

Afslutningsrapport

Early events i mælkesyrebakterier og
forudsigelse af fermenteringsforløb

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2000-36

August 2000



mejeriforeningen

danish dairy board

Mejeriforeningen

Afslutningsrapport for samarbejdsprojektet

**“Early events” i mælkesyrebakterier og forudsigelse af
fermenteringsforløb**

Medarbejdere:

Professor Mogens Jakobsen, Projektleder, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole,
Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet, Levnedsmiddelmikrobiologi, Rolighedsvej 30, 1958
Frederiksberg C. Tlf. 3528 3216. Fax 3528 3214. E-mail: moj@kvl.dk

Forskningsadjunkt, Ph.d. K. Bjørn Rechinger, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole,
Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet, Levnedsmiddelmikrobiologi, Rolighedsvej 30, 1958
Frederiksberg C. Tlf. 3528 3286. Fax 3528 3214. E-mail: kbr@kvl.dk

Ph.d.-stud. Henrik Siegumfeldt, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Mejeri- og
Levnedsmiddelinstitutet, Levnedsmiddelmikrobiologi, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiks-
berg C. Tlf. 3528 3286. Fax 3528 3214. E-mail: hsi@kvl.dk

Sammendrag:

Formålet med projektet var at undersøge intracellulære begivenheder i mælkesyrebakterier, som kan have betydning for deres syrningsaktivitet. Projektet har bidraget med ny viden, idet den første metode til bestemmelse af intracellulær pH (pH_i) på enkeltcelleniveau i mælkesyrebakterier er blevet udviklet. Samtidig er den tidligste proteinsyntese i mælkesyrebakterier efter podning i mælk blevet beskrevet for første gang.

Metoden der er blevet udviklet til bestemmelse af pH_i i individuelle bakterieceller er baseret på "fluorescence ratio imaging microscopy" (FRIM), hvor cellerne bliver farvet med et pH-afhængigt farvestof. Cellerne bliver immobiliseret på et membranfilter, som efterfølgende anbringes i et perfusionskammer på et omvendt fluorescensmikroskop. Efter belysning af cellerne ved to forskellige bølgelængder, konstrueres et intensitetsmoduleret (IMD) ratio billede ved hjælp af et billedbehandlingsystem. Metodens præcision til bestemmelse af pH_i i individuelle bakterieceller blev bestemt til 0,1 til 0,2 pH enheder. Denne eksperimentelle indgangsvinkel tillod samtidige pH_i målinger i enkeltceller af *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* og andre bakterier i en blandingskultur.

Reguleringen af pH_i i stammer af *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. innocua* blev undersøgt efter et hurtigt fald i ekstracellulær pH (pH_{ex}) fra 7,0 til 5,0. I stammer af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* faldt pH_i meget hurtigt når pH_{ex} blev sænket til 5,0. I stammer af mælkesyrekokker, var faldet i pH_i langsommere og mere variabelt. I alle de undersøgte mælkesyrebakterier var pH gradienten ($\Delta\text{pH} = \text{pH}_i - \text{pH}_{\text{ex}}$) mellem 0,3 og 0,8 efter pH_i havde stabiliseret sig ved pH_{ex} 5,0. *L. innocua* som ikke er en mælkesyrebakterie øgede derimod ΔpH til to enheder ved pH_{ex} 5,0.

Det blev undersøgt hvilken betydning henholdsvis H^+ -ATPasen (protonpumpen) og plasmamembranens integritet havde på pH_i reguleringen i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. innocua*, for at afgøre hvor meget de aktive og passive reguleringskomponenter bidrog til den samlede pH_i i mælkesyrebakterier. I *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* er det eneste behov for pH_i kontrol tilsyneladende tilstedeværelsen af en lille ΔpH , i hvert fald i pH_{ex} området 7,0 til 5,0. Det langsommere fald i pH_i i *L. lactis* subsp. *lactis* var primært styret af ATPaseaktiviteten, og i begge de undersøgte arter af mælkesyrebakterier var permeabiliteten af membranen overfor protoner høj, og der kunne

ikke observeres en cytoplasmisk bufferkapacitet af betydning. I *L. innocua*, var opretholdelsen af en høj ΔpH i høj grad afhængig af ATPaseaktiviteten, men denne bakterie besad også en cytoplasmisk bufferkapacitet som forhindrede at pH_i faldt til under 5.8 i løbet af eksperimentet. Disse mekanismer for pH_i -regulering er afgørende for mælkesyrebakteriernes syrningsaktivitet, og deres evne til at udkonkurrere uønskede bakterier.

Proteinprofilen efter to-dimensionel (2D) gelelektroforese, blev bestemt i et rigt vækstmedium (MRS) i den eksponentielle og stationære vækstfase, for at kunne vurdere hvilke proteiner der bliver særligt udtrykt under kraftig (eksponentiel) vækst. Gentagelse af disse forsøg viste en meget høj reproducerbarhed. *De novo* proteinsyntesen efter podning i mælk blev bestemt for første gang ved hjælp af radioaktivt mærket ^{35}S methionin, som blev inkorporeret i nysyntetiserede proteiner. Resultaterne viste at tre pletter i 2D-gelen udgjorde mere end 80 % af den totale mængde nysyntetiserede proteiner. To af pletterne var isoformer af det varmestabile phosphoryl carrier protein (HPr), og den sidste plet var et ukendt protein (EPr1). Selvom cellerne var opvokset i MRS med glukose som kulhydratkilde, sås ingen nysyntese af proteiner involveret i laktosetransport eller glykolyse. Dette indikerer at cellerne ikke har behov for syntese af disse proteiner, da omdannelsen af laktose til laktat begynder umiddelbart efter tilsætning af laktose. Nysyntese af stressproteiner var ikke udtalt, hvorimod den udtalte syntese af HPr indikerer en regulatorisk funktion i forbindelse med initiering af vækst.

Sammenhængen mellem udvalgte "early events" og efterfølgende syrningsaktivitet blev undersøgt. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* blev konserveret ved hjælp af to forskellige teknikker, frysning i flydende nitrogen med tilsat glycerol og frysetørring uden beskyttende stoffer. Antallet af kolonidannende enheder var meget højere i de frosne celler sammenlignet med de frysetørrede, og der blev fremstillet definerede blandinger af frosne og frysetørrede celler med overlevelsesprocenter fra 2 til 100. Disse blandinger indeholdt et sammenligneligt antal celler, bestemt ved farvning med et fluorescerende farvestof. Bestemmelse af acidification power (AP) på de definerede blandinger viste samme mønster som traditionelle målinger af syrningsaktivitet, hvilket indikerer at denne hurtigmetode kan erstatte syrningsforsøg. Ved undersøgelser med FRIM, blev det klart at antallet af celler som opretholdt en betydelig ΔpH under ikke-stressende betingelser var variabelt og korrelerede med antallet af kolonidannende enheder, selv når overlevelsesprocenten var lav. Det forskellige antal kolonidannende enheder i de definerede blandinger påvirkede de efter-

følgende syrninger, og derfor har FRIM et potentiale som en endnu bedre hurtigmetode til at forudsige syrningsforløb. Metoden er under patentering.

Summary:

The aim of the project was to investigate intracellular events in lactic acid bacteria that may influence the fermentation performance. The project has contributed with significant new knowledge, as the first method for determination of intracellular pH (pH_i) on a single cell basis in lactic acid bacteria was developed. Additionally, *de novo* protein synthesis in lactic acid bacteria after inoculation in their natural environment, milk, has been described for the first time.

The method developed for determination of pH_i in individual bacterial cells is based on fluorescence ratio imaging microscopy (FRIM), where the cells are stained with a pH-dependent fluorescent probe. The cells are immobilised on a membrane filter, which is subsequently placed in a perfusion chamber on an inverted microscope. After excitation at two different wavelengths, a ratio image is constructed in an image analysis program using intensity modulated display (IMD). An *in vivo* calibration curve in the pH range of 5.0 to 8.5 was constructed with pH equilibrated cells, and the accuracy of the method was determined to be 0.1 to 0.2 pH units. This experimental approach allowed the simultaneous determination of pH_i in single cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and other bacteria in a mixed culture.

