

Afslutningsrapport

Lactococcus lactis med ændrede proteolytiske egenskaber

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1995-3

December 1995



mejeriforeningen

danish dairy board

Afsluttende rapport for projektet

***LACTOCOCCUS LACTIS* MED ÆNDREDE PROTEOLYTISKE EGENSKABER**

José Arnau, Eva Hjerl-Hansen og Hans Israelsen
Bioteknologisk Institut, Kogle Allé 2, 2970 Hørsholm.
Tlf. 4516 0444
Fax-nr. 4516 0455.

RESUMÉ (DK)

Bovin plasmin er en serinprotease, der findes naturligt i mælk. Plasmin nedbryder mælkeproteiner, kaseiner, og har indflydelse på ostemodnings-processen. Der er behov for at få produceret plasmin i tilstrækkelige mængder m.h.p. opklaring af plasmins betydning for ostemodning. I dette projekt har det været målet at konstruere mælkesyrebakterier, der producerer bovin plasmin. DNA, der koder for fragmenter af bovin plasmin, blev indsat i ekspressions-vektorer og introduceret i mælkesyrebakterien *Lactococcus lactis*. Plasmin blev detekteret intracellulært i stamme BPL25. Produktion af plasmin intracellulært viste sig at være skadeligt for cellerne og resulterede i celledress og -lysis. Plasmin blev også fundet ekstracellulært i stammen BPL420, hvor plasmingenet er koblet til *usp45* promotor og signalsekvens fra laktokokker. Det lactococ-producerede plasmin viste sig at være katalytiske aktivt. Aktivitets-niveauerne var formodentlig for lave til anvendelse af de konstruerede stammer i osteforsøg. Derfor sigtes der i et nyt FØTEK2-projekt (*‘Identifikation af transportsignaler, der i mælkesyrebakterier sikrer udskillelse af plasminogen-fragmenter’*) på at højne produktionssniveauet af plasmin ved at anvende forbedrede transportsignaler.

ABSTRACT (UK)

Plasmin is a serine protease normally found at low level in milk. Heterologous production of bovine plasmin was studied in the industrially relevant bacterium *Lactococcus lactis*, as a first step to study the effect of increased amounts of this protease in cheese maturation. Two sets of lactococcal gene expression signals were coupled to a region of the plasmin gene coding for the C-terminal region of plasmin including part of Kringle 5 and the serine protease domain (B-chain). Using the promoter region of the *prtP* gene, plasmin was detected mainly intracellularly in strain BPL25 using Western blot hybridization. Intracellular presence of plasmin led to physiological stress. Expression of the plasmin gene driven by the promoter and complete signal sequence of the lactococcal *usp45* gene resulted in plasmin secretion in strain BPL420. Cell lysis was observed in strains producing plasmin fragments including the catalytic domain but not in control strains, which only produced a non-catalytic region of plasmin. The plasmin produced was shown to be biologically active. Presently, the levels of plasmin activity observed are relatively low to allow the study of acceleration of cheese maturation. In a new FØTEK2-projekt (*‘Identifikation af transportsignaler, der i mælkesyrebakterier sikrer udskillelse af*

plasminogen-fragmenter'), we aim at increasing the plasmin production using alternative and more efficient signal sequences.

FORMÅL OG MÅL

Projektets formål har været at bidrage til opklaringen af plasmins rolle under ostemodning. Målet har været at konstruere mælkesyrebakterier, der producerer katalytisk aktivt plasmin. Et sekundært mål har været at udvikle prototyper på nye mælkesyrebakterier til accelereret ostemodning.

