Il metabolismo energetico dei batteri lattici

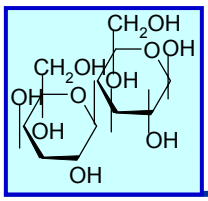
I generi e le specie appartenenti al gruppo dei batteri lattici vengono suddivisi in ulteriori sottogruppi in relazione al tipo di metabolismo energetico che possiedono. Si tratta di un metabolismo fermentativo a partire da monosaccaridi (esosi o pentosi).

genere	*monosaccaride*	*fermentazione*	*pathway*	*prodotto(i) principali*
Lactococcus	**esosi**	**omolattica**	**EMP**	**acido lattico**
Streptococcus	**esosi**	**omolattica**	**EMP**	**acido lattico**
Pediococcus	**esosi**	**omolattica**	**EMP**	**acido lattico**
Leuconostoc	**esosi**	**eterolattica**	**HMS**	**acido lattico CO_2 acetate/etanolo, (1:1:1)**
	pentosi	**eterolattica**	**PP**	**acido lattico acetate/etanolo, (1:1)**
Lactobacillus				
gruppo I	**esosi**	**omolattica**	**EMP**	**acido lattico**
gruppo II	**esosi**	**omolattica**	**EMP**	**acido lattico**
	pentosi	**eterolattica**	**PP**	**acido lattico acetate/etanolo, (1:1)**
gruppo III	**esosi**	**eterolattica**	**HMS**	**acido lattico CO_2 acetate/etanolo, (1:1:1)**
	pentosi	**eterolattica**	**PP**	**acido lattico acetate/etanolo, (1:1)**
Bifidibacterium	**esosi**	**eterolattica**	**BP**	**acido lattico acido acetico, (1:1.5)**

EMP = Embden-Meyerhoff-Parnas;
HMS = hexose monophosphate shunt (phosphogluconate-phosphoketolase)
PP = pentose-phosphate;
BP = bifidus (fructose ketolase)

Gruppi metabolici del genere *Lactobacillus*

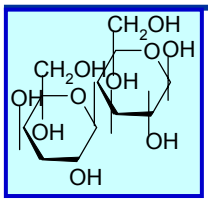
Gruppo I	**Omofermentanti obbligati (acido lattico), non fermentano pentosi. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii, bulgaricus e lactis, L. leichmannii, L. acidophilus, L. helveticus***
Gruppo II	**Omofermentanti facoltativi (acido lattico, acetato, etanolo, CO_2, acido formico), fermentano pentosi. *L. casei* subsp. *casei, rhamnosus e pseudoplantarum, L. plantarum, L. curvatus, L. sake.***
Gruppo III	**Eterofermentatnti obbligati (acido lattico, acetato, etanolo, CO_2, acido formico), fermentano pentosi. *L. fermentum, L. divergens, L. kefir, L. confusus, L. brevis, L. sanfrancisciensis, L. reuteri.***



Meccanismi di trasporto dei nutrienti

Le molecole di nutrienti devono oltrepassare la barriera cellulare costituita sia dalla parete batterica che dalla membrana cellulare che rimane il principale ostacolo al passaggio della maggior parte delle molecole. Molte delle proteine della doppia membrana fosfolipidica cellulare sono proteine di trasporto coinvolte nell'acquisizione di nutrienti o nell'esporto di prodotti finale del metabolismo. In generale, piccole molecole come mono e disaccaridi, amminoacidi e piccoli peptidi (finoa 8-10) amminoacidi sono trasportati senza modifiche all'interno della cellula attraverso a trasportatori specifici. Gli acidi grassi possono invece diffondere liberamente nello strato fosfolipidico, mentre i trigliceridi, i grossi peptidi, le proteine o polisaccaridi non possono essere trasportati all'interno delle cellula. In questo caso, queste molecole complesse potranno essere utilizzate solo se la cellula possiede enzimi idrolitici ancorati alla parete o rilasciati nel mezzo colturale. I mono- e i disaccaridi, gli amminoacidi e i piccoli peptidi sono trasportati attraverso la membrana attraverso a meccanismi di ***trasporto attivo****. Alcune caratteristiche di questa tipologia di trasportatori sono:*