The regulation of pH_i in strains of *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. innocua* was determined following a rapid decrease in extracellular pH (pH_{ex}) from 7.0 to 5.0. The pH_i decreased very rapidly in strains of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* when pH_{ex} was shifted to 5.0. In the lactic cocci, the decrease in pH_i was slower and more variable. In all the investigated lactic acid bacteria, the pH gradient ($\Delta\text{pH} = \text{pH}_i - \text{pH}_{\text{ex}}$) was between 0.3 and 0.8 after pH_i had reached a steady level at pH_{ex} 5.0. In contrast, *L. innocua*, which is not a lactic acid bacterium, increased ΔpH to approximately two units at pH_{ex} 5.0.

The influence of the H^+ -ATPase (proton pump) and plasma membrane integrity on the pH_i regulation in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. innocua* was investigated, to evaluate the contributions from active and passive components in the pH_i regulation of lactic acid bacteria. In *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* the only apparent requirement in the pH_{ex} range from 7.0 to 5.0, is the existence of a small ΔpH . The slower pH_i decrease in *L. lactis* subsp. *lactis* was primarily determined by the ATPase activity,

and in both species of lactic acid bacteria, the membrane permeability to protons was high, and no significant cytoplasmic buffering capacity was observed. In *L. innocua*, the maintenance of a large ΔpH was largely dependent on the ATPase, but this bacterium also revealed a buffering capacity of the cytoplasm that prevented a decrease in pH_i below 5.8 during the experiment. These mechanisms for pH regulation are crucial for the activity of the lactic acid bacteria and their competitive growth advantage compared to unwanted bacteria.

The protein profile, after two-dimensional (2D) gel electrophoresis, was determined in a rich growth medium (MRS) in the exponential and stationary growth phase, to evaluate which proteins were particularly expressed during active (exponential) growth. Repetitions of these profiles revealed a very high reproducibility. *De novo* protein synthesis after inoculation in milk was determined for the first time, using radioactively labeled ^{35}S methionine, which was only incorporated in newly synthesized proteins. The results showed that three spots in the 2D-gel accounted for more than 80 % of the total amount of newly synthesized protein. Two of the spots were isoforms of the heat-stable phosphoryl carrier protein (HPr), and the last spot was an unknown protein (EPr1). Although the cells were propagated in MRS with glucose as carbohydrate source, no synthesis was observed for proteins involved in lactose transport or glycolysis. This indicates that the cells have little need for synthesis of these proteins, as the conversion of lactose to lactate occurs begins directly after addition of lactose. Synthesis of stress proteins was low, whereas the pronounced synthesis of HPr indicates a regulatory function related to growth initiation.

The connection between selected “early events” and acidification of milk was investigated. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was conserved by two different techniques, direct freezing with added glycerol, and lyophilising without cryoprotectants. The number of surviving cells in the frozen aliquot was much higher than in the lyophilised aliquot as determined by colony forming units. Consequently, defined mixtures of frozen and lyophilised cells could be produced with viabilities ranging from 2 to 100 %. These mixtures contained comparable equal number of cells as determined by staining with a fluorescent probe. Determination of acidification power (AP) of the defined mixtures revealed the same pattern as traditional acidification test in milk, which indicates that this rapid method can replace the traditional time-consuming activity tests. Using FRIM, it was determined that the number of cells maintaining a significant ΔpH under non-stressful conditions was

variable and correlated very well with the number of colony forming units, even when the viability was low. The difference in the number of colony forming cells in the mixtures affected the subsequent fermentations of milk, which suggests that FRIM has potential as an even better rapid method to predict fermentation performance. The method is being patented.

1. Formål

Under anvendelse af *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* som gennemgående kultur, var det projektets hovedformål at gennemføre basale studier af fysiologiske og enzymatiske ændringer i mælkesyrebakterier i de tidligste faser af et syrningsforløb ("early events"). Desuden var det projektets formål at belyse sammenhænge imellem starterkulturers forhistorie, "early events" og syrningsforløb, og at anvende data fra udvalgte "early events" til at forudsige syrningsforløb.

2. Baggrund

Mælkesyrebakterier anvendes som starterkulturer i et bredt udvalg af mejeriprodukter. Deres anvendelse hviler på en hurtig syreproduktion fra laktose samt udvikling af flygtige aromaforbindelser. Syrningsforløbet er afgørende for produktets udseende, aroma, smag og konsistens, og den samlede organoleptiske kvalitet af det syrnede mælkeprodukt er bestemt af en nøje afstemt balance i fermenteringsforløbet, som igen er bestemt af kulturens aktivitet.

Traditionelt bestemmes kulturernes aktivitet ved syrningsforsøg i laboratorieskala i mælk, som strækker sig over et tidsrum på 5 – 6 timer. Der er imidlertid behov for hurtigere metoder, der samtidig giver et bedre billede af kulturens fysiologiske status, som kan anvendes til forudsigelse af fermenteringsforløbet.

Intracellulære begivenheder, som finder sted før egentlige substratændringer er målbare, er foreslået som pålidelige indikatorer for aktiviteten af starterkulturer og som centrale forudsætninger for et normalt fermenteringsforløb. Disse begivenheder er betegnet "early events", og refererer følgelig til kulturens umiddelbare reaktion på eksponering for et nyt miljø, f.eks. ved start af en syring.

De intracellulære begivenheder, der er foreslået til forudsigelse af fermenteringsforløb, omfatter bl.a. hurtigt indtrædende ændringer i cellernes udnyttelse af eksterne energikilder. Dette kan undersøges ved hjælp af den såkaldte "Acidification Power Test" (APT), som er en simpel og hurtig metode til bestemmelse af syrningsaktiviteten af en kultur. Cellernes evne til at opretholde pH_i indenfor bestemte fysiologiske grænser har betydning for cellens metabolisme og evne til at modstå stress, og denne parameter var derfor vurderet som et

