

Afslutningsrapport

Mælk – syrningseffektivitet af den primære starter

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2007-90

April 2007

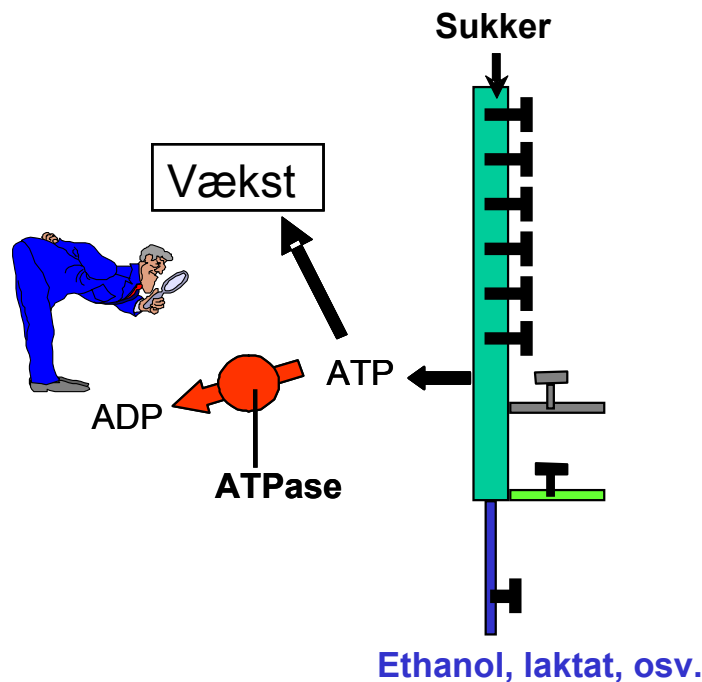


mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond for FØTEK-samarbejdsprojektet:

Mælk, syrningseffektivitet af den primære starter 2003-2006



Projektleder: Professor Peter Ruhdal Jensen
Center for Mikrobiel Bioteknologi
BioCentrum-DTU
Bygning 301
2800 Kgs. Lyngby
Tlf: +45 4525 2510
Fax: +45 4593 2809
E-mail: prj@biocentrum.dtu.dk

INDHOLD

Forord	3
1. Medarbejdere	4
2. Resumé af det samlede projekt	5
3. Engelsk sammendrag/English Summary	6
4. Introduktion	6
4.1. Baggrund	7
4.2. Problemstillingen	7
4.3. Modellsystemet	8
4.4. Glykolysen	8
4.5. Energimetabolismen i <i>L. lactis</i>	10
4.6. Introduktion af ukoblet ATPase-aktivitet i <i>L. lactis</i>	11
4.7. Metoder og værktøjer til det genteknologiske arbejde	12
4.7.1. Metode til indsættelse af en ekstra kopi af et gen i <i>L. lactis</i> ved site-specifik rekombination	12
4.7.2. Udskiftning af den oprindelige promotor foran genet med en syntetisk promotor ved homolog rekombination	15
4.8. Metabolisk kontrolanalyse	16
5. Resultater og diskussion	17
5.1. Systematisk undersøgelse af individuelle glykolytiske enzymer betydning for syrningsen.	17
5.2. Konstruktion og undersøgelse af stamme med forhøjet niveau af alle væsentlige glykolytiske enzymer	29
5.3. Fremstilling af spontane mutanter med forhøjet glykolytisk aktivitet.	33
5.4. Undersøgelse af det cellulære make-up i rekombinante mutanter.	34
5.5. Sammenligning af det cellulære make-up for spontane og rekombinante mutanter. ...	35
6. Samlet konklusion	35
7. Referencer (hele rapporten)	37
8. Publikationer og præsentationer	39
9. Forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og evt. forskerophold ved andre institutioner	42
10. Samarbejdsrelationer nationalt og internationalt	42
11. Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribrugget	43
12. Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter	43

Forord

I denne afslutningsrapport præsenteres et samarbejdsprojekt mellem Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU og Mejeribrugets ForskningsFond, med Professor Peter Ruhdal Jensen fra Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU som projektleder. Projektet har strukket sig fra primo 2003 til ultimo 2006. Medarbejderne på projektet ønsker at takke Mejeribrugets ForskningsFond og Den Danske Forsknings- og Innovationsstyrelse for økonomisk støtte til projektet. Vi vil også takke Styregruppen og Mejeriforeningen for opbakning og diskussioner, der har været under projektførelsen.

1. Medarbejdere

Professor Peter Ruhdal Jensen, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU, Bygning 301, 2800 Kgs. Lyngby. Tlf: +45 4525 2510, Fax: +45 4593 2809, E-mail: prj@biocentrum.dtu.dk (Projektleder)

Lektor Brian Købmann, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU, Bygning 301, 2800 Kgs. Lyngby. Tlf: +45 4525 2493, Fax: +45 4593 2809, E-mail: brk@biocentrum.dtu.dk

Adjunkt Christian Solem, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU, Bygning 301, 2800 Kgs. Lyngby. Tlf: +45 4525 2503, Fax: +45 4593 2809, E-mail: cs@biocentrum.dtu.dk

Forskningsassistent Søren Helmark, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU, Bygning 301, 2800 Kgs. Lyngby. E-mail: she@biocentrum.dtu.dk (Periode: 01.09.2003-29.02.2004)

Adjunkt Dina Petranovic, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU, Bygning 301, 2800 Kgs. Lyngby. E-mail: dp@biocentrum.dtu.dk (Periode: 01.01.2005-31.12.2005)

Involverede studerende på BioCentrum-DTU:

Civilingeniørstuderende Dan Stenvall (Kemisk og Bioteknologisk Fagpakkeprojekt: 2003).

Civilingeniørstuderende Nikolaj Vynne (Kemisk og Bioteknologisk Fagpakkeprojekt: 2003).

Civilingeniørstuderende Tejs Kyhl (Kemisk og Bioteknologisk Fagpakkeprojekt: 2003).

Diplomingeniørstuderende Martin Richardt (Eksamensprojekt: februar 2004-juli 2004)

Civilingeniørstuderende Eva Bækdahl (Eksamensprojekt: august 2004-februar 2005)

Civilingeniørstuderende Louise Birch Hansen (Eksamensprojekt: februar 2003-januar 2004)

International masterstuderende Gudmund Hardarson (Eksamensprojekt: januar 2004-oktober 2004)

Civilingeniørstuderende Niels Bertram Larsen (Eksamensprojekt: juli 2005-maj 2006)

International masterstuderende Fen Yang (Eksamensprojekt: februar 2006-september 2006)

Laborantstuderende Linda Alstrup (Eksamensprojekt: maj 2005-juli 2005)

Kandidatstuderende Christa Kaltoft (Eksamensprojekt: september 2006-januar 2007)

2. Resumé af det samlede projekt

Projektet har været inddelt i en række punkter, der tilsammen har sigtet mod at give et godt overblik og forståelse af syrnings effektiviteten af den primære starter *Lactococcus lactis*. Et centralt element i projektet har været en systematisk undersøgelse af alle de glykolytiske enzymer kontrol over syrningsaktivitet og produkt dannelse. Der er således blevet konstrueret stammebiblioteker for samtlige glykolytiske enzymer med modulerede ændringer af enzymaktiviteterne af de enkelte enzymer. Efterfølgende fysiologiske og kvantitative studier viste, at ingen af de individuelle enzymer havde kontrol over omsætnings hastigheden af glukose (og dermed syrningsaktiviteten), hvilket betyder, at det ikke er muligt at øge syrningsaktiviteten ved at modulere aktiviteten af de pågældende individuelle enzymer.

Derimod viste flere af de glykolytiske enzymer sig at have høj kontrol over produkt dannelsen, dvs. *fordelingen* mellem format, acetat, ethanol og laktat. Transporten af laktose ind og laktat ud af cellen er blevet studeret ved at introducere heterologe gener fra andre mælkesyre bakterier. De systematiske studier af de individuelle trin indikerer, at fluxen måske er kontrolleret over mange glykolytiske trin, således at det vil være nødvendigt at øge hele glykolysen (inkl. transport af sukker og mælkesyre) i kombination med en ukoblet ATPase-aktivitet for at få forøget hovedfluxen. Der er derfor blevet konstrueret en række stammer med gradvist forøgede aktiviteter af de forskellige glykolytiske enzymer. Den endelige stamme med 10 enzymer opreguleret blev fremstillet sidst i projektet, og vi nåede derfor desværre ikke at karakterisere denne stamme i tilstrækkelig grad til at udtale os om, hvorvidt strategien med overproduktion af hele glykolysen har virket eller ej.

En anden indgangsvinkel til at skaffe stammer med øget syrningsaktivitet er at selektere og screene for spontane mutanter, der har fået en øget syrningsaktivitet. Det lykkedes at selektere et stort antal af stammer, der voksede hurtigere end udgangs stammen med ATPase-aktivitet, men en efterfølgende screening af disse stammer viste, at den øgede vækst var et resultat af mindre ATPase-aktivitet og ikke øget syrningsaktivitet. Udvalgte stammer med øgede aktiviteter af en række glykolytiske enzymer og ukoblet ATPase-aktivitet blev desuden undersøgt ved proteomanalyse og transkriptomanalyse men analysen af disse data nåede ikke at blive fuldført i projektperioden.

Samlet konklusion. Dette projekt har foretaget et detaljeret kvantitativt studie af glykolysen i *L. lactis*, som har givet os en værdifuld indsigt i kontrol og regulering af disse processer, hvor der blev fundet enzymer med stor betydning for dannelsen af myre-, eddike- og mælkesyre. Der er desuden i projektets løbetid blevet konstrueret >1000 mutanter, som i sig selv udgør en guldmine for fremtidige studier af de metaboliske processer i mælkesyrebakterier. På baggrund af projektets resultater kan vi konkludere, at kontrollen over hovedfluxen i glykolysen sandsynligvis er fordelt over hele glykolysen, i kombination med de ATP-forbrugende processer. Projektets resultater vil i fremtiden kunne medvirke til at optimere mælkesyrebakteriers produkt dannelse samt bidrage til udviklingen af *in silico* modeller til at

identificere og forudsige, hvilke enzymaktiviteter der skal moduleres og i givet fald hvor meget for at opnå de ønskede produkttegenskaber.

3. Engelsk sammendrag/English Summary

The overall goal of the project was to characterize the control and regulation of glycolysis and product fluxes in *Lactococcus lactis*. An important element has been the construction of strains with modulated activities of glycolytic enzymes and subsequent characterization of the importance of these enzymes. No single enzyme was found to be rate limiting for the main flux through glycolysis but several enzymes played a key role in the distribution of product fluxes to formate, ethanol, lactate and acetate. The project also studied the role of sugar transport and lactate export by introducing heterologous transport proteins. The systematic studies indicate that the control of the main glycolytic flux may be distributed over many, perhaps even all the glycolytic enzymes, and a strain was therefore constructed, where each of the glycolytic enzymes were increased two fold. Unfortunately, time did not allow the final characterization of this strain with proper ATPase activities and we cannot yet say whether the strategy has worked or not. Another strategy was to select spontaneous fast growing/fast acidifying mutants in a high throughput screening setup but when analyzed further in real fermentation experiments, the isolated mutants did not have the desired phenotype. Some of the constructed strains with increased glycolytic enzymes were further characterized by proteome and transcriptome analysis, but the analysis of these data could not be completed in the project period.

Conclusion: The project included a detailed study of glycolysis in *Lactococcus*, which has given us valuable insight into the control and regulation of these processes, and a number of key factors for production of mixed acids were identified. The project has produced more than 1000 mutants, which constitute a gold mine for future studies of metabolic processes in lactic acid bacteria. On the basis of the results in the project it looks like the control of the main glycolytic flux is distributed over the glycolysis and the ATP consuming reactions. The results of the project will help future optimization of the product formation of lactic acid bacteria and contribute to the development of *in silico* models for identification and prediction of which enzyme activities should be altered to obtain a desired change in product properties.

4. Introduktion

Som introduktion til denne rapport gives et overblik over baggrunden for projektet, problemstillingerne, begrundelse for valg af modelstammen samt informationer omhandlende glykolysen og energimetabolismen i *Lactococcus lactis*. De generelle teknologier, konstruktionsarbejder og metabolisk kontrolanalyse, der er blevet benyttet igennem forskellige dele af

projektet, er ligeledes beskrevet i denne introduktion og vil efterfølgende blive henvist til efter behov.

4.1. Baggrund

Mælkesyrebakterien *L. lactis* bliver i stor udstrækning benyttet som primær starterkultur i fermenterede mejeriprodukter, hvor dens primære funktion er omdannelse af mælkesukker til mælkesyre. Syrningsaktiviteten af den primære starterkultur er således af grundlæggende betydning for mejeriernes produktion af ost og andre syrnede mejeriprodukter, både hvad angår fødevarer sikkerhed og udvikling af rationelle produktionsprocesser. Men på trods af den vigtige funktion var der ved projektets start kun ringe viden om, hvad der bestemmer syrningsaktiviteten af den primære starter, og hvad der bestemmer, i hvilket omfang der dannes andre, ønskede eller uønskede, smags- og aromastoffer. Hvilke af de mange enzymer inde i en levende mælkesyrebakterie bestemmer, hvor meget der kommer ud af hvert af de mulige biprodukter fra nedbrydningen af mælkesukker? Denne type viden kan få stor betydning for at sikre kvalitet og konkurrenceevne af danske mejeriprodukter og for at ruste mejeriindustrien til at imødekomme fremtidige forbrugerønsker. Det var således ønsket at opnå en kvantitativ forståelse af, hvad der kontrollerer syrningsaktiviteten i *Lactococcus lactis*. Sådanne kvantitative informationer om enzymernes kontrol vil bidrage til forståelsen af, hvilke genetiske modificeringer af starterkulturer der er nødvendige for at give en bedre (højere eller lavere) syrningshastighed eller ændrede fermenteringsprodukter. Den grundlæggende viden opnået omkring kontrol og regulering af mælkesyrebakteriers metabolisme forventes at kunne bidrage til en mere målrettet stammeforædling både via traditionelle forædlingsmetoder, men også på længere sigt ved hjælp af genteknologi.

4.2. Problemstillingen

For at foretage de kvantitative studier er det nødvendigt at have en optimal modulering af de enzymer, der ønskes undersøgt, hvilket kan gøres ved at *modulere* eller *tune* ekspressionen af generne, der koder for de respektive enzymer. I praksis kan dette gøres ved at introducere syntetiske promotorer med passende styrker foran generne. Til dette formål har vi benyttet den såkaldte Syntetiske Promotor Bibliotek-teknologi, der tidligere er blevet udviklet i gruppen, hvorved det har været muligt at modulere ekspressionen af generne i små trin. Det har efterfølgende været muligt at selekttere passende stammer til fysiologiske studier og kvantificere kontrollen over syrningsaktivitet og produkt dannelse ved brug af det biomatematiske værktøj, Metabolisk kontrolanalyse.

