

Afslutningsrapport

Kontrol af metabolisk flux igennem glykolysen hos Laktokokker
Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2001-41

Maj 2001

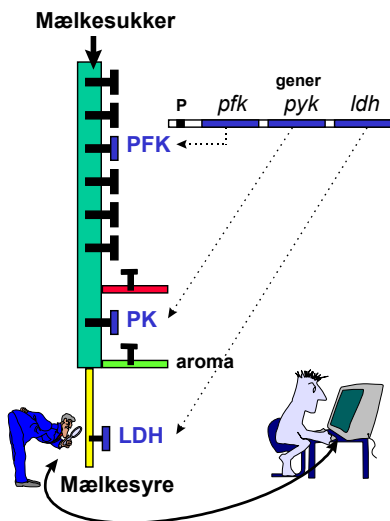


mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til MFF for FØTEK samarbejdsprojektet:

Kontrol af metabolisk flux igennem glykolysen hos Laktokker



Projektleder: Professor Karin Hammer
Sektion for Molekylær Mikrobiologi
BioCentrum-DTU
Bygning 301
2800 Lyngby
Tlf: 4525 2494
Fax: 4588 2660
E-mail: Karin.Hammer@Biocentrum.dtu.dk

INDHOLD

Medarbejdere	3
Forord	4
Resumé af det samlede projekt	5
Baggrund, Problemstillingen, Modellsystemet	6
Resultater	
Delprojekt A: <i>Matematisk modellering af glykolysen i Lactococcus lactis</i>	8
Delprojekt B: <i>Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i Lactococcus lactis</i>	15
Delprojekt C: <i>Isolering og karakterisering af mutanter med ændret glykolytisk flux</i>	28
Referencer (hele rapporten)	35
Publikationer og præsentationer	36

Medarbejdere:

Delprojekt A

Professor John Villadsen, Institut for Bioteknologi, DTU, Bygning 223, 2800 Lyngby.
Tlf: 4525 2667, Fax: 45932809, E-mail: john.villadsen@biocentrum.dtu.dk (Projektleder, delprojekt A)

Forskningsadjunkt Kirsten Væver Jochumsen, Institut for Bioteknologi, DTU, Bygning 223, 2800 Lyngby

Laboratorietekniker Kianoush Kangarlou, Institut for Bioteknologi, DTU, Bygning 223, 2800 Lyngby

Delprojekt B

Lektor Peter Ruhdal Jensen, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301, 2800 Lyngby.
Tlf: 4525 2510, Fax: 45932809, E-mail: Peter.R.Jensen@Biocentrum.dtu.dk (Projektleder, delprojekt B)

Ph.D. studerende Heidi Winterberg Andersen, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301 (ansat i perioden: 01.02.96-31.12.99)

Forskningsassistent Martin Bastian Pedersen, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301 (ansat i perioden: 01.01.98-31.08.98)

Lektorvikar Carsten Petersen, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301 (ansat i perioden: 01.09.00-28.02.01)

Delprojekt C

Professor Karin Hammer, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301, 2800 Lyngby.
Tlf: 4525 2494, Fax: 4588 2660, E-mail: Karin.Hammer@Biocentrum.dtu.dk (Coordinator, Projektleder, delprojekt C)

Forskningsadjunkt Martin Willesmoës, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301 (ansat i perioden: 01.09.96-31.01.99)

Laborant Katrine Madsen, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301 (ansat i perioden: 01.12.96-01.12.99) (fælles med delprojekt B)

Forskningsassistent Casper Jørgensen, Institut for Mikrobiologi, DTU, Bygning 301 (ansat i perioden: 15.01.99-14.01.00)

Øvrige medarbejdere (på Institut for Mikrobiologi):

Civilingeniørstuderende Martin Bastian Pedersen
(Eksamensprojekt: 01.09.96-31.06.97, delprojekt B)

Civilingeniørstuderende Nete Jacobsen og Jens Tornøe
(Midtvejsprojekt: 01.02.96-31.06.96, delprojekt B)

Civilingeniørstuderende Nete Jacobsen
(Eksamensprojekt: 01.02.97-31.01.98, delprojekt B og C)

Ph.D. studerende Christian Solem

(Ph.D. stipendium fra DTU, delprojekt B)

Lektor Mogens Kilstrup, Institut for Mikrobiologi (delprojekt C)

Forord:

I denne afslutningsrapport præsenteres et samarbejdsprojekt mellem Institut for Mikrobiologi*, Institut for Bioteknologi* og Mejeribrugets ForskningsFond, med professor Karin Hammer fra Institut for Mikrobiologi som projektleder. Projektet har strukket sig fra starten af 1996 til starten af 2001. Medarbejderne på projektet ønsker at takke Mejeribrugets ForskningsFond, Strukturdirektoratet, Erhvervsfremmestyrelsen og Undervisningsministeriet for økonomisk støtte til projektet. Vi vil også takke styregruppen og Mejeriforeningen for den udmærkede opbakning og de gode diskussioner der har været under projektførelsen.

* Siden 1/1-2001 er de tre institutter Institut for Mikrobiologi, Institut for Bioteknologi og Institut for Biokemi og Ernæring slået sammen til BioCentrum-DTU.

Resumé af det samlede projekt

Der er blevet anvendt tre forskellige angrebsvinkler, hver repræsenterende et delprojekt.

Delprojekt A, "Matematisk modellering af glykolysen hos *Lactococcus lactis*" er blevet ledet af Professor John Villadsen, med Kirsten V. Jokumsen ansat som forskningsadjunkt og Kianoush Kangarlou som laborant, og foregik ved Institut for Bioteknologi, DTU. I denne del af projektet blev anvendt eksisterende litteratur data vedrørende glykolytiske enzymeres kinetiske egenskaber, såsom den maksimale reaktionshastighed og substrataffinitet, til at etablere en matematisk model over glykolysen hos *L. lactis*. Desuden er der blevet etableret metoder til ekstraktion og kvantificering af udvalgte intracellulære metabolitter fra *Lactococcus lactis*. Endelig er der foretaget fermenteringsstudier til verificering af ovennævnte matematiske model.

Delprojekt B, "Metabolisk Kontrol Analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*" blev ledet af Lektor Peter Ruhdal Jensen, med Heidi W. Andersen ansat som Ph.D. studerende og Katrine Madsen som laborant, og foregik ved Institut for Mikrobiologi, DTU. *L. lactis* normale regulering af las-operonen der koder for generne, *pfk*, *pyk* og *ldh* er blevet undersøgt ved hjælp af bl.a. en række promoter fusioner, og under forskellige vækstbetingelser. Stammer er blevet konstrueret hvori mængden af de tre glykolytiske enzymer PFK, PK og LDH er blevet ændret omkring cellens normale niveau, såvel enkeltvis som alle tre samlet. Enzymatiske assays for de tre enzymer, PFK, PK og LDH blev etableret og optimeret. Fermenteringsforsøg med stammerne med ændret aktivitet af de glykolytiske enzymer er udført og de tre enzymeres betydning for gennemstrømning og metabolit koncentrationer i glykolysen er beregnet i form af kontrol koefficienter. En matematisk model for kontrollen af glykolysen i *Lactococcus lactis* er blevet opstillet og modellen er opdateret via de opnåede eksperimentelle fermenteringsdata.

Delprojekt C, "Isolering og karakterisering af mutanter med ændret glykolytisk flux" blev ledet af professor Karin Hammer med Martin Willemoës ansat som forskningsadjunkt og Katrine Madsen som laborant, og foregik ved Institut for Mikrobiologi, DTU. Her konstrueres stammer med enkelt mutationer i de glykolytiske gener, med henblik på at ændre de tre enzymeres kinetiske egenskaber med henblik på at afdække betydningen af enzymeres kinetiske egenskaber for flowet gennem glykolysen. Der er etableret screeningsmetoder til identifikation af stammer med ændret glykolytisk flow. Bakteriestammer med mutationer i *ldh* genet er blevet isoleret og karakteriseret. Plasmider til overproduktion af PFK og LDH er blevet konstrueret til brug for bl.a. antistof produktion og der er blevet arbejdet på at oprense og karakterisere de tre enzymer, PFK, PK og LDH fra *Lactococcus lactis*. Der blev desuden udført forsøg som viste at *Lactococcus* indeholder 2 gener der koder for det glykolytiske enzym Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase.

De kvantitative informationer om enzymeres kontrol, som er opnået under dette projektforsøg, forventes senere at kunne udnyttes til genetisk modificering af starterkulturer, hvor udtrykket og egenskaberne af de glykolytiske enzymer er modificeret til f.eks. at give en bedre (højere eller lavere) syrningshastighed eller ændrede fermenterings produkter. Den grundlæggende viden der er opnået omkring kontrol og regulering af mælkesyrebakteriers metabolisme, må også forventes at kunne bidrage til en mere målrettet stammeforædling via traditionelle forædlingsmetoder.

Baggrund

Baggrunden for projektet er et ønske om at tilvejebringe nye metoder til forbedring af kvaliteten af mejeriprodukter som fermenteres ved brug af mælkesyrebakterier, bl.a. med hensyn til egenskaber såsom syring, aromadannelse, konsistens og holdbarhed. I dag er man henvist til at anvende blandinger af mælkesyrebakterier for at opnå den ønskede kombination af disse egenskaber, hvilket ofte vil føre til kompromiser. Det ville være en fordel om man kunne tilpasse starterkulturernes egenskaber således, at færre forskellige bakterie stammer kunne producere mere veldefinerede produktsammensætninger.

En forudsætning for at tilpasse starterkulturers egenskaber er, at der først erhverves tilstrækkelig dybtgående fysiologisk viden om den pågældende mælkesyrebakterie til at bedømme, hvilke faktorer der har betydning for bakteriens produktion af såvel ønskede som uønskede stoffer.

Problemstillingen

Den levende mælkesyrebakterie-celle består af et relativt komplekst netværk af samspillende biokemiske reaktioner, og den problemstilling vi står overfor er, hvordan vi skal relatere en starterkulturs procesegenskaber til samspillet mellem cellens molekylære bestanddele og kulturens procesparametre. Vi anvender derfor moderne gen- og fermenterings-teknologi, kombineret med bio-matematiske værktøjer såsom Metabolisk Kontrol Analyse og Computer simulering.

Modelsystemet

I dette projekt har vi koncentreret os om at undersøge, hvilke enzymer der kontrollerer produktionen af mælkesyre i mælkesyrebakterien *Lactococcus lactis*. Denne bakterie er valgt som model system på grund af dens udbredte anvendelse til bl.a. ostefremstilling. Dertil kommer at denne bakteries fysiologi er relativt velbeskrevet; man kender nu de fleste metaboliske veje, adskillige af de tilhørende gener er blevet klonet/sekventeret og mange enzymeres biokemi/kinetik er blevet karakteriseret *in vitro*. Det er desuden rimeligt at forvente, at mange af projektets resultater vil være tilstrækkeligt generelle til også at gælde for andre mælkesyre bakterier end *Lactococcus lactis*.

Glykolysen i *lactococcus lactis* er den metaboliske reaktionsvej som under omdanner mælkesukker til mælkesyre og andre produkter, se figur 1.

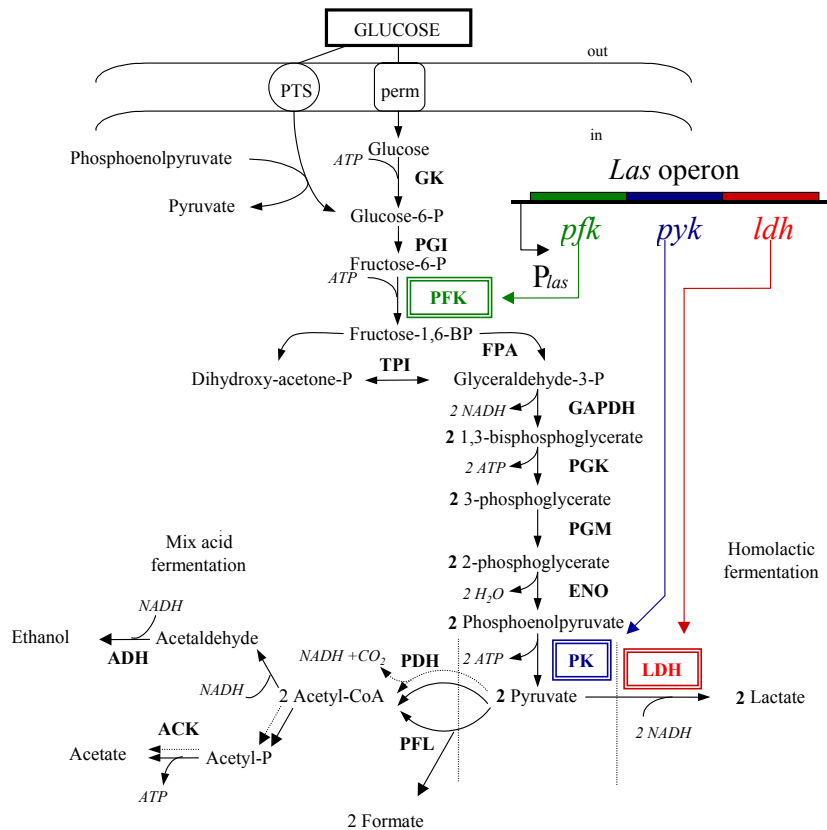


Fig. 1: Glykolysen og tilknyttede reaktioner i *L. lactis*, samt den genetiske organization af *las* operonens gener *pfk*, *pyk* og *ldh*.

I projektet især fokuseret på tre af de glykolytiske enzymer, Phosphofruktokinase (PFK), Pyruvatkinase (PK) og Laktatdehydrogenase (LDH). Generne kodende for disse tre glykolytiske enzymer sidder samlet i en såkaldt operon, dvs. at de tre gener må forventes at blive udtrykt i et bestemt forhold under forskellige vækstbetingelser. Denne genetiske organisering kan give cellen en enestående mulighed for at regulere gennemstrømningen i glykolysen uden at påvirke koncentrationen af glykolysens metabolitter: hvis der samtidigt laves mere af de tre enzymer, svarer det til, at der bliver åbnet for "hanen" både øverst og nederst i glykolysen. Samtidig vides det, at disse tre enzymer er blandt de mest regulerede enzymer i glykolysen. Disse egenskaber giver en formodning om, at Phosphofruktokinase, pyruvatkinase og laktatdehydrogenase indtager en central rolle mht. kontrol eller regulering af flowet gennem glykolysen.