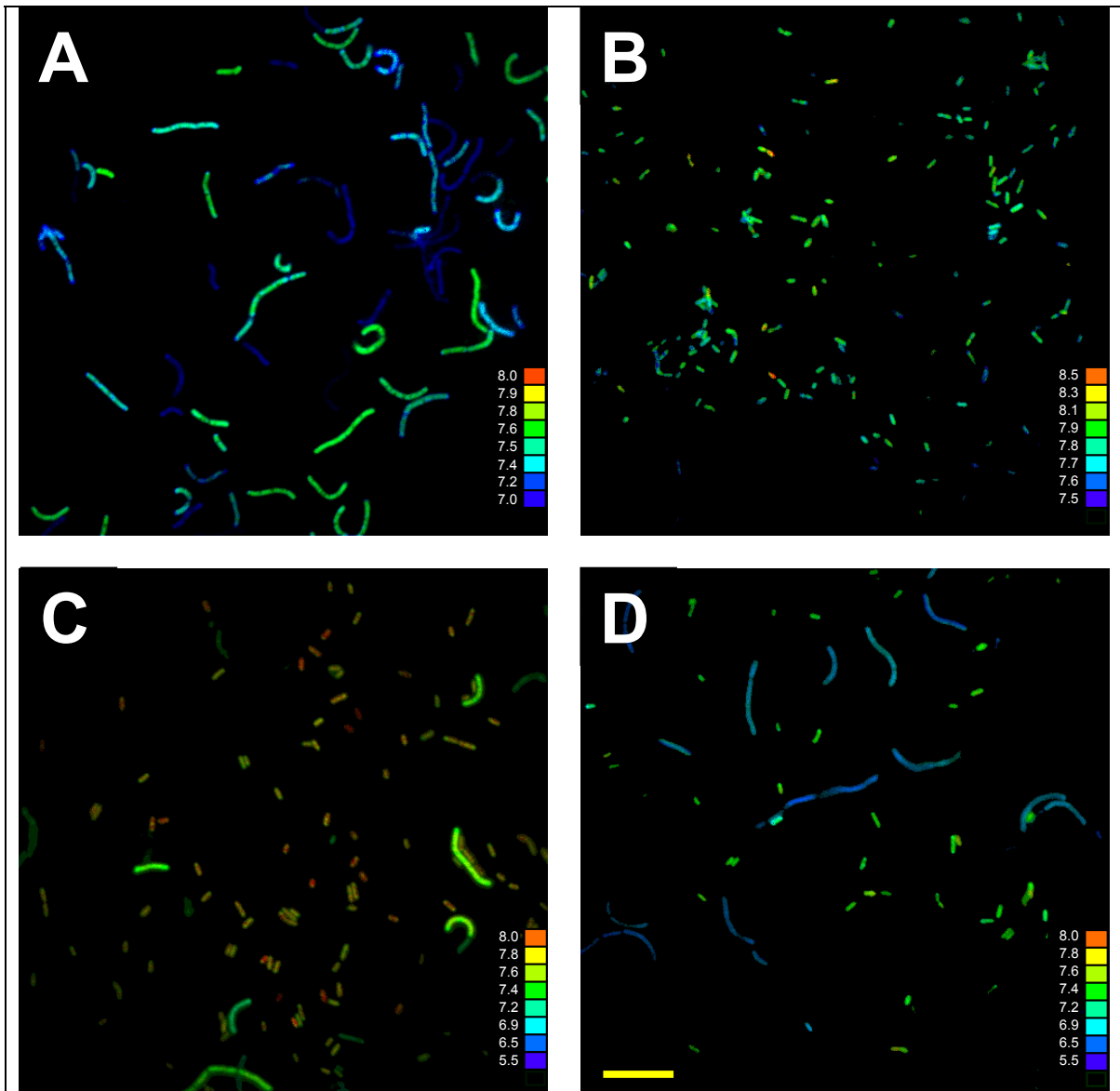
vigtigt mål for kulturens fysiologiske status. Der forelå ikke pH_i bestemmelser af mælkesyrebakterier på enkeltcelleniveau, og det var derfor en vigtig del af projektet at udvikle en sådan metode ved hjælp af FRIM. De tidlige begivenheder forudsætter ligeledes syntese af en række enzymer, og da der ikke tidligere var foretaget undersøgelser af den tidlige proteinsyntese efter inokulering i mælk, havde det også stor interesse at undersøge denne parameter, for at beskrive hvilke ændringer bakterieceller gennemgår i de tidligste stadier af den såkaldte nølefase.

3. Resultater

3.1. Måling af pH_i på enkeltcelleniveau i mælkesyrebakterier

En metode er blevet udviklet til bestemmelse af pH_i i individuelle bakterieceller. Metoden er baseret på "fluorescence ratio imaging microscopy" (FRIM), hvor cellerne bliver farvet med en fluorescerende forbindelse CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetat succinimidylester). Denne forbindelse er ikke fluorescerende i sin oprindelige form, men intracellulære esteraser spalter acetatgrupperne fra, hvorefter molekylet bliver fluorescerende. Ydermere binder succinimidylgruppen til proteiner, hvorefter man har et fluorescerende molekyle fanget i cellernes cytoplasma. Det fluorescerende molekyle er desuden pH afhængig hvis man exciterer molekylet ved 490 nm; men da fluorescensen også påvirkes af koncentrationen af farvestof, kan man opnå bedre resultater ved med korte intervaller at excitere cellerne en anden gang ved 435 nm, hvor fluorescensen ikke er pH afhængig. Derefter kan man dividere de to resultater, og opnå et koncentrationsuafhængigt forhold til bestemmelse af pH.

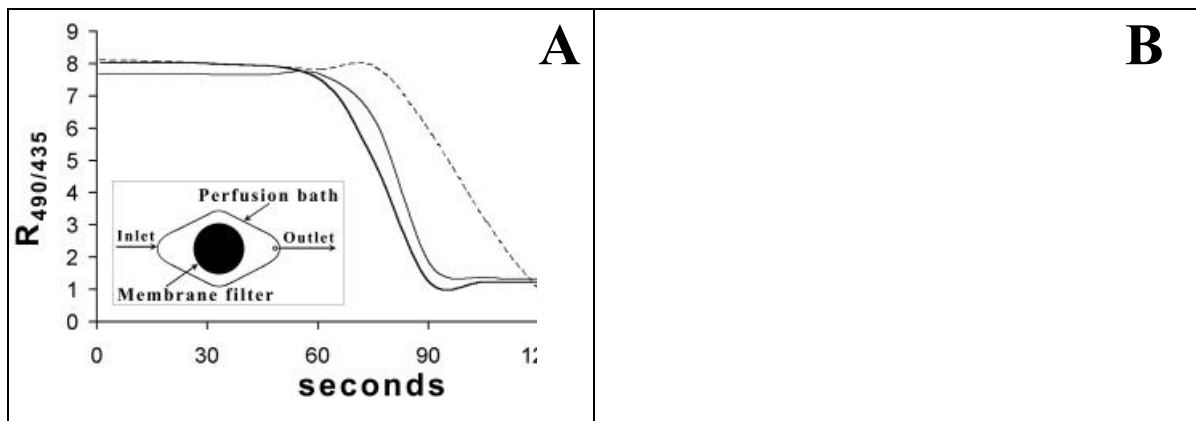
De fluorescerende celler bliver immobiliseret på et membranfilter, som efterfølgende anbringes i et perfusionskammer på et omvendt mikroskop. Cellerne bliver belyst ved de to forskellige bølgelængder, hvorefter et IMD ratio billede bliver konstrueret ved hjælp af et billedbehandlingssystem som vist i figur 1. Metodens præcision blev bestemt til 0,1 til 0,2 pH enheder. Denne eksperimentelle indgangsvinkel blev benyttet til målinger af pH_i i enkeltceller af *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* og *Listeria innocua*, og resultatet viste at mælkesyrebakterien reducerede pH_i i takt med at pH_{ex} blev reduceret, hvorimod *L. innocua* opretholdt et pH_i over 7, selv ved pH_{ex} værdier på 5. Desuden var det muligt at måle pH_i på enkeltceller i en blandingskultur, hvilket ikke tidligere har været udført.



Figur 1: Ratio billeder af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. innocua* i tilstedeværelse af 10 mM glukose. Renkulturer af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (A) og *L. innocua* (B) ved pH_{ex} 7. En blandingskultur af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (lange stave i par og kæder) og *L. innocua* (små stave) ved pH_{ex} 7 (C), og efter yderligere inkubering med 10 mM glukose i 15 min ved pH_{ex} 5 (D). Bjælke, 10 μm . En farvekodet pH skala er afbildet i hvert billede

3.2. Dynamiske ændringer i pH_i

I en fortsættelse af disse forsøg, blev det ekstracellulære pH sænket meget hurtigt ved at pumpe buffer med pH 5 ind i kammeret, og på den måde udskifte den eksisterende buffer (pH 7). Denne udskiftning foregik meget hurtigt, indenfor ca. et minut, som vist i figur 2A, og der var tydelige forskelle på hvorledes forskellige arter af bakterier reagerede på dette bratte fald i pH som vist i figur 2B.