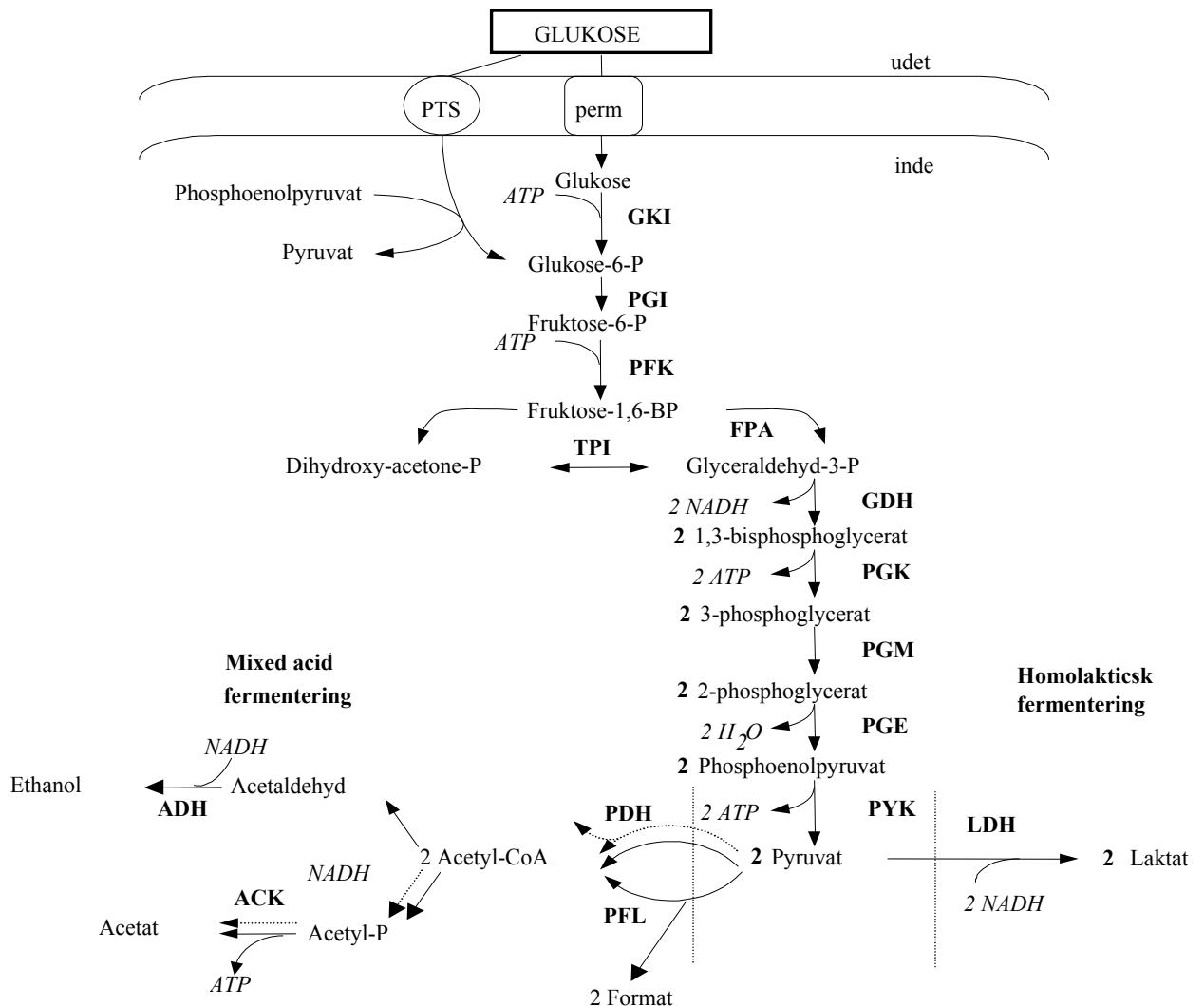
4.3. Modelsystemet

I dette projekt har vi fokuseret på at undersøge, hvorledes syrningseffektiviteten af mælkesyrebakterien *L. lactis* er kontrolleret. Der blev fra projektets start valgt at arbejde primært med laboriestammen *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 som modelstamme, idet sekvensen for hele genomet ved projektets starttidspunkt var blevet publiceret. Dette har gjort det genetiske konstruktionsarbejde langt lettere, end det ville have været tilfældet, hvis de genetiske informationer ikke havde været tilgængelige. Valget af *L. lactis* som modelorganisme er dels baseret på den relativt velbeskrevne fysiologi og metabolisme og dels på grund af organismens udbredte anvendelse i mejeriindustrien. Da organismen har en relativt simpel energimetabolisme, ville det samtidig være relativt lettere at drage konklusioner på basis af de udførte forsøg. Disse informationer forventes også at bidrage til en generel forståelse af mælkesyrebakteriers fysiologi og metabolisme.

4.4. Glykolysen

Glykolysen er den generelle metaboliske vej i *L. lactis* til generering af biokemisk energiform af ATP til cellen. Funktionen af glykolysen er at metabolisere sukre som f.eks. glukose og laktose, hvorved der dannes ATP ved substratniveau phosphorylering. Da *L. lactis* under almindelige betingelser ikke er i stand til at respirere, dannes fermentative produkter. Ved vækst på letomsættelige sukre som glukose og laktose dannes primært mælkesyre, mens en reduceret sukkermetabolisme typisk ligeledes resulterer i dannelse af myresyre, eddikesyre og ethanol. De forskellige trin i glykolysen er illustreret i figur 1.

Glykolysen



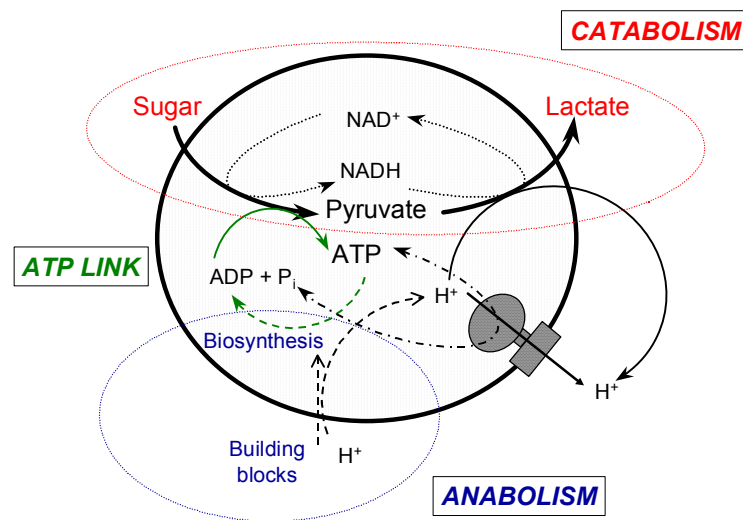
Figur 1: Metabolisk rute involveret i homolaktisk og mixed acid-fermentering i *L. lactis* ved vækst på glukose.

Glukose er omdannet til laktat (mælkesyre) ved homolaktisk fermentering under dannelse af 2 ATP, eller til format (myresyre), ethanol, og acetat (eddikesyre) ved mixed acid fermentering under dannelse af 3 ATP. De enzymatiske reaktioner indikeret med stiplede pile finder sted under aerobe betingelser. Forkortelser: PTS: phosphotrasferase system; perm: permease system; GKI: glukokinase; PGI: phosphoglucose isomerase; PFK: phosphofruktokinase; FPA: fruktose-1,6-bisphosphat aldolase; TPI: triose phosphat isomerase; GDH: glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase; PGK: phosphoglycerat kinase; PGM: phosphoglycerat mutase; PGE: phosphoglycerate enolase; PK: pyruvat kinase; LDH: laktat dehydrogenase; PDH: pyruvat dehydrogenase; PFL: pyruvat format lyase; ADH: alkohol dehydrogenase; ACK: acetat kinase.

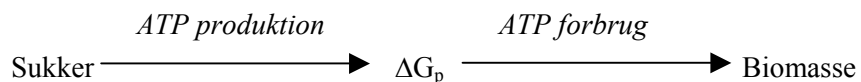
4.5. Energimetabolismen i *L. lactis*

Energimetabolismen i *L. lactis* er relativ simpel. Bakterien behøver et stort antal forskellige byggesten, aminosyrer, vitaminer m.m., for at kunne vokse. Derfor er mængden af sukker inkorporeret i biomasse relativ lille. Det er vist ved radioaktive mærkningsforsøg, at kun 5 % af glukose metaboliseret omdannes til biomasse (Novak & Loubiere, 2000). *L. lactis* er under normale betingelser ikke i stand til at respirere, hvorfor NADH/NAD⁺ balancen vedligeholdes ved at omdanne pyruvat til primært mælkesyre (Fig. 2a). Under normale vækstbetingelser på letomsætteligt glukose og laktose (i mælk) omdannes mere end 90 % af den optagne laktose til mælkesyre. Da mikroorganismen ikke har nogen oxidativ phosphorylering og stort set kun danner ATP via glykolyzen via substratniveauphosphorylering, resulterer dette i et lavt biomasse udbytte per kulstof. Den simple metabolisme i *L. lactis* gør det muligt at opdele energimetabolismen i *L. lactis* ind i et katabolisk modul, der er ATP-producerende (glykolyzen) og et anabolisk modul, der er energiforbrugende (vækst). Bindeleddet mellem de kataboliske og anaboliske reaktioner er således [ATP]/[ADP]-ratioen og protongradienten (Fig. 2b).

(a)



(b)

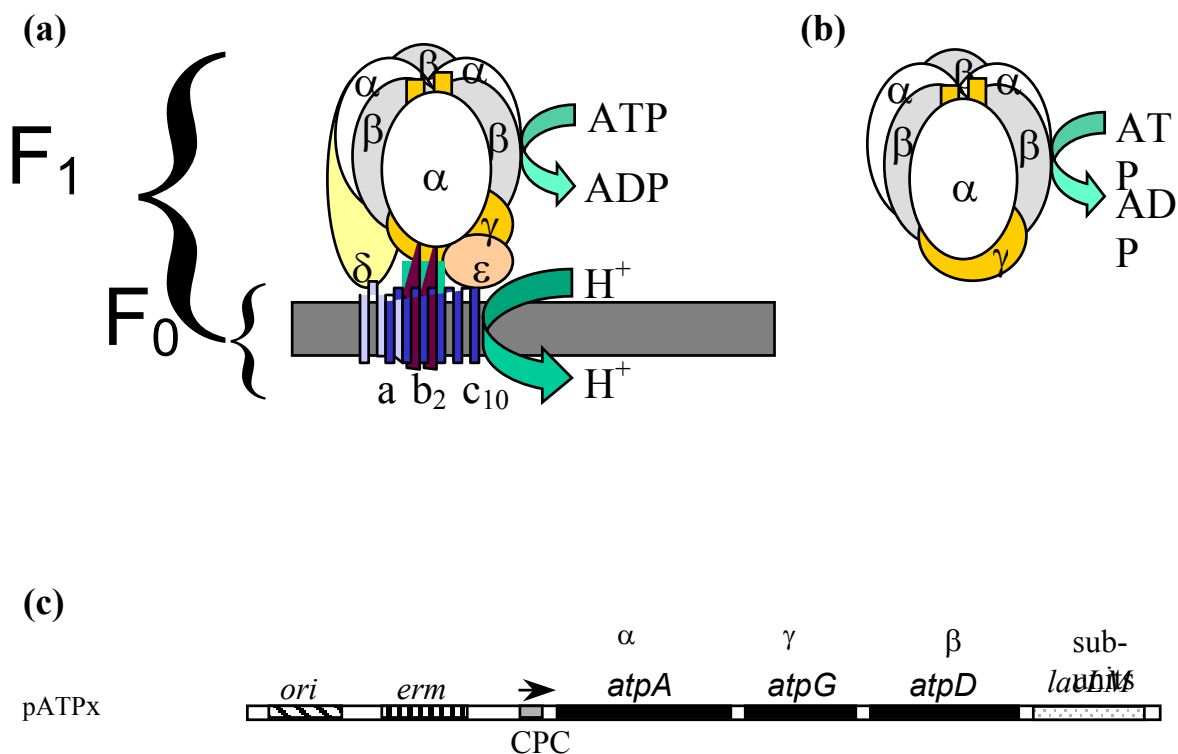


Figur 2: Energimetabolismen i fermenterende bakterier

(a) Et simplificeret overblik af energimetabolismen i *L. lactis*, hvor syntese og hydrolyse af ATP binder katabolisme og anabolisme sammen. Den primære energi bliver fremstillet i de kataboliske processer fra omdannelsen af sukker til pyruvat. Den sekundære energi vindes ved udskillelse af ladede komponenter, her symboliseret ved H⁺. (b) Simplificeret model af energimetabolismen i *L. lactis*, inddelt i et ATP-producerende modul (glykolyzen) og et ATP-forbrugende modul (anabolisme, transport, maintenance) med fri energi, ΔG_p , som den intermediære.

4.6. Introduktion af ukoblet ATPase-aktivitet i *L. lactis*

I projektet bliver benyttet en tidligere udviklet teknologi til introduktion af ukoblet ATPase-aktivitet i prokaryoter. Teknologien er baseret på det universelle H^+ -ATPase kompleks, der er involveret i omdannelsen mellem protongradienten og fri energi i form af ATP. H^+ -ATPase består af 8 enheder inddelt i et membranbundet domæne (F_0) og et cytoplasmisk domæne (F_1), som besidder det katalytiske site for ATP-hydrolyse. Ved at overudtrykke dele af F_1 -domænet (generne *atpAGD*) er det muligt at introducere en ukoblet ATPase-aktivitet i cellen (Figur 3). Introduktionen af denne ukoblede ATPase har i *Escherichia coli* vist sig at øge den glykolytiske flux betragteligt, hvilket viste at de ATP-forbrugende processer i *E. coli* havde kontrol over den glykolytiske flux (Koebmann et al., 2002a). Når den ukoblede ATPase blev udtrykt i *L. lactis*, har det derimod vist sig, at dette ikke havde betydning for den glykolytiske flux, og dermed syrningshastigheden (Koebmann et al., 2002b), hvilket indikerede, at de ATP-producerende processer (glykolysen) eller en kombination mellem de ATP-producerende og ATP-forbrugende processer kunne have kontrol.



Figur 3: Koncept for introduktion af ukoblet ATPase aktivitet *in vivo*.

(a) Det funktionelle (F_1F_0) H^+ -ATPase kompleks består af et membranbundet domæne, F_0 , og et cytoplasmisk domæne, F_1 . Pilene indikerer omdannelsen mellem protongradienten over membranen og det frie energipotential i form af ATP. (b) Ukoblet del af F_1 -domænet der indeholder det katalytiske site for ATP hydrolyse. (c) Lineær illustration af ATPase-plasmid konstrueret til modulering af cellens $[ATP]/[ADP]$ ratio i *L. lactis* (ikke tegnet til skala). x repræsenterer det individuelle nummer af ATPase-plasmidet.

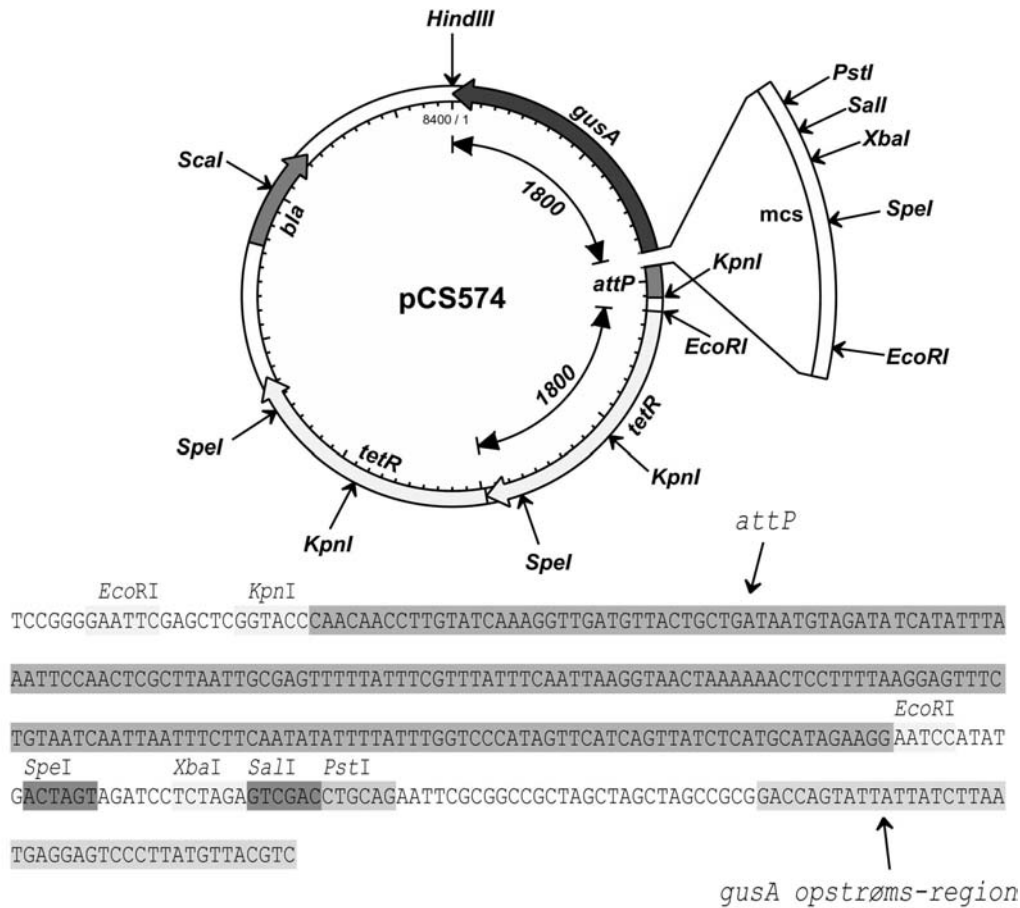
4.7. Metoder og værktøjer til det genteknologiske arbejde

Et centralt element i moduleringen af de glykolytiske gener har været benyttelsen af den såkaldte Syntetisk Promotor Bibliotek-teknologi (SPL), der tidligere er blevet udviklet i gruppen (Jensen & Hammer, 1998; Solem & Jensen, 2002). SPL-teknologien er baseret på det faktum, at styrker af prokaryotiske promotorer ikke kun afhænger af konsensus-boksene (-10 og -35), men også af sekvenserne af regionerne umiddelbart før, imellem og efter konsensusboksene (Jensen & Hammer, 1998). Det er derfor muligt at modulere den transkriptionelle styrke ved at randomisere disse regioner og efterfølgende vælge promotorer med passende styrker. *In vivo* aktiviteter af disse promotorer varierer over flere logaritmer af relative aktiviteter og er derfor yderst velegnede til metabolisk optimering og til metabolisk kontrolanalyse. Ved at inkorporere randomiserede promotorsekvenser foran det respektive gen, der ønskes moduleret, er det således muligt at modulere ekspressionen af dette i små trin.

