

## Exopolysacharideproductie door *Streptococcus thermophilus*

De exopolysachariden (EPS) die geproduceerd worden door melkzuurbacteriën zijn bijzonder nuttig in gefermenteerde levensmiddelen waarin ze de viscositeit en de rheologie, de textuur en het mondgevoel beïnvloeden. Bovendien worden aan de door melkzuurbacteriën geproduceerde EPS gezondheidsbevorderende eigenschappen toegeschreven zoals de stimulatie van het immuunsysteem en een prebiotisch effect.

*Streptococcus thermophilus* is een thermofiele melkzuurbacterie die, in co-cultuur met *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, gebruikt wordt voor de productie van yoghurt. Teneinde de textuur van op grote schaal geproduceerde roeryoghurt te verbeteren, waterafscheiding te voorkomen en romigere yoghurt te verkrijgen, kunnen EPS-producerende starterculturen toegepast worden. Daar *S. thermophilus* slechts lage hoeveelheden EPS produceert, wordt getracht om de productie op te drijven. Indien in de toekomst een voldoende grote *in situ*-productie van EPS gerealiseerd kan worden, maakt dit het toevoegen van additieven aan yoghurt overbodig.

Deze thesis had tot doel de genclusters betrokken bij het galactosekatabolisme en de EPS biosynthese in *S. thermophilus* te bestuderen en genetisch gemodificeerde *S. thermophilus* stammen te construeren om de regulatie van de EPS biosynthese te achterhalen.

Omdat de EPS precursors in lactose fermenterende *S. thermophilus* stammen gevormd worden van het galactosedeel van lactose, zou een functionele Leloir afbraakweg kunnen leiden tot een hogere EPS productie. De meeste *S. thermophilus* stammen zijn echter galactose negatief (Gal<sup>-</sup>). Tot op heden werd het Gal<sup>-</sup> fenotype uitsluitend toegeschreven aan een defect in het inductiemechanisme van het snelheidsbepalende enzym van de Leloir afbraakweg, GalK. Daar het volledig verbruik van galactose een gewenste eigenschap is in verschillende industriële fermentaties en dus ook tot een hogere EPS productie zou kunnen leiden, werd het galactose katabolisme uitvoerig bestudeerd in een groot aantal *S. thermophilus* stammen. Deze stammencollectie bevatte acht stammen met een galactose-positieve (Gal<sup>+</sup>) fenotype *sensu stricto* en hiervoor werden de fermentatiekarakteristieken en Leloir enzymactiviteiten bepaald. Alhoewel GalT en GalE activiteit voor alle Gal<sup>+</sup> stammen gemeten kon worden, werd GalK activiteit enkel gedetecteerd in twee van de acht Gal<sup>+</sup> stammen, hetgeen suggereert dat de andere zes stammen galactose metaboliseren via een alternatieve route. De *galR-galK* intergenische regio die de *gal* promotor bevat, werd voor alle stammen gesequeneerd en leidde tot acht verschillende nucleotidensequenties. Sequentieanalyse van deze regio toonde aan dat de *gal* promotor een belangrijke rol speelt in het Gal<sup>+</sup> fenotype, doch dit niet uitsluitend bepaalt. Bovendien toonde sequentieanalyse van vier Leloir genclusters aan dat Gal<sup>+</sup> stammen, na translatie van de *gal* genen, meer verschillen bevatten in aminozuursequentie dan Gal<sup>-</sup> stammen.

EPS worden gemaakt door polymerisatie van intracellulair gesynthetiseerde herhalingseenheden. Deze EPS herhalingseenheden worden geassembleerd op een membraangebonden lipidedrager door opeenvolgende additie van suikerresidu's afkomstig van geactiveerde suiker donors (suikernucleotiden) door specifieke glycosyltransferasen (GTF). Tot op heden zijn er negen verschillende EPS herhalingseenheden gekend in *S. thermophilus* maar van enkel drie van deze stammen is ook de nucleotidensequentie van het *eps* gencluster beschikbaar. GTF bepalen de structuur van de EPS herhalingseenheid. Door *eps* genclusters te sequencen van

stammen waarvan de EPS herhalingseenheid gekend is, kan de relatie tussen de aanwezige GTF en de overeenkomstige EPS herhalingseenheid bestudeerd worden. In dit werk werden vier *eps* genclusters van *S. thermophilus* beschreven en vergeleken met de 23 *S. thermophilus eps* genclusters van stammen beschikbaar in de GenBank sequentiedatabank. *In silico* analyse leverde 15 verschillende types van *eps* genclusters op die genen bevatten die coderen voor 70 vermeende GTF waarvan er 54 uniek zijn.

Verskillende genetische constructs werden gemaakt teneinde *epsA* en *epsB*, de regulatorische genen van het *eps* operon, uit te schakelen en zo de regulatie van de EPS biosynthese in *S. thermophilus* te bestuderen. Deze constructs konden echter niet getransformeerd worden in *S. thermophilus*. De aanhoudende transformatieproblemen wijzen erop dat deze stammen zich uiterst moeilijk laten transformeren of dat de transformatie van deze constructs voor *S. thermophilus* lethaal is.