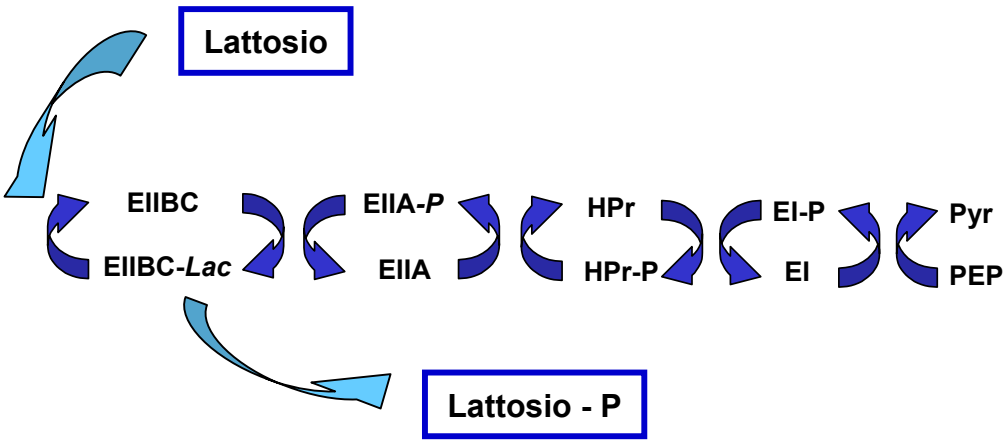
- *possono essere specifici per una molecola o per un gruppo di molecole;*
- *trasportano le molecole anche contro un gradiente di concentrazione;*
- *il processo di trasporto richiede energia.*



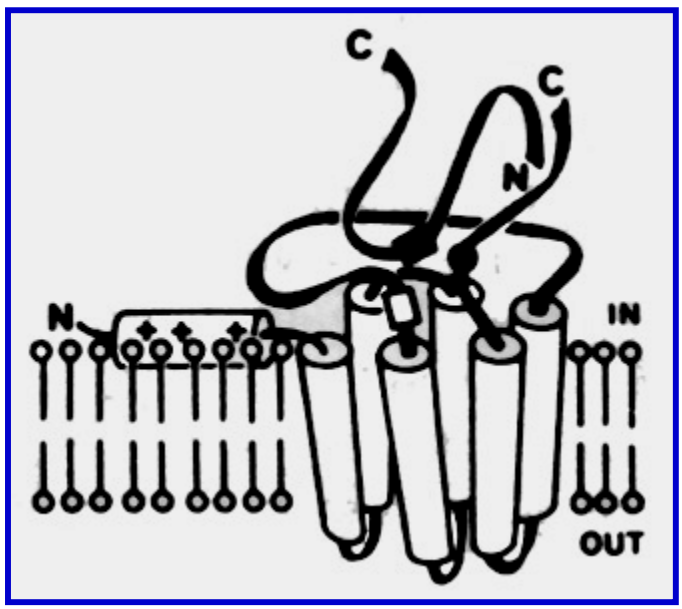
Nei batteri lattici e in altri batteri di interesse alimentare, le molecole di mono- e disaccaridi possono essere trasportati essenzialmente attraverso due sistemi di trasporto denominati ***PEP-PTS*** *e* ***sistema Permeasico****.*

La stessa molecola può essere trasportata attraverso il sistema PEP-PTS in una specie batterica e attraverso il sistema Permeasico in un'altra specie. Analogamente, nella stessa specie batterica alcuni zuccheri vengono trasportati attraverso il sistema PEP-PTS mentre altri mediante il sistema Permeasico.