I projektet er denne teknologi generelt blevet benyttet ved hjælp af tidligere beskrevne metoder (Solem & Jensen, 2002). Til den umiddelbare modulering af genekspressionen er blevet benyttet to strategier: 1) Metode til indsættelse af en ekstra kopi af et gen i *L. lactis* ved site-specifik rekombination, og 2) Udskiftning af den oprindelige promotor foran genet med en syntetisk promotor ved homolog rekombination. Fælles for de to strategier er, at den randomiserede promotorregion er inkorporeret i en primer benyttet til opformering af genet i enten en hel version af genet (til indsættelse af ekstra kopi) eller en trunckeret version af genet (til udskiftning af oprindelig promoter).

4.7.1. Metode til indsættelse af en ekstra kopi af et gen i *L. lactis* ved site-specifik rekombination

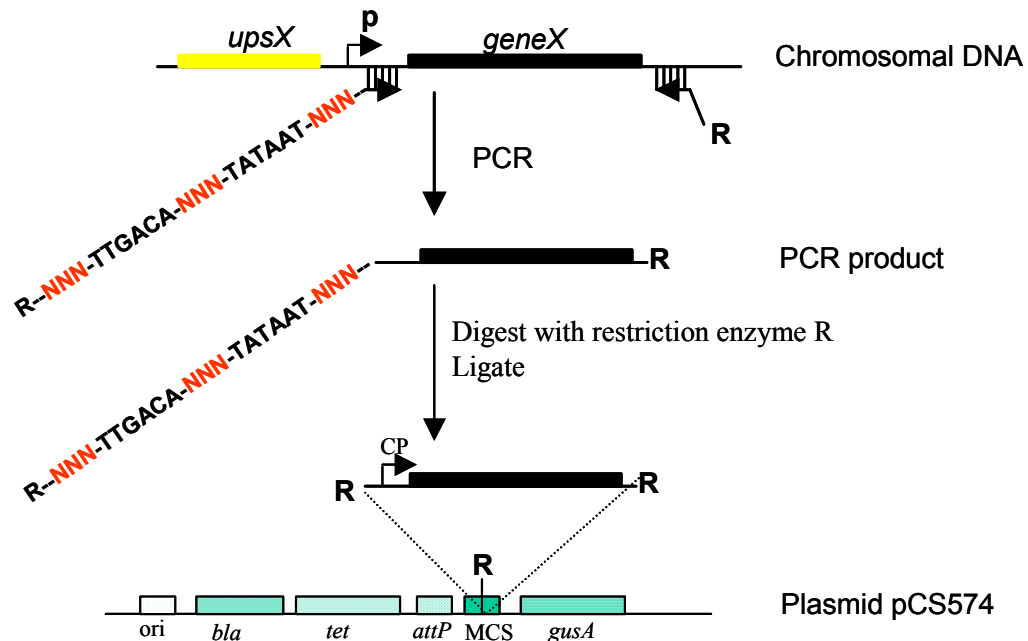
Metoden til indsættelse af en ekstra kopi af et gen i *L. lactis* blev oftest baseret på plasmidvektoren pCS574, der kan replikere i *E. coli*, men ikke i *L. lactis* (Solem et al., 2003). Plasmidet er bl.a. i besiddelse af tetracyclinresistensgener og et fag-attachement site, som ved tilstedeværelse af en integrase kan integrere site-specifik på det bakterielle fag attachment site i *L. lactis* (Brøndsted & Hammer, 1999). Derudover er placeret rapportergenet, *gusA*, der koder for β -glucuronidase umiddelbart efter multiple kloning site, hvilket tillader indirekte bestemmelse af promotorstyrker ved bestemmelse af β -glucuronidase aktivitet.



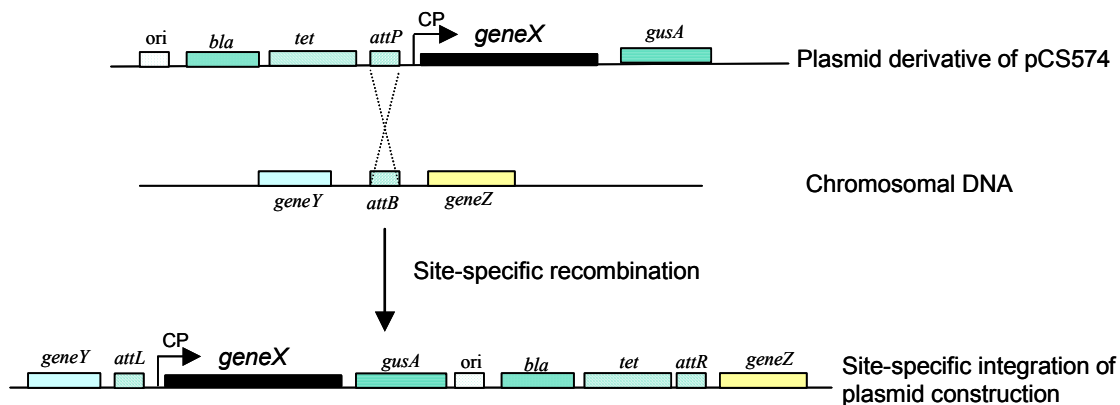
Figur 4. Plasmid pCS574 for site-specifik integration i *L. lactis*.

Plasmidet indeholder et origin for replikation i *E. coli* (ikke vist), et ampicillin resistensgen (*bla*), to tetracyclin resistensgener (*tetR*), rapportergenet for β-glucuronidase (*gusA*), et fag-attachment site som tillader site-specifik integration i *L. lactis* (*attP*), og et multiple cloning site (MCS). Sekvensen af MCS er vist under plasmidet.

I praksis opformeres en hel version af det ønskede gen med PCR ved inkorporering af randomiserede promotorer, som herefter indsættes i pCS574 (Figur 4 og 5). Plasmidbiblioteket amplificeres efterfølgende i *E. coli*, hvorefter det introduceres i *L. lactis*, der i forvejen indeholder en integrase, således at der kan forekomme site-specifik rekombination mellem det fag-specifikke og bakterielle attachmentsite (Figur 6). En selektion med tetracyclin vil hermed give et stammebibliotek med modulerede aktiviteter af det respektive gen over vildtype-niveau.



Figur 5. Illustration of genamplifikation med inkorporering af randomiserede syntetiske promotorer foran et gen. *GeneX* bliver amplificeret med PCR. Primeren opstrøms for genet indeholder en randomiseret promotersekvens. Begge primere er designet med restriktionssites (*R*) i 5'-enden. PCR-produktet bliver oprenset og skåret med restriktionsenzymet *R*, hvorefter fragmentet indsættes i tilsvarende restriktionssite i pCS574. Genet er her placeret foran rapportergenet *gusA*, som tillader indirekte screening af promotoraktiviteten. Forkortelser: Ori: origin for *E. coli*, *bla*: ampicillin-resistens, *tet*: tetracyclin-resistens, *attP*: fag-kodet attachment site, MCS: multiple cloning site (*attP-NdeI*, *SpeI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI-gusA*), *gusA*: β -glucuronidase.

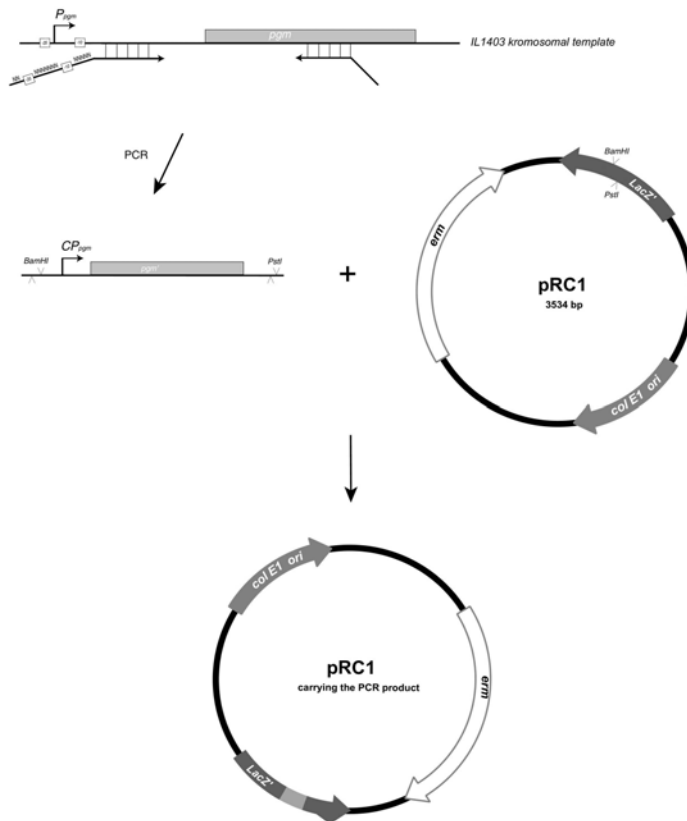


Figur 6. Site-specific rekombination i *L. lactis*.

Det fag-kodede attachment site, *attP*, rekombinerer site-specifikt på kromosomet i *L. lactis* med det bakterielle attachment site, *attB*. Til dette behøves et fag-kodet enzym, integrase, der er lokaliseret på et replikerende plasmid i den pågældende *L. lactis* stamme (ikke vist).

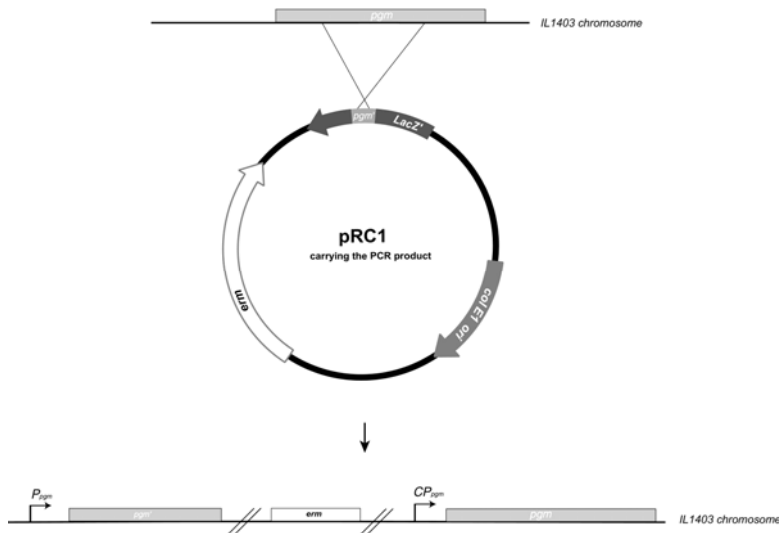
4.7.2. Udskiftning af den oprindelige promotor foran genet med en syntetisk promotor ved homolog rekombination.

En meget anvendt metode til modulering af genekspressionen var ved udskiftning af den oprindelige promotor med randomiserede promotorer. Til dette arbejde blev typisk anvendt plasmidvektoren pRC1, der er i besiddelse af erythromycin-resistensgen, men ikke kan replikere i *L. lactis*. Efter indsættelse af PCR-fragmenterne (bestående af en trunkeret version af genet efter randomiserede promotorer) i pRC1, amplificeres plasmidbiblioteket i *E. coli* og efterfølgende transformeres i *L. lactis*, og der selekteres på plader med erythromycin. Herved fremstilles stammebiblioteker med modulerede ekspressioner af det ønskede gen (Figur 7 og 8).



Figur 7. Konstruktion af plasmidbibliotek i pRC1.

En trunkeret version af det ønskede gen bliver opformeret med PCR ved samtidig inkorporering af syntetiske promotorer. PCR-fragmenterne indsættes efterfølgende i pRC1 og opformeres i *E. coli*.



Figur 8. Udskiftning af oprindelig promotor ved homolog rekombination.

Det konstruerede plasmidbibliotek introduceres i *L. lactis*. En selektion med erythromycin resulterer i stammer med udskiftet promotor, mens den oprindelige promotor er placeret foran en trunkeret version af genet.

4.8. Metabolisk kontrolanalyse

Metabolisk kontrolanalyse er et matematisk værktøj, der kan benyttes til kvantitativt at udforske kompleksiteten af metabolisme og analysere fordelingen af kontrol over en given reaktionsvej. En forudsætning for anvendelsen af metabolisk kontrolanalyse er, at der haves en steady state (eller pseudo steady state) og en forudsætning, at et steady state er defineret af enzymerne, der katalyserer de individuelle trin i en metabolisk vej. Flux-kontrolkoefficienter, $C_{e_i}^J$, angiver kvantitativt den relative effekt på en given flux i forhold til den relative ændring i enzymaktiviteten. Således vil en fluxkontrolkoefficient på 0,1 betyde, at en 10% stigning i enzymaktiviteten vil resultere i en 1% stigning i fluxen. I metabolisk kontrolanalyse betyder en positiv kontrol, at en øgning af det pågældende enzyms aktivitet vil øge den undersøgte flux, mens negativ kontrol angiver, at en øgning af enzymets aktivitet vil sænke den undersøgte flux. Et af formålene med dette projekt har været at kvantificere de individuelle glykolytiske enzymeres såvel som kombinationer af disse kontrol over syrningsaktivitet og produktdannelse.

5. Resultater og diskussion

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

5.1. Systematisk undersøgelse af individuelle glykolytiske enzymer betydning for syrningsen.

Et centralt punkt i dette forskningsprojekt var at foretage en systematisk gennemgang af de individuelle glykolytiske enzymer betydning for syrningsaktiviteten og produkt dannelsen i *L. lactis*. Ved projektets begyndelse eksisterede begrænset viden for de forskellige enzymer involveret i glykolyse. For at kunne foretage relevante fysiologiske studier blev der for hver af de glykolytiske enzymer lavet stammebiblioteker, hvori ekspressionerne af generne, der koder for de forskellige enzymer, var moduleret i små intervaller omkring det oprindelige niveau.

Disse stammebiblioteker muliggjorde efterfølgende fysiologiske og kvantitative studier af de individuelle enzymer kontrol over syrningsaktivitet, vækst og produkt dannelse. Stammer blev udvalgt fra stammebibliotekerne med genekspressioner, som dækkede passende intervaller for enzymerne. Disse stammer blev studeret mere detaljeret i vækstofforsøg med bestemmelse af væksthastighed, glukoseforbrug og produkt dannelse. De opnåede data blev efterfølgende benyttet til at kvantificere enzymerne kontrol over syrningsaktivitet og produkt dannelse ved hjælp af det matematiske værktøj, metabolisk kontrolanalyse. Neden for er data beskrevet for hver af de individuelle glykolytiske enzymer med henblik på kontrol af de forskellige enzymer på syrningsaktivitet og produkt dannelse.

Glukokinase (GKI). GKI er involveret i phosphoryleringen af glukose til glukose-6-phosphat (G6P). Det intracellulære niveau af glukose dannes enten ved transport af glukose gennem en glukose permease eller ved spaltningen af disaccharider som f.eks. for laktose, hvor laktose spaltes til galaktose og glukose vha. en β -galaktosidase. Der er blevet konstrueret IL1403-mutanter med modulering af det kodende gen for GKI, resulterende i stammer med GKI-aktiviteter mellem 20-30% af vildtypeniveauet, hvorfor det ikke har været muligt at foretage en metabolisk kontrolanalyse af GKI. I MG1363 er der imidlertid blevet konstrueret stammer med øgede aktiviteter af GKI. I vækstofforsøg med glukose som energikilde så ingen påvirkning af syrnings effektiviteten. Dette var heller ikke ventet, idet glukose i *L. lactis* primært bliver transporteret via PTS^{man} transportsystemet, resulterende i direkte dannelse af G6P i cellen.