Detailjerede beskrivelser af resultater opnået i de enkelt delprojekter:

Delprojekt A:

Matematisk modellering af glykolysen i Lactococcus lactis

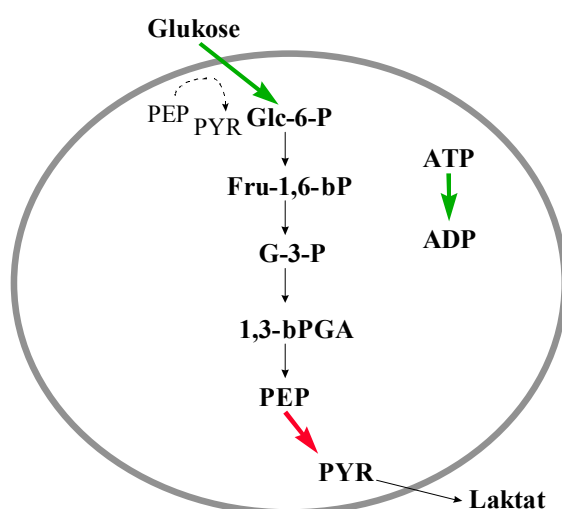
Glykolyse og produktdannelse i *L. lactis*

Under normale vækstbetingelser i mælk omdanner *L. lactis* mere end 90 % af den optagne laktose til mælkesyre. Mikroorganismen har ingen oxidativ Phosphorylering og danner derfor kun ATP via glykolysen, hvilket resulterer i et lavt biomasse udbytte per kulstof. Det er vist ved radioaktive mærkningsforsøg, at kun 5 % af glukose metaboliseret omdannes til biomasse (Novak og Loubiere, 2000). Det er denne egenskab, der gør mælkesyrebakterier til enestående syrnere i mejeriindustrien: de danner ikke tætte bakteriekulturer, men omdanner effektivt mælkesukkeret laktose til mælkesyre og aroma-komponenter. Disakkaridet laktose giver ved spaltning 1 molekyle glukose og 1 molekyle galaktose. Metaboliseringen af disse to monosakkarider er afgørende forskellig i mælkesyrebakterier, idet glukose nedbrydes meget hurtigt og næsten udelukkende til mælkesyre (homolaktisk), mens fermentering af galaktose resulterer i en blandet produkt-profil med syntese af både mælkesyre, etanol, eddikesyre, myresyre og kuldioxid ("mixed acid"). Dannelsen af disse produkter er nøje reguleret, således at redoxbalancen i cellen bevares: NADH dannet i glykolysen regenereres via syntese af disse fermenteringsprodukter. Reguleringen af denne produktdannelse er blevet studeret indgående i litteraturen, og er blevet korreleret til den glykolytiske flux (Thomas *et al.*, 1979; Fordyce *et al.*, 1984; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995). Det er således kendt, at en nedsat glykolytisk flux resulterer i "mixed acid" produkt profil. Det er også vist, at en lavere substrat-optagelses-hastighed giver en nedsat glykolytisk flux for både laktose og galaktose i forhold til glukose (Benthin, 1992; Monnet *et al.*, 1996; Garrigues *et al.*, 1997; Jensen, 2000). Det er der imod mere uklart, hvad der begrænser den glykolytiske flux op ad til, og der ligger en klar økonomisk gevinst for mejeriindustrien, hvis omdannelseshastigheden af laktose til mælkesyre kunne øges.

Matematisk modellering af glykolysen

Metabolisk kontrol analyse er et matematisk værktøj, der kan benyttes til at forudsige, hvilke trin i en reaktionsvej, der kontrollerer fluxen gennem reaktionsvejen. Formålet i delprojekt A har været at opstille en matematisk model, der beskriver kinetikken for enzymerne i den glykolytiske reaktionsvej, og ud fra denne model beregne, hvilke enzymer der har positiv henholdsvis negativ kontrol over fluxen gennem glykolysen. Positiv kontrol implicerer, at en øgning af denne enzymreaktion vil øge den samlede flux, negativ kontrol angiver, at den enzymatiske aktivitet skal ned-reguleres. *In vitro* enzymkinetik data skulle valideres for de tre nøgleenzymer PFK, PYK og LDH. Modellen ville også forudsige niveauerne af de intracellulære metabolitter, der for fleres vedkommende er centrale i regulering af metabolismen. Etablering af teknikker til *in vivo* måling af disse metabolitter var centralt element i delprojekt A, hvor fermenteringsforsøg med metabolitmålinger skulle validere modellen og dermed forudsigelserne vedrørende fluxkontrol.

Det er blevet foreslået i litteraturen, at fluxen gennem en reaktionsvej kontrolleres af behovet for produkter (Cornish-Bowden *et al.*, 1995). Det medfører, at en af betingelserne for at opnå en øget glykolytisk flux er, at produktet ATP også fjernes med en øget hastighed. Forsøg har vist, at glykolysen i *E. coli* er begrænset af cellernes ATP forbrug (Jensen, 1996; Koebmann *et al.* 1998), og det samme er observeret under visse betingelser i gær (Smits *et al.*, 2000). Der blev indledningsvis i dette projekt opstillet en matematisk model for glykolysen i *Lactococcus* baseret på litteraturdata. Modellen indeholder kinetiske udtryk for næsten alle reaktioner i glykolysen samt et udtryk, der beskriver ATP forbrug under vækst. Kontrol analyse udført på denne model forudsiger (som illustreret i figur 1), at den glykolytiske flux kan øges ved at øge ekspressionen af glukoseoptagelses-systemet (PTS), sænke aktiviteten af pyruvat kinase, samt bekræfter at den glykolytiske flux i princippet også kan øges ved at øge drænet af ATP.



Figur A1. Grafisk illustration af konklusionen på den kinetiske model. Pilene med grønt (Glukose til Glucose-6-fosfat (Glc-6-P) og ATP til ADP) illustrerer de trin, der ifølge modellen skal amplificeres og trinnet med rødt (Phosphoenolpyruvat (PEP) til pyruvat (PYR)) illustrerer det trin, der skal justeres ned for at øge den samlede glykolytiske flux.

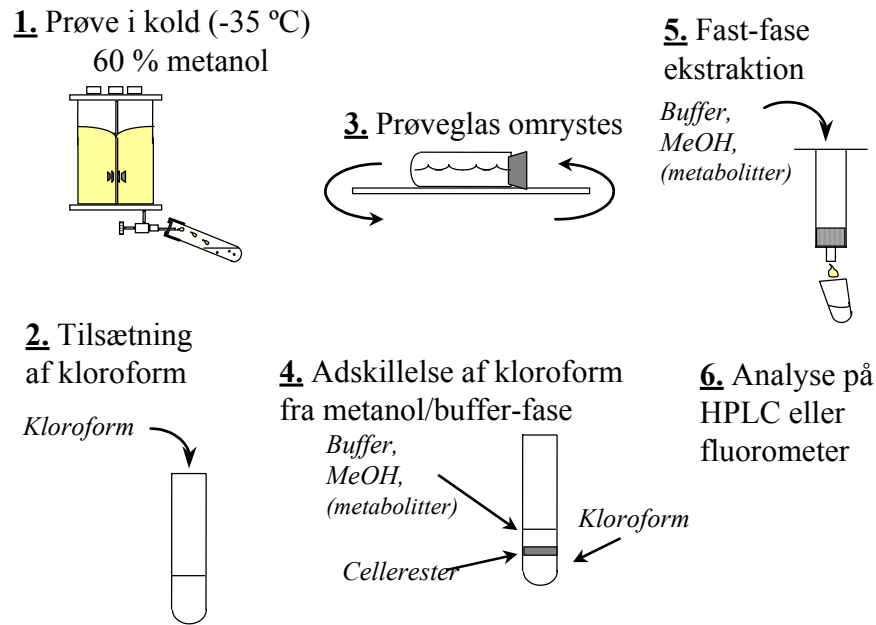
Peter Ruhdal Jensen's forskningsgruppe ved Institut for Mikrobiologi arbejder sammen med Chr. Hansen A/S på at inducere en ukoblet ATPase i *L. lactis*. Effekten i *Lactococcus* ser ud til at være mindre end i *E. coli*, og et stærkt øget ATP dræn forårsager faldende væksthastigheder og nedsat glykolytisk flux (Koebmann *et al.*, 2000). Da den simple strategi med at øge ATP drænet i cellen ikke ser ud til at give stærkt forhøjet flux i sig selv, må der eksistere andre begrænsninger for cellen. I den opstillede model var cellens redox forhold ikke inkluderet. Det har siden hen vist sig, at redox forholdet er overordentlig vigtigt for vækst og produkt dannelse (Garrigues *et al.*, 1997; Jensen, 2000; Melchiorson, 2000; Jensen *et al.*, *In press* 2001). Neves *et al.* (1999) har for nylig publiceret en matematisk model for glykolysen med redox forholdet som en af de variable. Forfatterne benytter en såkaldt top-down strategi, hvor dele af glykolysen grupperes, for at simplificere tolkningen af data. Modellen er valideret mod *in vivo* metabolitmålinger og er i stand til at forudsige skift fra anaerobe til aerobe vækstbetingelser. Konklusionen er, at kontrollen over den glykolytiske flux er fordelt over hele glykolysen, og at en øget flux formentlig ikke opnås ved at modulere få glykolytiske enzymer. Tilsvarende konklusioner er opnået ved eksperimentel modulering af glykolytiske enzymer i gær (Schaaff *et al.*, 1989; Smits *et al.*, 2000).

Hvis man foretog de genetiske ændringer, der muliggjorde en øget glykolytisk flux, ville resultatet formodentlig være en stigning i metabolitkoncentrationer i den øverste del af reaktionsvejen, hvilket ville feed-back inhibere kulhydratoptagelsen. Det samlede resultat ville derfor være en uændret eller måske reduceret flux. Dette ræsonnement sammenholdt med eksisterende modelforudsigelser og eksperimentelle data opnået i litteraturen viser, at en forøgelse af den glykolytiske flux formentlig ikke opnås via prediktive modeller. Oprensning af de tre enzymer PFK, PYK og LDH med henblik på *in vitro* karakterisering blev påbegyndt med henblik på validering af den kinetiske model. Dette blev ikke afsluttet, idet vi skønnede, at validering af en kinetisk model *ikke* ville lede til det ønskede resultat, nemlig at kunne forudsige de flux-kontrollerende trin i glykolysen.

På Institut for Bioteknologi har studier i parallelle forskningsprojekter i *Lactococcus*-gruppen vist, at *L. lactis* har en stor overskudskapacitet i glykolysen. Ved at dyrke *L. lactis* i kontinuert kultur ved en konstant lav væksthastighed og skifte til en høj væksthastighed har vi vist, at den glykolytiske flux momentant skifter fra et konstant lavt niveau til niveau langt højere end krævet ved den høje væksthastighed. Når tilstrækkelig næring pludselig er til stede responderer cellen altså ved at øjeblikkeligt at optage kulhydrat med høj hastighed (Melchiorsen *et al.*, 2001). Metabolisk kontrol analyse med efterfølgende gentisk op- og ned-regulering af udvalgte enzymer vil derfor sandsynligvis ikke resultere i en højere glykolytisk flux for *Lactococcus*. En fremtidig strategi bør i stedet være at tænke i selektionsstrategier, der direkte screener for mutanter med hurtigere syrning, og efterfølgende karakterisere disse mutanters fysiologi. Et sådant studie vil sandsynligvis vise, at det ikke er selve glykolysen, men snarere en øget/ændret anabolisme med dræn af flere produkter fra glykolysen, der resulterer i en øget glykolytisk flux.

Ekstraktion og kvantificering af intracellulære metabolitter

Ved analyse af en metabolsk reaktionsvej og modellering af denne er det vigtigt at kunne bestemme metabolitterne kvantitativt. Da projektet blev startet eksisterede der på Institut for Bioteknologi metoder til at kvantificere substrater og slut-produkter via diverse FIA, GC og HPLC metoder, og instituttet har højteknologiske bioreaktorer, der muliggør præcise fysiologiske studier. Kvantificering af de intracellulære metabolitter var derimod ikke muligt. Vi har udviklet en metode, der tillader en hurtig og præcis ekstraktion og kvantificering af metabolitter fra celler dyrket i bioreaktorer. Metoden består af 3 trin: 1) momentan inaktivering af metabolsk aktivitet i celler via høst ud i –35°C metanol, 2) ekstraktion af intracellulære metabolitter i metanol/kloroform, og 3) oprensning af metabolitter via fast-fase ekstraktion på ionbytnings-søjler. De oprensede metabolitter kan herefter kvantificeres via anionbytnings-HPLC eller enzymatiske metoder med fluorescensdetektion af dannet/forbrugt NADH (se figur 2). Metoden er publiceret: Jensen et al 1999



Figur A2. Ekstraktion og kvantificering af intracellulære metabolitter. 1) høst af celler fra bioreaktor direkte ned i -35°C metanol/buffer (stopper metabolsk aktivitet øjeblikkeligt). 2) tilsætning af kloroform. 3) Kvantitativ ekstraktion af metabolitter ud i metanol/kloroform/buffer. 4) Separation af biomasse og proteinrester fra metabolitter. 5) Oprensning af metabolitter ved fast-fase ekstraktion. 6) Kvantificering af metabolitter ved HPLC og fluorescensmetoder.

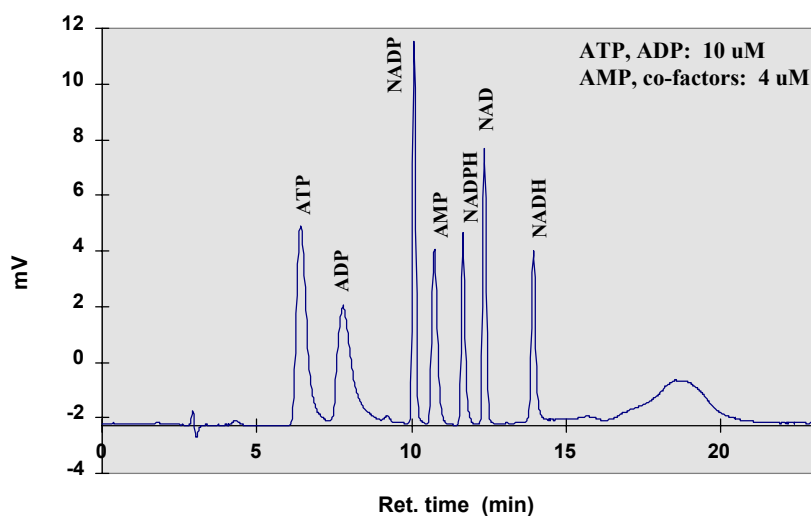
Genfindelsesgraden for metabolitterne er testet for glukose-1-fosfat (G1P), glukose-6-fosfat (G6P), fruktose-6-fosfat (F6P), fruktose-1,6-difosfat (FDP) og fosfoenolpyruvat (PEP). G1P optræder ikke i *L. lactis* metabolisme og benyttes derfor som ekstern standard. Genfindelsesgraden for denne standard, når den tilsættes før ekstraktion er 96-98 % og kvantificeres de andre metabolitter ud fra denne fås følgende genfindelses-ratio for 4 prøver:

Prøve	Genfindelses ratio i forhold til G1P (intern standard)			
	G6P	F6P	FDP	PEP
1	0,99	1,14	1,15	1,08
2	0,88	1,01	1,00	1,08
3	0,99	1,00	1,00	0,97
4	0,95	1,03	0,94	1,05

Ekstraktionsproceduren er arbejdskrævende, men som det ses af tabellen får man en ganske nøjagtig bestemmelse af metabolitkoncentrationerne selv ud fra dobbeltbestemmelser. Metoden er benyttet til at kvantificere de intracellulære metabolitter under en batch fermentering på defineret medium med glukose som kulstofkilde.

