

University of Groningen

Engineering of sugar metabolism in *Lactococcus lactis*

Pool, Weia Arianne

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2008

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Pool, W. A. (2008). *Engineering of sugar metabolism in Lactococcus lactis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR NIET-INGEWIJDEN

Dit hoofdstuk is bedoeld voor iedereen die geen kaas heeft gegeten van moleculaire biologie. In dit hoofdstuk wil ik duidelijk maken wat het doel was van mijn laboratorium werk en wat de behaalde resultaten zijn.

Bacteriën

Tijdens mijn promotieonderzoek bij de vakgroep moleculaire genetica in Haren heb ik gewerkt met bacteriën. Bacteriën zijn de oudste levensvormen op aarde. De evolutietheorie start met het ontstaan van deze eencellige organismen, waaruit vervolgens over een tijd van miljarden jaren al het andere leven is ontstaan. Bacteriecellen zijn bijna altijd tussen de 1 en 20 micrometer (1 micrometer is een duizendste millimeter) klein en ze zijn met het blote oog dus niet te zien. Hierdoor zijn ze pas ontdekt in 1676 door de Nederlandse bioloog Antonie van Leeuwenhoek toen hij door zijn zelf ontworpen microscoop keek. Inmiddels zijn er vele soorten bacteriën bestudeerd, hoewel het grootste deel van de bacteriesoorten nog niet bekend is, omdat deze onder laboratoriumcondities niet te kweken zijn. Er zijn heel veel verschillende soorten bacteriën en elke soort heeft zich aangepast aan de specifieke leefomgeving waarin ze leeft. Er zijn bacteriën die kunnen leven onder zeer extreme condities zoals bij hoge temperaturen in heet water bronnen, onder hoge druk diep in de oceaan, of bij hoge zoutconcentraties. Maar er zijn ook bacteriën die prima groeien onder (voor ons) normalere omstandigheden, bijvoorbeeld in tuinaarde, in ons maagdarm systeem, of in het vaatdoekje op het aanrecht. Er zijn bacteriën die gevaarlijk kunnen zijn voor ons mensen, zoals *Streptococcus pneumoniae* die tot een longontsteking kan leiden of *Salmonella* soorten die een dunne darm infectie kunnen veroorzaken. Maar er zijn ook vele onschadelijke bacteriën, die zelfs door ons gebruikt kunnen worden bijvoorbeeld in de voedingsmiddelenindustrie.

Gebruik micro-organismen in de voedingsmiddelenindustrie

In de voedingsmiddelenindustrie wordt al eeuwenlang op grote schaal gebruik gemaakt van bacteriën en andere micro-organismen zoals gist. De eencellige gist (*Saccharomyces cerevisiae*) zorgt al eeuwen voor de productie van alcohol tijdens het vergisten van bieren en wijnen. Tevens produceert gist het gas koolstofdioxide (CO₂) waar gebruik van wordt gemaakt bij het maken van een luchtig brood. Diverse *Lactobacillus* soorten worden gebruikt voor het produceren van gefermenteerde

producten zoals salami en zuurkool. De bacteriën *Streptococcus thermophilus* en *Lactobacillus bulgaricus* worden samen gebruikt voor de productie van yoghurt uit melk. Deze bacteriën worden toegevoegd aan de melk waar ze melkzuur (lactaat) produceren uit melksuiker (lactose). Deze bacteriën worden melkzuurbacteriën genoemd. De productie van melkzuur resulteert in een snelle verzuring van het product en dat draagt bij aan de smaak. Door deze snelle verzuring wordt tevens de groei van andere (mogelijk schadelijke) bacteriën voorkomen. Voor de productie van kaas worden ook melkzuurbacteriën gebruikt. Na pasteurisatie van de melk wordt er zuursel en stremsel aan de melk toegevoegd. Het zuursel bestaat uit een combinatie van melkzuurbacteriën, en zorgt voor een specifieke smaak en textuur van de kaas. Bij gebruik van een bacterie die CO₂ produceert ontstaan er bijvoorbeeld gaten in de kaas. Tevens zorgt het zuursel voor een snelle verzuring van de melk, waardoor de kaas langer houdbaar wordt. Naast het gebruik van melkzuurbacteriën voor het produceren van bepaalde voedingsmiddelen, worden ze tegenwoordig ook toegevoegd aan producten om te dienen als probiotica. Een probioticum is een levend microbiologisch voedingssupplement, dat de gezondheid van de gastheer bevordert door het microbiële evenwicht in de darmen te verbeteren. Van deze probiotische (zuivel)producten zijn tegenwoordig vele varianten op de markt, waarvan de meeste een verbeterde stoelgang of een verhoogde weerstand claimen.