GKI blev ligeledes undersøgt under vækst på maltose, idet det optagede maltose bliver spaltet af maltose phosphorylase til glucose og beta-glucose-1-phosphat. Glucoseenheden bliver efterfølgende phosphoryleret af GKI. Vækst af udvalgte stammer i SALN-medium med maltose viste små forskelle mellem vildtype og stammer med modulerede GKI-aktiviteter, hvilket

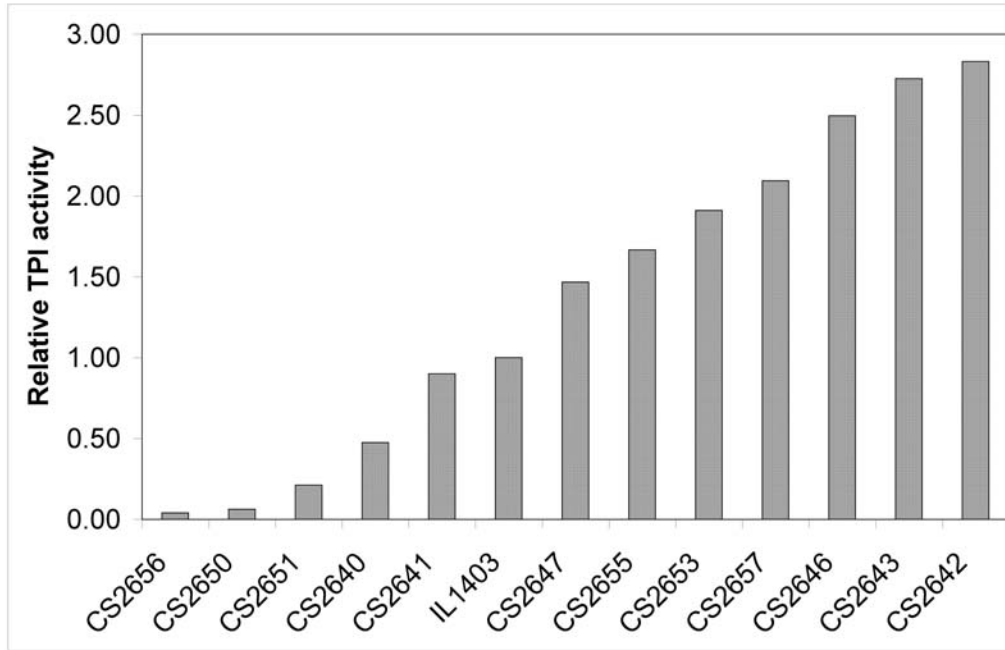
indikerer, at GKI ikke har kontrol over maltose-fluxen. Stammer med lav GKI-aktivitet producerede mere myresyre og eddikesyre på maltose end vildtypen. For yderligere informationer vedrørende studierne af GKI henvises til Yang (2006).

Phosphoglukose isomerase (PGI). PGI er involveret i omdannelsen af G6P til fruktose-6-phosphat (F6P) tidligt i glykolysen. Konstruktionen af stammer med modulerede PGI-aktiviteter i IL1403 resulterede i stammer med 25-260% PGI-aktiviteter i forhold til vildtypeniveau. Udvalgte stammer blev karakteriseret med hensyn til vækst, syringseffektivitet og produkt dannelse. Kontrolanalyse af de opnåede data viste, at PGI ikke havde nogen kontrol over hverken den specifikke væksthastighed, syringseffektiviteten eller produkt dannelsen ved vildtypeniveau. Ved 25% PGI-aktivitet blev derimod fundet positive flux-kontrolkoefficienter for væksthastighed, syringseffektivitet og laktatproduktion på henholdsvis $C(\text{vækst})=0,7$, $C(\text{glucose})=0,6$ og $C(\text{laktat})=0,6$, mens der blev fundet negative kontrolkoefficienter for format- og acetatdannelsen på omkring $C(\text{format, acetat})=(-0,1)-(-0,3)$. Fundet af negative kontrolkoefficienter på format- og acetatdannelsen var overraskende, idet en sænket PGI-aktivitet intuitivt vil føre til lavere koncentration af nedstrømsmetabolitterne herfor som f.eks. fruktose bishosphat og triosephosphaterne. Da disse metabolitter ifølge litteraturen er involveret i pyruvatmetabolismen med FBP som positiv regulering af LDH (Wolin, 1964) og triosephosphaterne som negativ regulatorer af PFL, var der egentlig forventet en relativt højere format/acetat-produktion og en relativt lavere laktatproduktion. For at få dette afklaret til fulde vil det dog være nødvendigt med egentlige metabolitmålinger af de pågældende metabolitter.

Phosphofruktokinase (PFK): PFK er involveret i omdannelsen af F6P til fruktose-1,6bisphosphat (FBP). Det kodende gen for PFK er en del af den såkaldte *las*-operon, der består af de kodende gener for enzymerne PFK, PYK og LDH. Data for studiet af PFK er derfor beskrevet neden for i afsnittet om *las*-operonen.

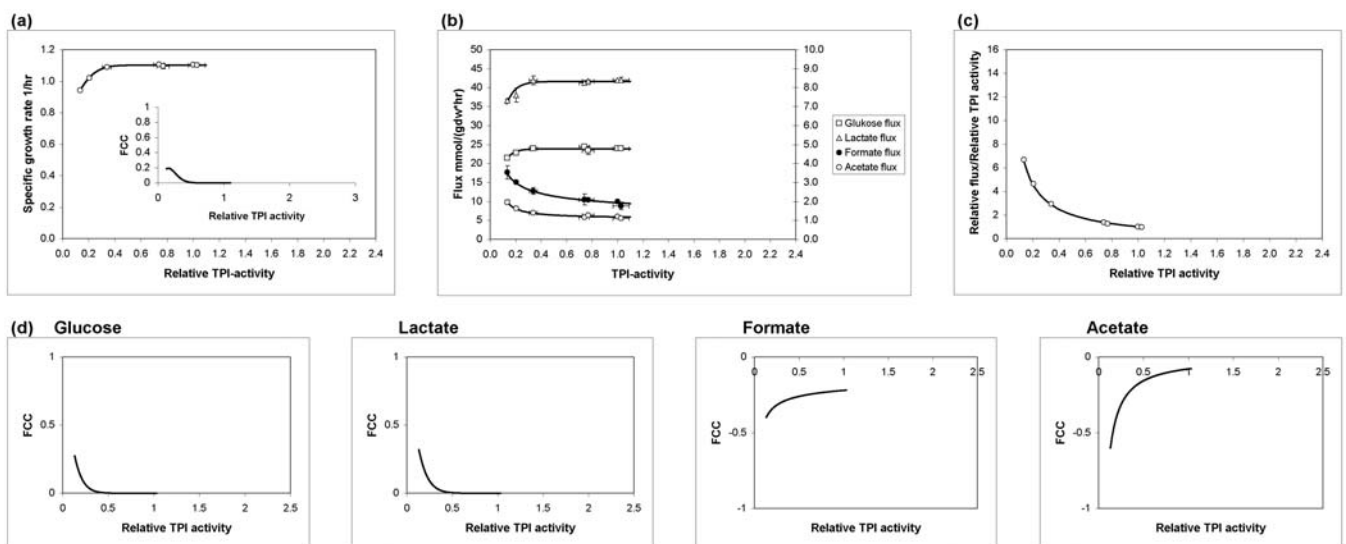
Fruktosebisphosphat aldoase (ALD): ALD er involveret i omdannelsen af FBP til triosephosphaterne dihydroxyacetonephosphat (DHAP) og glyceraldehyd-3-phosphat (G3P). Der er blevet konstrueret en række IL1403 stammer, hvori ALD-aktiviteter er moduleret mellem 22% til 180% som efterfølgende blev delvist karakteriseret i et studenterprojekt, men data er ikke klar til publikation.

Triosephosphat isomerase (TPI): TPI katalyserer omdannelsen mellem DHAP og G3P. Kontrolanalyser med TPI er blevet foretaget for både MG1363 og IL1403. Således er blevet fremstillet stammebiblioteker med TPI-aktiviteter på henholdsvis 3-275% (IL1403) og 13-103% (MG1363) relativt til vildtypeniveau (figur 9).



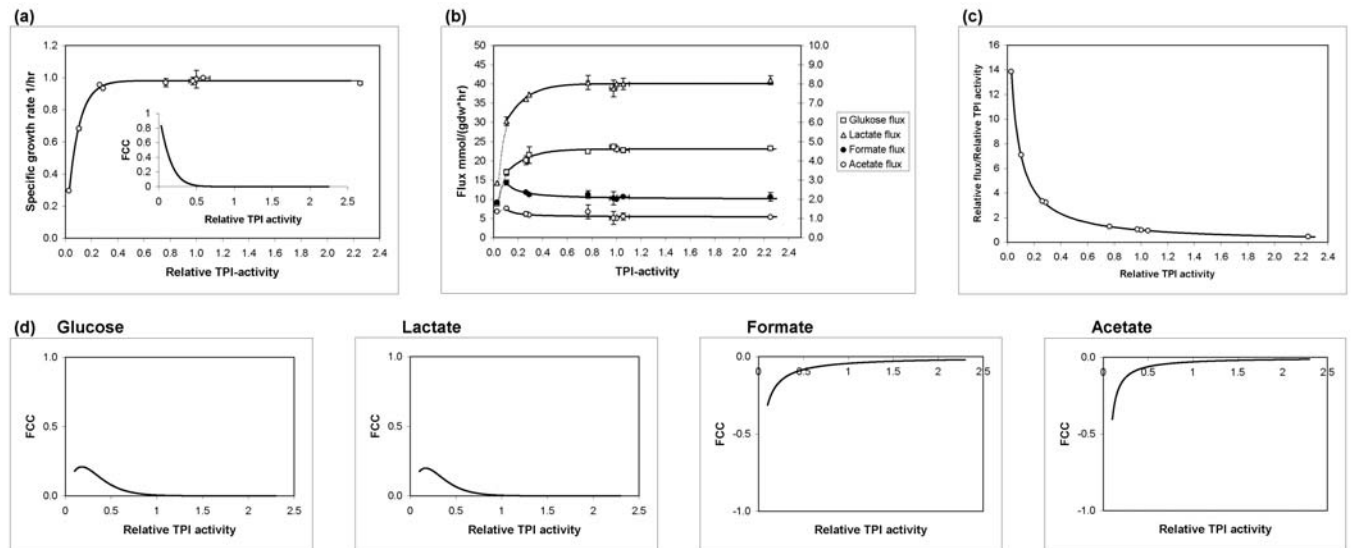
Figur 9. Relativ TPI-aktivitet bestemt fra celleekstrakter af de indikerede stammer vokset i SALN.

TPI blev i begge stammer fundet til at være i stort overskud, hvor 10 % TPI aktivitet var tilstrækkeligt til at opnå 70 % af syringseffektiviteten i vildtypen (Fig. 10). Selv ved ganske lave TPI-aktiviteter var metabolismen homolaktisk, på trods af et mindre forhøjet niveau af format- og acetatproduktion i stammer med stærkt reduceret TPI-aktivitet for både MG1363 og IL1403 (Figur 10 og 11).



Figur 10. Effekt af TPI-aktivitet på væksthastighed og metaboliske fluxe i MG1363.

Udvalgte stammer af MG1363 med modulerede aktiviteter af TPI voksede i GSALN-medium og blev studeret med hensyn til (a) Væksthastighed (b), Metaboliske fluxe, (c) Det relative turnover af TPI blev beregnet som ratio af den relative glykolytiske flux og den relative TPI-aktivitet og plottet som en funktion af den relative TPI-aktivitet, (d) Flux-kontrolkoefficienter af TPI over de metaboliske fluxe (Fra Solem et al., submitted).



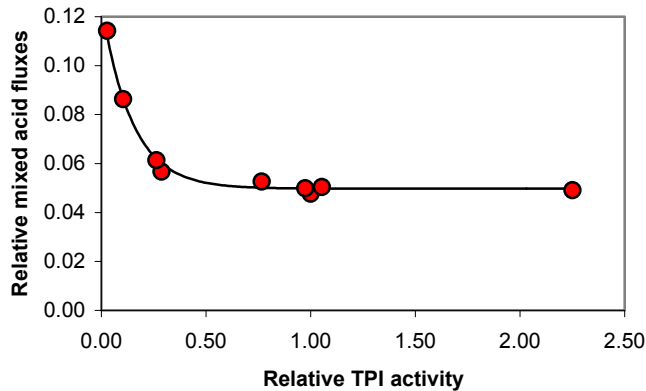
Figur 11. Effekt af TPI-aktivitet på væksthastighed og metaboliske fluxe i IL1403.

Udvalgte stammer af IL1403 med modulerede aktiviteter af TPI voksede i GSALN-medium og blev studeret med hensyn til (a) Væksthastighed (b) Metaboliske fluxe. (c) Det relative turnover af TPI blev beregnet som ratio af den relative glykolytiske flux og den relative TPI-aktivitet og plottet som en funktion af den relative TPI-aktivitet. (d) Flux-kontrolkoefficienter af TPI over de metaboliske fluxe (Fra Solem et al., submitted).

En bestemmelse af opstrømsmetabolitterne G6P, FBP og DHAP i IL1403-mutanter viste, at disse var stort set uændrede i intervallet 26-225 % (Tabel 1), hvilket formodentlig skyldes at enzymets turnover number steg i takt med reduktionen af enzymets aktivitet (se figur 12). Ved en TPI-aktivitet på 3% øgedes DHAP-niveauet dog omkring 4 gange. Det høje niveau af DHAP resulterede i en relativt forhøjet format- og acetatproduktion (Figur 11), hvilket er i modsætning til de regulatoriske egenskaber beskrevet i litteraturen. De opnåede data for TPI forsøges publiceret i EIT Systems Biology (Solem et al., submitted).

Tabel 1. Intracellulær koncentrationer af glykolytiske metaboliter i udvalgte IL1403 derivater.

Stamme	Relativ TPI aktivitet	DHAP mM	G6P mM	FBP mM
CS1695	0,03	29(2)	6(4)	48(6)
CS2116	0,26	7(2)	13(3)	50(6)
CS2110	0,28	6(2)	13(4)	47(2)
CS2127	1,00	4(2)	15(4)	46(8)
CS2121	1,02	4(2)	12(1)	41(5)
IL1403	1,00	7(2)	15(3)	50(5)



Figur 12. Effekt af TPI-aktivitet på den relative mixed acid-flux i IL1403.

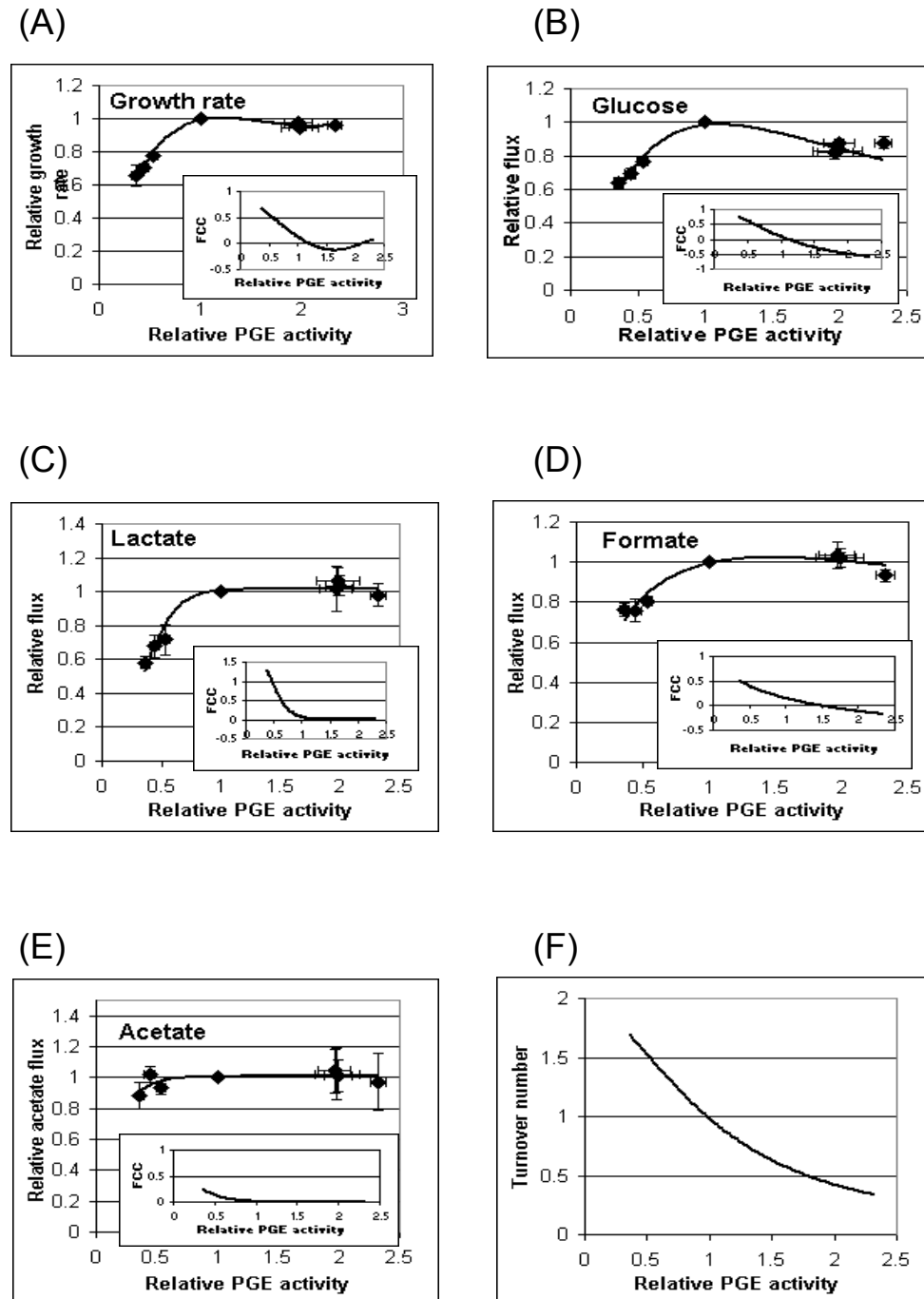
Den relative mixed acid flux er beregnet som mængden af myresyreproduktion relativt til summen af myresyre- og mælkesyreproduktion.

Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase (GDH): GDH er involveret i omdannelsen af G3P til 1,3-diphosphoglycerat (1,3 DPG). Et kontrolstudium af GDH i MG1363 var ved projektets begyndelse netop afsluttet (Solem et al., 2003). Her fandt vi, at GDH ikke havde kontrol over den glykolytiske flux (syrningseffektiviteten) i modsætning til, hvad der tidligere er beskrevet i litteraturen (Poolmann et al., 1987). For at teste om kombinationen af en øget GDH-aktivitet med en ukoblet ATPase-aktivitet kunne resultere i øget glykolytisk flux, var der blevet introduceret et ATPase-plasmid i en stamme med øget aktivitet af GDH. De efterfølgende fysiologiske studier viste imidlertid, at heller ikke denne stamme havde en øget syringseffektivitet. Detaljerede informationer af dette studium kan findes i Solem et al. (2003).

Phosphoglycerat kinase (PGK): PGK er involveret i omdannelsen af 1,3-DPG til 3-phosphoglycerat (3-PG) under samtidig dannelse af 1 ATP. Vækstforsøg med stammer med øgede PGK-aktiviteter viste, at PGK ikke havde kontrol over hverken syringseffektiviteten eller acetatproduktionen.

Phosphoglycerat enolase (PGE): Phosphoglycerat enolase er placeret sent i glykolysen, hvor det katalyserer omdannelsen af 2-phosphoglycerat (2-PG) til phosphoenolpyruvat (PEP). Produktionen af PEP er interessant, idet PEP har forskellige funktioner i cellen: PEP kan blive omdannet til pyruvat via pyruvat kinasen (PYK), hvorved der samtidig dannes 1 ATP. Derudover fungerer PEP som fosfatdonor til PTS-sukkertransportsystemerne. Dannelse og koncentration af PEP kan således have betydning for både ATP-produktionen såvel som sukkertransporten. Der er i projektet blevet foretaget et detaljeret studie af PGE med henblik på kvantificering af PGE's kontrol over syringseffektivitet og produkt dannelse. Således har vi fremstillet et IL1403-bibliotek, hvori aktiviteten af PGE er blevet moduleret mellem 36-232% relativt til vildtypeniveauet. Udvalgte stammer blev efterfølgende benyttet til fysiologiske studier, hvorfra data blev benyttet til kvantificering. Det blev fundet, at PGE ved vildtypeniveau hverken havde kontrol over syringseffektivitet, vækst eller produkt dannelse (Figur 13). Men ved 36% PGE-aktivitet var flux-kontrolkoefficienterne på væksthastighed og syringseffektivitet

ektivitet hhv. 0,7 og 0,8, mens den på dannelsen af laktat, format og acetat var hhv. 1,3, 0,5 og 0,25. Disse flux-kontrolkoefficienter viser, at metabolismen i IL1403 bliver en anelse mere mixed acid ved reducerede PGE-aktiviteter. Overskuddet af PGE i IL1403 viste sig ved beregninger at være mindre end det dobbelte. De opnåede resultater for PGE er blevet publiceret i efteråret 2006 (Koebmann et al., 2006).



Figur 13. Effekt af PGE-aktivitet på (a) Væksthastighed, (b) Syrningseffektivitet, (c) Mælkesyreproduktion, (d) Myresyreproduktion og (e) Eddikesyreproduktion. Flux-kontrolkoefficienter for PGE på fluksene udregnet på basis af formler for de fittede kurver. (f) Den relative omdannelse af PGE blev udregnet som forholdet mellem den relative syrningseffektivitet og den relative PGE-aktivitet og plottet som en funktion af den relative PGE-aktivitet (Fra Koebmann et al., 2006).

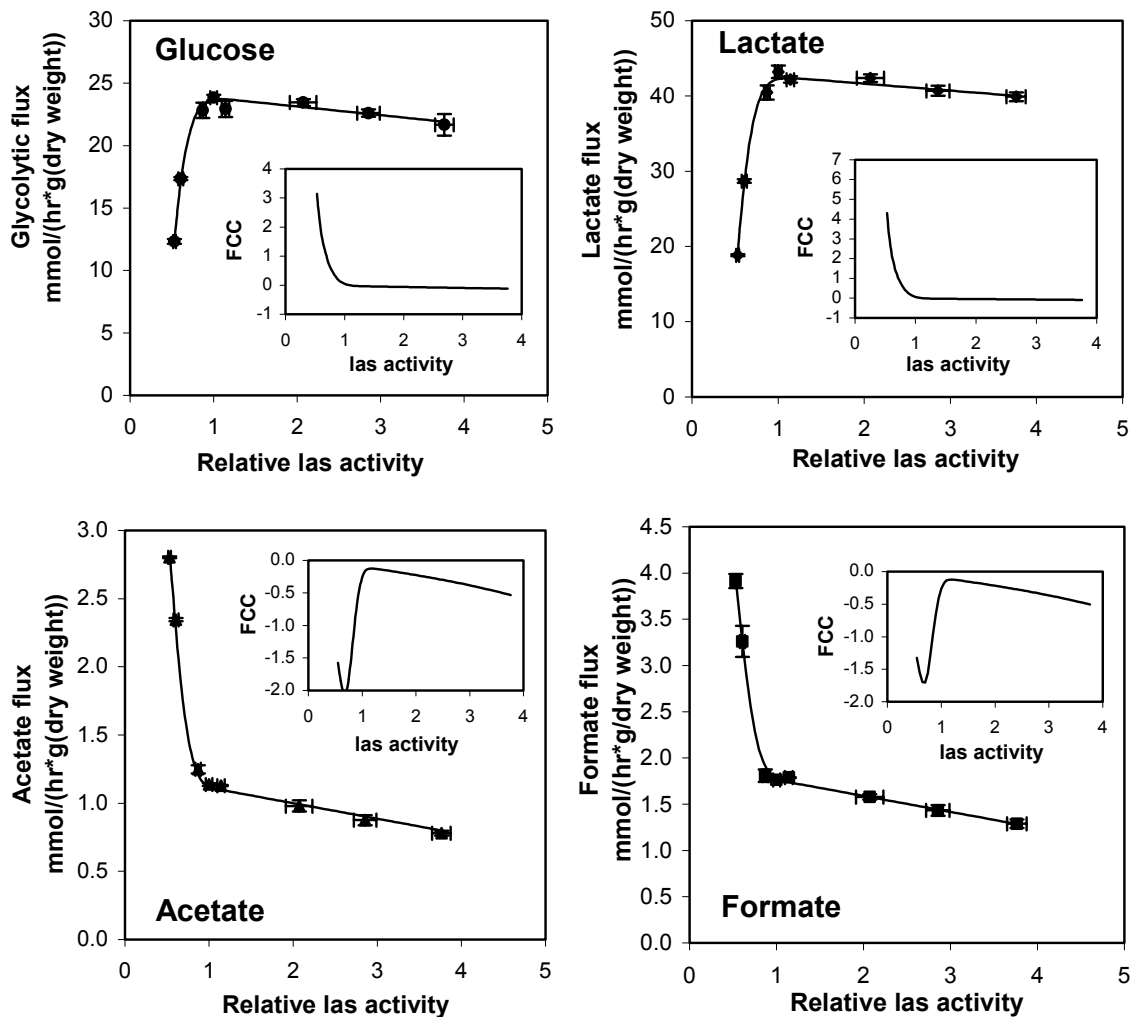
Pyruvat kinase (PYK): Det kodende gen for PYK udgør en del af *las*-operonen. Data for den individuelle modulering af PYK er beskrevet i afsnittet om *las*-operonen.

Laktat dehydrogenase (LDH): Det kodende gen for LDH udgør ligeledes en del af *las*-operonen. Data for kontrolanalyse af LDH under vækst på glukose er tidligere blevet beskrevet af Andersen et al. (2001). I dette projekt er undersøgelserne af LDH blevet udvidet til at omfatte vækst på maltose, ligesom hele *las*-operonen er blevet studeret i detaljer. Data herfor kan findes i nedenstående afsnit omhandlende *las*-operonen.

***Las*-operonen (PFK, PYK og LDH):** I *L. lactis* er de tre af de glykolytiske enzymer, phosphofruktokinase (PFK), pyruvatkinase (PYK) og laktatdehydrogenase (LDH) kodet af gener, der er organiseret i den såkaldte *las*-operon. Årsagen til denne genetiske organisering kan være at give cellen en måde 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 gør, at *las*-operonen formodes at indtage en central rolle mht. kontrol eller regulering af flowet gennem glykolysen. For at studere dette nærmere er der i projektet blevet foretaget detaljerede studier af de individuelle *las*-enzymer såvel som for hele *las*-operonen.

Stammer er blevet konstrueret, hvori aktiviteterne af de tre enzymer er blevet ændret omkring cellens normale niveau, såvel enkeltvis som alle tre samlet. Fermenteringsforsøg er blevet udført, og de tre enzymeres betydning for syringseffektiviteten og produktifikationen er beregnet i form af kontrolkoefficienter. I disse studier er blevet benyttet enten glukose eller maltose som energikilde.

Vækst på glukose: I et tidligere studie var det fundet, at LDH havde en høj negativ kontrol på format-produktionen ($C^{**}=-1,3$) (Andersen et al., 2001). I vores undersøgelser blev fundet, at hverken PFK eller PYK havde kontrol over syringseffektiviteten eller væksthastigheden ved vildtype-niveau. Derimod havde PYK en høj positiv kontrol på format-dannelsen ($C^{*}=0,9-1,1$) og acetatproduktionen ($C^{*}=0,8-1,0$), hvorimod PFK ikke har nogen kontrol over disse flukse (Koebmann et al., 2005). Sænkning af hele *las*-operonen resulterede i en stærk reduktion af væksthastighed og syringseffektiviteten således at der ved 53 % ekspression af *las*-operonen blev fundet en syringseffektivitet på 44 % (Figur 14). Øgede ekspressioner af *las*-operonen førte til et lille fald i syringseffektiviteten. Ved vildtypeniveau var kontrollen for hele *las*-operonen tæt på nul for både syringseffektivitet og produktifikation. Interessant var det, at summen af flux-kontrolkoefficienter for de individuelle *las*-enzymer var sammenlignelig med kontrolkoefficienter for modulering af hele *las*-operonen, hvor den stærke positive kontrol for PYK på formatproduktionen stort set gik lige op med den negative kontrol for LDH. Vores analyse indikerer således, at co-regulering af PFK og PYK giver en effektiv måde at regulere syringseffektiviteten, og co-regulering af PYK og LDH tillader *L. lactis* at forblive homolaktisk under regulering af glykolysen. Resultaterne er blevet publiceret i FEBS Journal (Koebmann et al., 2005).



Figur 14. Flux-kontrolkoefficienter for *las*-enzymene på metaboliske flukse.

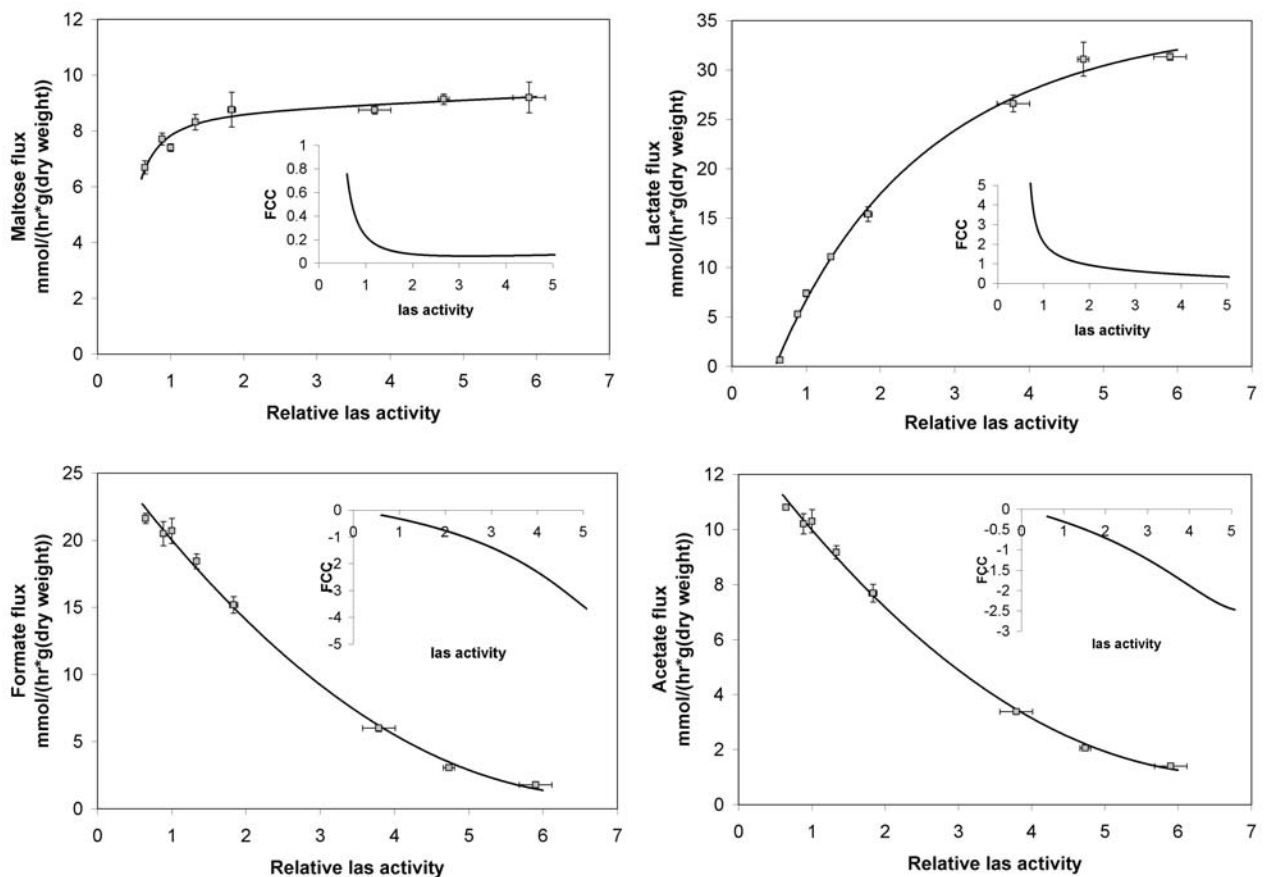
Udvalgte stammer blev analyseret med hensyn til syringseffektivitet (glycolytic flux) og metaboliske flukse. Flux-kontrolkoefficienter (FKK) med hensyn til glykolyse, laktat, acetat og formatproduktion er bestemt ud fra de fittede funktioner (Fra Koebmann et al., 2005).

Vækst på maltose: Betydningen af *las*-operonen er også blevet studeret ved vækst med det langsomt omsatte sukker, maltose, som energikilde. Under denne betingelse udviste vildtypen MG1363 et mixed acid mønster, hvorved omkring 65% af maltosen blev omdannet til format, ethanol og acetat. I stammer, hvori aktiviteterne af enten PFK eller LDH var øget, blev fermenteringsmønstret mere homolaktisk, hvorimod øget PYK-aktivitet ikke havde nogen betydning for produkt dannelsen. Flux-kontrolkoefficienterne for PFK og LDH på laktatproduktionen ved vildtypeniveau blev fundet til at være henholdsvis $C_{PFK}^{lactate} \approx 0,8$ og $C_{LDH}^{lactate} \approx 1,1$, og på format produktionen henholdsvis $C_{PFK}^{formate} \approx -0,23$ og $C_{LDH}^{formate} \approx -0,21$. Modulering af hele *las*-operonen havde en voldsom effekt på fermenteringsmønstret med en flux-kontrolkoefficient på $C_{las}^{lactate} \approx 2,1$ for laktatproduktionen ved vildtypeniveau. Ved høj ekspresion af *las*-operonen var fermenteringsmønstret stort set homolaktisk svarende til,

hvad der normalt ses med glukose som energikilde. Maltosefluxen steg ved øget ekspresion af *las*-operonen, resulterende i en flux-kontrolkoefficient på maltosefluxen på $C_{las}^{maltose} \approx 0,23$ ved vildtypeniveau. Den specifikke væksthastighed faldt ved både lavere og højere ekspresioner af *las*-operonen, hvilket viste, at ekspresionen af *las*-operonen var optimal for hurtig vækst. Et samlet overblik over flux-kontrolkoefficienterne ved vækst på maltose er vist i tabel 2. Resultaterne er ved at blive publiceret i FEBS Journal (Solem et al., submitted).