Il sistema PEP-PTS per il trasporto del lattosio in *Lactococcus lactis*

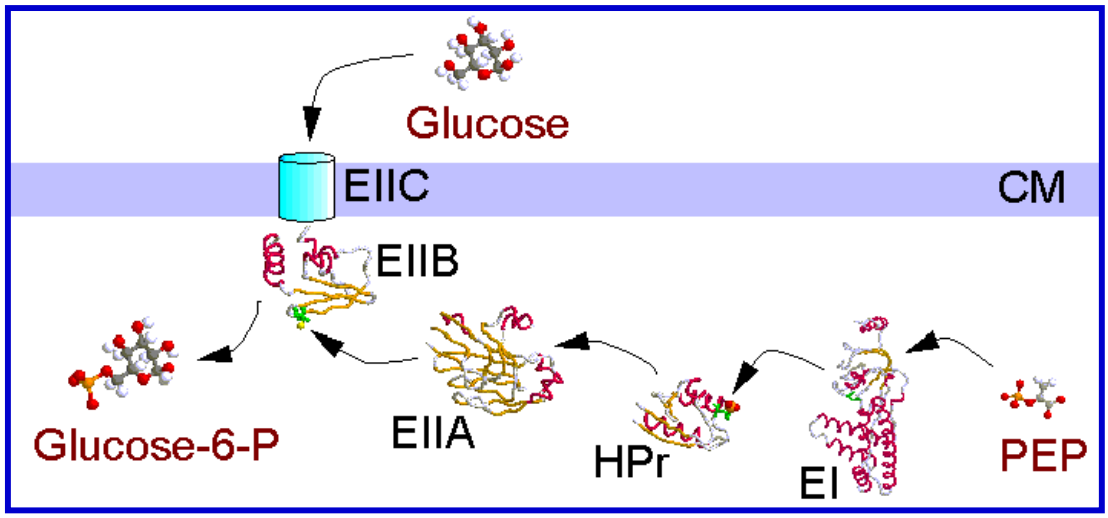


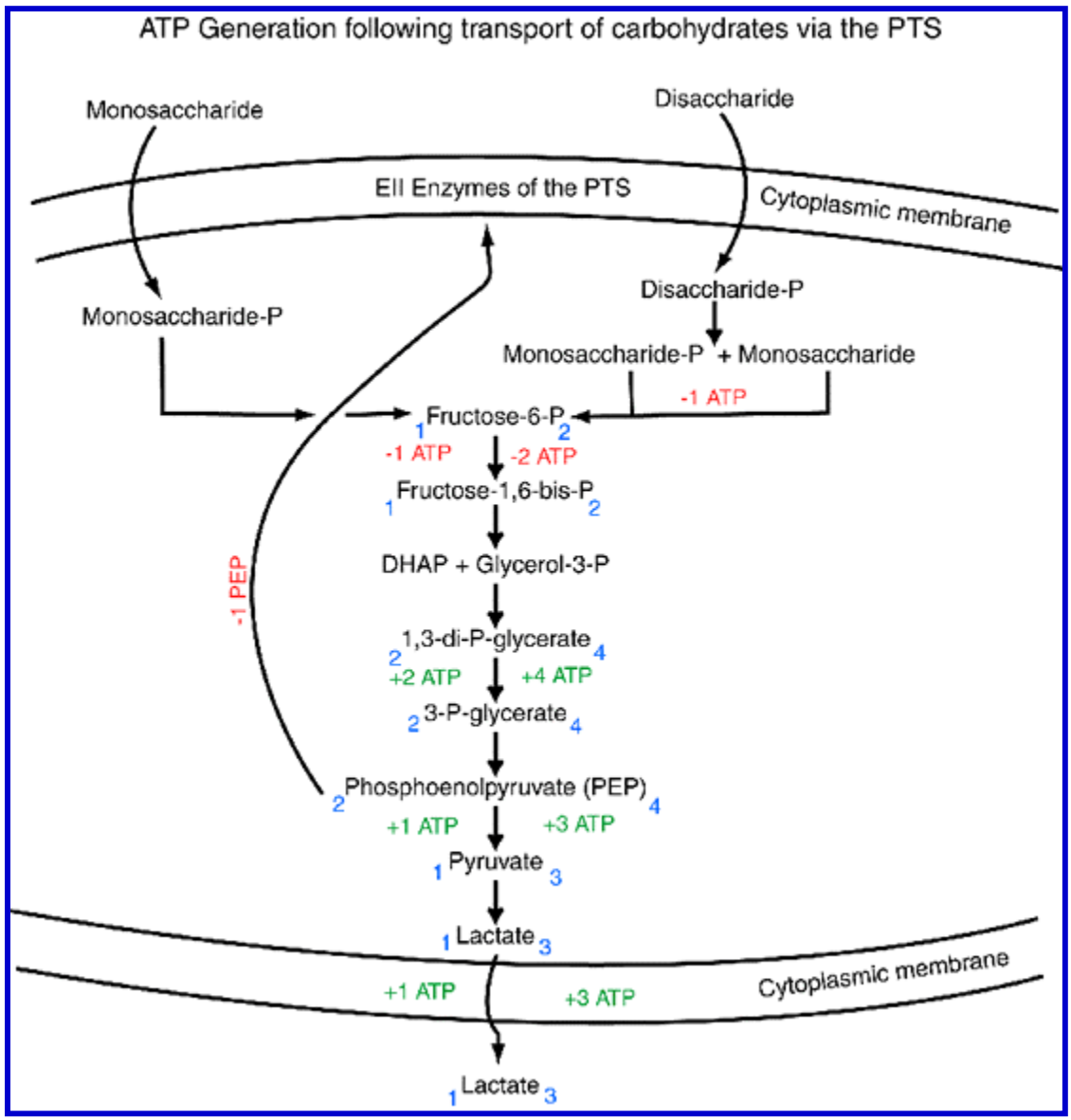
Il legame fosfato ad alta energia del fosfoenolpiruvato è trasferito sequenzialmente da EI *a* Hpr, EIIA *(tutti a livello citoplasmatico e non specifici per il lattosio),* EIIB e EIIC *(entrambe sulla membrana e specifici per il lattosio), e infine al lattosio. Il lattosio viene quindi trasportato nel citoplasma cellulare come* ***lattosio-fosfato****.*



