

Mejeriforeningen

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

Periode: 1. januar 2000
 Budget: 31. december 2003
 Intern finansiering: Mælkeafgiftsfonden
 Ekstern finansiering: FØTEK 3
 Afslutningsrapport: Slutrapport Juni 2004
 Projektleder: Mogens Jakobsen
 Institution: KVL, Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet
 Deltagere:
 Offentliggørelse:
 Link til projekt:
 Publikationer: Mælkeritidende (2002) 4

 Appl. Envir. Microbiol (68) 4145-4147

Formål: At forstå de fysiologiske og mikrobiologiske ændringer, som foregår i en starterkultur umiddelbart efter podning.

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

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

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

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