Metabolit	Koncentration (mmol per liter cellevolumen)
Glukose-6-fosfat	17,1 ± 1,4
Fruktose-6-fosfat	4,0 ± 0,5
Fruktose-1,6-difosfat	21,9 ± 2,0
Dihydroxyacetone-fosfat	11,0 ± 1,6
Glyceraldehyd-3-fosfat	1,0 ± 0,4
Di-Phosphoglycerat	0,5 ± 0,2
3-Phosphoglycerat	8,8 ± 1,5
Phosphoenolpyruvat	4,0 ± 0,7

Da co-faktorerne i de glykolytiske reaktioner er vigtige for de enkelte enzyms kinetik og giver værdifuld viden om cellens metaboliske tilstand, var det et stort ønske også at kunne kvantificere ATP, ADP og NADH/NAD⁺. Der blev udviklet en HPLC metode, der var i stand til at adskille disse nukleotider og co-faktorer og et kromatogram for standarder er vist i figur 3. Det ses, at der er fin separation af de 3 nukleotider ATP, ADP og AMP samt af de to redox par NAD(H) og NADP(H). Desværre kunne ekstraktionsmetoden med efterfølgende fast-fase oprensning af de Phosphorylerede metabolitter ikke benyttes direkte til også at kvantificere nukleotider og co-faktorer. Der krævedes en yderligere optimering af fast-fase ekstraktionsproceduren, hvilket vi ikke nåede i dette projekt.



Figur A3. Separation af standardopløsning af nukleotiderne ATP, ADP og AMP, samt redox-parrene NAD(H) og NADP(H) ved revers-fase HPLC. Kolonne: C-18. Eluent: 0,1 M KH₂PO₄ med en lineær gradient af metanol (0-30 % v/v) fra 0-13 min. 13-23 min: = % metanol. Komponenterne er detekteret ved 254 nm (UV). Detektionsgrænsen for co-faktorer og nukleotider er ca. 0,1 uM for standarder.

Fermenteringsfysiologiske studier

Analyse af substratoptagelse, produkt dannelse og variation i koncentration af intracellulære metabolitter skal foretages ved nøje kontrollerede fermenteringsbetingelser, hvis regulering af metabolismen skal beskrives. Da vi ønskede at kunne studere både maksimal glykolytisk flux samt lavere glykolytisk flux, var det vigtigt at kunne kontrollere substratoptageshastigheden. Det var derfor

vigtigt, at kunne foretage de fysiologiske studier i et vækstmedium, der er begrænset med hensyn til kulhydrat substrat og ikke med hensyn til andre ikke-identificerede komponenter.

Jensen og Hammer (1993) har publiceret et defineret vækstmedium bestående af glukose, 20 aminosyrer, vitaminer, makrosalte samt spormetaller. Batch fermenteringer med *L. lactis* MG1363 i dette medium viste, at mediet ikke var begrænset med hensyn til kulstofkilden glukose. Det så man ved, at vækstkurverne bøjede af inden al glukosen var forbrugt. Mange forsøg blev foretaget, hvor både vitaminmængden, spormetalmængden og diverse aminosyrer blev tilsat i øget mængde for at identificere den vækstbegrænsende komponent. Ingen af komponenterne kunne umiddelbart identificeres som vækstbegrænsende, idet en fordobling af alle komponenter i mediet ikke førte til øget biomassedannelse, og vækstkurverne fortsat bøjede af ved en given biomassekoncentration. Normalt fremstilles fermenteringsmedier til bioreaktorer ved, at man ud fra koncentrerede stamopløsninger blander sit medium op i vand, og herefter steriliserer de komponenter der kan tåle autoklavering. Glukose autoklavres separat for at undgå reaktion med nitrogenforbindelser. I dette definerede medium måtte aminosyrer og vitaminer tilsættes ved sterilfiltrering efter autoklavering af de øvrige mediekomponenter. I stedet for at arbejde med stamopløsninger, blev det forsøgt at afveje samtlige komponenter og opløse dem direkte til et færdigt medium, der blev sterilfiltreret ned i en autoklaveret bioreaktor. Ved vækst i medium hvor komponenter var blevet sterilfiltreret i en 1:1 koncentration observerede vi ingen afbøjning af vækstkurven før glukosen var opbrugt fra mediet. I det øjeblik kulstofkilden var opbrugt, standsede væksten. Mediet var altså skaleret korrekt, og glukose var den vækstbegrænsende faktor. Det blev identificeret, at det var vitaminopløsningen, der i en 100 x stamopløsning ikke kunne sterilfiltreres ned i en bioreaktor, idet et eller flere vitaminer blev tilbageholdt i sterilfilteret, når de var opkoncentreret.

Ud fra de mange forsøg med varierende skalering af aminosyrer kunne det faktiske biomasseudbytte på hver aminosyrer beregnes. Herved kunne det vises, at alle aminosyrer på nær arginin forbruges i den mængde, der kan beregnes teoretisk ud fra biomassesammensætning. Ved at plote arginin koncentrationen mod biomasse koncentration kunne det illustreres, at arginin har to forskellige udbyttekonstanter i batchfermenteringer, hvor vækstkurven bøjer af inden glukosen er forbrugt: Den første udbyttekonstant svarer til den teoretiske forbrug af arginin til biomassedannelse. Herefter ses ingen biomasse tilvækst, men Arginin omdannes kvantitativt til Ornitin. Denne reaktion er koblet til generering af ATP. Når glukoseoptagelsen standser, kunne det altså vises, at arginin forbruges som energikilde.

Inden årsagen til de afbøjede vækstkurver var identificeret, blev det også undersøgt, om faldet i væksthastighed kunne skyldes inhibering. Ved fermentering af mælkesyrebakterier i mejeriprocesser er laktatinhibering et kendt men komplekst fænomen, der skyldes både inhibering på grund af faldende pH og inhibering fra den organiske syre laktat. Vi undersøgte blandt andet om tilsætning af laktat til en eksponentielt voksende kultur kunne påvirke væksthastigheden. Ved fastholdt pH i bioreaktorer kunne vi ikke se nogen negativ effekt af laktat ved koncentrationer op til 15 g/l. Dette skal sammen holdes med, at der var dannet ca 6 g/l laktat, når vækstkurven bøjede af. Laktatinhibering kunne altså ikke forklare den faldende væksthastighed.

Det meget tunge arbejde med at konstruere et medium, der kun er sukkerbegrænset under hele fermenteringsforløbet synes umiddelbart ikke at kunne føre til egentlige selvstændige publikationer. Dog har dette arbejde været nødvendigt for at man i senere forsøg kan uddrage klare eksperimentelle resultater. Efter vor opfattelse er meget eksperimentelt arbejde vedrørende LAB skæmmet af, at andre fænomener end dem man ville undersøge kom til udtryk.

Delprojekt B:

Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i Lactococcus lactis

Transkriptionel regulering af *las* operonen.

Udtrykket af *las* operonen kodende for de glykolytiske enzymer phosphofruktokinase, pyruvate kinase og laktat dehydrogenase i *L. lactis* er blevet undersøgt. Reguleringen af *las* operonens promoter (P_{las}) er blevet analyseret i forskellige promotor probe vektor systemer, nemlig plasmid-bærende og integreret på cellens kromosom. I multikopi systemet pAK80 viste promotor fusion 13 (Fig. B1) indeholdende det største DNA fragment også den højeste aktivitet af reporter enzymet β -galactosidase, mens promotor fusion 4 indeholdende det mindste DNA fragment, den laveste aktivitet. Formålet var at sammenligne aktiviteterne af de forskellige transcriptionelle promotor fusioner for at se, hvilken effekt DNA fragmenterne havde på promotor aktiviteten. Resultatet viste, at aktiviteten blev stepvist nedsat 3 gange, når DNA fragmenternes størrelse reduceres fra 3'enden. Årsagen hertil kan være forskel i RNA'ets stabilitet for de forskellige DNA fragmenter. Deletioner fra 5'enden af DNA fragmenterne påvirkede ikke promotor aktiviteten.

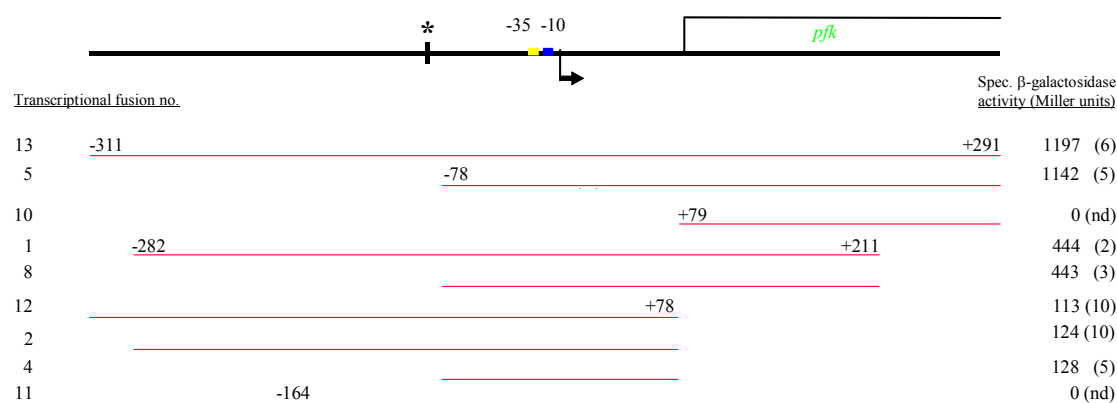


Fig. B1: Figuren viser promotor fusionerne, som indeholder forskellige DNA fragmenter omkring *las* operonen (sorte tynde linier), der er klonet i multikopi systemet pAK80. For hver promotor fusion er længden af DNA fragmentet angivet i forhold til starten af *pfk* genudtrykket. Promoter styrkerne er angivet i Miller Units og den procentiske standard afvigelse i parentes.

Udvalgte fusioner omkring *las* promotoren blev integreret på kromosomet i enkeltkopi således, at det var muligt at undersøge reguleringen af promotoren mere nøjagtigt (undgå indflydelse fra plasmidets kopital). Promotorens aktivitet blev målt som niveauet af β -glucuronidase aktivitet. Denne aktivitet blev induceret omkring 5 gange ved overgangen til stationær vækstfase ved $OD_{600} = 1.2$ og $pH = 6.3$ i komplekst medium (se Fig. B2) i forhold til en ikke induceret kontrol promotor. Denne induktion kunne også detekteres på enzym niveau, hvor enzym aktiviteterne blev forøget i samme vækstfase. Dog var induktionsgraden forskellige for de tre *las* enzymer. Mulige faktorer til induceringen så som pH, slutproduktet laktats koncentration og mediets sammensætning blev undersøgt. Det er nu klarlagt, at den inducerende faktor bliver udskilt til vækstmediet.

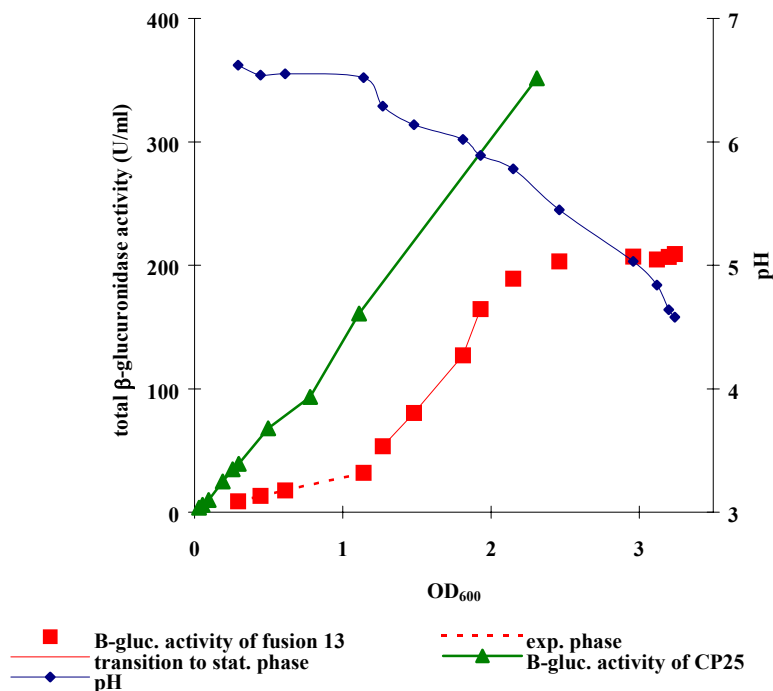


Fig. B2: Vækstfase regulering af promotor fusion 13 i forhold til en syntetisk promotor CP25. Aktiviteten af promotor fusionen 13 er vist før reguleringen med stiplede og efter reguleringen med fuldt optrukne linier. Ved overgangen til stationær væksthase fås en 5 folds induktion af promotoren.

Dette blev undersøgt ved at fremprovokere en induktion med vækstmedie, som var høstet fra induceret celler. Det viste sig også, at induktionen af *las* promotoren er betinget af en bestemt væksthase under cellens vækst, og denne induktion er ikke afhængig af pH i mediet. Dette blev bevist ud fra forsøg, hvor enten 1) saltsyre blev tilsat kulturen for at efterligne en syring, 2) pH i det tilsatte inducerende medie blev neutraliseret eller 3) vækstforsøget blev udført i en fermentor under betingelser, hvor pH blev fastholdt til et konstant niveau. Induktionsmekanismen eller selve induceren er ikke endeligt fastlagt, men kunne være laktat sammenkoblet med flere andre faktorer.

Overraskende bliver *las* promotoren ikke induceret i defineret medium. Dette kan skyldes det ændrede vækstmønster forårsaget af en anden sammensætning i dette medium fx. bufferkapaciteten.

Flere undersøgelser af *las* promotorens aktivitet viste, at denne represseres fuldstændigt kort tid efter den væksthaseafhængige induktion har fundet sted (Fig. B2). Fænomenet ses ikke ved de konstitutive kontrolkulturer. Dette indikerer, at repressionen af *las* promotoren ikke skyldes en general nedbrydning eller inaktivering af reporterenzymet ved lav intracellulær pH.

50 % reduktion af phosphofruktokinase aktivitet resulterer i en stærkt nedsat væksthastighed og glykolytisk flux.

I denne del er enzymet phosphofruktokinases betydningen på cellens fysiologi undersøgt. Der er konstrueret to *las* mutanter, hvor den native *las* promotor blev udskiftet med syntetiske konstitutive promotorer, CP25 og CP29 (se Fig. B3). En forudsætning for konstruktionen af disse *las* stammer var den upublicerede region

omkring *nagA* genet, som er opstrøms for *las* generne. Denne region blev opformeret, sekvensbestemt og deponeret i sekvens databanken NCBI nr. AY007718.