Lactococcus lactis als melkzuurfabriekje

De bacterie die voornamelijk is gebruikt voor het werk beschreven in dit proefschrift draagt de naam *Lactococcus lactis*. *L. lactis* is een melkzuurbacterie en wordt gebruikt voor de productie van kaas en andere zuivelproducten. Deze bacterie groeit het liefst bij een temperatuur van 30°C in een omgeving met weinig zuurstof. Hiernaast wordt *L. lactis* tevens veelvuldig gebruikt voor wetenschappelijke vraagstukken omdat *L. lactis* gemakkelijk en snel te kweken is onder laboratoriumcondities, en omdat de bacterie een relatief simpel metabolisme heeft. Metabolisme is het totaal aan chemische omzettingen dat plaatsvindt in de cel, ook wel de stofwisseling genoemd. *L. lactis* is een soort melkzuurfabriekje. De bacterie breekt suiker af tot melkzuur waarbij energie vrij komt voor de bacterie om te groeien. Er zijn verschillende soorten suikers (sacchariden), bijvoorbeeld glucose, galactose en lactose. Glucose en galactose bestaan uit één koolstofring en heten ook wel monosaccharides. Lactose is een disaccharide en bestaat uit twee koolstofringen, namelijk een glucose en een galactose deel. Bij de afbraak van lactose ontstaan dus glucose en galactose. In aanwezigheid van diverse soorten

suiker zal *L. lactis* eerst zijn meest favoriete suiker afbreken, voordat een andere suiker aan de beurt komt. Glucose is de meest favoriete suiker van *L. lactis*, en heeft de voorkeur boven galactose, lactose en alle andere suikers. De afbraak van suikers verloopt via diverse stappen. Elke stap wordt uitgevoerd met behulp van een enzym dat een bepaalde reactie katalyseert. Elk organisme produceert een bepaald aantal specifieke enzymen. Welke enzymen kunnen worden geproduceerd is afhankelijk van het erfelijke materiaal (DNA) van het organisme.

Van DNA naar eiwit

In het DNA staat aan de hand van een vier-letterige code alle genetische informatie van een organisme beschreven, en vormt dus een soort blauwdruk. Het totale DNA van *L. lactis* bestaat uit 2.500.000 lettertjes (nucleotiden), en hierin worden bijna 2500 genen beschreven. Elk gen kan worden afgeschreven tot RNA. Dit RNA kan vervolgens worden afgelezen tot een eiwit, zoals een enzym. Niet alle genen in het DNA worden even vaak afgeschreven. Dit is afhankelijk van de enzymen die het organisme op dat moment nodig heeft en is dus een sterk gereguleerd proces. Op het DNA ligt voor elk gen een zogenaamde promotor. Hier kunnen vaak verschillende moleculen aan binden, wat kan leiden tot activatie of inhibitie van het gen. Dit promotor-gebied fungeert dus als een soort aan/uit-knop voor het afschrijven van het gen. Als glucose aanwezig is, worden de enzymen voor de afbraak van glucose door *L. lactis* aangemaakt en tegelijkertijd wordt de productie van enzymen voor de afbraak van andere suikers geremd, zodat geen energie onnodig door de bacterie wordt verspeeld.

'Metabolic engineering'

Het doel van dit onderzoek was om inzicht te verkrijgen in een aantal metabole processen van *L. lactis*. Er werd specifiek gekeken naar het metabolisme van glucose, galactose en lactose. Welke genen spelen hierbij een rol en wat zijn de eigenschappen van de betrokken enzymen? Hiernaast wilden we het metabolisme van de bacterie aanpassen naar onze wensen, door de bacterie genetisch te bewerken, ook wel 'metabolic engineering' genoemd. Door middel van moleculair biologische technieken zijn genen in *L. lactis* te manipuleren. Het is bijvoorbeeld mogelijk specifieke genen uit te schakelen door aan de genetische code te sleutelen. De code kan worden veranderd door slechts één lettertje te veranderen, of door een heel stuk van het gen weg te halen, waardoor er geen functioneel genproduct (eiwit) wordt gemaakt. Het is ook mogelijk om genetische informatie toe te voegen, waardoor de bacterie een extra genproduct gaat maken. Hiernaast kan

ook de promotor van een gen worden veranderd, waardoor het gen op een andere manier gereguleerd kan worden.