Modello trans-membrana proposto per **EnzII-FacIII.**

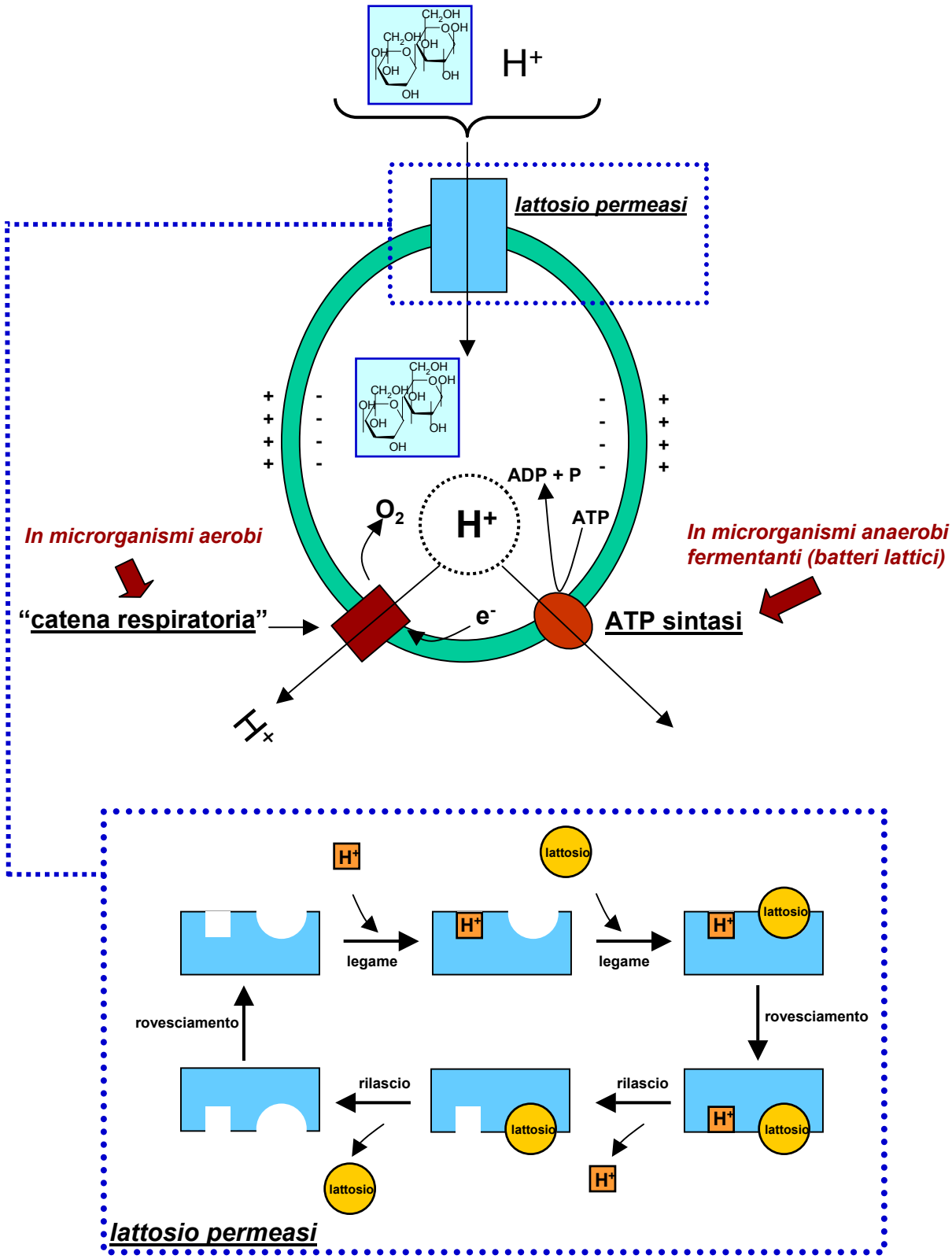
Rappresentazione schematica del funzionamento del sistema PEP-PTS *in E.coli*





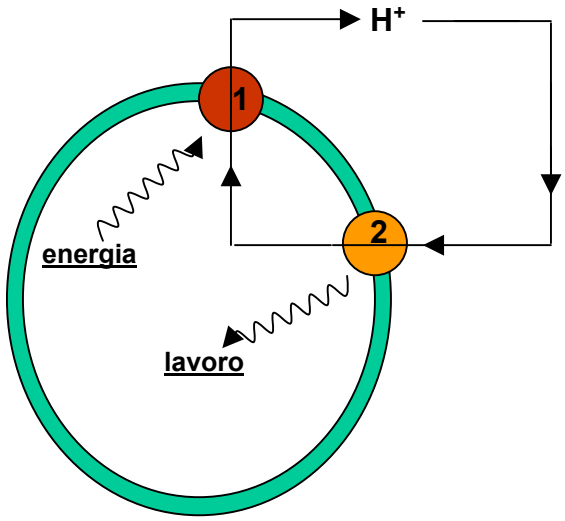
Il sistema Permeasico per il trasporto del lattosio

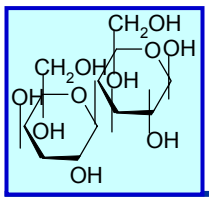
*Il sistema permeasico per il trasporto del lattosio è un **simporto**. Il lattosio trasporta con se un H^+ attraverso una permeasi specifica per il disaccaride. Una volta all'interno della cellula, a causa di un cambiamento di conformazione della permeasi, lattosio e H^+ vengono rilasciati nel citoplasma.*