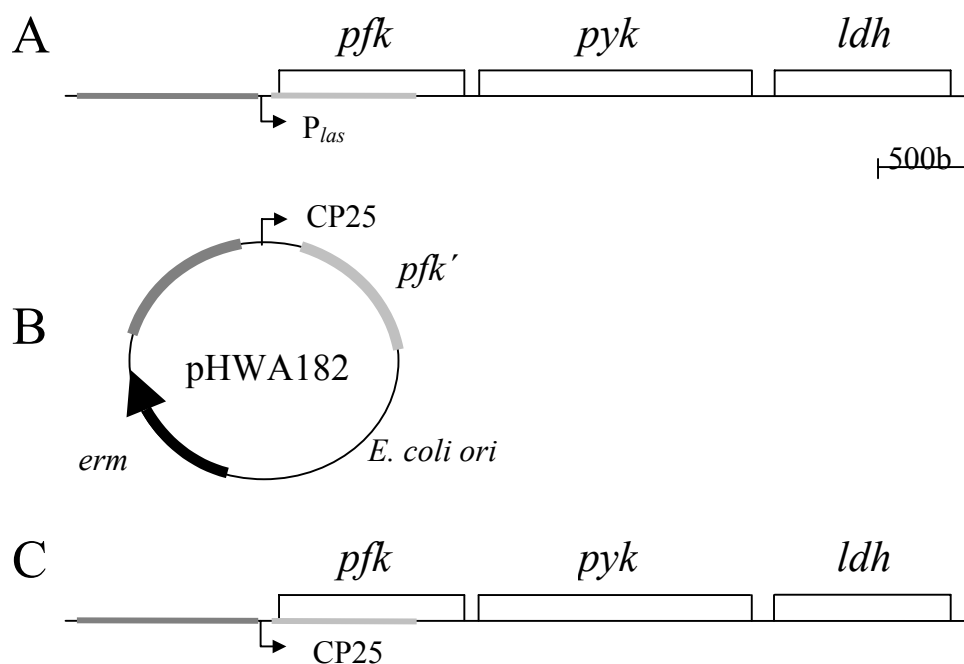


Fig. B3: Strategien anvendt til at ændre udtrykket af *las* generne. (A) En skematisk præsentation af *las* operonen i MG1363 og de DNA fragmenter, som er blevet klonet i pHWA182. Den bøjede pil indikerer den native P_{las} promoter. (B) Den syntetiske promoter CP25 indsættes i vektoren pHWA182. (C) Herefter konstrueres ved double homolog rekombination mellem MG1363 og bl.a. pHWA182, stammerne HWA217 og HWA232.

Det viste sig, at *las* mutanternes udtryk af de individuelle gener *pfk*, *pyk* og *ldh* var forskelligt. Mutanterne havde omkring en 50 procents reduktion af phosphofruktokinase aktiviteten, hvorimod aktiviteten af pyruvate kinase og laktat dehydrogenase var tættere på vildtype niveauet (Tabel B1). Dette resultat indiker, at de tre geners koordinerede udtryk var ødelagt i de stammer, hvor den native promotor var udskiftet med syntetiske.

TABEL B1.

Den specifikke aktivitet af phosphofruktokinase, pyruvate kinase og lactate dehydrogenase i *las* mutanterne

Stammer	Genotype ^a	Sp act af <i>las</i> enzymerne ^b					
		Phosphofruktokinase		Pyruvate kinase		Lactate dehydrogenase	
		U/OD ₆₀₀	% of wt	U/OD ₆₀₀	% of wt	U/OD ₆₀₀	% of wt
MG1363	vildtype (wt)	5.56	100 (6)	13.52	100 (1)	23.30	100 (7)
HWA217	wt <i>las</i> ::CP25	2.18	39 (2)	16.46	122 (21)	32.58	140 (1)
HWA232	wt <i>las</i> ::CP29	3.34	60 (4)	13.12	97 (6)	24.14	104 (18)

^a Alle mutanterne er derivater af MG1363. De syntetiske promotorer CP25 og CP29, som udtrykker *las* generne er vist.

^b Den specifikke aktivitet er angivet som U/OD₆₀₀ og den procentiske standard afvigelse i parentes.

De efterfølgende forsøg viser, at denne ændring havde stor indflydelse på cellens fysiologi.

I defineret medium tilsat glukose var *las* mutanternes væksthastighed nedsat til 0.44 h⁻¹ henholdsvis 0.54 h⁻¹ i forhold til vildtypen MG1363 (0.77 h⁻¹). Sammenhængen mellem væksthastigheden og PFK aktiviteten var, at mutanten med den højeste PFK aktivitet havde en højere væksthastighed. Biomasseudbyttet per mol glukose var stort set ens for alle stammerne, hvilket indikerer, at det ændrede udtryk af *las* generne havde en betydningsfuld indflydelse på den glykolytiske flux. Det viste sig også, at den glykolytiske flux var reduceret til 62-76 %, og lignende lave værdier blev også bestemt for laktat fluxen (Tabel B2).

TABEL B2. Den glykolytiske flux og fluxen imod forskellige slutprodukter i *las* mutanterne

Stammer	Glykolytisk flux ^a mmol*g dw ⁻¹ * h ⁻¹	Biomasse udbytte g dw/mol glukose	Flux til slut produkter mmol*g dw ⁻¹ * h ⁻¹		
			Lactat	Format	Acetat
MG1363	23.5 (100)	32.7	36.6 (100)	1.8 (100)	n.d. ^b
HWA217	14.6 (62)	30.2	24.9 (68)	2.2 (122)	1.0
HWA232	17.5 (76)	30.2	29.5 (81)	2.0 (111)	0.6

^a Den procentiske glykolytiske flux er angivet i forhold til fluxen i MG1363 og standard afvigelserne i parentes. ^b Kunne ikke detekteres.

I modsætning hertil var format fluxen forøget i disse mutanter, hvilket er forventet, da en reduktion i laktat fluxen vil forøge fluxen til mixed acids. Overraskende viste det sig, at *las* mutanterne stadig havde en homolaktisk fermenteringsprofil med en høj produktion af laktat, se figur B4

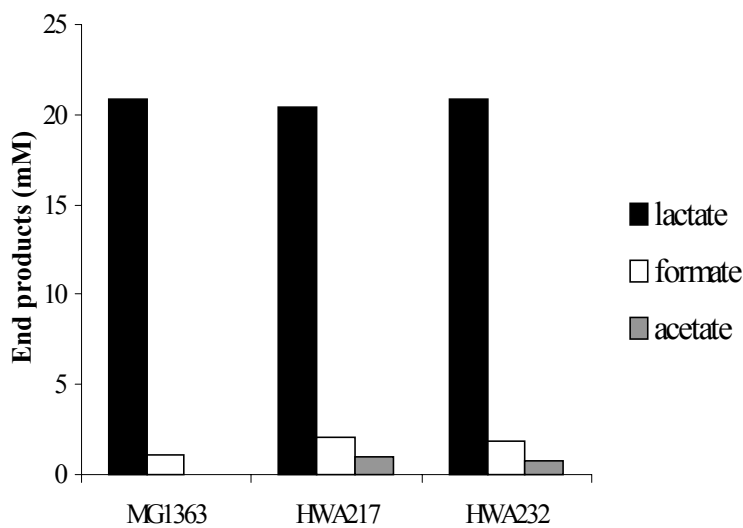


Fig. B4: Dannelsen af fermenteringsprodukter fra *las* mutanterne.

Dette resultat var uventet. Normalt vil mutanter, der oplever en energibegrænsning (lav glykolytisk flux) have en produkt sammensætning som mixed syre fermenteringskulturer. Dette antyder, at årsagen til disse mutanter har en nedsat væksthastighed og flux er ikke, fordi mutanterne udsættes for glukosebegrænsende vækstbetingelser.

Vækstmønsteret på andre substater blev undersøgt for nærmere at belyse årsagen til den ændrede fysiologi. Resultatet viste, at mutanternes væksthastighed på fruktose og maltose var sammenlignelig med MG1363. Dette kan tolkes som, at mutanterne har normal vækst, når det ikke er nødvendigt at anvende PFK enzymet eller når fluxen er lavere end normalt. Normalt betragtes glykolysen som en katabolsk reaktionsvej, dog er der stadig en lille flux mod de anaboliske veje (Novak og Loubiere, 2000). Hvis man forestiller sig, at der findes en begrænsning i de øvre reaktionsveje af glykolysen, kan dette forårsage en begrænsning i de intermediære metabolitters koncentrationen, som normalt kræves til de anaboliske reaktioner. I et defineret medium skal cellerne selv syntetisere fx. nukleotider anvendt i anabolismen. Et komplekst vækstmedium indeholder de fleste byggesten, som er ekskluderet fra det definerede medium, og derfor burde *las* mutanterne opnå en normal vækst hvis denne hypotese var korrekt. Det viste sig at *las* mutanternes væksthastighed i M17 medium tilsat glukose var reduceret yderligere (50% væksthastighed) i forhold til cellens normale vækst. Vi kan derfor konkludere, at det sandsynligvis ikke var en mangel på byggesten, som var den direkte årsag til *las* mutanternes ændrede fysiologi.

Ved at transformere *las* mutanterne med et plasmid, der udtrykker *pfk* genet, kan man komplementere eller erstatte den manglende PFK aktivitet. Hvis den nedsatte PFK aktivitet er årsagen til den ændrede fysiologi, vil disse stammer indeholdende *pfk* plasmidet vise et normal vækstmønster. Disse forsøg bekræftede vores hypotese. En mulig forklaring på en så drastisk effekt på cellens fysiologi er, at den nedsatte aktivitet af phosphofruktokinase kan resultere i en ophobning af sukker phosphater. Når substraterne før PFK enzymet ikke metaboliseres, ophobes disse. Denne ophobning har før vist sig at være toksisk for cellen (Fraenkel, 1968).

Glukose-begrænsede kemostat fermenteringer blev udført for at teste om en ophobning af sukker phosphaterne var den direkte årsag til den ændrede fysiologi,

udfra den hypotese at en evt. ophobning af sukker phosphater undgås ved lave glucose koncentrationer. I disse forsøg var det være muligt at forøge *las* mutanternes væksthastighed ved langsomt at forøge fortyndingshastigheden.

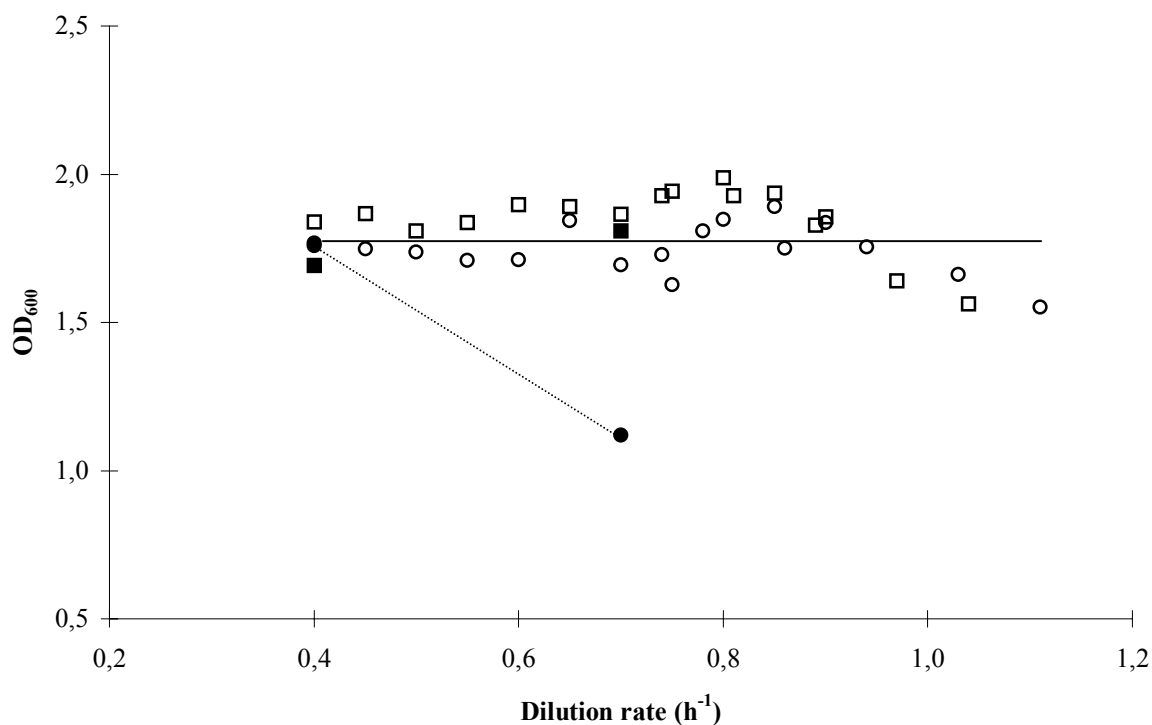


Fig. B5: Væksten af *las* mutanten HWA217 (cirkler) og MG1363 (firkanter) i kemostatkulturer ved forskellige fortyndingshastigheder. I forsøgene hvor fortyndingshastigheden er forøget hurtigt er vist med lukkede symboler. Ligeledes vises en langsom ændret fortyndingshastighed med åbne symboler.

Faktisk viste det sig at det var muligt at forøge væksthastigheden op til 195 % i forhold til vækst i batch, hvor kulturen var mættet med glukose. Dette resultat indikerer at den lave vækst hastighed af stammerne hvori phosphofruktokinase har nedsat aktivitet, skyldes at enzymet har en stærk negativ kontrol over koncentrationen af metaboliterne opstrøms for phosphofruktokinase. I projektets sidste fase blev koncentrationen af de relevante hexose phosphater desuden målt. Resultaterne viste at i stammerne med lavere udtryk af phosphofruktokinase, var koncentrationerne af glucose-6-phosphat og fruktose-6-phosphat forhøjet 2 til 4 gange iforhold til den normale celle, hvilket understøtter ovennævnte hypotese.

Disse resultater er accepteret til publikation i Journal of Bacteriology.

Laktat dehydrogenase har ingen kontrol på laktat produktionen, men en høj negativ kontrol på fluxen mod format

Det er undersøgt, hvilken indflydelse et moduleret udtryk af laktat dehydrogenasen har på forskellige variable som den glykolytiske flux, dannelsen af forskellige fermenteringsprodukter og væksthastigheden. En mutant, der er deleteret for *ldh*, er en forudsætning for at konstruere mutanter med et lavere udtryksniveau af *ldh* end vildtypen. Denne deletionsmutant blev konstrueret.