Tabel 2. Flux-kontrolkoefficienter ved vildtypeniveauer af MG1363.

	Maltose	Laktat	Format	Acetat
PFK	0,17	0,76	-0,23	-0,23
PK	0,01	-0,01	0,17	0,18
LDH	0,01	1,12	-0,21	-0,23
Sum	0,18	1,87	-0,27	-0,27
las-operon	0,23	2,09	-0,32	-0,31

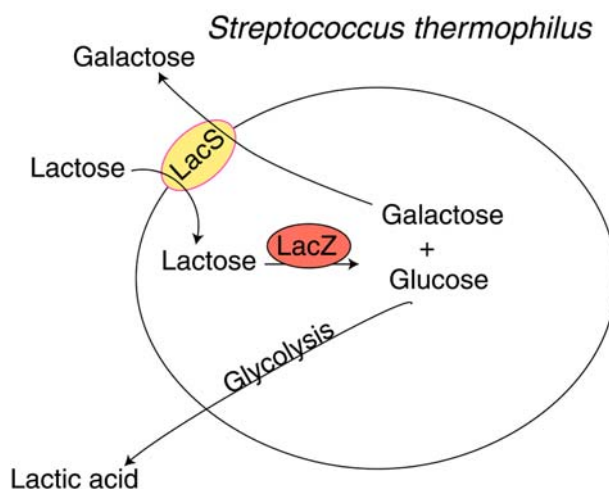


Figur 15. Metaboliske flukse bestemt for stammer med modulerede *las*-aktiviteter.

Figuren viser maltose-, laktat-, format og acetatfluxe. Flux-kontrolkoefficienterne på de forskellige flukse af *las*-enzymene er ligeledes vist (Fra Solem et al., submitted).

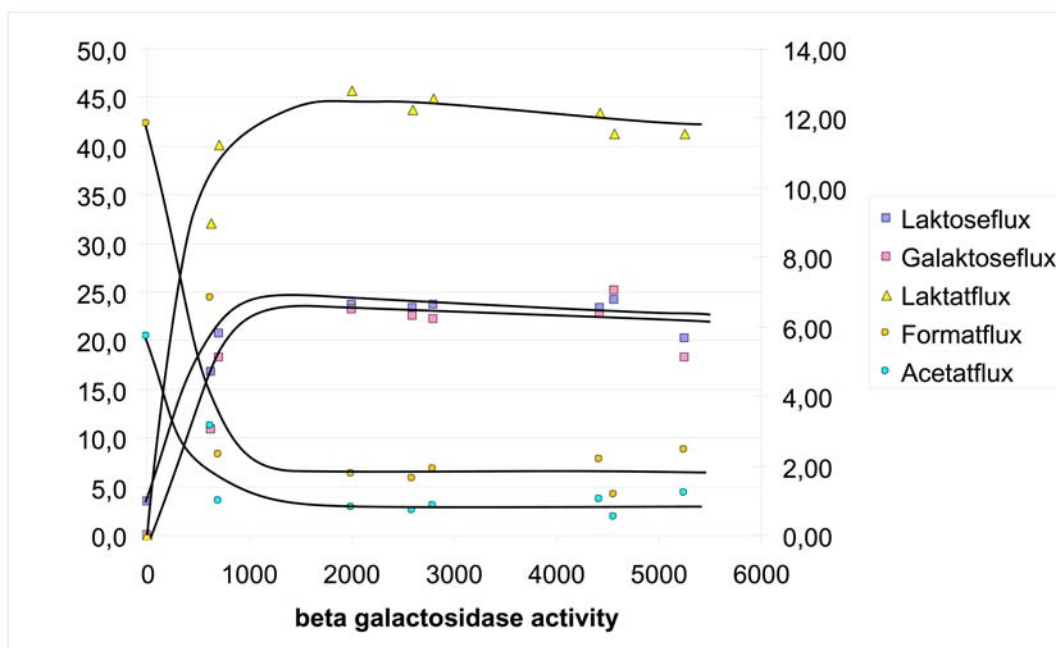
Laktat permease: Et af de trin, der kan have kontrol over syrnings effektiviteten, er *L. lactis*' evne til at transportere den dannede laktat ud af cellen. Transporten af laktat formodes at ske via en laktat permease, men det funktionelle enzym er endnu ikke blevet identificeret. For at undersøge kontrollen af laktattransport for syrnings effektiviteten er der i stedet blevet konstrueret en række stammer, hvori en laktat permease fra *Bacillus subtilis* er udtrykt i *L. lactis* IL1403 i forskellige niveauer. De benyttede genetiske konstruktioner er lavet ved at opformere laktat permease-genet med samtidig inkorporering af syntetiske promotorer, som beskrevet tidligere, hvorefter PCR-produktet er blevet indsat foran rapportergen *gusA* i pCS574 således, at det er muligt at tjekke for ekspresion af laktat permease-genet. Der blev efterfølgende foretaget vækstofforsøg med en række udvalgte stammer med forskellige ekspresionsstyrker baseret på aktiviteten af rapportergen. Imidlertid viste vækstofforsøgene ingen forskel i syrnings effektiviteten i det benyttede definerede medium. Noget tyder derfor på, at laktattransporten ikke for sig selv kontrollerer syrnings effektiviteten i *L. lactis*. Der er dog ikke blevet afklaret, om laktat permeasen er aktiv i *L. lactis*, hvorfor det ikke med sikkerhed kan udelukkes, at laktat permeasen i *L. lactis* har kontrol over syrningsaktiviteten.

Laktosetransport via laktose-permease fra *Streptococcus thermophilus*: En begrænsende faktor for glykolysen kunne også ligge i transporten af sukker ind i cellen. I *L. lactis* er glukose og laktose primært transporteret af PTS-systemer som består af flere enzymatiske enheder. En kontrolanalyse af PTS-systemerne er således forholdsvis komplekse. En anden mulighed er at undersøge kontrollen i transporten af sukker ind i cellen ved at introducere et simpelt transportsystem, der har vist sig at have høj aktivitet i andre relaterede organismer. Mælkesyre bakterien *Streptococcus thermophilus* har en forholdsvis høj glykolytisk flux, sammenlignet med *L. lactis* og laktose transporter og β -galactosidase fra denne organisme, kodet af *lacSZ*-operonen, er således en oplagt kandidat. Laktosepermeasen fra *S. thermophilus* fungerer ved at udskille galaktose ved optagelse af laktose (Figur 16).



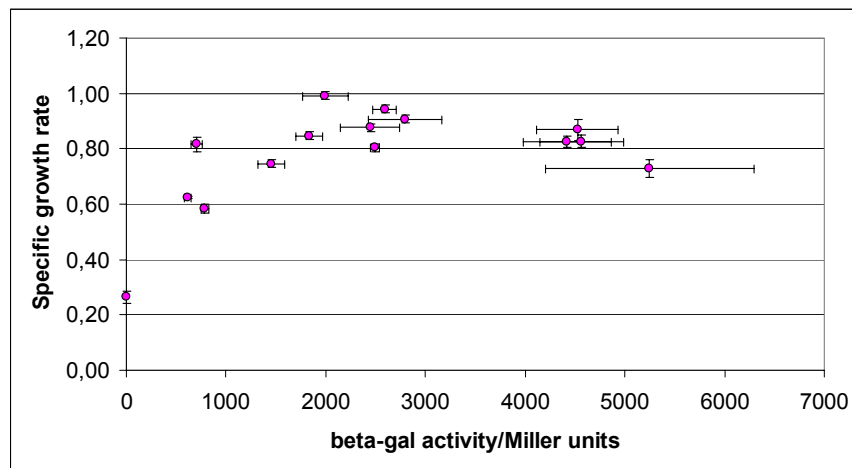
Figur 16. Illustration af transportprocessen af laktose i LacS transporteren fra *S. thermophilus*.

LacSZ-operonen blev opformeret med PCR med samtidig inkorporering af syntetiske promotorer, efterfølgende introduceret i *Lactococcus lactis* og endeligt selekteret på laktoseplader. Dette resulterede i et stammebibliotek med varierende ekspressioner af *lacSZ*-operonen baseret på målinger af den specifikke β -galactosidase-aktivitet. Et repræsentativt antal af stammer blev derefter studeret i vækstforsøg. Det blev fundet, at disse *L. lactis* stammer metaboliserede laktose på samme måde som *S. thermophilus*; galaktoseenheden af laktose blev udskilt fra cellen, og kun glukoseenheden blev metaboliseret, når stammerne voksede på laktose (Figur 17). Ved en lav ekspression af *lacSZ*-operonen opnåede vi dog en mixed acid-metabolisme og co-metabolisering af galaktose og glukose. Ved høj ekspression af *lacSZ*-operonen blev både glukose og galaktose udskilt, hvilket indikerede, at transporten af laktose var over det optimale niveau, hvilket også blev understøttet af en optimal væksthastighed og laktoseflux ved intermediære β -galactosidase-aktiviteter (Figur 18).



Figur 17. Metaboliske fluxe bestemt for stammer med modulerede *lacSZ* ekspressioner.

Figuren viser laktose-, galaktose-, laktat-, format- og acetatfluxe.



Figur 18. Væksthastighed på laktose for stammer med ekspresion af *lacSZ*.

Ekspresion af *lacSZ* er relateret til målingerne af den specifikke β -galaktosidase aktivitet af *lacZ*.

Den glykolytiske flux og væksthastighed var en anelse højere end observeret for stammer med laktosetransport gennem *L. lactis*' egen PTS^{lac} transportere, hvilket indikerede, at transportprocessen eller enzymer involveret i tagatoseruten kan have kontrol over den glykolytiske flux under vækst på laktose. Introduktion af en ukoblet ATPase i kombination med laktose-transporteren fra *S. thermophilus* øgede ikke den glykolytiske flux (Tabel 3).

Tabel 3: Udvalgte stammer med ekspresioner af *lacSZ* med/uden ATPase aktivitet

Stamme	Specifik vækstrate	Laktoseflux
CS1353	0,96	12,4
CS1353 pATP2	0,82	10,5
CS2004	1,00	21,9
CS2004 pATP2	0,87	22,5

Glykolytiske enzymer i kombination med ATPase:

Da en forøgelse af syrningseffektiviteten vil resultere i øget ATP-dannelse via glykolysen, vil det intuitivt forventes, at der kan være behov for at få hydrolyseret den ekstra ATP for at bevare en forøget flux. For at afklare dette har der for en række af de individuelle glykolytiske enzymer været konstrueret stammer, hvori en forøget aktivitet af glykolytiske enzymer er blevet kombineret med introduktionen af en ukoblet ATPase-aktivitet. IL1403-stammer, hvori aktiviteterne af de individuelle glykolytiske enzymer PGI, ALD, TPI og *las*-operonen er øget til omkring det dobbelte, er blevet transformeret med ATPase-plasmidbibliotek, hvorved der er lavet biblioteker af de forskellige stammebiblioteker, hvori der er en øget aktivitet af de respektive enzymer kombineret med forskellige grader af ATPase-aktivitet. Der blev efterfølgende foretaget forsøg med udvalgte stammer. For stammer med introduceret ATPase-

aktivitet blev observeret et fald i biomasseudbyttet, som også forventes ved introduktion af en ukoblet ATPase-aktivitet. Introduktionen af ATPase-aktivitet resulterede ligeledes i et fald i væksthastigheden. Bestemmelser af de specifikke syrningseffektiviteter for de forskellige stammer med ATPase-aktivitet viste, at der ikke var nogen ændring. Således havde kombinationen af de øgede aktiviteter af de individuelle glykolytiske enzymer PGI, ALD, TPI og *las*-operonen med ATPase ingen kontrol over syrningseffektiviteten i *L. lactis* IL1403. Som beskrevet oven for under GDH er der ligeledes undersøgt, om kombination af GDH og ATPase giver anledning til øget syrningsaktivitet i MG1363, hvilket heller ikke var tilfældet. Derudover har der været konstrueret MG1363-mutanter, hvori aktiviteterne af de glykolytiske enzymer GKI, PGI, TPI, PGM og PGE har været øget i kombination med ukoblet ATPase-aktivitet, men vækstforsøg med disse stammer viste imidlertid heller ingen effekt på syrnings-effektiviteten. På nær PGK er kontrollen af samtlige individuelle glykolytiske enzymer i kombination med ATPase-aktivitet således blevet undersøgt i enten MG1363 eller IL1403, men ingen af stammerne har givet anledning til øget syrningsaktivitet.

Det er ligeledes blevet forsøgt at kombinere stammer med introduceret laktat-permease fra *B. subtilis* (se ovenfor) med ATPase-aktivitet. Der er efterfølgende blevet lavet fysiologiske studier af udvalgte stammer, men heller ikke kombinationen af en laktat-permease og ATPase viste sig at øge den specifikke syrningseffektivitet.

Delkonklusion: Ingen af de individuelle glykolytiske enzymer havde kontrol over hele den glykolytiske flux, men nogle af enzymerne har stor kontrol over pyruvatmetabolismen. Det var heller ikke tilstrækkeligt at øge aktiviteten af de individuelle glykolytiske enzymer i kombination med en ekstra ATP-forbrugende proces (ATPase). Baseret på den systematiske gennemgang af de individuelle glykolytiske enzymer formodes det således, at det vil være nødvendigt at øge flere, måske endda samtlige, glykolytiske enzymer i kombination med en ekstra ATP-forbrugende proces, der ikke er koblet til de anaboliske processer. Hypotesen om, at kontrollen af glykolysen i *L. lactis* er fordelt over hele glykolysen og i de ATP-forbrugende processer, stemmer godt overens med en publiceret matematisk model for glykolysen (Neves et al., 1999), i hvilken konklusionen er, at kontrollen over den glykolytiske flux netop er fordelt over hele glykolysen, og at en øget flux formentlig ikke opnås ved at modulere få glykolytiske enzymer. Hvis man foretog de genetiske ændringer, der muliggjorde en øget glykolytisk flux, ville resultatet formodentlige være en stigning i metabolitkoncentrationer i den øverste del af reaktionsvejen, hvilket ville feedback-inhibere kulhydratoptagelsen. Det samlede resultat ville derfor være en uændret eller måske reduceret flux.

5.2. Konstruktion og undersøgelse af stamme med forhøjet niveau af alle væsentlige glykolytiske enzymer.

Da ingen af de individuelle glykolytiske enzymer har kontrol over syrningsaktiviteten, er der som en del af projektet blevet arbejdet på at konstruere en stamme, hvori hele glykolysen er

øget i een celle. Da de glykolytiske enzymer normalt er højt udtrykt i cellen, vil det ikke være hensigtsmæssigt at øge ekspressionen af de glykolytiske enzymer mange gange. Yderligere var det ønsket, så vidt det var muligt, at bevare metabolitkoncentrationerne på niveauer svarende til vildtypeniveauet. Der var således behov for en fintuning af ekspressionen af de enkelte gener. Grundet ovenstående faktorer blev der valgt at arbejde på at øge aktiviteten af alle de glykolytiske enzymer til omkring det dobbelte niveau i forhold til IL1403. Til dette arbejde er benyttet en strategi, hvor de genetiske ændringer i cellerne begrænser sig til promotorregionen foran de respektive glykolytiske gener, der her bliver substitueret med passende syntetiske promotorer. Proceduren for fremstilling af en stamme med dobbeltniveau af alle de glykolytiske enzymer var som følger:

1. Fremstilling af stammebibliotek med modulerede ændringer af de individuelle glykolytiske enzymer ved at substituere de oprindelige promotorer med syntetiske. Til dette arbejde er blevet anvendt plasmidvektor pGhost, som ikke kan replikere i *L. lactis*. Generne er blevet indsat i pGhost foran et bibliotek af syntetiske promotorer, som beskrevet for de individuelle enzymer. Dette har ført til en række stammebiblioteker med varierende antal stammer.
2. Måling af enzymaktiviteter og selektion af konstruktion, der giver omkring 2 gange enzymaktivitet af vildtypeniveau. De konstruerede stammebiblioteker er efterfølgende blevet undersøgt mht. enzymaktiviteter af de respektive glykolytiske enzymer relativt til IL1403. Stammer med omkring dobbeltniveau af de respektive glykolytiske enzymer er blevet udvalgt til videre arbejde.
3. Konstruktion af plasmid til dobbelt homolog rekombination, således at de oprindelige promotorer udskiftes med den syntetiske. For at minimere de genetiske ændringer i cellen er der efterfølgende blevet lavet genetiske konstruktioner baseret på pGhost hvori regionen opstrøms for de gældende gener er blevet indsat foran et fragment med den passende syntetiske promotor og det pågældende gen (Figur 19). De genetiske konstruktioner er efterfølgende blevet benyttet til dobbelt rekombination i *L. lactis*. Grundet den dobbelte rekombination vil nettoændringen i stammerne kun være substitution af promotorregionen, hvilket bevirker, at metoden kan genanvendes uden at efterlade antibiotikaresistens-markører i cellen.
4. Enzymaktiviteten i den konstruerede stammer bestemmes for at verificere korrekt niveau af enzymaktivitet.
5. Modulering af næste gen ifølge pkt. 1-4.