BAGGRUND

Surmælksprodukter og ost produceres ved fermentering af mælk. Under fermenteringen forløber et stort antal enzymatiske processer, som påvirker produktets aroma, smag, konsistens, holdbarhed og udseende. Ved produktionsstart tilsættes en starterkultur med mælkesyrebakterier, som under den efterfølgende vækst omdanner mælkesukker til mælkesyre. Den resulterende syring har en konserverende effekt. Under fermenteringen producerer mælkesyrebakterierne også proteaser og peptidaser til nedbrydning af mælkeproteinerne, kaseiner, til peptider og frie aminosyrer. Bakterierne anvender blandt andet de frie aminosyrer til opbygning af bakterielle proteiner. Nedbrydning af kaseinerne og dannelsen af peptider påvirker mejeriproduktets konsistens og smag. I disse år forskes der intenst i forståelsen af mælkesyrebakteriers proteaser og pepsidasers indflydelse på nedbrydningen af mælkeproteiner. Målet er at kunne påvirke ostemodning både med hensyn til smagsudvikling og modningshastighed (se f.eks. Kunji et al. 1996, A. van Leeuwenhoek 70:187-221).

Imidlertid indeholder mælk i sig selv proteaser, som også påvirker forløbet af ostemodning. I Torben Ellebæk Petersen's gruppe på Laboratoriet for Proteinkemi på Aarhus Universitet er der gennem en årrække blevet forsket i mælkezymer og proteiner (Benfeldt et al. 1995, Int Dairy J 5: 577-592, Berglund et al. 1995 Int Dairy J 5: 593-603). I mælk findes plasmin, der er en protease. Plasmin nedbryder α_2 - og β -kasein og er tilsyneladende vigtig for osts modningsproces (Fox et al. 1996, A. van Leeuwenhoek 70:271-297). Farkey og Fox (1992, J Dairy Res 59: 209-216) har vist, at ekstra tilsætning af plasmin medfører en hurtigere modningshastighed for ost. I blodet er plasmin en komponent i det fibrinolytiske system. Bovin plasmins inaktive forstadiet er plasminogen, et protein, der er opbygget af 786 aminosyrer (Benfeldt et al. 1995, Int Dairy J 5: 577-592). Både urokinase-plasminogenaktivator (uPA) og vævsplasminogenfaktor (tPA) kan aktivere bovin plasminogen ved at spalte peptidbindingen mellem aminosyrerne arginin og isoleucin i position 557 og 558. Spaltningen medfører at de resulterende kæder, A- og B-kæderne, kun holdes sammen af to svovlbroer. Funktionen af de såkaldte kringler i A-kæden er knyttet til plasmins evne til at binde sig til fibrin i blod, mens B-kæden indeholder det katalytiske domæne. I mælk er mini-plasmin identificeret - en forkortet men katalytisk aktiv form af plasmin bestående af kringler 4 og 5 associeret til B-kæden via de to svovlbroer (Benfeldt et al. 1995, Int Dairy J 5: 577-592).

Da oprenset plasmin er for kostbart til anvendelse til karakterisering af plasmins rolle under ostemodning, er et alternativ, at få den anvendte starterkultur til at producere plasmin.

I dette projekt har det været målet at konstruere mælkesyrebakterier, der producerer katalytisk aktivt plasmin. Formålet har været at bidrage til opklaringen af plasmins rolle under ostemodning. Under de rette forudsætninger vil der som sidegevinst være udviklet prototyper på nye mælkesyrebakterier til accelereret ostemodning.

FORUDSÆTNINGER:

Projektet blev igangsat 1992. Det første grundlag for projektet var genetisk materiale med bovin plasmin- cDNA, som skulle produceres i Torben Ellebæk Petersen's gruppe. Ved projektets start havde Lab. for Proteinkemi endnu ikke færdiggjort cDNA-kloningerne. Derfor blev der i det første halve år arbejdet med cDNA, der koder for human uPA. I april 1993 modtog vi fra Lab. for Proteinkemi en cDNA-klon, der koder for et fragment, der strækker sig fra Kringle 5 til C-terminalen af plasmin. Senere modtog vi cDNA-kloner, som koder for den resterende del af plasmin.

I 1992 var der kun beskrevet et relativt begrænset udvalg af genetisk værktøj til brug i mælkesyrebakterien *Lactococcus lactis*. Ud fra litteraturen var det oplagt at anvende to vektorer, pNZ336 og pNZ337, fra NIZO i Holland. Vektorerne blev fremskaffet.