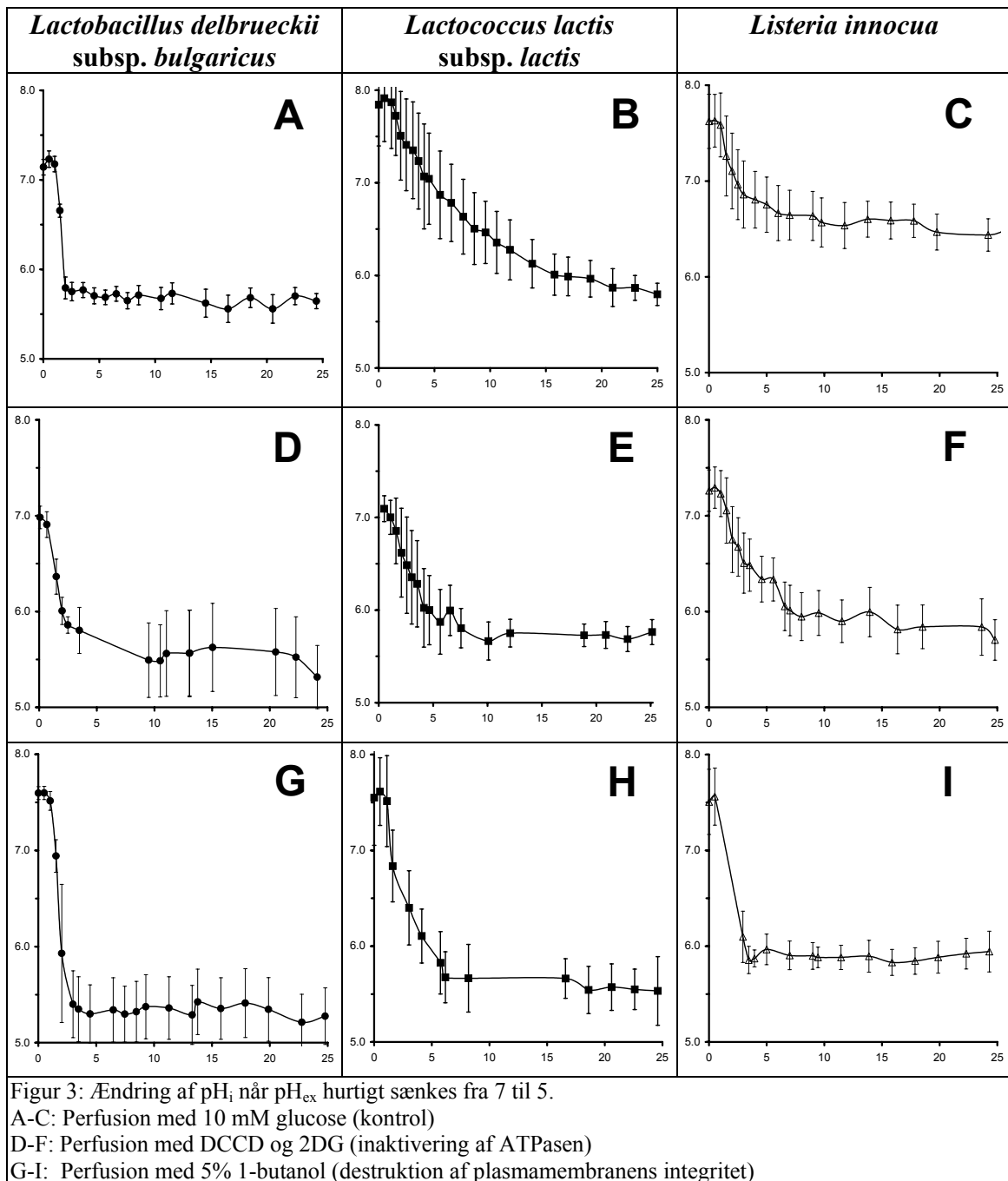
Figur 2: A: Ændring i $R_{490/435}$ (pH), når et perfusionskammer fyldt med buffer pH 7 efter et minut gennemskylles med en buffer pH 5. Faldet i pH i kammeret foregår indenfor et minut. B: Ændring i pH_i efter pH_{ex} bliver sænket fra 7 til 5. Ændringen påbegyndes efter to minutter.

(■) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, (○) *Lc. lactis* subsp. *lactis*, (Δ) *L. innocua*

Forsøgene viste at laktobaciller reducerede pH_i meget hurtigt som følge af pH faldet, hvorimod streptokokker og laktokokker reducerede pH_i noget langsommere, men dog til samme niveau som laktobacillerne. I modsætning hertil, reducerede *L. innocua* ikke pH_i i nær samme grad som mælkesyrebakterierne, og denne opførsel er også kendetegnende for langt de fleste levnedsmiddelrelevante Gram-negative bakterier, som er pH-homeostatiske, dvs. de opretholder pH_i i det neutrale område fra 7 til 8.

Evnen til at reducere pH_i , er sandsynligvis en af grundene til at mælkesyrebakterier optræder så hyppigt i spontane fermenteringer, idet pH-homeostase er energikrævende, og da mælkesyrebakterier derfor ikke skal bruge energi på denne proces, opnår de en konkurrencefordel i en blandingsflora. Ydermere tyder resultaterne på at hastigheden hvormed pH_i reduceres korrelerer med syretolerancen, idet laktobacillerne, som hurtigt reducerer pH_i er de mest syretolerante mælkesyrebakterier.

For bedre at forstå mekanismerne bag de forskellige pH_i reguleringer afbildet i figur 2B, blev det ydermere undersøgt hvorledes den aktive protontransport, som udføres af H^+ -ATPasen, og den passive pH_i regulering som er forbundet med permeabiliteten af plasmamembranen influerer pH_i reguleringen. I figur 3 er afbildet forsøg hvor det ekstracellulære pH sænkes hurtigt efter selektiv inaktivering af den aktive eller passive pH_i regulering. Da laktobaciller reducerer pH_i så hurtigt, er der ikke noget der tyder på en egentlig styring eller regulering af pH_i ; hvorimod det langsommere fald i laktokokker skyldes en mere aktiv H^+ -ATPase. I *L. innocua*, er både den aktive og passive pH_i regulering involveret i at opretholde et relativt højt pH_i . Den passive regulering skyldes primært den intracellulære bufferkapacitet.



3.3. Undersøgelse af proteinprofil og tidlig proteinekspresion i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Proteinprofilen af *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* blev undersøgt i den eksponentielle og den stationære væksthase, ved hjælp af to-dimensionel gelelektroforese, og resultaterne efter vækst i rigt medie (MRS) med glukose som kulhydratkilde ses i figur 4. Generelt viste forsøgene en meget stor reproducerbarhed. Identiteten af proteiner, der var til stede i store mængder blev bestemt ved hjælp af N-terminal sekvensanalyse eller massepektrometri (Tabel 1).