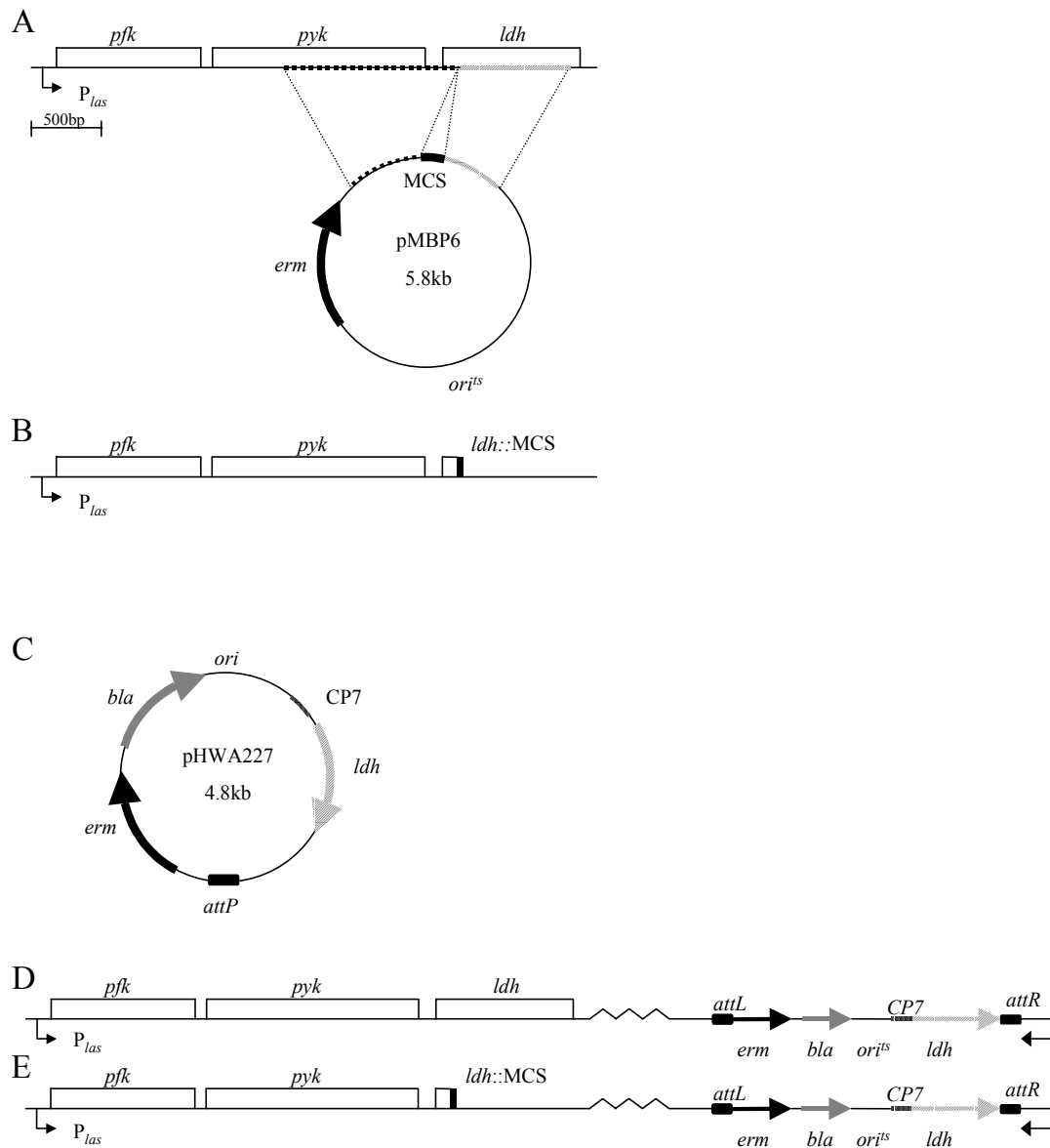


Fig. B6: Skematisk præsentation af plasmider anvendt til at konstruere stammer med ændret udtryk af *ldh* genen. (A) DNA fragmenterne fra *las* operonen klonet i pMBP6, som anvendes til at konstruere *ldh* deletionsstammen, som ses i (B). En af de site-specifikke integrationsvektorer pHWA227, hvor *ldh* genen udtrykkes fra den syntetiske promotor CP7 (C). Site-specifik integration af pHWA227 på kromosomet af enten MG1363 (A) eller MBP12 (B) resulterer i *ldh* mutanterne HWA236 (D) og HWA248 (E).

Til modulering af genudtrykket blev plasmider konstrueret, hvor *ldh*'s native promotor blev udskiftet med syntetiske promotorer. Disse plasmider blev specifikt integreret på kromosomet både i deletionsmutanten og i vildtypen. Herved opnåede vi en række mutanter, hvor aktiviteten af LDH varierede mellem 0-133 % i forhold til vildtype stammen MG1363. De *ldh* mutanter, som havde LDH aktivitet mellem 59-133 %, viste et vækstmønster og en homolaktisk fermenteringsprofil ligesom vildtypen. Her blev laktat produceret i størst mængde (87%), samtidigt med små mængder af format og acetat (Fig. B7).

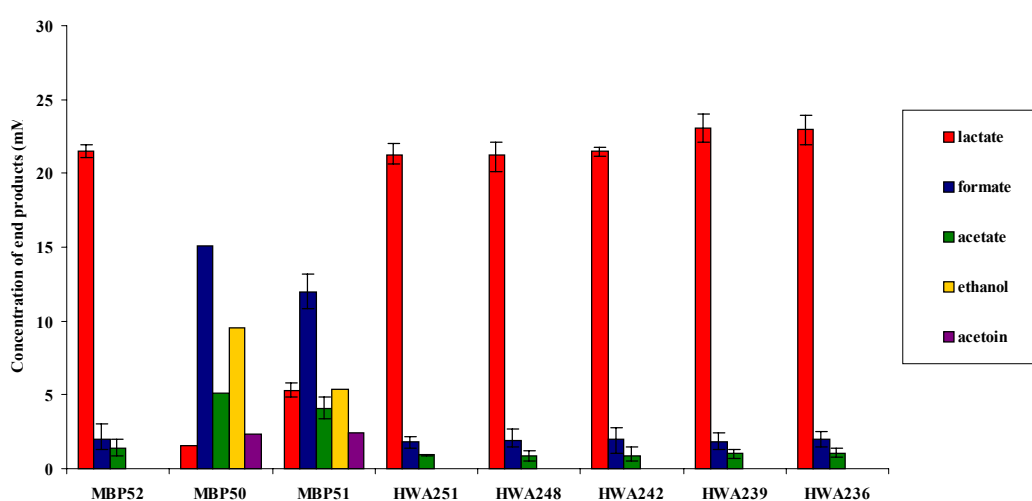


Fig. B7: Dannelsen af forskellige slutprodukter i *ldh* mutanterne.

Først når aktiviteten af LDH reduceres ca. 10 % ændres vækstprofilen signifikant, og disse *ldh* mutanter begynder at producere mixed syre produkter som format, acetat, acetoin og ethanol samtidigt med laktat. Selv den *ldh* mutant, som var deleteret for *ldh* genet, producerede en lille mængde laktat (5%), hvilket kan tyde på, at andre enzymer end LDH kan omdanne pyruvate til laktat.

Kontrol koefficienter for laktat dehydrogenase er eksperimentielt bestemt ved anvendelse af det bio-matematiske redskab metabolisk kontrol analyse. Kontrol koefficienter er kun gyldige værdier, når systemet er i steady state eller quasi-state. Steady state er en dynamisk ligevægt, hvor de intermediære metabolitters koncentration forbliver konstante. Herved opstår der en balance mellem dannelsen og nedbrydningen af selve metabolitten. Denne fysiologiske tilstand kan ses som en konstant flux igennem reaktionsvejene. Til validering af vores system blev både redskaberne dvs. *ldh* mutanterne og vækstbetingelserne undersøgt. Systemet kunne betragtes som stabilt, da det modulerede gen blev udtrykt med en konstant hastighed under hele vækstforsøget, og den totale LDH aktivitet var proportional med celledensiteten. Ligeledes fandt vi, at de samme stabile omstændigheder galdt for den glykolytiske flux og fluxene til slutprodukterne.

Den glykolytiske flux varierede mellem 95-100% for *ldh* mutanterne, som havde LDH aktiviteter mellem 59-133%. Når LDH aktiviteten blev nedsat yderligere, blev

fluxen reduceret til 64%. Gennem disse eksperimentielle datapunkter blev en kurve tilpasset med en one phase exponential association funktion.

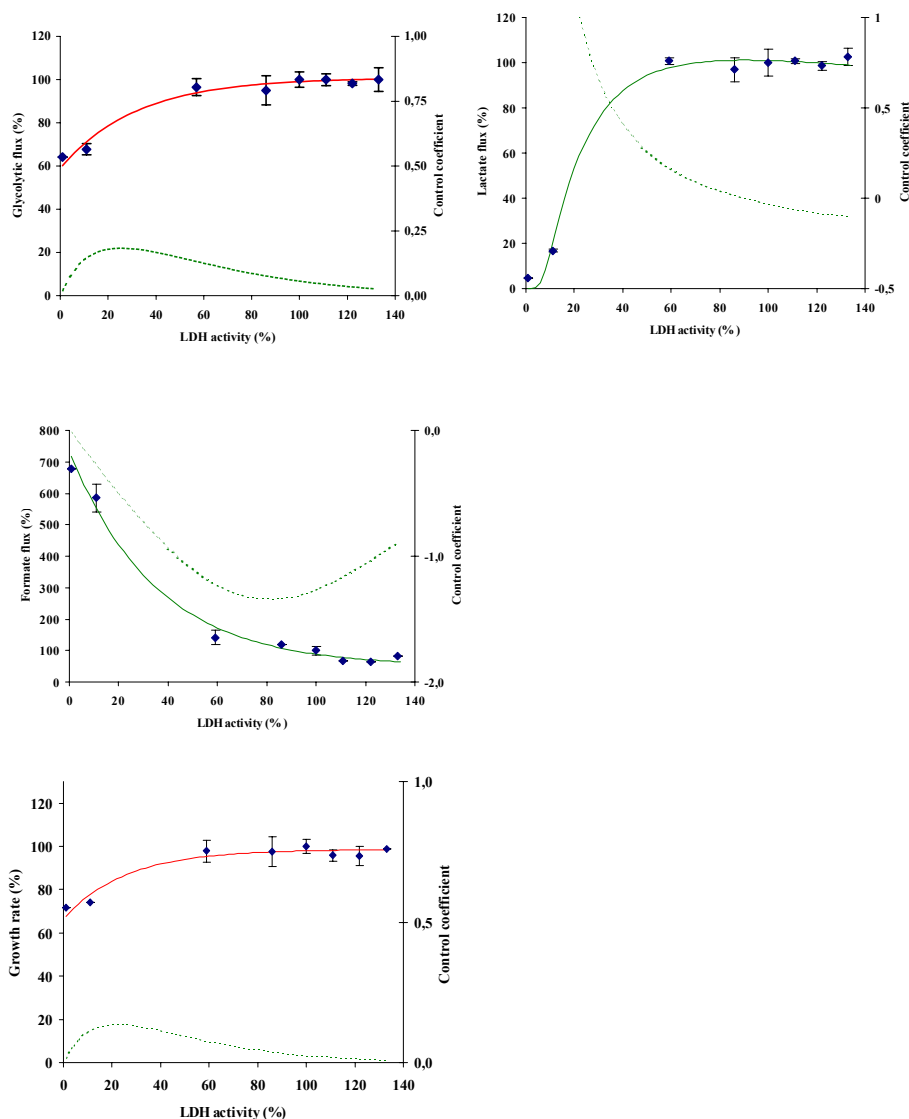


Fig. B8: Den relative glykolytiske flux, laktat og format fluxene og væksthastigheden som funktion af LDH aktiviteterne er angivet med fuldt optrukne kurver. De eksperimentelt beregnede kontrol koefficienter for fluxene og væksthastigheden vises med stiplede kurver.

Ud fra denne funktion blev kontrol koefficienten på den glykolytiske flux beregnet til $C_{LDH}^{JG} = 0.06$ omkring vildtype niveauet (Fig. B8). Hvis enzymet har fuld kontrol over en flux gennem en given reaktionsvej, er koefficienten på 1.0. Hvis enzymet ingen kontrol har over fluxen, er værdien nærmere nul.

Mutanternes flux mod laktat var nærmest konstant (97-100%) for LDH aktiviteter mellem 59-133%. Som forventet var der et langt større fald i den producerede mængde af laktat (4.5%), når LDH aktiviteten blev reduceret. Kontrol koefficienten for laktat fluxen ved vildtype niveauet blev beregnet til $C_{LDH}^{JL} = -0.03$, når one phase exponential decay funktionen blev anvendt. Ved lavest LDH aktivitet var fluxen til format højest (678%), mens denne flux faldt drastisk, når LDH aktiviteten forøges. Ved anvendelse af en one phase exponential decay funktion blev kontrol koefficienten

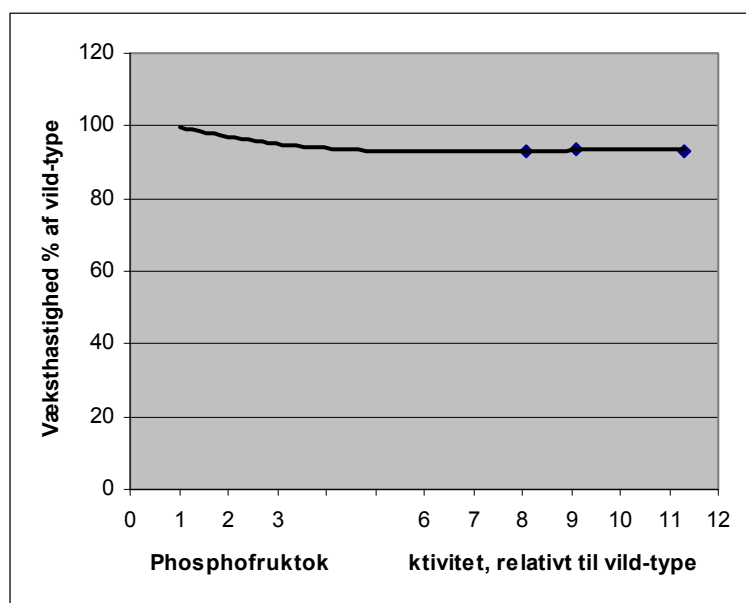
beregnet til $C_{LDH}^{Jf} = -1.27$. Når vækst hastigheden af *ldh* mutanterne blev sammenholdt med LDH aktiviteterne, observerede vi det samme mønster som for den glykolytiske flux. Kontrol koefficienten for væksthastigheden omkring vildtype niveauet blev beregnet til $C_{LDH}'' = 0.03$.