Produktion af katalytisk aktive eukaryote enzymer i bakterier kan være problematisk. Årsagen skyldes primært, at det færdige enzym kan få en forkert konformation, f.eks. fordi svovlbroer enten ikke dannes (ved intracellulær ophobning i bakterien) eller dannes tilfældigt (ved ekstracellulær lokalisering). Da plasmin indeholder en del svovlbroer, viste vi på forhånd, at konformationsaspektet kunne blive en væsentlig barriere i bestræbelserne på at producere et aktivt enzym i mælkesyrebakterier.

DETALJERET RESULTATBESKRIVELSE INKL. AFVIGELSER FRA FORSØGSPLANER OG FORUDSÆTNINGSBRIST

Hjemtagning og kontrol af genetisk værktøj

Projektet blev indledt med at hjemtage og undersøge vektorer til brug i laktokokker. Fra de hollandske mejeriers R&D-institut, NIZO, modtog vi kloningsvektoren pNZ336 og expressionsderivatet heraf, pNZ337 (se Arnau et al. 1997, in press). Vektoren pNZ336 indeholder et promotorløst *lacG* gen (som koder for phospho- β -galactosidase), et *cat*-gen som resistensmarkør og et pSH71- replikon, som er rolling circle replikerende; pNZ337 indeholder endvidere promotoren P^{prp} opstrøms for *lacG* og to restriktionsenzym sites mellem promotor og *lacG*.

Kloning og expression af human uPA i laktokokker

Vi modtog en human uPA-cDNA-klon, pcUK176, *m.h.p.* kloning og expression af human uPA i laktokokker. Det var hensigten, at vi kunne erhverve os erfaring i

kloning og expression af komponenter fra det fibrinolytiske system i laktokokker, inden plasmin-cDNA kloner blev leveret fra Torben Ellebæk Pedersens gruppe. Et 1337 bp *ScaI-StuI* fragment fra pcUK176, der inkluderer uPAs sekvens fra codon nr. 14 blev klonet i *SmaI*-skåret pNZ337, hvor ekspressionen er styret af P^{prtP} . Orientering af uPAs fragment viste sig at være forkert i alle de undersøgte *E. coli* kolonier. Samme fragment kunne klones i rigtig orientering i pNZ336, hvor der ikke ligger en promotor opstrøms fra *SmaI*-sitet. Plasmidet pNZ336::uPA blev introduceret i laktokokker. Immunoblot med anti-uPA-antistoffer, hvor intracellulært ekstrakter fra *L. lactis* pNZ336::uPA-stammen blev analyseret, viste et specifikt, svagt bånd. Årsagen til detektionen af uPA fra denne konstruktion skyldes formodentlig en svag gennemlæsning fra det opstrøms liggende gen, *repA*, i pNZ336 og/eller en kunstig promotordannelse under kloningen. På dette tidspunkt meddelte Torben Ellebæk Petersen, at tPA og ikke uPA var ansvarlig for omdannelse af plasminogen til plasmin i mælk/ost, hvorefter en videre karakterisering af uPA-produktionen i laktokokker blev standset.