Tabel 1. Kvantificering og identificering af "tidlige" proteiner i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Spot ^a #	Spot intensity ^b		³⁵ S	Mol. weight (kDa)	pI	N-terminal sequences and sequence alignment		Homologue
	Exp.	Stat.				N-terminal sequences	sequence alignment	
A	14.2 ± 2.7	43.4 ± 0.7	0.053 ± 0.015	67.3	4.90	- A K D I K F S E D A r/i Y L/s M L¹	60 kDa heat shock protein (GroEL) ^{2,3}	
				57.4	4.89	M A K E I K F S E D A R A A M L²	not determined	
				57.2	4.75	M S K D I K F S S D A R T A M M³	not identified	
B	7.4 ± 0.8	not matched	0.048 ± 0.007	65.1	4.68	k A n¹	not determined	
C	6.8 ± 0.6	0.7 ± 0.1	0.013 ± 0.003	52.2	5.82	K E N N Q F L A A L A Q M K E V V q Y¹	not determined	
D	42.4 ± 1.9	32.6 ± 0.2	0.076 ± 0.024	50.1	5.00	t/a e/k v/k e/v h/i e/y n/v v/? t/? a/k ? E I F¹	Elongation factor (EF-TS) ³	
E	6.1 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.013 ± 0.001	46.6	5.13	q/a N I T A ? Q V K E L m E T T G A G V q¹	Triosephosphate isomerase (Tpi) ^{3,4}	
				32.2	5.17	M A I T A Q Q V K E L R E K T G A G M M³	not identified	
F	3.3 ± 0.9	1.8 ± 0.3	0.009 ± 0.002	28.7	4.70	- k R R T P I I A G N ? K L N¹	Homologue to H based on MS (HPr)	
				27.4	4.74	M S R R T P I I A G N W K L N⁴	Phosphocarrier protein (HPr) ^{3,5}	
				26.9	4.63	M S R R K P I I A G N W K M N³	10 kDa heat shock protein (GroES) ^{6,7}	
G	7.1 ± 0.8	1.8 ± 0.4	not matched	15.0	5.25	M K K L D A T T L T A D Q I f f i/k D A L ? F v L¹	30S ribosomal protein S6 (RPSF) ⁸	
H	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.047 ± 0.008	12.0	5.85	M K K L N T N K L T E E¹	not identified	
				12.4	6.71	M K K L K L N K I I N E⁵		
I	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	54.2 ± 1.87	12.8	4.70	N-terminally blocked		
J	3.3 ± 0.4	1.4 ± 0.1	11.3 ± 1.32	12.8	4.90	M E K K E F ? I I A E T G I ? P A T L L V Q A A S K¹		
				9.3	4.92	M E K R D F H V V A D T G I H A R P A T L L V Q T A S K⁵		
				9.2	5.05	M A S K E F H I V V E T G I H A R P A T L L V H T A S K³		
K	1.7 ± 0.6	13.3 ± 0.9	1.06 ± 0.18	9.9	4.95	M L T P I G D ? V I V E V I E ? E E S Q V¹		
				10.0	4.93	M L K P L G D R V I V E V E E Q T V⁶		
				10.2	5.03	M L K P L E N R V V L R V K E E E K S M⁷		
L	1.3 ± 0.3	0.6 ± 0.0	1.27 ± 0.38	9.9	5.30	M T T K Y E I T Y I I ? P D V¹		
				11.1	5.23	M R - K Y E V M Y I I R P N I⁸		
M	5.2 ± 0.3	1.6 ± 0.1	31.9 ± 0.30	6.3	4.35	V K M T F S P E A R D F L Q K K L G N¹		

Amino acid sequences are presented in 1-letter code. Small letters depict amino acids not identified with certainty. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 sequences and identical amino acids in homologous sequences are marked in bold. A gap in the alignment is marked with a dash and question marks indicate unidentified amino acids. The underlined peptide sequence in **J** was determined by nano electrospray MS/MS.

^aLetters correspond to spots indicated in Figure 4 and 5.

^bAverage of volume on two gels ± half the difference, normalized to $\sum \text{Spot}\{A, M\} = 100\%$. Spots **A** to **M** represent 31.3%, 36%, and 83.4% of the spots scored from the exponential, stationary and ³⁵S labelled proteins.

¹*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772, this study

²TrEMBL O32847 (*Lactobacillus zeae*)

³*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 (Dr. A. Bolotin, INRA, personal communication)

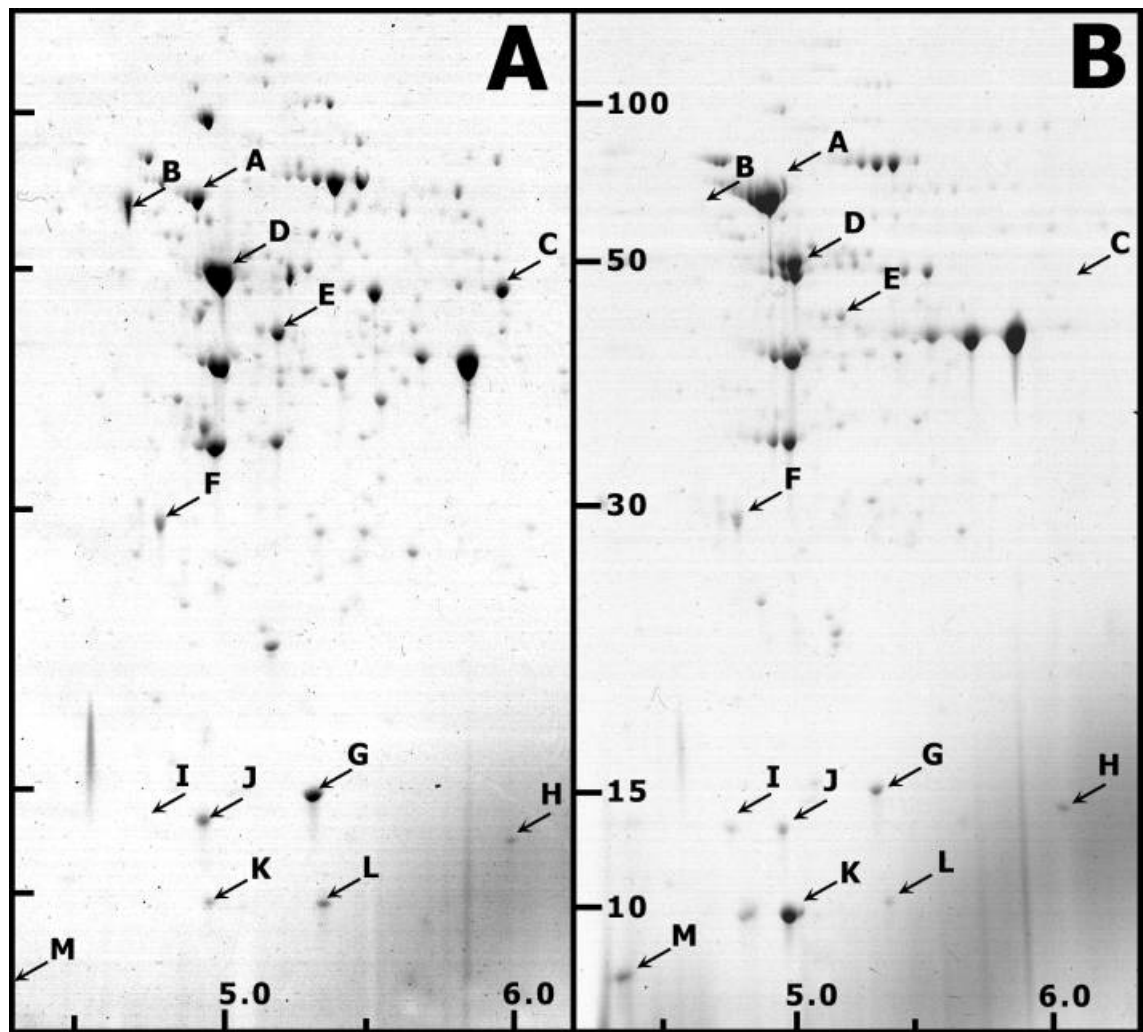
⁴SWISS-PROT O32757 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*)

⁵SWISS-PROT O07125 (*Lactobacillus sake*)

⁶TrEMBL O32846 (*Lactobacillus zeae*)

⁷SWISS-PROT P37283 (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*)

⁸SWISS-PROT P21468 (*Bacillus subtilis*)