Wat waren onze wensen en waarom

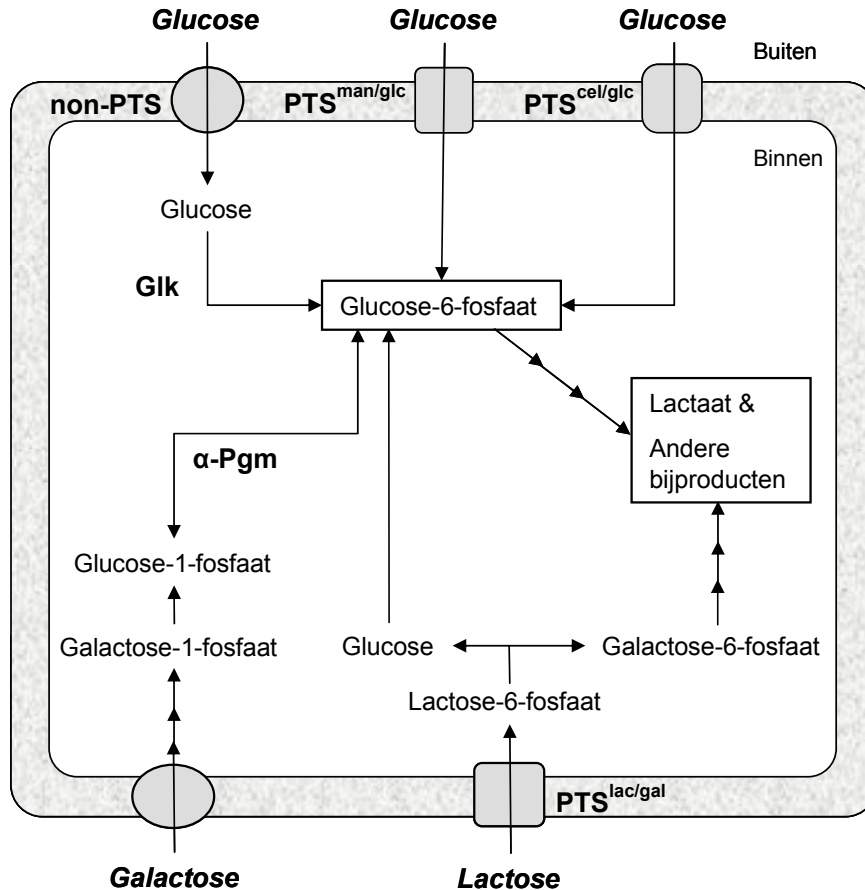
De wensen die we hadden zijn beschreven in een project genaamd 'Nutracells', gesubsidieerd door de Europese Unie. De term Nutracells is afgeleid van Nutraceuticals, wat een samenvoeging is van 'nutritional' en 'pharmaceutical'. De definitie van een 'nutraceutical' is: voeding of een voedingssupplement dat gezondheidsbevorderende eigenschappen bezit, en kan helpen bij het behandelen van een ziekte. De gezondheidsproblemen waar dit onderzoek aan is ontleend zijn de stofwisselingsziekten lactose intolerantie en galactosemie. Personen die last hebben van lactose intolerantie kunnen de melksuiker lactose niet verteren. Het gen dat codeert voor het enzym lactase, nodig voor de afbraak van lactose tot galactose en glucose, is niet functioneel. Lactose intolerante individuen kunnen voedsel waar lactose in zit niet eten, anders krijgen ze last van winderigheid en diarree. Galactosemie is een stofwisselingsziekte waarbij een enzym nodig voor het verteren van galactose ontbreekt. Hierdoor stapelt het toxische stofje galactose-fosfaat zich op in het lichaam, wat o.a. leidt tot problemen in de hersenen, nieren en darmen. Personen die lijden aan galactosemie zijn gebonden aan een levenslang dieet zonder lactose en galactose. Gedurende dit onderzoek is geprobeerd om de melkzuurbacterie *L. lactis* genetisch zo te bewerken dat de afbraak van glucose metabolisme wordt geblokkeerd en dat het metabolisme van galactose en lactose wordt opgeschroefd. De kennis die op deze manier werd verkregen kan in de zuivelindustrie worden gebruikt voor het uiteindelijk produceren van zuivelproducten zonder of in ieder geval met minder lactose en/of galactose. In Nederland mogen de door ons genetisch gemodificeerde bacteriën (nog) niet in de voedingsmiddelenindustrie worden gebruikt op dit moment. We kunnen met behulp van deze genetische experimenten wel laten zien wat er in de bacterie metabolisch gezien mogelijk is, zodat industriële partners kunnen proberen bacteriën met dezelfde eigenschappen te verkrijgen door ze gericht te kweken zonder genetische modificatie toe te passen.