Kloning og expression af bovin plasmin i laktokokker

Vi modtog en cDNA-klon, 6-4, fra Torben Ellebæk Petersens gruppe. Klon 6-4 indholder 1200 bp af plasmingenetets 3'-ende. Klonen blev sekventeret og anvendt til PCR-amplifikation af et fragment, som koder for de 477 C-terminale codons fra plasmin. Dette fragment blev forsøgt klonet i pNZ337 med samme resultat, som beskrevet ovenfor for uPA. Kloning af samme fragment i pNZ336 kunne gennæføres i *E. coli*. Derefter blev SB-promotoren (P^{SB}) fra lactococcer indsat foran plasmingenet i pNZ336. Det resulterende plasmid kunne konstrueres i *E. coli*, men ikke introduceres i laktokokker. Herefter blev der yderligere konstrueret en række plasmider med DNA, der koder for forskellige plasminfragmenter (med og uden fusionerede transportsignaler; en gennemgang af resultaterne vedr. anvendelse af transportsignalerne er beskrevet nedenfor) i kombination med forskellige promotorer (Fig. 1). Efter konstruktion i *E. coli* blev plasmiderne forsøgt introduceret i laktokokker. Af Fig. 1 ses det, at DNA, der koder for Kringle 4, uden problemer kan kombineres med forskellige promotorer, og at en efterfølgende introduktion i laktokokker er uproblematisk. Tilsvarende resultater opnås med DNA, der koder for plasmins B-kæde. Derimod opstår der problemer både med konstruktion i *E. coli* og efterfølgende introduktion i laktokokker, når DNA, der koder for en del af Kringle 5 efterfulgt af B-kæden sættes efter en promotor. Problemet størrelse vokser jo større del af Kringle 5, der fusioneres til B-kæden. På grundlag af ovenstående resultater og da Kringle 4 ikke indeholder en katalytisk funktion, antog vi, at katalytisk aktivt plasmin kan produceres i laktokokker, omend det medfører problemer for bakterierne. Det lykkedes at isolere nogle få transformerede laktokokker, der indeholdt pBPL19 med P^{prtP} foran plasmingenet. Denne stammekonstruktion, BPL25, var meget væksthæmmet. En efterfølgende analyse v.h.a. SDS-PAGE viste en intracellulære proteinprofil med en høj produktion af flere forskellige stress-proteiner i transformanterne til forskel fra vildtypen (se afsnittet "Plasmin ekspression forårsager cellelysis i laktokokker").

Vi besluttede på dette tidspunkt, at koncentrere os i) om konstruktion af laktokokker, der eksporterer plasmin, ii), om konstruktion af laktokokker, der regulerbart producerer plasmin samt iii) om immunkemisk og aktivitetsmæssig detektion af plasmin intracellulært og ekstracellulært i de konstruerede laktokokker.