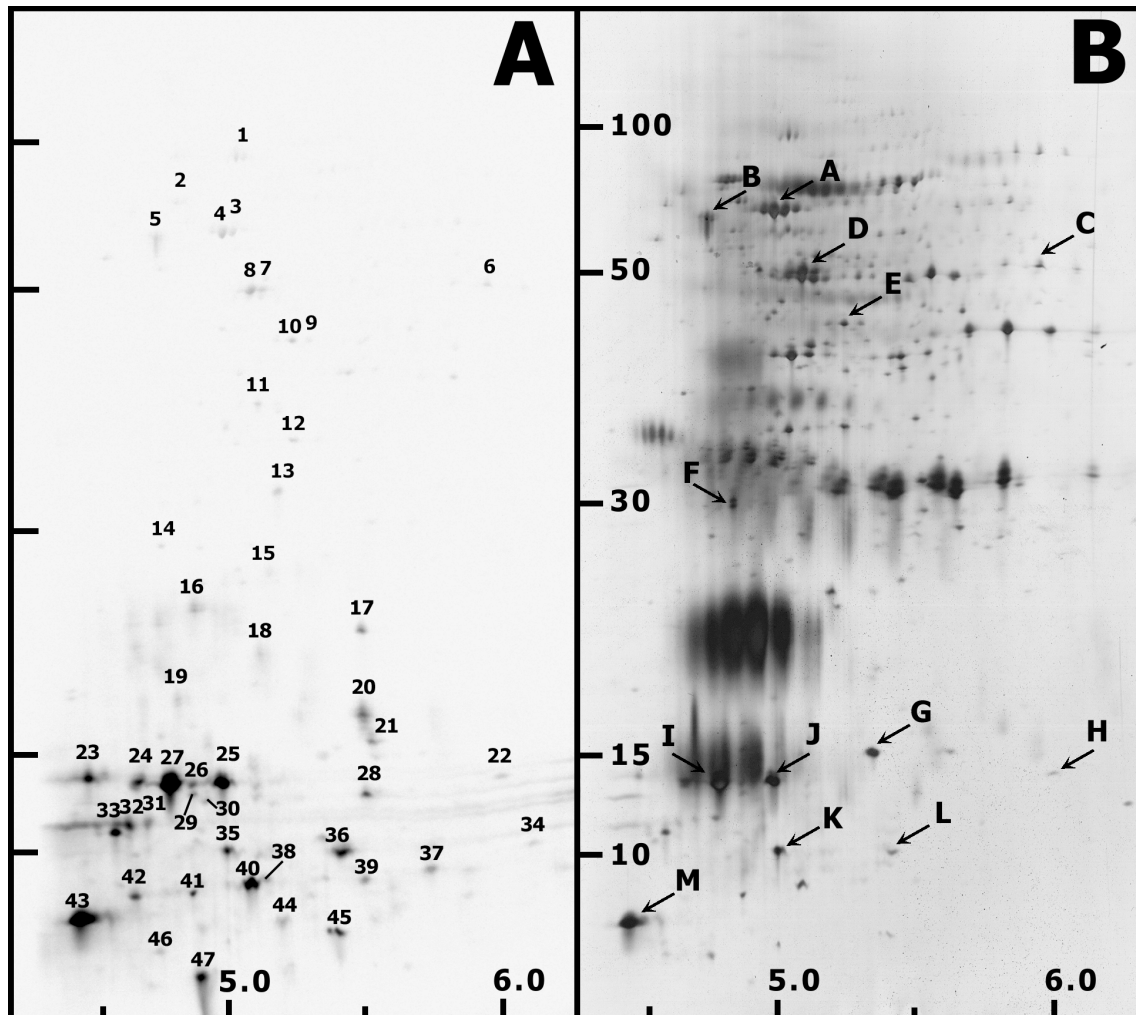


Figur 4: Proteinprofilen af (A) eksponentielt voksende og (B) stationære celler af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Total protein ekstrakt af celler opvokset i MRS blev separeret ved 2D gelelektroforese og visualiseret med Coomassie Blue. Proteinerne A-M fra tabel 1 er indikeret med pile.

Hvis man tilsætter radioaktivt mærket methionin til rekonstitueret skummetmælk, opnår man at denne methionin bliver inkorporeret i nysyntetiserede proteiner. Dette projekt undersøgte for første gang den tidlige proteinsyntese efter podning i mælk, og resultatet er afbildet i figur 5. Efter 2D gelelektroforese var over 80 % af den totale mængde nysyntetiseret protein koncentreret i tre pletter på gelen. To af pletterne var isoformer af det varme-stabile phosphoryl carrier protein (HPr), og den sidste plet var et ukendt protein (EPr1). Da cellerne var opvokset med glukose som kulhydratkilde (MRS) før konservering, er det interessant at der ikke foregår nysyntese af proteiner til laktoseoptag eller glykolytiske proteiner. Dette indikerer at cellerne ikke har behov for yderligere syntese af disse proteiner, fordi der åbenbart er nok til stede til at omdanne laktose til laktat fra tidspunktet for inokulering (se omtalen af "Acidification Power Test" nedenfor). Ydermere er den store mængde af nysyntetiseret HPr en indikation af en regulatorisk funktion for dette

protein i forbindelse med initiering af vækst, hvorimod der ikke nysyntetiseres stressproteiner af betydning.

Det er også værd at bemærke at langt de fleste af de 47 identificerede ”nye” proteiner i figur 5 har en lav molekylvægt og et lavt isoelektrisk punkt (nederst til højre i figur 5A), idet dette område af 2D-gelen sædvanligvis ikke indeholder mange kraftigt udtrykte proteiner (jvf. figur 4).



Figur 5: Tidlige proteiner fra af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, syntetiseret indenfor de første 30 min af en syring i rekonstitueret skummetmælk. (A) Autoradiogram; (B) Samme gel efter sølvfarvning, som ydermere viser mælkeproteinerne. De identificerede proteiner er indikeret med pile.

3.4. ”Early events” som indikator for syrningsaktivitet

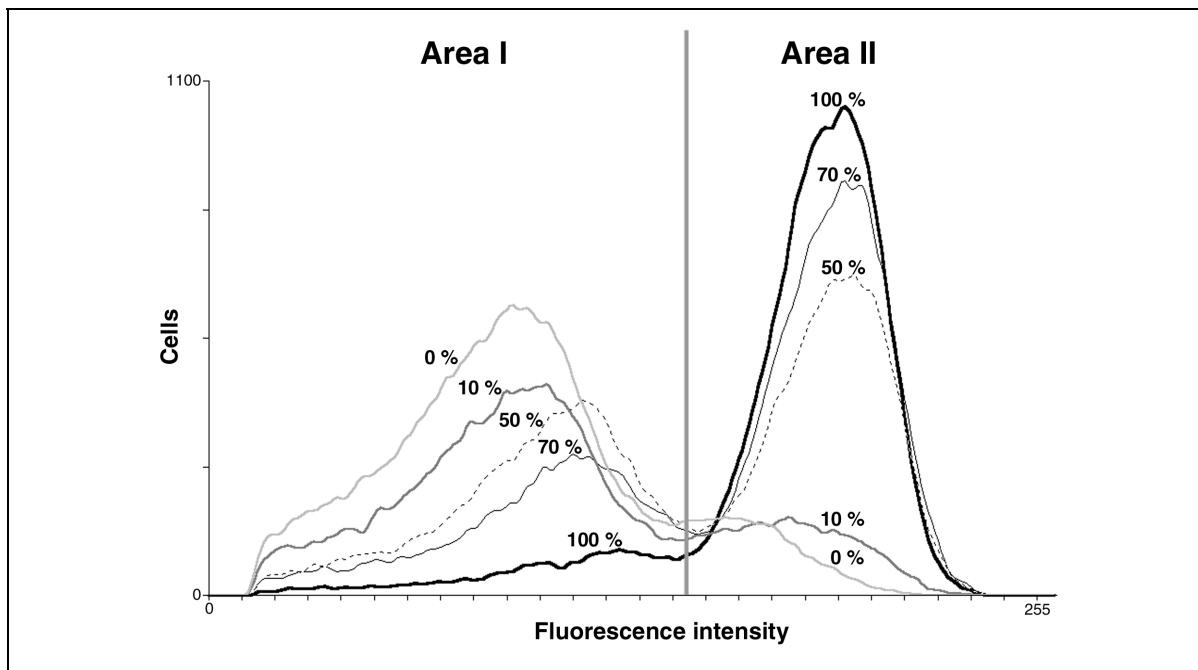
For at kunne bestemme sammenhængen imellem udvalgte ”early events” og den tidskrævende bestemmelse af syrningsaktivitet, blev det besluttet at fremstille standardiserede kulturer med kendt viabilitet. Derfor blev to konserverede kulturer af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fremstillet, med meget forskellig viabilitet. Den ene kultur blev høstet i stationær fase, vasket, tilsat 10 % glycerol og derefter straks frosset, hvorefter den blev

opbevaret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Denne kultur havde derfor en meget høj proportion af overlevende celler målt som antallet af kolonidannende enheder. Den anden kultur blev høstet fra eksponentiel fase, hvorefter den blev frysetørret uden beskyttende stoffer, hvorfor denne kultur havde en meget lav andel af overlevende celler. Ved at fremstille standardiserede blandinger af disse to kulturer var det muligt at fremstille kulturer med op til 50 gange forskel i antallet af kolonidannende enheder. Disse kulturer blev derefter analyseret ved hjælp af traditionelle syrningsforsøg i mælk, og forskellige hurtigmetoder til bestemmelse af aktivitet.

