykket fra generne i GTP-syntesen.

Selv om vi ikke har nævnt det i projektet, opklarede vi, at syntesen af ATP, GTP, CTP og UTP var afhængig af enzymet pyruvat kinase fra glykolysen. Denne sammenhæng mellem nukleotidsyntesen og glykolysen er meget spændende og har store relationer til det netop afsluttede projekt ”Mælk, syringseffektivitet af den primære starter”, hvor mængden af alle glykolysens proteiner blev modulerede. Der ville være stor interesse fra vores side for at indgå et samarbejde med MFF omkring dette emne.

Lyngby, d. 24-08-2007

Mogens Kilstrup