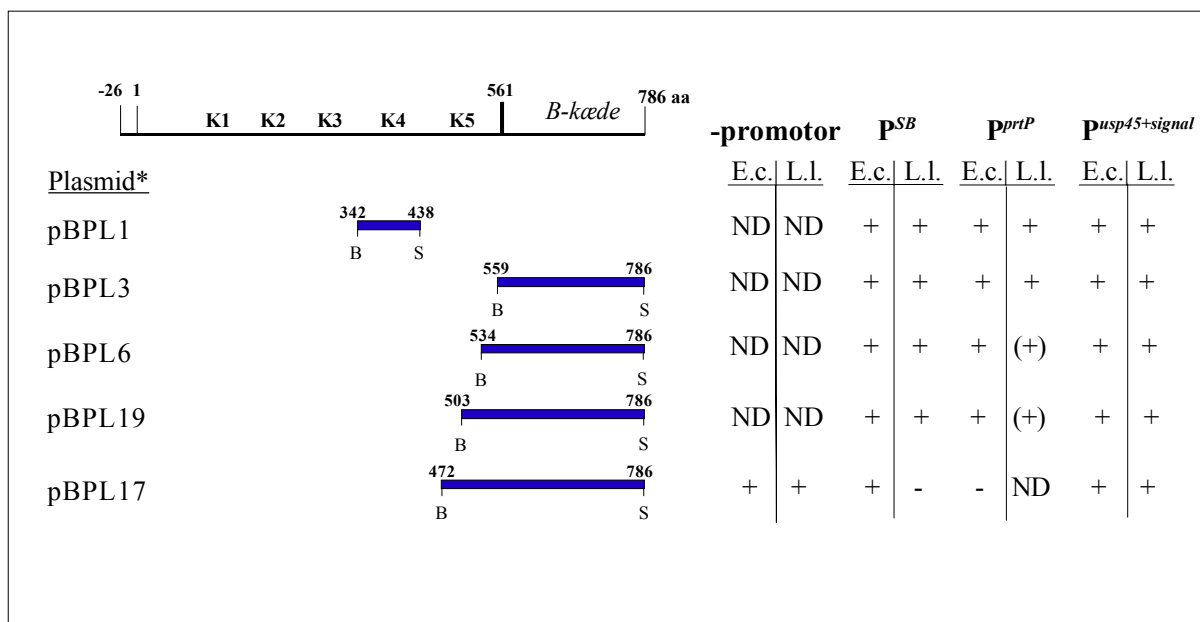


Fig. 1

Der er angivet fem forskellige plasmidderivater, pBPL1, 3, 6, 19 og 17, som hver indeholder en DNA-sekvens, der koder for den del af plasmin, som er angivet øverst i figuren. Det er også angivet, om plasmidet uden promotor (-promotor), med P^{SB}-promotor, med P^{prtP}-promotor eller med P^{usp45}-promotor+signalsekvens opstrøms for DNA-sekvensen kan konstrueres i *E. coli* (E.c.) og introduceres *L. lactis* (L.l.). +: plasmid kan konstrueres eller introduceres; (+): introduktion af plasmid giver få, væksthæmmede transformanter; -: plasmid kan ikke konstrueres eller introduceres; ND: ikke afprøvet; *: plasmidnavne er angivet med P^{SB}-promotor indsats opstrøms for plasmingenet.

Konstruktion af laktokokker med henblik på produktion og eksport af bovin plasmin

I 1994 var karakteriseringen af transportsignaler fra to ekporterede proteiner, Usp45 og PrtP, fra laktokokker beskrevet (van Asseldonk et al. 1990 Gene 95: 155-160, Vos et al. 1989 J Biol Chem 264: 13579-13585). Derfor var det oplagt at forsøge en plasmieksport fra laktokokker under anvendelse af disse to transportsignaler. I plasmiderne pBPL1, 3, 6, 19, 17, beskrevet i Fig. 1, blev DNA, der koder for PrtP-henholdsvis Usp-transportsignalet, forsøgt indsat. Kun konstruktion af plasmider med Usp-transportsignalet var succesfulde. Som vist i Fig. 1, kunne alle plasmidkonstruktionerne med Usp-signalet introduceres i laktokokker.

Fremstilling af anti-plasmin-antistoffer.

Med henblik på detektion via Western blotting blev immunisering af kaniner gennemført med nativt og denatureret plasmin. Immunkemisk analyse af antisera viste en detektions-grænsen på 3-6 µg plasmin/ml.

Regulerbar produktion af plasmin i laktokokker

I et andet FØTEK-samarbejdsprojekt havde vi identificeret og isoleret en regulerbar promotor, P170, fra laktokokker. Promotoren P170 er blandt andet reguleret af pH og bakteriens væksthase. Promotoraktiviteten er slået fra under vækst og ved neutral pH, mens den er slået til ved overgang til stationær fase og ved pH under 6. Vi ønskede at anvende denne promotor i forbindelse med produktion af plasmin i laktokokker, således at bakterierne skulle kunne gro til en ønsket tæthed ved pH 7 uden at være hæmmet af plasminproduktion. Ved overgang til stationær fase ville en sænkning af pH få bakterierne til at producere den ønskede plasmin. De anvendte regulationsparametre ville iøvrigt kunne anvendes senere ved forsøgsproduktion af ost.

Imidlertid viste det sig ikke muligt at konstruere det ønskede plasmid til regulerbar ekspression af plasmingenet. Som det fremgår af Tabel 1, blev flere forskellige plasmider konstrueret, men introduktionen af den sidste og afgørende komponent med henblik på konstruktion af det endelige plasmid lod sig ikke gøre.

Element	Konstruktion															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
950 bp plasmingen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Ingen promotor	x	x														
P ^{SB}			x													
P ^{PrtP}				x												
P ^{PrtP} +signal					x											
P ^{usp} +signal						x										
P170, 4 kb							x	x		x	x	x			x	
P170, 2.6 kb									x				x	x		x
lac replicon	x		x	x	x	x	x									
citrat replicon		x						x	x		x	x	x		x	x
E. coli replicon		x						x	x	x	x	x	x	x	x	x
cat	x		x	x	x	x	x									
erm		x						x	x			x	x	x	x	x
bla										x	x	x	x	x		
Konstruktion mulig	ja	ja	ja	nej	nej	ja	nej	nej	nej	ja	ja	nej	nej	nej	ja	ja

Tabel 1.