La forza proton-motrice

La membrana batterica cellulare è attraversata da un vero e proprio circuito protonico. I protoni sono traslocati alla superficie cellulare esterna attraverso sistemi enzimatici (pompe protoniche) che utilizzano energia e ritornano alla cellula attraverso a trasportatori specifici (simporto) che possono anche generare energia (ATPsintasi). L'accumulo di protoni sulla superficie esterna della membrana cellulare determina la formazione di un ***potenziale di membrana****. Nello stesso modo, può formarsi anche un gradiente di pH (acido all'esterno). La cellula può cosi essere paragonata a una "pila" che si carica attraverso la reazione* **1** *e che genera lavoro attraverso la reazione* **2***. La bassa permeabilità ai protoni del doppio strato fosfolipidico della membrana rende ancora più efficiente il sistema, poiché i protoni possono rientrare nella cellula (secondo gradiente) solo attraverso a sistemi che sfruttano il loro passaggio per generare ATP (ATP sintasi).*

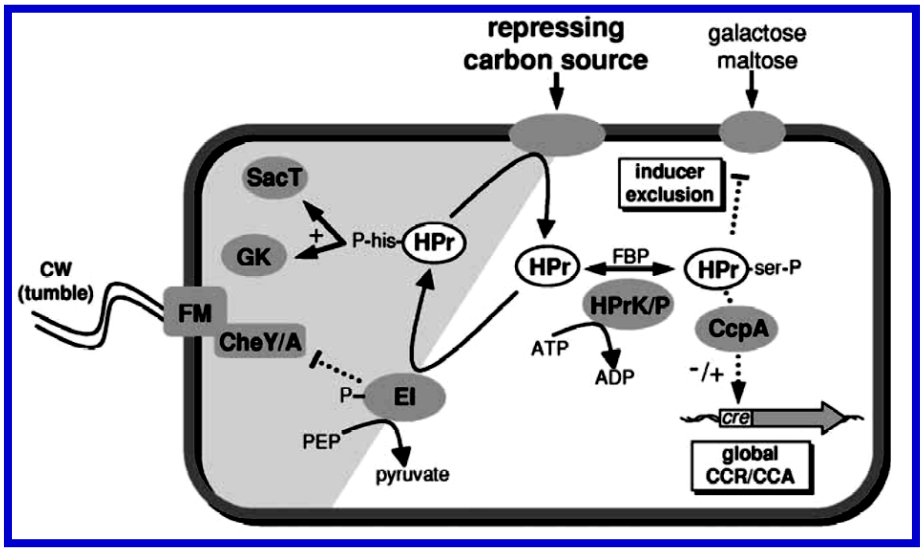




Meccanismi controllo del metabolismo degli zuccheri

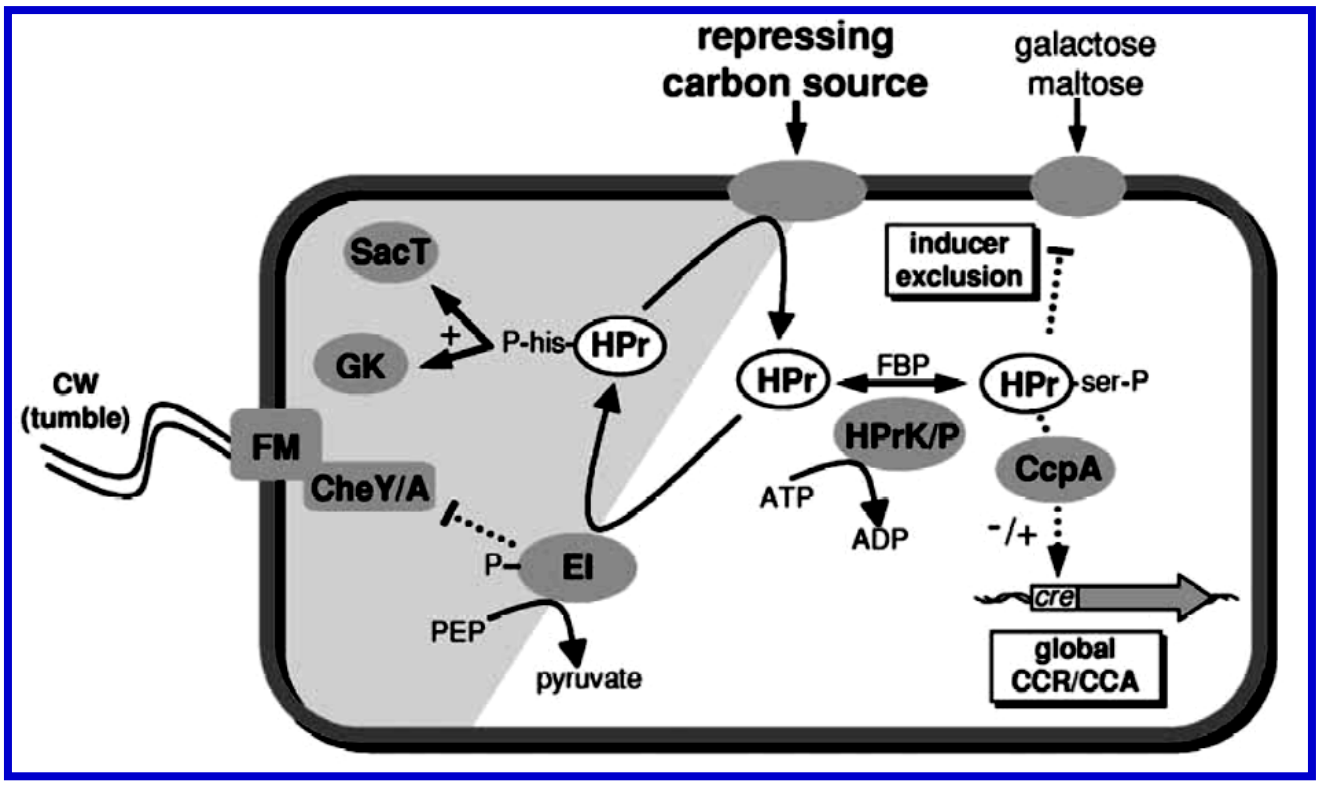