Disse resultater viser, at LDH omkring det fysiologiske niveau har ingen kontrol på de undersøgte variable, ej heller på reaktionsvejen katalyseret af selve enzymet. Dette resultat forklarer de tidligere mislykkede forsøg på at forøge laktat mængden alene ved at hæve udtrykket af *ldh*. Imodsætning hertil har LDH en høj negativ kontrol på fluxen mod de mixed syre reaktionsveje. Resultatet bekræftiger de vellykkede eksperimentielle forsøg på at forøge fluxen mod de aromatiske metabolitter ved at ødelægge det kromosomale *ldh* gen, som koder for enzymet LDH.

Resultaterne vedrørende LDHs kontrol over *L. lactis* fysiologi er næsten klar til at blive submitted (til European Journal of Biochemistry).

PFK har ingen kontrol over den glykolytiske flux i *Lactococcus lactis*.

Resultaterne fra ovennævnte forsøg viste at en beskedent sænkning af PFK aktiviteten i *L. lactis* havde en stærk effekt på den glykolytiske flux. Dette betyder dog ikke at enzymet normalt har kontrol over fluxen i en wild-type celle. For at undersøge dette er det nødvendigt også at undersøge fluxen i stammer med forhøjet udtryk af PFK og der blev derfor fremstillet en række stammer med variabelt udtryk af *pfk* enzymet. Til dette formål blev i sidste fase af projektet udviklet en ny metode til modulering af gen ekspression med de kunstige promotorer. Istedet for at klonede de kunstige promotorer enkeltvis blev der lavet biblioteker af kloner med forskellige promotorer indsat foran *pfk* genet.

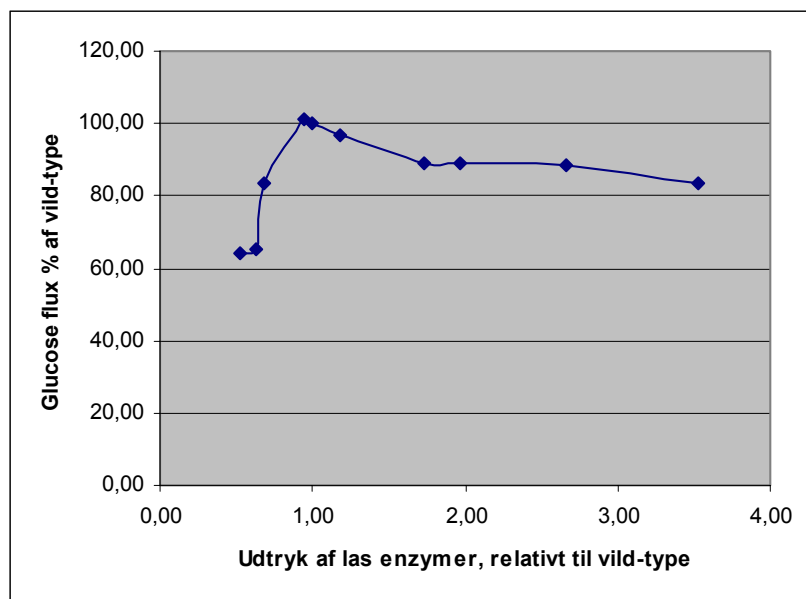


Figur B9. Effekt af modulering af phosphofruktokinase aktivitet over vild-type niveauet på *L. lactis* væksthastighed.

Disse DNA fragmenter blev indsat i en vektor foran et reportergen således at screening for relevante aktiviteter blev gjort nemmere. Efter integration i attachment

sitet for fagen TP901 på *L. lactis* kromosom opnåede vi stammer med udtryk af PFK enzymet fra normalt niveau til 11 gange normalt niveau. Stammerne blev herefter undersøgt mht væksthastighed og glykolytisk flux. Både flux og vækst er højest ved normalt udtryk af PFK og begge variable falder gradvist ved høje udtryk af enzymet. Det kan derfor konkluderes at *PFK har ingen kontrol over den glykolytiske flux ved normalt udtryk af enzymet*. Disse resultater vil nu blive skrevet sammen til en artikel med henblik på publikation.

Las enzymerne har samlet ingen kontrol over den glykolytiske flux i *Lactococcus lactis*. Med henblik på at undersøge betydningen af udtrykket af den samlede las operon over den glykolytiske flux blev der fremstillet en række stammer med variabelt udtryk af de tre las enzymer. Til dette formål blev ovennævnte metode til modulering af gen ekspression med kunstige promotorer anvendt med følgende modifikationer. Istedet for at anvende hele *pfk* genet blev kun en del af genet klonet og efterfølgende blev plasmid konstruktionerne integreret direkte i las operonen hvorved hele operonen bliver sat under kontrol af de kunstige promotorer. Der blev opnået hundredvis af stammer. 60 stk blev udvalgt til videre analyse, heraf var ca. 30 integreret korrekt og disse blev undersøgt for aktivitet af las enzymet LDH. 10 stammer heraf med LDH udtryk fra ca. 50% af normalt til ca. 300 % af normalt blev udvalgt til videre forsøg. Måling af aktiviteten af de tre enzymer, PFK, PK og LDH i alle 10 stammer viste at de tre gener blev udtrykt proportionalt. Vækst forsøg blev dernæst udført med disse 10 stammer til vurdering af effekten af las operonens udtryk på de metaboliske fluxe i *Lactococcus*.



Figur B10. Effekt af moduleret ekspression af las operonen på den glykolytiske flux.

Disse forsøg viser at både over og underproduktion af las enzymerne havde en negativ effekt på den glykolytiske flux, således at det normale udtryk af las operonen gav den maximale flux. Med andre ord har las enzymerne samlet ingen kontrol over den glykolytiske flux i *L. lactis* hvilket er temmelig overraskende i lyset af disse enzymeres centrale placering. Las enzymerne havde ligeledes ingen kontrol over fluxen til mælkesyre. Med hensyn til produktion af andre biprodukter forbliver *L. lactis*

homolaktisk både ved lave og høje niveauer af las enzymerne. Dog ses under aerobe vækstbetingelser en høj, negativ, kontrol over acetoin produktionen (data ikke vist).

Gene-replacement via fusarsyre selektion på mælkesyrebakterier. Følgende arbejde blev udført med henblik på at udvikle en metode til hurtig gene-replacement i *L. lactis*. For *E. coli* kan man opnå positiv selektion af tetracyclin-sensitive mutanter i en population af Tet-resistente bakterier ved at udplade på plader med Fusarsyre (fusaric acid=5-butyl picolinic acid). Princippet i selektionen er ikke præcist kendt men bygger formentlig på fusarsyres evne til at chelere metal-ioner. Selektionen for *E. coli* laves typisk med fusarsyre koncentrationer på 6-12 µg/ml afhængigt af stammebaggrunden. I litteraturen findes ikke nogen eksempler på selektion af tet-sensitive mutanter i Gram-positive arter, og altså heller ikke i *L. lactis*. Det blev forsøgt at selektere Fusarsyre-resistente lactococcer på følgende medie: GM17 agar, 0.1 mM ZnCl₂, 10 g/l NaCl, samt Fusarsyre fra 10 til 200 µg/ml. Selektionen blev lavet på stammerne: SOL582 (indeholder Tetr plasmid med ts-replicon, pG-host) og SOL701 (indeholder Tetr gen integreret i fag attachment site i genomet). Stammerne blev opvokset ved 30°C i flydende GM17+5 µg/ml Tet og ca. 5 x 10⁵ celler blev udpladet på en agarplade med det selektive medie (30°C to døgn). Denne udpladning viste at det kræver ca. 200 µg/ml fusarsyre for at opnå samme væksthæmning af lactococcerne som man ser for *E. coli* ved 10 µg/ml fusarsyre. For begge *L. lactis* stammer pibede på 200 µg/ml pladen en halv snes klart fusarsyre resistente kolonier op over et svagt baggrundstæppe, hvilket er væsentligt færre end de 100-200 resistente kolonier man ser i en typisk *E. coli* selektion. For hver selektion reisoleredes 8 resistente kloner som herefter testedes for tet-resistens. Konklusion på dette arbejde var at man kan selektere fusarsyre resistente lactococcer ved høje fusarsyre koncentrationer. Men i modsætning til *E. coli* er den dominerende klasse blandt sådanne selektanter ikke kloner, som har mistet tetracyclin resistensen, men andre mutationer, der i sig selv giver fusarsyre resistens. En mulig årsag til det negative resultat kan skyldes at tetracyclin-pumper kan inddeles i tre klasser, og det ser ud til at kun en af disse klasser giver anledning til Fusarsyre-sensitivitet. Det kan derfor meget vel tænkes at den Gram-positive tet-pumpe som vi har anvendt ikke giver anledning til Fusarsyre-sensitivitet. Vi er nu gået igang med udvikling af alternative gene-replacement teknikker baseret på mere veldefinerede selektions systemer.

Konklusion: (Delprojekt B)

Enzymerne phosphofruktokinase, pyruvate kinase og laktat dehydrogenase er transkriptionelt reguleret ved overgangen til stationær væksthase. Mekanismen er uafhængig af extracellulært pH, men afhængig af en bestemt væksthase. Det er vist, at induceren bliver udskilt til vækstmediet. Dog er de involverede faktorer endnu ikke opklaret, men slut produktet laktat spiller muligvis en vigtig rolle.

En 50 procents reduktion af phosphofruktokinases aktivitet har en drastisk effekt på væksten, den glykolytiske flux og laktat fluxen. Den heraf ændrede fysiologi kan være et resultat af et ubalanceret niveau mellem de glykolytiske intermediære metabolitter eller endda toksiske koncentrationer af substraterne for phosphofruktokinase fx. hexose phosphaterne. De fysiologiske forsøg antydede, at phosphofruktokinase kan muligvis udøve kontrol over væksten og fluxene ved det normale niveau af enzymet. Men efterfølgende forsøg med stammer hvori aktiviteten af phosphofruktokinase blev moduleret omkring det normale niveau viste at enzymet ingen kontrol har over flux og vækst i den normale celle.

Enzymet laktat dehydrogenase har ikke nogen form for kontrol på væksthastigheden, den glykolytiske flux og endda ikke på reaktionen katalyseret af selve enzymet, nemlig laktat produktionen. Derimod fandt vi at laktatdehydrogenase har en meget høj negativ kontrol på format fluxen ($C = -1,3$).

Det lykkedes også at konstruere stammer som har ændret udtryk af alle tre laktat dehydrogenase enzymer samtidig. Disse stammer muliggjorde en bestemmelse af de tre enzymeres samlede kontrol over glykolysen og det viste sig at, samlet set, har disse enzymer ikke nogen kontrol.

Delprojekt C:

Isolering og karakterisering af mutanter med ændret glykolytisk flux

Udvikling af pladescreen for detektion af mutanter med ændret glykolytisk aktivitet

Til screening af mutanter i glykolysen er et pladescreen udviklet der er baseret på rigt medium suppleret med en kulstofkilde samt en pH indikator (bromkresol grøn). Herved kan der skelnes mellem hurtig syring ved homolaktisk fermentering og langsom syring ved ikke-homolaktisk fermentering. *L. lactis* MG1363 kolonier farves således grønne ved vækst på 1-2% glukose, men forbliver hvide ved vækst på 0.3% glukose, 2% maltose og 2% galaktose. Denne plade-screen blev anvendt til at karakterisere de isolerede *ldh* mutanter (se nedenfor), idet mindre grønne kolonier svarede til mutanter med et nedsat niveau af laktat dehydrogenase.

Anvendelse af pladescreen til isolering af mutanter, der er mere grønne end vild typen

Der blev isoleret to mutanter der viste mere grønfarvning på glukose pladerne end vild typen. De fremkom ved en tilfældighed under mutagenesen af *ldh* genet, men indeholdt ingen mutationer i *ldh* genet. Det blev påvist, at de var svagt temperatursensitive, samt at de var *Lactococcus lactis* stammer (ved sekventering af ribosomalt RNA). Stammerne blev ikke yderligere undersøgt. Men forsøget indikerer, at der kan være mulighed for at isolere mutanter der giver mere syring end udgangsstammen.

Overekspression af phosphofruktokinase og laktat dehydrogenase samt produktion af antistoffer mod disse proteiner

Til delprojekt A var der oprindeligt planlagt en oprensning og kinetisk karakterisering af de tre enzymer der kodes for i *las*-operonen. I delprojekt C blev det derfor forsøgt at klonede de tre gener hver for sig i udvalgte expressionsvektorer. Det lykkedes at konstruere plasmider indeholdende generne *pfk* og *ldh* efter inducerbare promotorer, men ikke for *pyk* genet. Induktion af *E. coli* stammer transformeret med disse plasmider har resulteret i et overudtryk af proteinerne, hvilket dog resulterede i dannelse af inclusion bodies –dvs proteinerne aggregerede. Disse inclusion bodies blev oprenset og blev brugt til immunisering af kaniner med henblik på at opnå antistoffer mod de to proteiner. De herved producerede antistoffer er blevet testet og er vist at være specifikke for henholdsvis phosphofruktokinase og laktat dehydrogenase fra *L. lactis*.

Konstruktion af genbank i *E. coli* med mutageniseret *ldh* gen fra *L. lactis* og isolation af erm-resistente *ldh* mutanter i *L. lactis*

En meget anvendt metode til mutagenisering af DNA er såkaldt mutagenic PCR (Vartanian *et al.*, 1996). Under anvendelse af denne metode er der blevet konstrueret en genbank i *E. coli* med 70 individuelle stammer indeholdende plasmid med mutageniseret *L. lactis* *ldh*. Plasmiderne i genbanken indeholder ikke et *L. lactis* origin, og vil derfor, når de introduceres i denne bakterie, krydse ind på kromosomet via rekombination når man selektionerer for resistensmarkøren på plasmidet (Erm^R). Fra *ldh* mutant biblioteket er der isoleret ialt 31 *L. lactis* stammer med et plasmid siddende i *ldh*. Af disse mutanter er *ldh* genet blevet sekventeret i 23 stammer hvoraf

9 af stammerne ikke indeholder mutationer i genet. De resterende 14 stammer indeholder alle mutationer i *ldh* genet: fra én til ni amino-syreændringer, fem af stammerne indeholder desuden et stopcodon i *ldh* sekvensen. Der er desuden isoleret en stamme (LL35) med indkryds af plasmidet pMW47 der indeholder et vildtype *ldh* gen. Denne stamme er brugt som vildtype, og opfører sig i vækstforsøg som en erm-resistent MG1363. Det skal dog bemærkes, at der er en baseændring i *ldh* genet i LL35 i forhold til *ldh* genet i MG1363 givende aminosyre ændringen F270C. Dette skyldes at de plasmider der er brugt til konstruktionen af *ldh* mutant biblioteket indeholder DNA fra stammen LM0230 fordi de klonede dele af *las*-operonen som vi i sin tid modtog fra Allan Hillier i Australien, netop var blevet isoleret fra LM0230, en *L. lactis* stamme der desværre indeholder flere mutationer i forhold til MG1363. Oprindeligt kommer MG1363 og LM0230 fra samme udgangsstamme. Denne forskel betyder, at stammerne LL53 og LL61 (se nedenfor) ligeledes indeholder F270C ændringen.