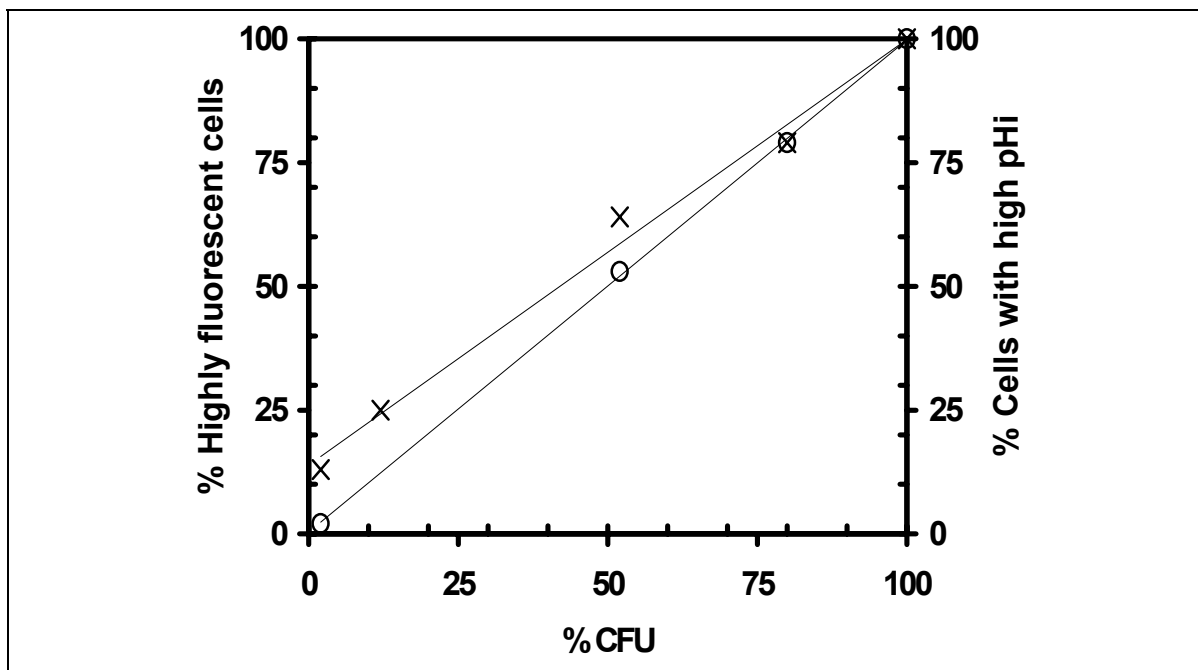
”Acidification Power Test” (APT) er en metode til forudsigelse af syrningsaktivitet som består i at måle pH-faldet efter tilsætning af forgærbart kulhydrat (laktose) til en koncentreret cellesuspension. Metoden er meget hurtig idet den består af 10 minutters måling af pH-fald før tilsætning af laktose og 10 minutters måling efter tilsætning. I projektet blev det vist at metoden kan reduceres til måling efter tilsætning af laktose, og metoden blev ydermere reduceret til kun at anvende 2 ml cellesuspension. Faldet i pH begynder nærmest momentant efter tilsætning af laktose, og da de frosne celler anvendt til dette forsøg var de samme som blev anvendt til undersøgelsen af proteinsyntesen, understøtter den momentane syring at alle enzymer til omsætning af laktose er til stede i rigelige mængder i de frosne celler. Hvis man sammenligner resultaterne fra APT med syring af mælk er resultaterne så sammenlignelige, at måling af APT vil kunne erstatte syrningsforsøg som aktivitetsmål.

Imidlertid måler APT en aktivitet på populationsniveau, og hvis man ønsker en hurtigmetode der mere generelt siger noget om bakteriers fysiologiske tilstand, er det ønskværdigt at benytte en metode der kan skelne på enkeltcelleniveau. Derfor blev de standardiserede blandinger også undersøgt ved hjælp af flowcytometri og FRIM. Resultaterne fra den flowcytometriske analyse er afbildet i figur 6, og selvom denne metode afspejler at blandingerne består af to subpopulationer, er korrelationen mellem antallet af celler med en høj fluorescens (celler med god fysiologisk status), og antallet af kolonidannende enheder ikke god, når antallet af beskadigede (frysetørrede) celler er højt.

I modsætning hertil har antallet af celler som opretholder en pH-gradient (forskul mellem pH_i og det ekstracellulære pH) en meget fin korrelation med antallet af kolonidannende enheder, som det ses i figur 7.



Figur 6: Histogrammer af fluorescensintensiteten af de definerede blandinger efter farvning med CFDA-SE. Blandingerne indeholder to populationer med hhv. lav fluorescens (Area I) og høj fluorescens (Area II).



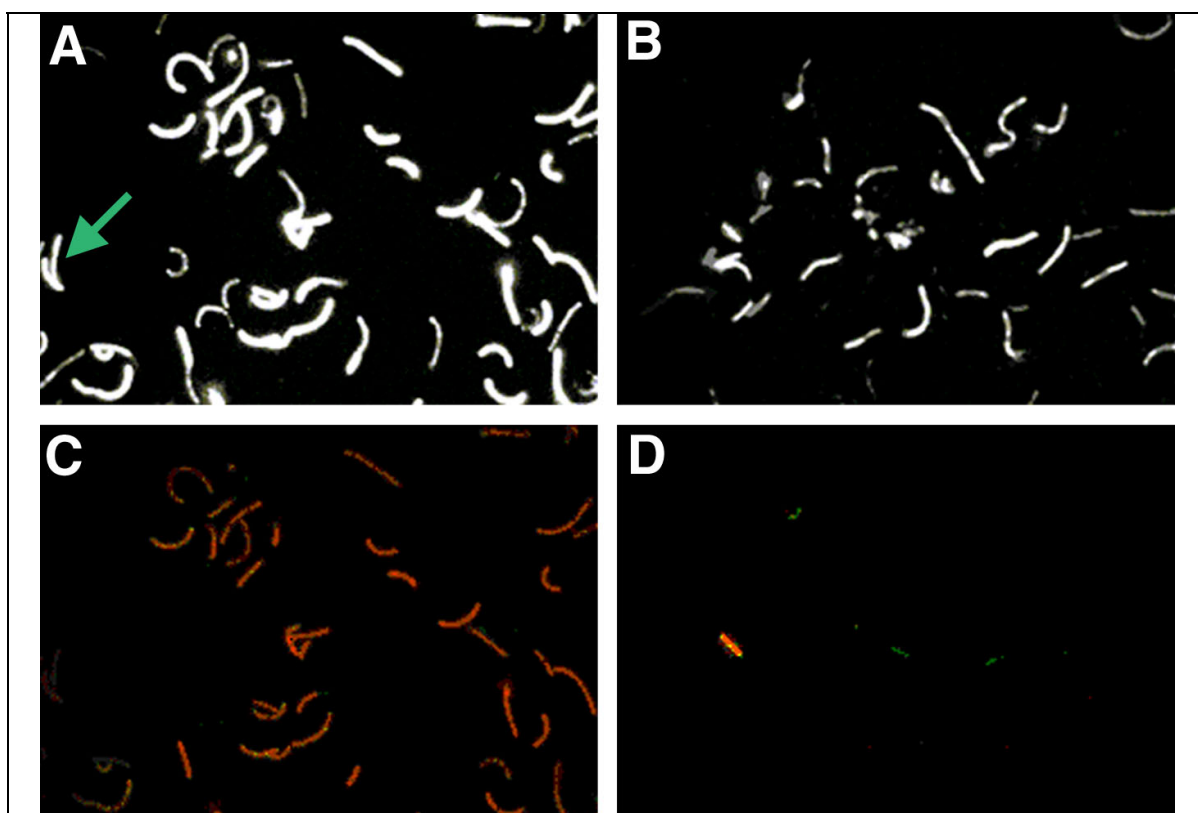
Figur 7: Korrelation imellem viable celler bestemt ved CFU, flow cytometry og FRIM.