I batteri utilizzano le fonti di carbonio attraverso sistemi rigorosamente controllati in maniera gerarchica per i quali essi hanno sviluppato meccanismi che governano e coordinano l'assunzione e il metabolismo delle fonti di carbonio. Tutto ciò è stato possibile grazie allo sviluppo di sistemi **CCR** *(***C***arbon* **C***atabolite* **R***epression*) *che intervengono a livello trascrizionale e non solo. I sistemi* CCR *sono estremamente sofisticati e consentono al batterio di "sentire" il livello del proprio stato nutrizionale permettendogli di regolare di conseguenza le sue attività cataboliche. Tra i sistemi* CCR*, il* **meccanismo di controllo globale trascrizionale** *e il meccanismo di controllo delle proteine denominato* **induzione per esculsione/espulsione** *sono sicuramente i più importanti. Entrambi i sistemi sono stati descritti sia nei batteri del gruppo enterico dei Gram negativi sia nel gruppo dei batteri Gram positivi a basso contenuto in GC che comprende anche i batteri lattici.*

*Entrambi i sistemi si basano sui componenti del sistema fosfotransferasico (*PTS*) anche se esistono sostanziali differenze tra batteri Gram negativi e Gram positivi. La regolazione del metabolismo delle fonti di carbonio (*C-regulation*) nei batteri Gram positivi a basso contenuto in GC coinvolge diverse specie molecolari.*