Behaalde resultaten

Glucose, galactose en lactose worden opgenomen in de bacterie-cel met behulp van specifieke transport eiwitten. Daarna worden bijna alle suikers omgezet tot glucose-6-fosfaat. Vanaf glucose-6-fosfaat verloopt de afbraak voor alle suikers via dezelfde route, de zogenaamde glycolyse. Om specifiek de afbraak van glucose te

blokkeren, hebben we in *L. lactis* gekeken naar de eerste stappen in het metabolisme van glucose. Allereerst moet glucose de cel in worden getransporteerd en dit kan op twee manieren. Het kan worden opgenomen door een zogenaamde PTS transporter, die de glucose de cel importeert en er gelijk een fosfaatgroep aan vast zet, of door een non-PTS transporter die glucose importeert waarna het nog moet worden gefosforyleerd door een enzym genaamd glucokinase. Voor een overzicht, zie figuur 1. Het gen dat codeert voor de non-PTS transporter was niet bekend, dus om deze glucose afbraak route te blokkeren hebben we het gen dat codeert voor glucokinase (*glk*) in *L. lactis* uitgeschakeld. Om de PTS-route te blokkeren hebben we de bekende PTS transporter ($\text{PTS}^{\text{man/glc}}$) weggehaald. Op basis van reeds bekende literatuur dachten we dat *L. lactis* zonder glucokinase en $\text{PTS}^{\text{man/glc}}$ (glk^- , $\text{PTS}^{\text{man/glc}-}$) geen glucose meer zou kunnen afbreken. Tot onze verbazing kon *L. lactis* (glk^- , $\text{PTS}^{\text{man/glc}-}$) wel degelijk op glucose groeien, wat betekende dat er nog een andere PTS transporter aanwezig moest zijn in *L. lactis* die glucose kon importeren. De volgende stap was om uit te zoeken welk gen codeert voor deze transporter. We gingen er vanuit dat de nog onbekende glucose-specifieke PTS transporter opgereguleerd zou worden in *L. lactis* (glk^- , $\text{PTS}^{\text{man/glc}-}$), om in de afbraak van glucose te kunnen voorzien. Door het totale RNA van *L. lactis* (glk^- , $\text{PTS}^{\text{man/glc}-}$) en de moederstam te vergelijken, en te kijken welke genen in *L. lactis* (glk^- , $\text{PTS}^{\text{man/glc}-}$) hoger tot expressie kwamen, verkregen we een aantal potentiële genen die betrokken zouden kunnen zijn bij glucose transport. Eén van deze genen stond bekend als een PTS transporter specifiek voor de suiker cellobiose (PTS^{cel}). Dit was een goede kandidaat om mogelijk ook glucose te transporteren. Vervolgens werd een *L. lactis* stam gekloneerd waarin de genen coderend voor glucokinase, $\text{PTS}^{\text{man/glc}-}$, en PTS^{cel} uitgeschakeld waren. Deze stam bleek niet meer in staat om glucose af te breken en werd daarom glucose-negatief (Glc^-) genoemd. Hieruit werd geconcludeerd dat PTS^{cel} glucose kon transporteren, en deze transporter werd hernoemd tot $\text{PTS}^{\text{cel/glc}}$. Verschillende mutanten werden gemaakt waarbij de verschillende transport systemen afzonderlijk werden uitgeschakeld. De drie verschillende glucose transport systemen zelf (non-PTS, $\text{PTS}^{\text{man/glc}}$, $\text{PTS}^{\text{cel/glc}}$) en het effect van het gebruik van deze verschillende systemen op het metabolisme van glucose werd vervolgens uitgebreid gekarakteriseerd, om meer te weten te komen over glucose metabolisme in *L. lactis*. Hiervoor werden verschillende technieken gebruikt waaronder Nucleaire Magnetische Resonantie (NMR), waarmee een specifiek gelabeld koolstof atoom (het kleinst mogelijke deeltje) in de loop van de tijd gevolgd werd. De vakgroep “cel fysiologie en NMR” onder leiding van Prof. Dr. Helena Santos, gelokaliseerd in Oeiras, Portugal, heeft deze techniek in de afgelopen tien jaar geoptimaliseerd voor het volgen van