Sammensætning af genetiske elementer til konstruktion af plasmid til brug ved regulerbar produktion af plasmin. P efterfulgt af betegnelse eller superscript angiver en promotor. cat, erm og bla: resistensgener mod henholdsvis chloramphenicol, erythromycin og penicillin.

Konklusionen blev, at der er inkompatibilitet mellem citratreplicon, resistensmarkør (erm), P170-promotor og plasmingenet. De øvrige resultater tydede på, at udskiftning af lactococ-replikationsorigin og -resistensgen ikke vil afhjælpe problemet. Det blev besluttet at vente med videre arbejde vedrørende regulerbar produktion af plasmin, indtil der enten foreligger en nærmere karakterisering af P170, eller der findes en alternativ regulerbar promotor.

Detektion af intra- og ekstracellulært lokaliseret plasmin fra laktokokker

I stamme BPL25 blev der indirekte demonstreret produktion af plasmin på grundlag af proteinmønster og cellelysis. Immunoblot-analyse af intracellulære ekstrakter fra BPL25 blev gennemført for at påvise tilstedeværelsen af plasmin. Som vist i Fig. 2, blev plasmin fundet i BPL25 og i *E. coli* indholdende samme plasmid-konstruktion. Flere bånd blev detekteret i både BPL25 og i *E. coli*::pBPL25. Et hovedbånd på ca. 22 KDa kan svare til plasmin-monomer, selvom størrelsen på det forventede produkt er ca. 32 KDa. Da fuldlængde plasmin udviser en ændret mobilitet under SDS-PAGE, kan dette også være tilfældet for det producerede plasminfragment. De øvrige bånd på ca. 40, 60 og 80 KDa kan repræsentere dimere, trimere og tetramere former af plasmin.

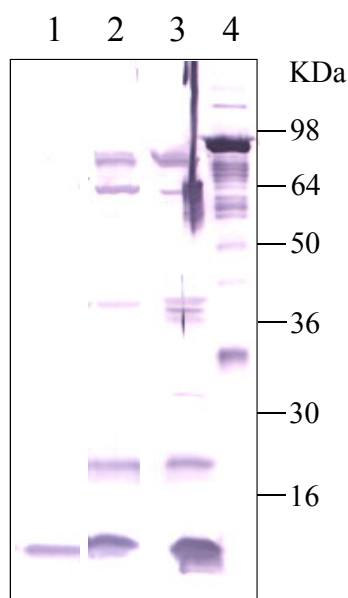


Fig. 2.

Western blot af intracellulære ekstrakter fra *L. lactis* MG1363 (lane 1); BPL25 (lane 2); *E. coli* med pBPL25-konstruktionen (lane 3) og kommerciel plasminogen (Sigma, lane 4). Molekylvægt standard er vist i Kilodalton(KDa).

Western blot blev også gennemført på koncentrerede supernatanter fra BPL25 og BPL420 stammer. Som vist i Fig. 3, findes der også plasmin ekstracellulært i BPL25. Formodentlig et resultat af stress og cellelysis (se nedenfor), fordi plasmin-mønstret er identisk med de intracellulære ekstrakter. I BPL420, hvor DNA, der koder for det samme plasminfragment som i pBPL25, er fusioneret til *usp45*-signal sekvensen, ses et hovedbånd på ca. 62 KDa. Produktet svarer til en dimer af det forventede processerede produkt (ca. 31 KDa). Da der ikke blev fundet plasmin intracellulært i BPL420, fungerede signalsekvensen fra *usp45* genet til udskillelse af plasmin i laktokokker, selvom plasmin-udbyttet var lavere end i BPL25 (Fig. 3).