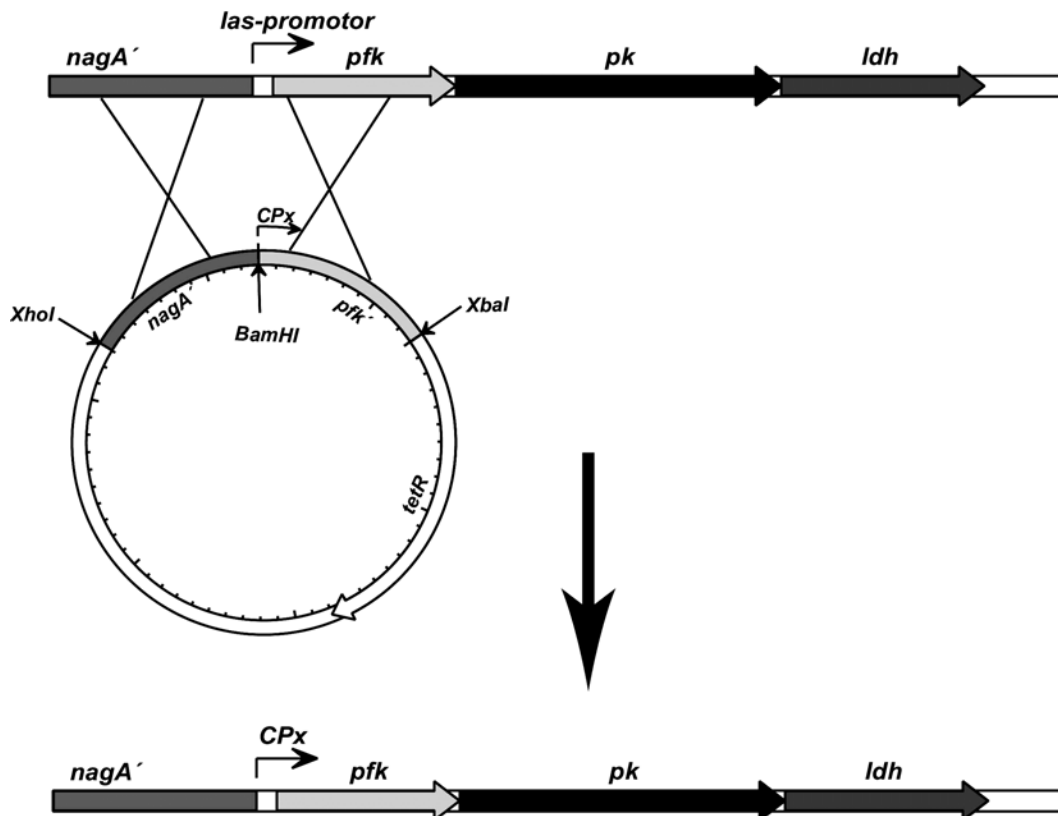


Fig. 19: Princip for udskiftning af den kromosomale promotor.

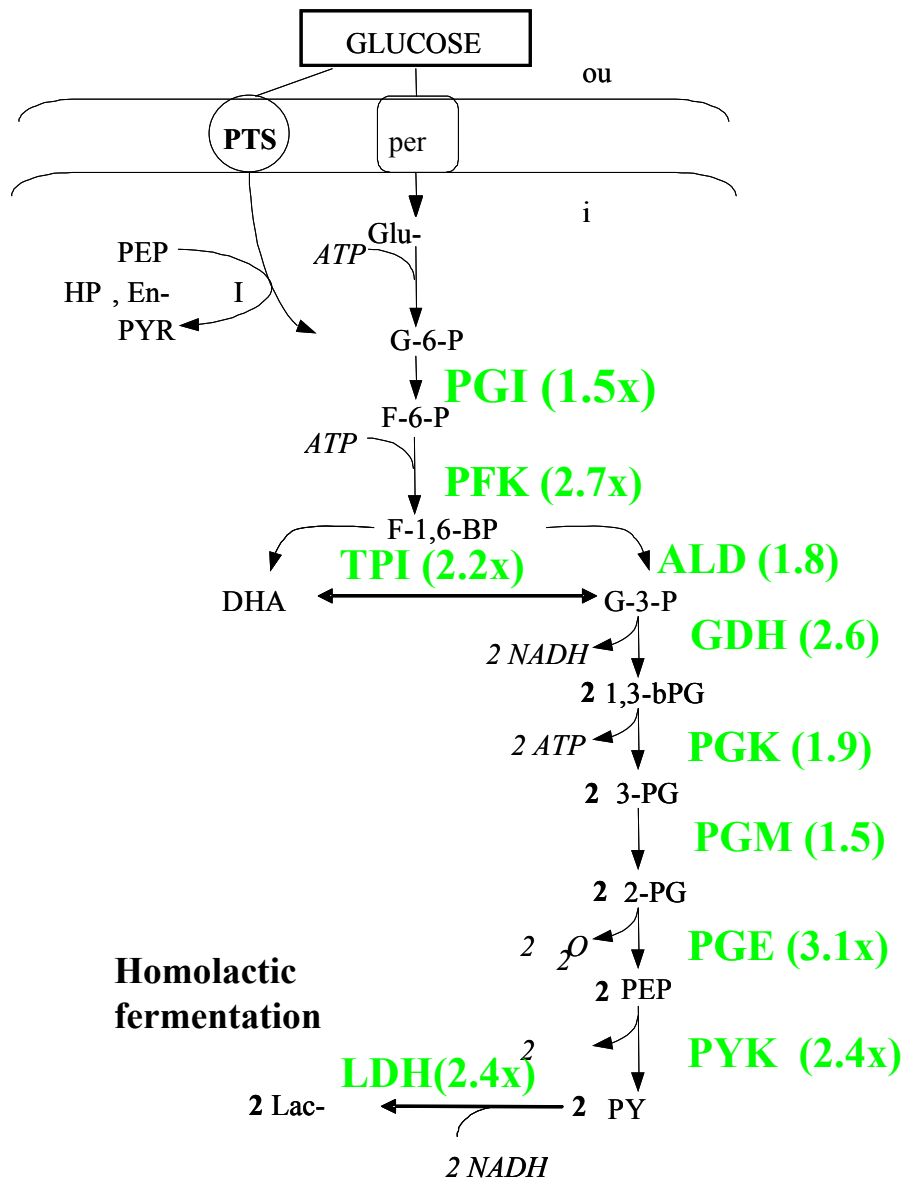
Regionen opstrøms for de(t) respektive gen(er), her illustreret ved *las*-operonen, er indsat i pGhost foran et fragment med det respektive gen placeret efter en syntetisk promotor. Dobbeltrekombination i *L. lactis* resulterer i en substitution af den oprindelige promotor.

De konstruerede stammer med øgede niveau af flere eller alle glykolytiske enzymer fik efterfølgende introduceret ATPase-aktivitet ved at transformere stammerne med det eksisterende ATPase-plasmid pATP2 fra BK1552, der tidligere har vist sig at have en moderat ATPase-aktivitet i MG1363. Arbejdet med konstruktionen af stammen med øget niveau af hele glykolysen har ført til en række stammer med moduleringer af flere glykolytiske enzymer, som beskrevet i tabel 4.

Tabel 4: Liste over IL1403-derivater med øgede aktiviteter af flere glykolytiske enzymer

Stamme.	PGI	PFK	TPI	ALD	GDH	PGK	PGM	PGE	PYK	LDH	ATPase
CS1552	-	2,7	-	-	-	-	-	-	2,4	2,4	-
CS1604	-	2,7	-	1,8	-	-	-	-	2,4	2,4	-
CS1876	-	2,7	-	1,8	-	1,9	-	-	2,4	2,4	-
CS2133	-	2,7	-	1,8	-	1,9	-	3,1	2,4	2,4	-
CS2630	-	2,7	-	1,8	-	1,9	1,5	3,1	2,4	2,4	-
CS2781	-	2,7	2,5	1,8	-	1,9	1,5	3,1	2,4	2,4	-
CS2883	1,5	2,7	2,5	1,8	-	1,9	1,5	3,1	2,4	2,4	-
CS3047	1,5	2,7	2,5	1,8	2,6	1,9	1,5	3,1	2,4	2,4	-

Niveauerne af de forskellige glykolytiske enzymer i stammen med øget niveau af hele glykolysen er illustreret i Figur. 20.



Figur 20. En stamme med ca. 2 gange forhøjet niveau af alle glykolysens enzymer. Se tekst for detaljer om konstruktion, mm.

Delkonklusion: Konstruktionsarbejdet af en stamme med øget niveau af hele glykolysen har vist, at det er muligt at modulere ekspressionen af flere gener i samme celle ved små ændringer af promotorregionen uden at efterlade uønskede antibiotikaresistensmarkører. Dette betyder ligeledes, at den samme metode til modulering af genekspressionen kan genanvendes, såfremt der ønskes at modulere flere gener i den samme celle. Ved hjælp af den anvendte metode lykkedes det således at fremstille en stamme med øget niveau af hele glykolysen i en celle.

Der er her tale om et genteknologisk kvantespring, hvor vi er gået fra at kunne manipulere enkelte gener til meget præcist at kunne manipulere en komplet metabolismevej, og vel at

mærke den højst udtrykte metabolismevej i organismen. Vi forventer derfor, at dette arbejde, når de fysiologiske undersøgelser er afsluttet, vil have gode muligheder for at kunne publiceres i det meget højt ansete tidsskrift, Nature Biotechnology.

5.3. Fremstilling af spontane mutanter med forhøjet glykolytisk aktivitet.

En anden måde at opnå stammer med øget syrningsaktivitet vil være ved at have en selektions- og screeningsmetode til at finde spontane mutanter med øget syrningsaktivitet. Til dette formål blev konstrueret stammer for MG1363 og IL1403, hvori *atpAGD* var fjernet fra den kromosomale *atp*-operon. Under standardbetingelser er H^+ -ATPase essentiel, idet *L. lactis* ikke kan respirere (Koebmann et al., 2000). Derimod er *L. lactis* i stand til at vokse uden en funktionel H^+ -ATPase under aerobe betingelser ved tilstedeværelse af hemin, hvilket giver *L. lactis* mulighed for at respirere (Blank et al., 2001). De konstruerede stammer fik efterfølgende introduceret *atpAGD* på et plasmid *in trans*, der, udover at kompensere for den manglende *atpAGD*, introducerede en ATPase-aktivitet. Formålet med dette var følgende:

1) Tilstedeværelse af ATPase-aktivitet i *L. lactis* resulterer i reduceret væksthastighed som konsekvens af et øget ATP-forbrug. Stammer, der spontant genvinder deres væksthastighed, kan således skyldes spontane mutationer i gener, der koder for enzymer, som kontrollerer ATP-produktionen (og dermed syrningsaktiviteten) og ad denne vej får en hurtigere syrningsaktivitet.

2) Da *atpAGD* leveret på plasmidet er essentielt for at danne et funktionelt H^+ -ATPase kompleks i disse stammer, vil en vækst i medie uden hemin udelukke muligheden for fjernelse af *atpAGD* fra plasmiderne eller inaktivering af enzymerne, de koder for, som ellers kunne tænkes at være den primære årsag til spontan genvundet væksthastighed.

Et udvalg af ATPase-plasmider fra et eksisterende ATPase-bibliotek blev introduceret i IL1403 og MG1363-derivater med fjernet *atpAGD*, og der blev selekteret for stammer, der kunne vokse på plader uden hemin. Det blev efterfølgende bekræftet, at disse stammer havde en nedgang i biomasseudbyttet, hvilket skal være tilfældet ved introduktion af en ATPase-aktivitet.

Introduktion af ATPase-aktivitet i vildtype MG1363 og IL1403 bevirker samtidig en nedgang i væksthastigheden. Ved at selektere for hurtigtvoksende spontane mutanter vil det derfor i teorien være muligt at finde mutanter, der har øget ATP-produktionen og dermed øget syrningsaktivitet. 100-200 stammer med hurtigere væksthastighed blev screenet for væksthastighed i BioScreen, og interessante stammer med tilsyneladende øget syrningsaktivitet blev efterfølgende studeret i egentlige vækstforsøg. På trods af det langvarige og omfattende arbejde med at selektere for spontane mutanter med øget syrningsaktivitet blev der i de detaljerede vækstforsøg ikke fundet stammer med øget syrningsaktivitet. Det viste sig derimod, at de

pågældende stammer tilsyneladende havde fået reduceret deres oprindelige ATPase-aktivitet, indikeret af en mindre nedgang i biomasseudbyttet sammenlignet med den oprindelige stamme. Dette kan f.eks. være sket ved mutationer i promotorregionen foran *atpAGD* resulterende i reduceret promotorstyrke og dermed lavere ATPase-aktivitet.

En fremtidig strategi bør i stedet være at tænke i selektionsstrategier, der direkte screener for mutanter med hurtigere syrnings, f.eks. på plader indeholdende syrningsindikatorer, og efterfølgende karakterisere disse mutanters fysiologi.

Delkonklusion: I forsøget på at selektere for spontane mutanter med øget syrningsaktivitet blev der i projektet konstrueret stammer med introduceret ATPase-aktivitet resulterende i stammer med lavere væksthastighed. For at undgå mutationer i de gener, der koder for F₁-ATPase-aktiviteten, blev de nødvendige F₁-ATPase-enheder gjort essentielle. På trods af at det lykkedes at isolere mange stammer med øget væksthastighed i forhold til de oprindelige stammer med ATPase-aktivitet, blev der ikke fundet stammer med øget specifik syrningsaktivitet. På trods af den manglende succes med denne strategi, kan det dog ikke udelukkes, at metoden vil kunne benyttes til selektion af spontane mutanter med øget syrningsaktivitet.

5.4. Undersøgelse af det cellulære make-up i rekombinante mutanter.

I undersøgelserne af det cellulære makeup i rekombinante mutanter er der blevet foretaget 2D-proteingelanalyse og transkriptomanalyse af udvalgte stammer.

2D-proteingelanalyse: Der er blevet lavet 2D-proteingelanalyse af stammer med øget niveau af 5 glykolytiske enzymer samt med/uden introduktion af ATPase-aktivitet. Af disse undersøgelser fremgik det, at ændringer af mængderne af de pågældende glykolytiske enzymer med/uden ATPase-aktivitet ikke påvirkede ændringer af de øvrige proteiner i cellen. Fra de pågældende proteingeler fremgår det ligeledes, at de glykolytiske enzymer normalt er tilstede i højt niveau inde i cellen, hvilket viser nødvendigheden af en moderat overekspression af de glykolytiske enzymer, som beskrevet under punkt 2.

Transkriptomanalyse: Der blev foretaget transkriptomanalyse med udvalgte stammer med modulering af syv glykolytiske enzymer med/uden ATPase-aktivitet som følger: 1) *L. lactis* IL1403 (vildtype), 2) Stamme med øget aktivitet af syv glykolytiske enzymer, 3) Stamme med øget aktivitet af syv glykolytiske enzymer samt øget ATP-forbrug ved introduktion af ATPase plasmid (pCP34::AGD_{II}), og 4) IL1403 med introduktion af ATPase-plasmid (pCP34::AGD_{II}). Efter at have undersøgt stammerne for vækst i defineret SAL-medium med/uden nukleosider blev det besluttet at foretage analysen i medium uden nukleosider. Der blev efterfølgende lavet en række vækstforsøg, hvor der blev målt væksthastighed og metaboliske flukse samt udtaget prøver til RNA oprensning mhp. transkriptomanalysen. For hver af de fire stammer er der dyrket tre uafhængige kulturer, resulterende i 12 prøver til transkrip-

tomanalysen. RNA-prøverne blev efterfølgende oprenset og sendt af sted til transkriptomanalyse hos Nimblegen, Holland, i August 2006. I skrivende stund er data desværre stadig ikke modtaget, trods gentagne rykkere, og resultaterne af transkriptomanalysen kan derfor ikke medtages i projektrapporten.

Delkonklusion: Den foreløbige konklusion på dette arbejde er, at der sker forbavsende lidt med cellernes øvrige proteiner, selv ved overproduktion af relativt store mængder af glykolytiske enzymer samt ved overproduktion af ATPase-enzymet. Dette er en positiv overraskelse, som lover godt for fremtidige strategier til optimering af mælkesyrebakteriers metabolisme.