suikermetabolisme in *L. lactis*. Eén glucose molecuul bestaat uit 6 koolstof (C), 6 zuurstof (O), en 12 waterstof (H) atomen. Glucose wordt afgebroken zoals in figuur 1 is beschreven. Door gebruik te maken van een gelabeld C-atoom in glucose kan met behulp van NMR worden bepaald via welke stoffen dit C-atoom wordt overgedragen en wat de eindproducten van de afbraak van glucose uiteindelijk zijn.



Figuur 1: overzicht glucose, galactose en lactose opname en metabolisme door een *L. lactis* cel. Glucose kan worden opgenomen en gefosforyleerd tot glucose-6-fosfaat door twee verschillende PTS-transporters ($\text{PTS}^{\text{man/glc}}$ en $\text{PTS}^{\text{cel/glc}}$), of het wordt opgenomen door een non-PTS transporter gevolgd door fosforylatie door glucokinase (Glk) in de cel. Galactose wordt voornamelijk opgenomen door een galactose transporter, waarna het wordt afgebroken tot glucose-6-fosfaat via galactose-1-fosfaat en glucose-1-fosfaat. Het enzym α -phosphoglucomutase (α -Pgm) speelt hierbij een belangrijke rol. Lactose wordt opgenomen door $\text{PTS}^{\text{lac/gal}}$ en in de cel gesplitst in glucose en galactose-6-fosfaat. Uiteindelijk wordt alles afgebroken tot lactaat en mogelijk enkele andere bijproducten, afhankelijk van de groeiomstandigheden.

De genen nodig voor de afbraak van lactose werden toegevoegd aan de glucose-negatieve stam van *L. lactis*. Deze stam (*L. lactis* Glc⁻Lac⁺) kon groeien in een omgeving met lactose als enige suikerbron, waarbij alleen het galactose-deel van lactose werd verteerd. Het glucose-deel van lactose kon niet door deze stam worden afgebroken en werd door de cel uitgescheiden. De uitgescheiden glucose zou kunnen worden gebruikt als natuurlijke suiker in fermentaties, waardoor er minder of geen extra suiker aan het product hoeft te worden toegevoegd. Als *L. lactis* wordt gebruikt voor fermentaties is de zuurgraad meestal de limiterende factor voor de groei. De fermentatie begint vaak met een neutrale pH van ongeveer 6,5. *L. lactis* stopt met groeien als de pH in zijn omgeving beneden de 4,2 komt. Zoals al eerder gezegd zorgt *L. lactis* zelf voor de verzuring van zijn omgeving door de productie van melkzuur. Doordat *L. lactis* Glc⁻Lac⁺ alleen het galactose-deel van lactose kan afbreken tot lactaat, kan deze stam dus twee keer zoveel lactose afbreken dan de moederstam van *L. lactis* voordat de groei wordt geremd door de verlaagde pH. Dit verhoogde lactose verbruik leidt dus tot een verlaagde lactose concentratie aan het eind van de fermentatie. Dit hebben we aangetoond voor *L. lactis* Glc⁻Lac⁺ onder laboratorium condities. *L. lactis* Glc⁻Lac⁺ is naast in laboratorium medium ook gekweekt in magere melk en hierin werden dezelfde resultaten behaald. *L. lactis* Glc⁻Lac⁺ is dus een zeer bruikbare stam om gefermenteerde melkproducten met minder lactose te verkrijgen.