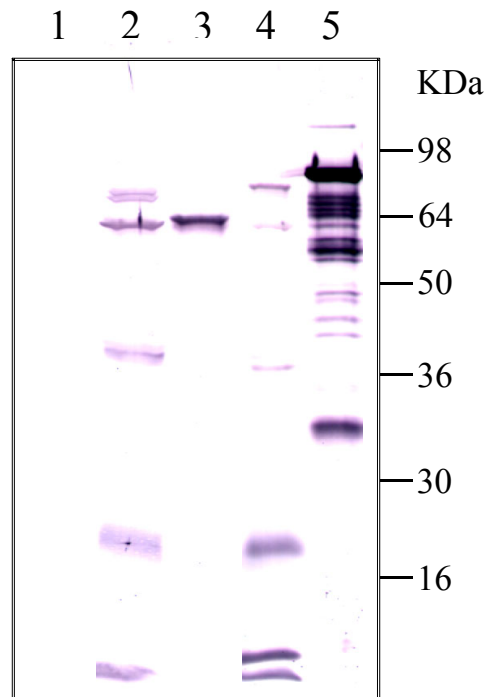


Fig. 3

Western blot af ekstracellulære ekstrakter fra *L. lactis* MG1363 (lane 1); BPL25 (lane 2); BPL420 (lane 3) BPL25-intracellulært ekstrakt (kontrol, lane 4) og kommerciel plasminogen (Sigma, lane 5). Molekylvægt standard er vist i Kilodalton(KDa) til højre.

Plasmin ekspression forårsager cellelysis i laktokokker.

Intracellulære ekstrakter fra BPL25 viste et voldsomt ændret proteinmønster, sammenlignet med vildtypen og BPL420, hvor plasminfragmentet er udskilt (Fig. 4). Denne observation i BPL25 kunne skyldes stress og er typisk beskrevet i andre bakterier, når man prøver at producere fremmede proteiner. Cellestress kan resultere i cellelysis. I laktokokker har man anvendt laktatdehydrogenase (LDH) aktivitet som et mål på cellelysis, idet LDH normalt kun findes intracellulært.

Ved at måle LDH i kultursupernatanter under vækst, kunne vi vise at kultursupernatanter fra BPL25 indholdt LDH (Tabel 2). Cellelysis som følge af plasmin produktion kan forklare væksthæmningen, som vi observerede i BPL25. Et endnu højere niveau af cellelysis blev observeret i BPL420, selvom det intracellulære proteinmønster ikke var forskelligt fra vildtypen. Det er muligt, at plasmin, der udskilles i BPL420, forårsager cellelysis uden at have bivirkninger intracellulært i modsætning til BPL25, hvor intracellulært tilstedeværelse af aktivt plasmin medvirker lysis. Alternativt kan plasmin hænge fast i translokationssystemet hvorved cellelysis fremmes.

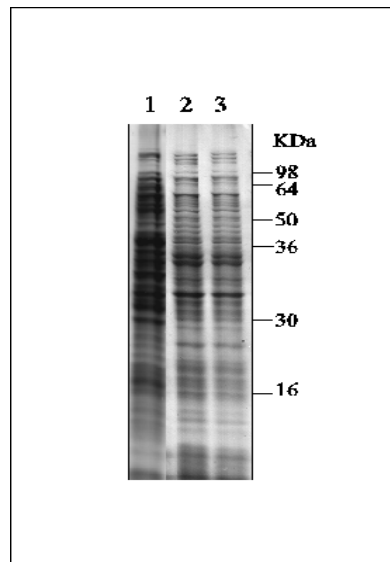


Fig. 4

SDS-PAGE separation af intracellulære proteinekstrakter fra BPL25 (lane 1), MG1363 (lane 2) og BPL420 (lane 3). Molekylvægt standard er vist i Kilodalton, kDa.

STAMME	LDH (mU/mg prot) in kultursupernatanter ^a ved OD _{600nm}		
	0.5	1.0	3.0
MG1363	0	1.67 ± 0.28	2.95 ± 0.55
BPL25	1.16 ± 0.33	6.94 ± 0.86	18.18 ± 2.87
BPL420	3.84 ± 0.52	11.76 ± 0.18	43.38 ± 5.62

^a Supernatanter blev koncentreret 20 gange.

Tabel 2.