Fænotypisk karakterisering af *ldh* mutanter

LL35 samt to af de isolerede *ldh* mutanter, nemlig LL53 (indeholdende *ldh* allelen *ldh4-8*) og LL61 (*ldh11-5*) opfører sig som MG1363 på grønne GM17 indikator plader, dvs kolonierne af stammerne er små og grønne. Dette tyder på at disse stammer er homolaktiske. 11 *ldh* mutanter, eksempelvis LL29, giver store hvide kolonier på pladerne, hvilket indikerer at disse mutanter har mistet deres LDH aktivitet og er mixed acid fermenterende. LL52 (*ldh4-4*) har en intermediaær fænotype, idet den giver store lysegrønne kolonier på pladerne. Denne antagelse blev bekræftet ved enzymassays af LDH aktiviteten, idet der kun kunne måles LDH aktivitet i to af de isolerede mutanter, nemlig LL53 og LL61.

Tabel C1: Væksthastighed og specifik aktivitet af LDH i isolerede *ldh* mutanter dyrket i SA medium med glucose

Stamme ^a	<i>ldh</i> allel	Amino syre ændringer i LDH	Fænotype ^b	Specifik væksthastighed	Specifik aktivitet af LDH ^c	
				(h ⁻¹)	(nmol/min·mg)	(% af wt)
LL35	WT		grøn, lille	0,70	1824	100
LL53	<i>ldh4-8</i>	K316R, N325D	grøn, lille	0,72	1679	92
LL61	<i>ldh11-5</i>	E312G, F214S, A320P	grøn, lille	0,63	324	18
LL52	<i>ldh4-4</i>	I63V, K86stop	lysegrøn, stor	0,50	<1	<1
LL28	<i>ldh2</i>	L240P	hvid, stor	0,46	<1	<1
LL29	<i>ldh3</i>	F155S, D250G, F260L, Q264R, N292D	hvid, stor	0,44	<1	<1

^a Alle stammer er MG1363 derivater

^b Fænotypen er angivet som kolonifarve og -størrelse på grønne GM17 indikatorplader

^c Den specifikke aktivitet (nanomole per min per mg protein) af LDH. LL35 er sat til vild type aktivitet

Tabel C1 viser den specifikke aktivitet af LDH i fem udvalgte *ldh* mutanter samt LL35 der indeholder et vild type *ldh* gen. I LL53 og LL61 kan der måles en aktivitet af LDH på hhv 92% og 18% af aktiviteten i LL35. LL53 vokser i minimal medium med en specifik væksthastighed der svarer til den observerede væksthastighed for LL35, mens LL61 har en 10% lavere specifik væksthastighed end vild typen. Idet en nedsættelse af LDH aktiviteten på over 80% ikke giver anledning til en ændret fænotype på grønne GM17 indikator plader, må det derfor forventes at LDH findes i overskud i cellen. Dette stemmer overens med resultatet fra Delprojekt B. I LL52, en isoleret mutant med en ødelagt *ldh* læseramme, samt i LL29 kan der ikke detekteres nogen LDH aktivitet. Det var derfor forventet at disse stammer har en fænotype på grønne GM17 indikator plader der svarer til en mixed acid fermenterende stamme, dvs store hvide kolonier. Dette er tilfældet for LL29, men det er dog blevet observeret at LL52 giver store lysegrønne kolonier på disse plader. Dette må formentlig skyldes, at denne mutant indeholder en svag LDH aktivitet in vivo, der ikke kan måles in vitro. Celleekstrakter fra de resterende 10 isolerede *ldh* mutanter indeholdt ingen LDH aktivitet (data ikke vist).

Tabel C2: Analyse af overnatskultur af isolerede *ldh* mutanter^a

Stamme	<i>ldh</i> allel	pH ^b	OD ₄₅₀	Slutprodukt analyse (mM)		
				Laktat	Format	Acetoin
LL35	WT	4,24	2,26	21,5	0,4	-
LL53	<i>ldh4-8</i>	4,25	2,35	20,6	0,4	-
LL61	<i>ldh11-5</i>	4,75	3,88	13,7	3,6	3,9
LL52	<i>ldh4-4</i>	5,97	3,95	5,8	8,5	4,2
LL29	<i>ldh3</i>	6,22	3,91	ND ^c	ND	ND

^a Analyse af kultur vokset i 5 ml SA-IV medium med 1% glukose ved 30°C i 24 timer. Produktionen af andre slutprodukter end laktat, format og acetoin er ikke medtaget pga store udsving i måleresultaterne

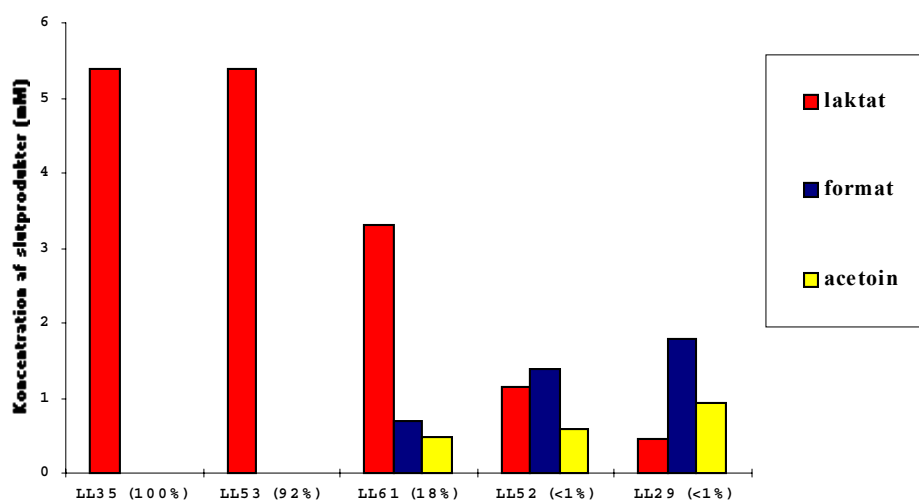
^b pH af medium er 7,05 ved forsøgets begyndelse

^c ND, not determined

For nærmere at karakterisere de tre LDH mutanter (LL52, LL52 og LL61) der udviser LDH aktivitet på de grønne plader, er der blevet målt på deres evne til at syrne, deres yield samt deres laktat produktion i en overnatskultur. Som kontroller er medtaget vild typen samt en total negativ LDH (LL 29). Som det kan ses i Tabel C2, syrner vild typen en overnatskultur i minimal medium til pH 4,24. LL53 syrner til samme niveau som vild typen, mens de tre andre mutanter syrner i en lavere grad hvilket er i overensstemmelse med den observerede lave LDH aktivitet i disse stammer. Denne lavere syrningsgrad i disse tre *ldh* mutanter resulterer i en højere yield, målt som OD₄₅₀, sammenlignet med LL35. En analyse af slutprodukt dannelse i mutanterne, viser at hvor LL35 og LL53 er udpræget homolaktiske er LL52 og LL61 mixed acid fermenterende. LL61 producerer dog en betydelig mængde laktat. Som det blev

observeret i Delprojekt B, kan en stamme uden detekterbart LDH udtryk (LL52) producere en lille mængde laktat.

For en yderligere karakterisation af mutanterne, er der blevet målt på mængden af deres slutprodukt dannelse under eksponentiel vækst. De tre *ldh* mutanter samt LL35 er vokset i minimal medium med 0,25% glukose og prøver er udtaget ved OD₄₅₀ på 0,5. Resultatet af disse forsøg er vist i Figur C1, og bekræfter målingerne på overnatkulterer der viste at LL35 samt *ldh* mutanten LL53 begge er homolaktisk fermenterende, mens LL52 er mixed acid fermenterende. LL61 producerer en høj mængde laktat samt små mængder af mixed acid fermenteringsprodukterne. En af konklusionerne i Delprojekt B er, at først når LDH aktiviteten nedsættes til ca 10% af vild type niveauet ændres vækstprofilen signifikant. Dette ses ligeledes ud fra resultaterne i Figur C1, idet LL61 (18% LDH aktivitet) producerer 62% af den mængde laktat som LL35 producerer. Til sammenligning producerer LL29 under 10% af vild typens laktatproduktion.

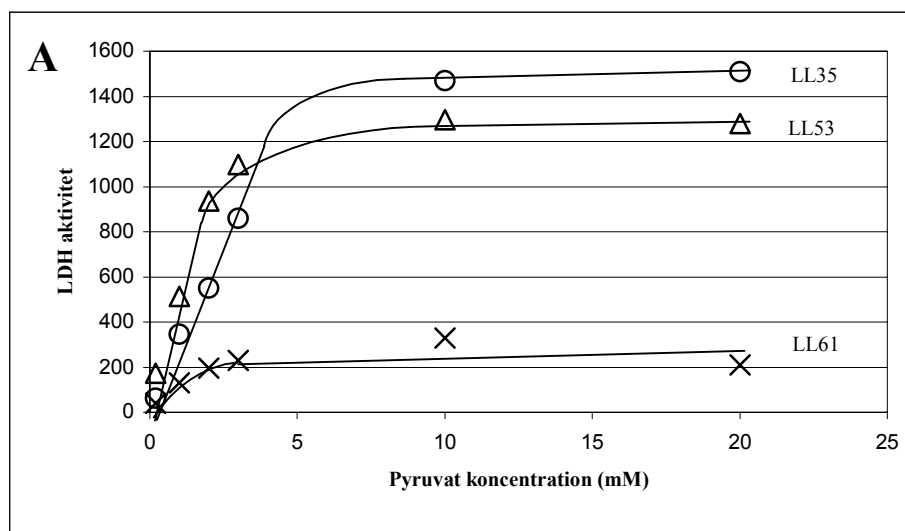


Figur C1. Slutprodukt dannelse i LL35 samt fire *ldh* mutanter. Tal i parentes efter stammenavn angiver LDH aktivitet i forhold til LL35. Prøverne er ikke analyseret for andre slutprodukter end de viste. Prøverne er målt på kulturer voksende i eksponentiel fase i minimal medium med 0,25% glukose og er høstet ved OD₄₅₀ på 0,5.

Kinetisk karakterisering af LDH mutanter

LL53 ligner på mange punkter vild typen idet den er homolaktisk og har en væksthastighed der svarer til vildtypens. LDH aktiviteten i denne stamme svarer dog kun til 92% af den aktivitet der er målt i LL35. Idet indledende forsøg med denne mutant viste, at den producerer et LDH protein der har ændrede kinetiske egenskaber end vild type proteinet, blev dette mutantprotein sammen med LDH fra LL61 derfor karakteriseret mere detaljeret. Figur C2 viser LDH aktiviteten i vild typen (LL35) og i LDH mutanterne LL53 og LL61 afbildet som funktion af koncentrationen af pyruvat. Ud fra denne graf, er det meget tydeligt at de to mutanter adskiller sig fra vild typen. Det er ud fra disse kinetikforsøg muligt at bestemme K_m -værdier og V_{max} -værdier for

vildtypen og mutanterne, se Figur C2. K_m er for LDH i LL35 bestemt til at være 2,9 mM. Dette stemmer overens med resultater fra litteraturen, idet denne værdi under samme betingelser tidligere er blevet bestemt til 3 mM (Garrigues *et al.*, 1997).



<i>B</i>	K_m	V_{max}
Stamme	(mM)	U/mg protein
LL35	$2,9 \pm 0,43$	1613 ± 110
LL53	$1,2 \pm 0,15$	1347 ± 64
LL61	$2,0 \pm 0,09$	396 ± 6

Figur C2. Kinetisk karakterisering af LDH mutanter. Enzymaktiviteten er målt på celleekstrakt fra celler vokset i minimal medium med 0,25% glukose og høstet ved en OD_{450} på 0,7. A. Variation af LDH aktivitet i mutanterne ved forskellige substratkoncentrationer. B. K_m og V_{max} værdier for LDH for substratet pyruvat. De kinetiske parametre er bestemt vha programmet UltraFit 3.0.

LDH proteinet produceret i LL53 har en svagt nedsat V_{max} værdi overfor pyruvat, mens K_m værdien derimod er nedsat betydeligt for dette protein, nemlig til 1,2 mM. Dette betyder, at LDH i denne stamme har en højere affinitet over for pyruvat end vild type proteinet har. I LL61 har det producerede LDH protein en kraftig nedsat V_{max} værdi, mens K_m værdien kun er en anelse lavere end for vild typen. Disse ændringer af LDH i LL61 betyder at stammen er mixed acid fermenterende.

Forsøg på konstruktion af *pfk* mutanter

Til konstruktion af en deletionsmutant i *pfk* er der blevet konstrueret et plasmid indeholdende promotoren for *las*-operonen efterfulgt af et *pfk* gen med en *EcoRV* in-frame deletion. Dette plasmid er blevet integreret på kromosomet af MG1363, og den isolerede stamme har, som forventet, ingen umiddelbar fænotype. Det har dog ikke været muligt, trods flere forsøg, at selektere for tab af erythromycin

resistensmarkøren. Det har heller ikke været muligt at fusionere det muterede *pfk* gen til pGhost plasmider. Dette førte til konstruktionen af et nyt selektionssystem for tab af erythromycin-resistensen. Til denne procedure indføres *upp* genet (der koder for uracil phosphoribosyltransferase) på plasmidet og der transformeres til en MG1363 derivat med genotypen *upp, tdk*. Udkryds kan herefter selekteres for ved vækst på fluorouracil. Der blev derfor konstrueret et plasmid der indeholder *pfk* deletionen og *upp* genet og dette plasmid blev flere gange forsøgt krydset ind på kromosomet af *L. lactis*. Det lykkedes dog aldrig at isolere en Δpfk mutant. Der er desuden konstrueret plasmider til indkryds på kromosomet indholdende en mutation i *pfk*, nemlig L177W (Serre *et al.*, 1990). Enzymet som allelen giver ophav til er ikke reguleret af ADP eller PEP og vil derfor sandsynligvis have ændrede intra-cellulære pools af enkelte af de glykolytiske intermediære som f.eks fruktose-6-phosphat. Denne mutant er desværre aldrig blevet konstrueret.

Proteomisk evidens for to glycerinaldehyd-3-phosphate-gener (*gap*) i MG1363

Hillier og medarbejdere rapporterede i 1995 om kloningen af et *gap* gen fra *Lactococcus lactis* (Cancilla *et al.*, 1995). Vi har klonet og overudtrykt dette gen fra MG1363 og identificeret to protein spots på 2 Dimensionale geler, der svarer til denne sekvens. Endvidere har vi vist at disse gen produkter ikke findes i MG1363 under normale vækstbetingelser. Vi har i overensstemmelse med dette resultat kunne konstruere en mutant, der har fået ødelagt det *gap* gen som Cancilla *et al* klonede, og denne mutant gror ligeså godt som udgangstammen. Under alle undersøgte vækst forhold har vi i MG1363 påvist to andre proteinpletter der altid produceres og som indeholder GAP-lignende peptider. Efter at DNA-sekvensen af *Lactococcus lactis* IL1403 er frigivet kan vi se, at der også er påvist to forskellige *gap*-gener i denne stamme. Vi har foreslået, at det *gap* gen der normalt ikke udtrykkes kaldes *gapB*, mens det udtrykte gen kaldes *gapA*. Man kan ikke forvente at kunne ødelægge det normalt udtrykte *gapA* gen uden at *gapB* er udtrykt i cellen, da genproduktet glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase må anses at absolut nødvendigt for laktokokkerne. Vore studier har yderligere påvist at begge genprodukter undergår en kovalent modifikation, idet der forekommer to proteinpletter fra hvert genprodukt.