Hiernaast hebben we geprobeerd een *L. lactis* stam te “engineeren” waarbij de afbraak van galactose zou worden gestimuleerd. Galactose wordt geïmporteerd in de cel door een galactose transporter, en vervolgens via een reeds bekende route afgebroken (zie figuur 1) tot glucose-6-fosfaat. De genen die coderen voor de betrokken enzymen worden gereguleerd. Als er glucose aanwezig is, worden de genen voor de afbraak van galactose niet afgeschreven. Wij hebben een extra kopie van een aantal van deze genen in *L. lactis* gezet, met een aangepaste promotor. Deze alternatieve promotor konden we zelf aanzetten, door het stofje nisine toe te voegen aan het groeimedium. Echter, toen we de galactose genen activeerden, nam de bacteriegroei af en er werd juist minder snel galactose afgebroken. De reden hiervoor bleek een opeenhoping van galactose-fosfaat en glucose-fosfaat te zijn; deze stoffen zijn in hoge concentraties toxisch voor de bacterie. In de route voor galactose-afbraak zat dus ergens een enzymatische stap die de bottleneck in de route vormde waardoor deze suiker-fosfaten accumuleerden. De bottleneck bleek te liggen bij het enzym alfa-phosphoglucomutase (α -pgm), die de omzetting van glucose-1-fosfaat naar glucose-6-fosfaat katalyseert.

Om deze bottleneck te verhelpen werd geprobeerd om naast de activatie van de galactose genen, α -pgm hoger tot expressie te brengen in *L. lactis*. Omdat het gen dat codeert voor α -pgm in *L. lactis* niet bekend was, werd het gen voor α -pgm van een andere melkzuurbacterie (*Streptococcus thermophilus*) gebruikt. Overexpressie van de α -pgm van *S. thermophilus* samen met de galactose genen van *L. lactis* in *L. lactis* leidde tot een snellere galactose opname vergeleken met de moederstam van *L. lactis* zonder gen-overexpressies.

Omdat het voor kloneringen in de toekomst handig was om de α -pgm van *L. lactis* zelf te gebruiken, en tevens uit pure fundamentele interesse, werd geprobeerd het gen dat codeert voor α -pgm in *L. lactis* op te sporen. Hiervoor werden diverse strategieën gebruikt. Uiteindelijk bleek de biochemische methode waarbij de activiteit van α -pgm werd geïsoleerd succesvol. Gen *yfgH* (een gen-naam beginnend met een y staat voor een gen waarvan de functie nog niet bekend is) bleek te coderen voor het enzym α -pgm en gen *yfgH* werd daarom hernoemd tot gen *pgmH*. Gen *pgmH* is het enige gen in *L. lactis* dat codeert voor een α -pgm, aangezien we hebben aangetoond dat een *L. lactis* stam waarin *pgmH* is uitgeschakeld niet meer kan groeien op galactose. Vervolgens werd de α -pgm van *L. lactis* uitgebreid gekarakteriseerd. De optimale pH en de specificiteit van het enzym werden bepaald, evenals mogelijke factoren die van invloed zouden kunnen zijn op de activiteit van het enzym, zoals de aanwezigheid van een aantal mineralen. De α -pgm van *L. lactis* bleek een uniek enzym te zijn, niet vergelijkbaar met enzymen met dezelfde functie in homologe bacteriën, en er wordt daarom nog verder onderzoek naar gedaan.

Al met al zijn er veel fundamentele vragen betreffende glucose, galactose en lactose metabolisme in *L. lactis* beantwoord door dit onderzoek. Hiernaast zijn er een aantal nieuwe vraagstukken bijgekomen, die door vervolgonderzoek zullen moeten worden opgelost. Er zijn een aantal zeer interessante *L. lactis* stammen gekloneerd, die gebruikt zouden kunnen worden voor het produceren van zuivelproducten met minder lactose en galactose en voor het gebruik van glucose als natuurlijke zoetstof in zuivelproducten. De resultaten zijn in dit hoofdstuk niet in detail besproken. Bent u geïnteresseerd geraakt dan verwijs ik u voor de details door naar de hoofdstukken hiervoor.