5.5. Sammenligning af det cellulære make-up for spontane og rekombinante mutanter.

Dette punkt omhandler en undersøgelse og sammenligning af det cellulære make-up i spontane og rekombinante mutanter. Da det ikke er lykkedes at selekttere spontane mutanter med øget syrningsaktivitet, giver det ikke mening at arbejde videre med dette punkt. Sammenligninger af stammer fremstillet ved ”klassiske” metoder med stammer fremstillet ved rekombinant DNA-teknologi er imidlertid blevet beskrevet af andre under 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, 28. august til 1. september 2005, Egmond aan Zee, Holland. Informationer herom kan findes i Pedersen et al. (2005).

6. Samlet konklusion

Projektets mål var at undersøge kontrollen over syrningsaktiviteten i de enkelte glykolytiske trin samt i glykolysen samlet. Dette mål må siges at være opfyldt, idet samtlige enzymer i glykolysen er blevet moduleret omkring deres normale aktivitetsniveau, og deres betydning for sukkeromsætning og produkt dannelse er blevet undersøgt i fermenteringsforsøg. Enzymernes kontrol over de cellulære flukse er dernæst blevet kvantificeret ved hjælp af metabolisk kontrolanalyse. Flere af de enkelte enzymer viste sig hver for sig at spille en afgørende rolle for produkt dannelsen, og manipulering af disse nøgleenzymer vil i fremtiden kunne bruges til at tilpasse mælkesyrebakteriers produkt dannelse efter behov.

Ingen af de undersøgte enzymer havde kontrol over hovedfluxen gennem glykolysen ved det normale niveau af enzymerne, ej heller i kombination med ekstra ATPase-aktivitet. Dette var i nogen grad forventet inden projektet blev påbegyndt, og der var derfor fra starten fokus på en strategi til samtidigt at overudtrykke samtlige glykolytiske enzymer med en faktor to. Dette mål blev nået lige inden projektet stoppede, men desværre nåede vi ikke at tilføre ekstra ATPase-aktivitet til disse stammer, og vi kan derfor ikke udtale os om, hvorvidt glykolysen og ATPasen samlet set har kontrol over den glykolytiske flux. Dette er rimeligt at forvente, men

der er stadig sukker- og laktattransportprocesserne, som kan have kontrol over glykolysen, selvom vores data indikerer, at disse processer ikke har kontrol hver for sig.

7. Referencer (hele rapporten)

- Andersen, H.W., M.B. Pedersen, K. Hammer & P.R. Jensen. 2001. Lactate dehydrogenase has no control on lactate production but has a strong negative control on formate production in *Lactococcus lactis*. *Eur J Biochem.* 268:6379-6389.
- Blank, L.M., B.J. Koebmann, O. Michelsen, L.K. Nielsen & P.R. Jensen. 2001. Hemin reconstitutes proton extrusion in an H⁺-ATPase-negative mutant of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 183:6707-6709.
- Brøndsted, L., and K. Hammer. 1999. Use of the integration elements encoded by the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 to obtain chromosomal single-copy transcriptional fusions in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:752-758.
- Jensen, P.R. & Hammer, K. (1993) Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4363-4366
- Koebmann, B.J., D. Nilsson, O.P. Kuipers & P.R. Jensen. 2000. The membrane-bound H⁺-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 182:4738-4743.
- Koebmann, B., C. Solem & P.R. Jensen. 2005a. Control analysis as a tool to understand the formation of the *las* operon in *Lactococcus lactis*. *FEBS J.* 272:2292-2303.
- Koebmann, B., C. Solem & P.R. Jensen. 2006b. Control analysis of the importance of phosphoglycerate enolase for metabolic fluxes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Syst. Biol.* 153:346-349.
- Koebmann, B.J., C. Solem, M.B. Pedersen, D. Nilsson & P.R. Jensen. 2002a. Expression of genes encoding F₁-ATPase results in uncoupling of glycolysis from biomass production in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 68:4274-4282.
- Koebmann, B.J., H.V. Westerhoff, J.L. Snoep, D. Nilsson & P.R. Jensen. 2002b. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol.* 184:3909-3916.
- Neves, A.R., Ramos, A., Nunes, M.C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., de Vos, W.M., Almeida, J. & Santos, H. (1999). In vivo nuclear magnetic resonance studies of glycolytic kinetics in *Lactococcus lactis*. *Biotech. Bioeng.* 64, 200-212
- Novak L, Loubiere P. 2000. The metabolic network of *Lactococcus lactis*: distribution of (14)C-labeled substrates between catabolic and anabolic pathways. *J Bacteriol.* 182(4):1136-43.
- Pedersen, M. B., Iversen, S. L., Sorensen, K. I. & Johansen, E. (2005) The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 29:611-24. Review.
- Poolman, B., B. Bosman, J. Kiers, and W. N. Konings. 1987. Control of glycolysis by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 169:5887-5890.
- Solem, C. & P.R. Jensen. 2002. Modulation of gene expression made easy. *Appl Environ Microbiol.* 68:2397-2403.

Solem, C., B.J. Koebmann & P.R. Jensen. 2003. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase has no control over glycolytic flux in *Lactococcus lactis* MG1363. *J. Bacteriol.* 185:1564-1571.

Solem, C., Koebmann, B., Yang, F., & Jensen P.R. The *las* enzymes control the maltose fermentation in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* *submitted*.

Yang, F. (2006) Carbohydrate metabolism in *Lactococcus lactis* with focus on the enzyme glucokinase. Master's thesis, Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, DTU.

Wolin Mj. 1964. Fructose-1,6-Diphosphate Requirement of Streptococcal Lactic Dehydrogenases. *Science.* 146:775-7.

8. Publikationer og præsentationer

Publikationer i tidsskrifter med referee:

Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P.R. 2006. Control analysis of the importance of phosphoglycerate enolase for metabolic fluxes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Systems Biology, IEE Proceedings* **153**:346- 349.

Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P. R. 2006. Phosphoglycerate enolase has no control on the glycolytic flux and product formation in *Lactococcus lactis* IL1403. *IEE Proc. Systems Biology*, **153 (5)**, 346-349.

Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P.R. 2005. Control analysis as a tool to understand the formation of the *las* operon in *Lactococcus lactis*. *FEBS Journal* **272**:2292-2303.

Mijakovic, I., Petranovic, D. & Jensen, P. R. 2005. Tunable promoters in systems biology. *Curr. Opin. Biotech.* **16**:329-335.

Solem, C., Koebmann, B.J., & Jensen, P.R. 2003. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase has no control over glycolytic flux in *Lactococcus lactis* MG1363. *J. Bacteriol.* **185**:1564-1571.

Publikationer i tidsskrifter uden referee:

Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P. R. 2006. Tunable promoters for systems biology: Applied to prokaryotic model systems. *In* Proceeding of the 1st International Symposium on Systems Biology, 1.-2. juni 2006. Murcia, Spanien, s. 299-314.

Koebmann, B. J., Solem, C. & Jensen, P. R. 2004. Hvad kontrollerer syrningseffektiviteten af den primære starter? *Mælkeritidende* 2004 **3**:55-64.

Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P. R. 2004. Kontrolanalyse af glykolysen i mikrobielle systemer. *Dansk Kemi*, **5**:22-26.

Koebmann, B. J., Solem, C., Hammer, K. & Jensen, P. R. 2003. Experimental control analysis of glycolysis in *Lactococcus lactis*. *BioCentrum-DTU Research Activities* 2002, s. 4-8.

Manuskripter indsendt til publikation:

Koebmann, B., Blank, L., Solem, C., Petranovic, D. & Jensen, P. R. Sugar starvation and respiration increases the energy efficiency in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *in preparation*.

Solem, C., Koebmann, B., Yang, F., & Jensen P.R. The *las* enzymes control the maltose fermentation in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, *submitted*.

Postere og resultater præsenteret ved kongresser og konferencer:

8th Symposium on Lactic Acid Bacteria. Genetics, Metabolism and Applications. Egmond an Zee, Holland, 28. august – 1. september 2005.

Posterpræsentationer: 1. Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P.R.: Control analysis as a tool to understand the formation of the *las* operon in *Lactococcus lactis*., **2. Solem, C., Koebmann, B. & Jensen, P.R.:** Triosephosphate isomerase has no control on the glycolytic flux and metabolic shift in *Lactococcus lactis*.

12th European Congress on Biotechnology. Bringing Genomes to Life. København, 21.-24. august 2005.

Posterpræsentationer: 1. Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P.R.: Control analysis as a tool to understand the formation of the *las* operon in *Lactococcus lactis*., **2. Solem, C., Koebmann, B. & Jensen, P.R.:** Triosephosphate isomerase has no control on the glycolytic flux and metabolic shift in *Lactococcus lactis*.

3rd Symposium on Food Microbiology. Gl. Avernæs, Fyn, 17.-18. maj, 2005.

Mundtlig og posterpræsentation (C. Solem): The mixed acid shift in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363.

Posterpræsentationer: 1. Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P.R.: Control analysis as a tool to understand the formation of the *las* operon in *Lactococcus lactis*., **2. Solem, C., Koebmann, B. & Jensen, P.R.:** Triosephosphate isomerase has no control on the glycolytic flux and metabolic shift in *Lactococcus lactis*.

11th International Meeting on BioThermoKinetics. Developing Concepts for Systems Biology. Oxford, England, 3.-6. september 2004.

Mundtlig præsentation (B. Koebmann): Sugar starvation and respiration improves the efficiency of energy metabolism in *Lactococcus lactis*.

Posterpræsentation: Koebmann, B., Solem, C. & Jensen, P.R.: Control analysis as a tool to understand the formation of the *las* operon in *Lactococcus lactis*.

2rd Symposium on Food Microbiology. Gl. Avernæs, Fyn, 18.-19. maj, 2004.

Mundtlig og posterpræsentation (B. Koebmann): Starvation and respiration improves the efficiency of energy metabolism in *Lactococcus lactis*.

Point-, midtvejs- og afsluttende projekter udført på BioCentrum-DTU under samarbejdsprojektet:

Stenvall, D., Vynne, N. & Kyhl, T. (2003) Undersøgelse af den glykolytiske flux i *Lactococcus lactis*. Kemisk og Bioteknologisk Fagpakkeprojekt.

Richardt, M. (2004) Control analyse af phosphoglyceratkinase og aldolase i *Lactococcus lactis*. Diplomingeniørprojekt.

Hardarson, G. (2004) Control analysis of F-1,6 bisphosphate aldolase. International masterprojekt.

Hansen, L. B. (2004) Control analysis of phosphofruktokinase in *Lactococcus lactis*. Civilingeniørprojekt.

Hansen, L. B. (2004) Metabolite measurements in PFK mutants. Specialeprojekt.

Bækdahl, E. (2004) The effect of lactic acid stress on the energy metabolism of *Lactococcus lactis*. Civilingeniørprojekt.

Alstrup, L. (2005) Undersøgelse af β -PGM i *Lactococcus lactis*. Laborantprojekt.

Larsen, N.B. (2005) Transcriptome and proteome analysis in *Lactococcus lactis*: Preliminary studies. Civilingeniørforprojekt.

Larsen, N. B. (2006) Proteomic- and transcriptomic analysis of *Lactococcus lactis*. Civilingeniørprojekt.

Yang, F. (2005) Carbohydrate metabolism in *Lactococcus lactis* with focus on the enzyme phosphoglucose isomerase. International masterprojekt (forprojekt).

Yang, F. (2006) Carbohydrate metabolism in *Lactococcus lactis* with focus on the enzyme glucokinase. International masterprojekt (afgangsprojekt).

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

I forbindelse med et samarbejde med Lars Axelsson fra Matforsk i Norge har vi i 2 omgange haft besøg af en ph.d.-studerende, Ida Rud fra Matforsk. Peter Ruhdal Jensen har desuden besøgt Matforsk og fremlagt bla. resultater fra nærværende projekt ved et seminar.

I forbindelse med samarbejde med Pierre Renault, INRA, Jouy-en-Josas, paris, omkring sukkertransport i *Lactococcus lactis* har vi flere gange haft besøg af Dina Petranovic fra P. Renaults gruppe samt Pierre Renault selv. Dina Petranovic var efterfølgende i en periode ansat som postdoc på projektet, og hun og hendes mand, Ivan Mijakovic, er pt. ansat ved DTU-Biocentrum på andre projekter.

10. Samarbejdsrelationer nationalt og internationalt.

Der har i løbet af projektet været samarbejde med Lars Axelsson fra Matforsk i Norge omkring glykolyse og ATP-hydrolyse i *Lactobacillus plantarum* og *sakei* samt udvikling af syntetiske promoter-biblioteker til disse organismer. En artikel er publiceret (Rud et al., 2006) og yderligere en er undervejs.

Der har i sær gennem den første del af projektet været samarbejdet med Pierre Renault, INRA, Jouy-en-Josas, Paris, omkring sukkertransport i *Lactococcus lactis*.

Der er blevet etableret samarbejde med en forskningsgruppe på Universidade Nova de Lisboa, Portugal, repræsenteret af Helena Santos (gruppeleder) og Ana Rute Neves. Denne gruppe er eksperter i *in vivo* NMR-bestemmelser af intracellulære metabolitter og mælkesyrebakteriers fysiologi. Samarbejdet blev opstartet omkring *in vivo* NMR-studier i Portugal af udvalgte stammer fra vores biblioteker med modulerede aktiviteter af glykolytiske enzymer, samt for stammer med introduceret ATPase-aktivitet, men har i skrivende stund endnu ikke givet afkast i form af publikationer.

I forbindelse med udviklingen og anvendelsen af DNA-array til transkriptomarbejdet blev der etableret samarbejde med Hanne Østergaard Jarmer, Center for Biologisk Sekvensanalyse, DTU, som har stor ekspertise i arbejdet med DNA-array, hvad angår såvel det praktiske arbejde samt fortolkningen af data fra transkriptomanalyser. Hanne Ø. Jarmer gik i 2005 på barselsorlov og vente først tilbage i sidste halvår af projektet, hvilket var medvirkende til at transkriptomanalyserne ikke kunne fuldføres i projektperioden.

En vigtig brik i projektet er computermodellering af de opnåede eksperimentelle data, og vi aftalte at samarbejde med flere grupper omkring dette, bl.a. Bas Teusink fra Wageningen Center

for Food Science og Jacky Snoep og Johann Rohwer fra University of Stellenbosch. Dette arbejde er i skrivende stund igangværende via eksisterende personale hos samarbejdspartnerne.

11. Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribrug

Projektet åbner mulighed for skræddersyning af starterkulturer til mejeriindustrien med nye og forbedrede egenskaber, hvilket på længere sigt kan få betydning for dansk mejeriindustri konkurrencedygtighed på eksisterende og nye markeder.

Resultaternes betydning for mejeriindustrien ligger formodentlig et stykke ud i fremtiden men resultater omkring kontrol af produkt-dannelsen i starterkulturer vil kunne bidrage til hurtigere syring, mere sikre mejeriprodukter, bedre styring af mejeriprocesser og udvikling af nye produkter med ændret smag og aroma.

Projektet har medført en opbygning af stærke kompetencer inden for molekylær genetik, globale analysemetoder, kontrolanalyse og systembiologi.

Den i projektet opbyggede samling af genetiske mutanter har et enormt uudnyttet potentiale for at bibringe os yderligere information om glykolysens regulering. Således har flere internationale forskningsgrupper udtrykt interesse for samarbejde omkring yderligere undersøgelser og fremtidige projekter på dette område vil kunne opnå meget store yderligere landvindinger på grundlag af denne mutant samling uden at skulle investere en masse tid i mutant konstruktioner.

I forbindelse med analyse af fluxkontrol, sådan som det er blevet udført i det nærværende projekt, var enzymaktiviteter og metaboliske fluxe de vigtigste parametre og variable, der skulle registreres. Men projektet har også vist, at når det handler om laktokkernes mekanismer til regulering af metabolismen, er det måske i højere grad metabolit-pools og deres indflydelse på enzymaktiviteter, der skal i fokus. Fremtidige projekter, som tager afsæt i det nærværende projekt og den eksisterende mutantsamling, bør derfor sætte yderligere fokus på andre aspekter af cellens mekanismer til regulering af syrningsaktivitet, såsom *in vivo* kinetik, betydningen af kovalente modifikationer af proteiner og adaptiv evolution.

12. Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter.

Projektet er beslægtet med projekterne ”Diagnosticering af bakteriofaginficerede celler i mejeriprocesser” og ”Fermentering af mælk, kortlægning ud fra fysiologiske ændringer i *Lactococcus lactis*, undersøgt ved DNA mikroarray og proteomanalyse” idet projektet i lighed med disse projekter har anvendt globale analysemetoder og analyse af cellernes vækstfysiologi samt det nye projekt, ”Starterkulturers fysiologiske og genetiske status som indikator for

modningsforløb i ost” som i lighed med nærværende projekt benytter syntetiske promotor biblioteker til modulering af genekspression samt metabolisk kontrolanalyse.

Lyngby, d. 16-04-2007

Peter Ruhdal Jensen