Lactate Dehydrogenase (LDH) aktivitet i koncentrerede kultursupernatanter af plasminproducerende *L. lactis* stammer. Kulturene i tidlig (OD~0,5), sen eksponentiel (OD~1.0) eller stationær (OD~3) fase blev centrifugeret og supernatanter anvendt i assayet. Tabellen viser specifik LDH aktivitet i supernatanterne.

Laktokokker producerer katalytiske aktivt plasmin.

Plasmin er en serinprotease med bred substratspecificitet. Plasmin kan spalte efter en arginin i den primære sekvens. Serinproteaseaktivitet kan måles ved hjælp af et chromogent substrat S-2288 (D-Ile-L-Pro-L-Arg-pNA). Tilstedeværelse af en aktiv serinprotease bliver fulgt spektrofotometrisk efter frigørelse af pNA fra S-2288. Intracellulære ekstrakter af BPL25 viste et meget højere niveau af serinprotease end MG1363. Som beskrevet ovenfor, tydede væksthæmning, proteinmønster og LDH måling på kultursupernatanter fra BPL25 på cellestress i denne stamme. Det er kendt, at blandt universelle stress proteiner findes der en klasse serinproteaser. For at undersøge at det høje niveau af serinprotease-aktivitet i BPL25 udelukkende skyldtes plasmin og ikke stressproteaser, anvendte vi en specifik plasmininhibitor, bdellin. Ved

tilsætning af bdellin i aktivitetsassay kunne vi måle plasmin-specifik aktivitet i BPL25, både i intracellulære og ekstracellulære ekstrakter (Tabel 3).

PRØVE	S-2288 assay for serinprotease		mU plasmin ^d
	Total aktivitet	Aktivitet med tilsat bdellin ^c	
MG1363 intracellulær	116.7	117.8	-
MG1363 extracellulær ^b	80.2	80.2	-
BPL25 intracellulær	542.2	484.4	82.5
BPL25 extracellulær ^b	114.0	66.0	68.6

^a Værdier er gennemsnit af tre uafhængige forsøg. Afvigelse var under 25 % af værdierne.

^b Koncentrerede kultursupernatanter (200 gange)

^c 5 mg Bdellin blev tilsat. Det svarer til en 70 % reduktion i aktivitet af 1 mg kommerciel plasmin.

^d Specifik aktivitet. En unit plasmin vil producere en $DOD_{405nm}=0.01 \text{ min}^{-1}$, ved pH 8.4, 37⁰ C. Værdierne blev justeret for at tilføje det 30 % plasminaktivitet som ikke er påvirket af bdellin i assayet.

Tabel 3.

Aktivitetsassay for plasmin produceret i laktokokker^a. Intracellulære og ekstracellulære ekstrakter fra den samme kultur blev anvendt.

Konklusion

- Katalytisk aktivt plasmin kan produceres i *L. lactis* omend produktionsniveauet på nuværende tidspunkt er for lavt til anvendelse i osteforsøg
- Intracellulær produktion af katalytisk aktivt plasmin i *L. lactis* medfører cellelysis og -stress
- Anvendelse af Usp-transportsignal resulterer i eksport af plasmin i *L. lactis*, dog er udbyttet lavt og cellelysis høj
- Identifikation og brug af alternative transport signaler fra *L. lactis* vil formodentligt kunne afhjælpe problemerne med lavt udbytte og høj cellelysis. Dette undersøges i et nyt FØTEK2-projekt med titlen '*Identifikation af transport signaler, der i mælkesyrebakterier sikrer udskillelse af plasminogen-fragmenter*'
- Anvendelse af en kompatibel udgave af den regulerbare promotor P170 til plasmiekspression vil være ønskelig m.h.p. at opnå en tilstrækkelig celledæthed efterfulgt af en høj produktion af plasmin

Dokumentation og øvrige publikationer

Arnau, J. & Israelsen H. (1996) "Nye mælkesyrebakterier til produktion af ost"
Mælkeritidende 25/26: 651-652.

Arnau, J., Hjerl-Hansen, E. and Israelsen, H. (1997) "Expression of bovine plasmin fragments in *Lactococcus lactis*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).