Konklusion: (Delprojekt C)

Det har voldt meget stort besvær at fremstille kloner af *las*-generne, dette er også erkendt af andre forskere, der har arbejdet med dette DNA område (Gasson og Hillier, personlig communication). Delprojekt C har ydet en service virksomhed over for de to andre delprojekter, m.h.t. afhjælpning af kloningsbesvær i delprojekt B og ved at fremstilling vektorer til overekspression af LDH og PFK genproduktkerne, der oprindeligt var planlagt til anvendelse i delprojekt A. Men det er nu lykkedes for os at få disse konstruktioner, der kan anvendes til overudtrykkelse af disse gener til f.eks oprensning af genprodukterne. Vi har endvidere anvendt dem til fremstilling af specifikt antistof mod hhv. LDH og PFK. Vi kan således fremover måle proteinmængden af disse enzymer med antistofferne.

Kloningproblemerne medførte, at mutant isoleringen blev koncentreret om *ldh* genet, som er lettest at modificere ved indkryds af mutageniserede plasmider, fordi det ligger til sidst i *las*-operonen.

Vi har dog plasmid-konstruktioner parate til forsøg på at indføre hhv. en deletion og et ændret *pfk* gen i MG13663, når der engang senere kommer arbejdskraft i laktokokgruppen til en videreførsel af dele af dette projekt.

Den etablerede mutageniseringsprocedure for *ldh* genet gav to ud af 14 mutanter som havde LDH aktivitet in vitro. Disse to mutanter viste sig at have ændrede K_m og V_{max} værdier. Metoden vil derfor kunne anvendes til større screeninger for at få andre mutanter med nedsat aktivitet eller til fremstilling af site directede mutanter i f.ex. substratbindings sites. De isolerede *ldh* mutanter viste i overensstemmelse med delprojekt B, at LDH normalt forefindes i overskud. En nedsættelse af aktiviteten af LDH til 18% af vild type niveauet nedsætter kun laktat produktionen til 62% af vild type niveauet og giver kun svagt forøget generationstid. LL28 indeholder kun én mutation i *ldh* genet, nemlig L240P. Vi kan derfor konkludere at denne Leucin 240 ikke kan substitueres med Prolin uden at al LDH aktivitet forsvinder. Det er sandsynligt at denne mutation ødelægger foldningen af proteinet.

Det er vist, at der må findes to *gap* gener i MG1363. Det tidligere identificerede gen *gapB* er ikke nødvendigt for normal vækst af MG1363, og det udtrykkes normalt heller ikke. Dette er en meget væsentlig information for fremtidige studier af modulering af glykolysen, idet det viser, at man bør anvende *gapA* genet til f.ex. metabolisk kontrol analyse af glykolysen under normale vækstbetingelser. Endvidere viser vore studier, at der skal tages højde for kovalent modificerede former af enzymet.

Referencer (hele rapporten)

- Andersen, H.W. 2000. Ph.D. thesis, IM, DTU.
- Andersen, H.W., C. Solem, K. Hammer, and P.R. Jensen. 2001. A two-fold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in a strong decrease of growth rate and glycolytic flux. *Journal of Bacteriol.*, in press.
- Benthin, S. (1992) Ph.D. Thesis, IBT, DTU
- Bibal, B., Goma, G., Vayssier, Y. and Pareilleux, A. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 340-344
- Bibal, B., Kapp, C., Goma, G. and Pareilleux, A. (1989) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 155-159
- Cornish-Bowden, A., Hofmeyr, J.-H.S. and Cardenas, M.L. (1995) *Bioorganic Chemistry* 23,439-449
- Fraenkel, D. G. 1968. *J. Biol. Chem.* 243:6451-6457.
- Cancilla, M.R., A.J. Hillier, and B.E. Davidson. 1995. *Lactococcus lactis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, *gap*: further evidence for strongly biased codon usage in glycolytic pathway genes. *Microbiology* 141:1027-1036.
- Garrigues, C., P. Loubiere, N.D. Lindley, and M. Cocaign-Bousquet. 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J. Bacteriol.* 179:5282-5287.
- Jensen, N.B.S.J. 2000. Ph.D. Thesis, IBT, DTU
- Jensen, N.B.S., Jokumsen, K.V. and Villadsen, J. (1999) *Biotech. Bioeng.* 63, 356-362.
- Jensen, N.B.S., Melchiorsen, C.R., Jokumsen, K.V. and Villadsen, J. *In press* 2001
- Jensen, P.R. and Hammer, K. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4363-4366
- Jensen, P.R. (1996). A method of converting ATP into ADP in a living cell. Patent Application, No. 0963/96. IPN, WO 98/10089.
- Koebmann, B.J., Nilsson, D., Snoep, J.L., Westerhoff, H.V., and Jensen, P.R. (1998) In *Biothermokinetics In The Post Genomic Era*, Larsson *et al.*, (Eds.), 205-210
- Koebmann, B.J., Pedersen, M.B., Nilsson, D. and Jensen, P.R. (2000). In *Animating the Cellular Map*, Hofmeyr *et al.*, (Eds.), 299-306.
- Melchiorsen, C.R. 2000. Ph.D. Thesis, IBT, DTU
- Melchiorsen, C.R., Jensen, N.B.S., Christensen, B., Jokumsen, K.V., and J. Villadsen. *In press* 2001
- Neves, A.R., Ramos, A., Nunes, M.C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., de Vos, W.M., Almeida, J. and Santos, H. (1999) *Biotech. Bioeng.* 64, 200-212
- Schaaff, I., Heinisch, J. and Zimmermann, F.K. (1989) *Yeast* 5, 285-290
- Smits, H.P., Hauf, J., Müller, S., Hobley, T.J., Zimmermann, F.K., Hahn-Hägerdal, B., Nielsen, J. and Olsson, L. (2000) *Yeast* 16, 1325-1334
- Serre, M.-C., W. Teschner, and J.-R. Garel. 1990. Specific suppression of heterotrophic interactions in phosphofructokinase by the mutation of leucine 178 into tryptophan. *J. Biol. Chem.* 265:12146-12148.
- Vartanian, J.P., M. Henry, and S. Wain-Hobson. 1996. Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Res.* 24:2627-2631.
- IL1403 database adresse: <http://spock.jouy.inra.fr/>

Publikationer og præsentationer

Publikationer i tidsskrifter med referee:

Delprojekt A: Matematisk modellering af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- Jensen, N.B.S., Jokumsen, K.V. and Villadsen, J. (1999) Determination of the intracellular phosphorylated sugars of the EMP pathway in *Lactococcus lactis* using a fast sampling technique and solid phase extraction. *Biotechnology and Bioengineering* 63, 356-362.

Delprojekt B: Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- Andersen, H.W., C. Solem, K. Hammer, and P.R. Jensen. 2001. A two-fold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in a strong decrease of growth rate and glycolytic flux. *J Bacteriol. In Press.*

Publikationer i tidsskrifter uden referee:

- Peter Ruhdal Jensen. 1998. Hvordan styrer Mælkesyrebakterier deres syrningsaktivitet? *Mælkeritidende*, September 1998.

Manuskripter indsendt til publikation:

Delprojekt B: Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- Andersen, H.W., C. Solem, K. Hammer, and P.R. Jensen. 2001. A two-fold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in a strong decrease of growth rate and glycolytic flux. *Journal of Bacteriol., in press.*

Manuskripter under udarbejdelse:

Delprojekt B: Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- Andersen, H.W., M.B. Pedersen, K. Hammer, and P.R. Jensen. 2001. Lactate dehydrogenase has no control on lactate production but a strong negative control on formate production in *Lactococcus lactis*. Under udarbejdelse til *Eur. J. Biochemistry*.
- Andersen, H.W., C. Solem, K. Hammer, and P.R. Jensen. 2001. Transcriptional regulation of the *las* operon encoding the glycolytic enzymes phosphofructokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase in *Lactococcus lactis* during the transit to stationary growth phase. Under udarbejdelse.

Delprojekt C: Isolering og karakterisering af mutanter med ændret glykolytisk flux

- Willemoës, M., M. Kilstrup, P. Roepstorff, and K. Hammer. 2001. The *gap* gene product is dispensable for growth of *Lactococcus lactis*. Proteomic evidence for two glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenases in *Lactococcus lactis*. Under revision for *Microbiology*.

Andre forskningsrelevante publikationer:

Delprojekt B: Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- Andersen, H.W. (1999). Glycolysis in *Lactococcus lactis* with the Emphasis on the Role of Phosphofruktokinase, Pyruvate Kinase, and Lactate Dehydrogenase in Regulation and Control. Litteraturstudie på Ph.D. kurset: Molecular biology of lactic acid bacteria. Den Kgl. Veterinære-og Landbohøjskole, Frederiksberg, Danmark.
- Andersen, H.W. (2000). Regulation and Control of the Glycolytic Enzymes Phosphofruktokinase and Lactate Dehydrogenase in *Lactococcus lactis*. Ph.D. afhandling. Institut for Mikrobiologi, Danmarks Tekniske Universitet.

Konference proceedings med referee:

Delprojekt B: Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- Andersen, H.W., Schürmann, R., Madsen, K., Pedersen, M.B., Købmann, B.J., Piskur, J., Hammer, K. and Jensen, P.R. (1998). Synthetic Promoters for Experimental Control Analysis. In BioThermoKinetics: In the Post Genomic Era (Larsson, C., Pålman, I., Gustafsson, L. eds.), Sweden, pp. 11-17.
- Pedersen, M.B., Andersen, H.W. and Jensen, P.J. (1998). Modeling of Free-Energy Metabolism in *Lactococcus lactis*. In BioThermoKinetics: In the Post Genomic Era (Larsson, C., Pålman, I., Gustafsson, L. eds.), Sweden, pp. 215-220.
- Andersen, H.W., Pedersen, M.B., Hammer, K. and Jensen, P.R. (1998). Experimental strategies to analyze the Control in *Lactococcus lactis*. In BioThermoKinetics: In the Post Genomic Era (Larsson, C., Pålman, I., Gustafsson, L. eds.), Sweden, pp. 261-267.
- Andersen, H.W., Hammer, K. and Jensen, P.R. (2000). The Importance of Balanced Expression of Glycolytic Genes in *Lactococcus lactis*. In BioThermoKinetics: Animating the cellular Map (Hofmeyr, J., Rohwer, J., and Snoep, J., eds.), South Africa, pp. 263-270.

Posters præsenteret ved kongresser og konferencer:

Delprojekt B: Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- 5. Symposium vedr. lactic acid bacteria: genetics, metabolism, and applications. Veldhoven, Holland, 23-27 september 1996.
Poster præsentation: "Metabolic Control Analysis of Glycolysis in *Lactococcus lactis*".
- Symposium vedr. Mejeriprodukter arrangeret af Mejeriforeningens Forsknings Fond.
Århus Universitet, Danmark, 7 november 1997.
Poster præsentation: "Metabolisk Kontrol Analyse af glykolysen hos *Lactococcus lactis*".
- 8. Konference vedr. BioThermoKinetics.
Fiskebäckskil, Sverige, 2-5 juli 1998.
Poster præsentation: "Strategies to Analyze the Control of Glycolysis in *Lactococcus lactis*".
- 9. Konference vedr. BioThermoKinetics.
Stellenbosch, Sydafrika, 3-7 april 2000.

Oral and poster præsentation: "The importance of balanced expression of glycolytic genes in *Lactococcus lactis*".

- Kongresser vedr. fødevarevidenskab.
Proces- and bioteknologi, Kvalitetskontrol, Fysiske, Kemiske og Ernæringsmæssige egenskaber. Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby, Danmark, 24-25 januar 1996.
Proces- and bioteknologi, Kvalitetskontrol, Fysiske, Kemiske og Ernæringsmæssige egenskaber. Den Kgl. Veterinære-og Landbohøjskole, Frederiksberg, Danmark, 30-31 januar 1997.
Levnedsmiddelfysik, struktur-funktion, Muscle Food, Appetit og sensorik, Molekylær mikrobiologi og fermentering. Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby, Danmark, 29-30 januar 1998.
Levnedsmiddelfysik, struktur-funktion, Muscle Food, Appetit og sensorik, Molekylær mikrobiologi og fermentering. Den Kgl. Veterinære-og Landbohøjskole, Frederiksberg, Danmark, 28-29 januar 1999.
Poster præsentationer ved alle kongresser vedr. fødevarevidenskab: "Metabolisk Kontrol Analyse af glykolysen hos *Lactococcus lactis*".

Delprojekt C: Isolering og karakterisering af mutanter med ændret glykolytisk flux

- 6. Symposium vedr. lactic acid bacteria: genetics, metabolism, and applications. Veldhoven, Holland, 19.-23. september 1999.
Poster præsentation: "Isolation and Characterisation of Mutations in the *ldh* Gene Encoding Lactate Dehydrogenase in *Lactococcus lactis*".
- Levnedsmiddelkongres 2000. 26.-27. januar 2000, Danmarks Tekniske Universitet.
Poster præsentation: "Isolation and Characterisation of Mutations in the *ldh* Gene Encoding Lactate Dehydrogenase in *Lactococcus lactis*".

Point-, midtvejs-og specialeopgaver udført under samarbejdsprojektet:

Delprojekt B: Metabolisk kontrol-analyse af glykolysen i *Lactococcus lactis*

- Tornøe, J. and Jacobsen, N. (1996). Kloning og karakterisering af promoteren for *las* operonen kodende for de tre enzymer phosphofruktokinase, pyruvate kinase og lactate dehydrogenase i den glykolytiske pathway hos *Lactococcus lactis*. Midtvejs-projekt. Institut for Mikrobiologi, DTU, Danmark.
- Pedersen, M.B. (1996+1997): Metabolic control analysis on glycolysis in *Lactococcus lactis*. Midtvejs og speciale projekt. Institut for Mikrobiologi, DTU, Danmark.

Delprojekt C: Isolering og karakterisering af mutanter med ændret glykolytisk flux

- Jacobsen N. (1997 og 1998) Metabolic control analysis on glycolysis in *Lactococcus lactis*: Cloning and characterisation of the *gap* gene and its promoter and studies on the enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Speciale hhv. 18 og 33 point. Institut for Mikrobiologi, DTU, Danmark. (I samarbejde med delprojekt B.)