(x) Korrelation imellem flowcytometri og CFU: $y = 0.8601x + 13.882$, $R^2 = 0.9906$;

(O) Korrelation imellem FRIM og CFU: $y = 0.9938x + 0.3883$, $R^2 = 0.9997$.

FRIM analysen af de standardiserede blandinger viste også at nogle celler har en høj fluorescens uden at have en høj pH_i (figur 8), og dette er sandsynligvis grunden til at de flowcytometriske analyser, som måler fluorescensintensitet istedet for pH_i, overestimerer antallet af kolonidannende enheder, når der er mange beskadigede celler. Da der tydeligvis er en sammenhæng imellem syrningsaktivitet og antallet af kolonidannende enheder, må

FRIM derfor anses for en meget lovende hurtigmetode til bestemmelse af syrningsaktivitet. Metoden er under patentering.



Figur 8: Fluorescens billeder (A, B) og ratio billeder (C, D) af *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i buffer pH 6 med tilstedeværelse af 10 mM glukose. (A, C) Celler konserveret ved frysning (= høj viabilitet) (B, D) Celler konserveret ved frysetørring (= lav viabilitet). Begge blandinger indeholder et højt antal fluorescerende celler; men antallet af celler som opretholder en ΔpH (kraftigt røde celler i C og D) er meget højere i blandingen med høj viabilitet (C). Et eksempel på en celle som er kraftigt fluorescerende uden at opretholde en ΔpH ses ved den grønne pil (A).

4. Konklusion

I kraft af de udviklede metoder og de opnåede resultater, har projektet bidraget med ny viden om hvilke intracellulære begivenheder, som indtræffer ved podning i nyt medium. Ydermere har projektet identificeret en "early event", opretholdelsen af en pH- gradient, som på enkelcelleniveau er stærkt korreleret til cellens evne til at formere sig, hvilket igen har betydning for en effektiv syring. De identificerede hurtigmetoder til bestemmelse af syrningsaktivitet viste sig at være succesfulde både på populationsniveau (APT) og enkeltcelleniveau (FRIM), og de opnåede resultater har i stort omfang kunnet anvendes til publikationer i internationale videnskabelige tidsskrifter

Publikationer:

1: Artikler i internationale videnskabelige tidsskrifter

Siegumfeldt, H., Rechinger, K. B. & Jakobsen, M. (1999) The use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacterial cells in mixed cultures. *Microbiology*, **145**, 1703-1709.

Siegumfeldt, H., Rechinger, K. B. & Jakobsen, M. (2000) Dynamic changes of intracellular pH in single cells of lactic acid bacteria in response to a rapid drop in extracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2330-2335.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H., Svendsen, I. & Jakobsen, M. (2000) "Early" protein synthesis of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in milk revealed by ³⁵S methionine labeling and two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis*, In Press.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. Rapid assessment of Cell Viability in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by measurement of intracellular pH in individual cells using fluorescence ratio imaging microscopy. In preparation for submission to *Applied and Environmental Microbiology*.

Siegumfeldt, H., Rechinger, K. B. & Jakobsen, M. Mechanisms for Regulation of Intracellular pH in Single Cells of Bacteria. In preparation for submission to *Applied and Environmental Microbiology*.

2: Extended abstracts (trykt i proceedings)

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1998) Cell vitality and cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* assessed by flow cytometry. I: J. Slavik. (Ed.) *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes* (Vol. 2), Plenum Press, NY, 1998, 239-244.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1999) Regulation of intracellular pH of individual bacterial cells in mixed cultures as a basic mechanism of microbial interactions. I: A.C.J. Tuijtelaars, R.A. Samson, F.M Rombouts and S. Notermans (Eds.) *Food*

Microbiology and food safety into the next millenium. Ponsen & Looyen, Wageningen, Netherlands, 1999, 200-203.

3: Ph.d. afhandling

The dynamics of pH_i regulation in lactic acid bacteria. Forsvaret af Henrik Siegumfeldt den 13. juni 2000.

4: Artikler i danske fagblade:

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1997) "Tidlige begivenheder" i syrningskulturer, Mælkeritidende, 15, 388-390.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (2000) "Early events" i starterkulturer, Plus Proces, 1, 3-5.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (2000) Forskning i "Early events" i starterkulturer, Dansk Kemi, 4, 34-38.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (2000) Artikel til Mælkeritidende (under udarbejdelse).

Patentansøgning:

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (2000). Rapid Method of monitoring cell viability and activity. Prioritetsgivende dansk patentansøgning. PA 2000 00449.

Foredrag:

Siegumfeldt, H. (1999) Intracellular pH in single bacterial cells determined by fluorescence ratio imaging. 1st International Conference on "Analysis of microbial cells at the single cell level why, how, when?", 1999, Como-Italy, 1999

Rechinger, K. B. (1999) Intracellular pH in single bacterial cells. Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen 28/06 1999.

Rechinger, K. B. (1999) Regulation of intracellular pH of individual bacterial cells in mixed cultures as a basic mechanism of microbial interactions. 17th International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Veldhoven, 1999

Siegumfeldt, H. (1999) Moderne mikroskopiteknik: Flowcytometri, Ratioimaging mm. Møde i Levnedsmiddelselskabet 15/11 1999.

Posters ved kongresser og konferencer:

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1997) Cell vitality and cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* assessed by flow cytometry. 2nd Conference on Fluorescence Microscopy and Fluorescent probes, Prague, Czech Rep. 09-12/04 1997.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1997). "Early events" i mælkesyre bakterier. Mejeriforskningsdag 97, Århus 07/11 1997,.

Siegumfeldt, H. & Rechinger, K. B. (1997). "Early events" in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* assessed by fluorescence microscopy and flow cytometry. Symposium: Focus on fluorescence – Industrial applications, Leiden, Netherlands 17/11 1997.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1998). "Early events" i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. LMC Kongres, Lyngby 29-30/1 1998.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1998). "Early events" in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. 25th International Dairy Congress, Århus 21-24/09 1998.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1999). Assessment of physiological status in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. LMC Kongres, Frederiksberg 28-29/1 1999.

Siegumfeldt, H. & Rechinger, K. B. (1999) Intracellular pH in single bacterial cells determined by fluorescence ratio imaging. 1st International Conference on "Analysis of microbial cells at the single cell level why, how, when?", Como, Italy 25-27/03 1999.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1999). Regulation of intracellular pH of individual bacterial cells in mixed cultures as a basic mechanism of microbial interactions. 17th International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Veldhoven, Netherlands 13-17/09 1999.

Rechinger, K. B., Siegumfeldt, H. & Jakobsen, M. (1999). Early protein synthesis in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. 6th Symposium on lactic acid bacteria Veldhoven, Netherlands 19-23/09 1999.

Kontakter:

Dr. Gert J. Grobben, Division of Industrial Microbiology, Department of Food Science, Agricultural University, Wageningen. (Udarbejdelse af syntetisk medium, K.B. Rechinger på besøg i november 1997)

Dr. Pieter Breeuwer, Division of Industrial Microbiology, Department of Food Science, Agricultural University, Wageningen. (måling af intracellulær pH)

Dr Ian R. Booth, Dept. of Molecular & Cell Biology, Institute of Medical Sciences, Aberdeen University. (brug af pH-følsomt GFP, K.B. Rechinger på besøg i juni 1999)

Frederiksberg 11. juni 2003

Henrik Siegumfeldt, K. Bjørn Rechinger og Mogens Jakobsen