HPr, HPr kinasi/fosfatasi (**HPrK/P**) (*facenti parte del sistema* PTS*) e la proteina* **CcpA** *(catabolite control protein) sono coinvolti nella valutazione dello stato fisiologico della cellula e nella regolazione del metabolismo delle fonti di carbonio. In specifico il livello di fosforilazione di* HPr *è un indice del livello di fonti di carbonio disponibili per la cellula. La fosforilazione di* HPr *a carico del* PEP *celulare, per il trasporto intracellulare di mono- e disaccaridi, avviene a livello di una istidina (his) generando* **HPr-his-P**. *Questa reazione è catalizzata da enzimi fosfotransferasici (***EI***). I sistemi di uptake cellulare di zuccheri sono principalmente* PTS*-dipendenti (esistono 9 diversi sistemi* permeasici del tipo PTS *in Lactococcus lactis). Quando le molecole di mono- e disaccardi (trasportate nella cellula mediante i sistemi* PTS*) vengono metabolizzate, il livello cellulare di intermedi glicolitici (fruttosio1,6-bifosfato) si alza e stimolano l'attività di* HPrK/P *che aumenta a sua volta il livello di* HPr *fosforilato, questa volta a livello di una serina (ser) generando* **HPr-ser-P**. *Questo livello di fosforilazione di* Hpr *(*HPr-ser-P*) non consente ulteriori reazioni di fosforilazione e quindi non è più disponibile per* EI. *Di conseguenza* HPr-ser-P *non può più intervenire nel sistema* PTS *per introdurre nella cellula ulteriori molecole di zuccheri. Analogamente, quando il livello cellulare di intermedi glicolitici decresce (basso livello energetico) l'enzima bifunzionale* HPrK/P *catalizza la reazione di defosforilazione di* HPr-ser-P *rendendo la molecola disponibile alla fosforilazione di* **EI** *che genera* HPr-his-P *a sua volta disponibile per il trasporto di nuove molecole di zuccheri.*

In considerazione del fatto che lo stato metabolico cellulare (il livello degli intermedi glicolitici) determina il grado e la tipologia di fosforilazione di HPr *si evince di conseguenza che anche le fonti di carbonio non-*PTS *influenzano il rapporto* Hpr-his-P/HPr-ser-p *e quindi agiscono sulla regolazione del metabolismo del carbonio (es. Streptococcus thermophilus).*



Meccanismi di regolazione da cataboliti del metabolismo delle fonti di carbonio nei batteri Gram positivi a basso contenuto in GC. La rappresentazione grafica di cui sopra, indica la cellula in due differenti condizioni metaboliche: i) in presenza di una fonte di carbonio in eccesso, cioè in presenza di un alto livello energetico cellulare (zona bianca) e ii) in assenza di un eccesso di fonte di carbonio (zona grigia).
Gli attori principali rappresentati nella figura sono:

- **HPr** *fosfotransferase del sistema* PEP-PTS;
- **HPrK/P** *kinasi/ fosfatasi* HPr *dipendente;*
- **FBP** *intermedio glicolitico, fruttosio 1,6 -bifosfato;*
- **PEP** *fosfoenolpiruvato, fornisce P al sistema* PEP-PTS;
- **CcpA** *catabolite control protein, interagisce con* HPr-ser-P *nel legame ai siti* <u>cre</u> *di geni che codificano per attivatori o repressori metabolici;*
- **CCR/CCA** *sistema Carbon Catabolite Repression/Activation;*
- **EI** *enzimi fosfotransferasici del sistema* PEP-PTS;
- **GK** *glicerolo-kinasi;*
- **SacT** *proteina antiterminantore dell'operone saccarosio;*
- **CheY/A** *proteine della chemotassi;*
- **FM** *motore flagellare;*
- **CW** *rotazione in senso orario (clockwise) (normalmente ruota in senso antiorario)*

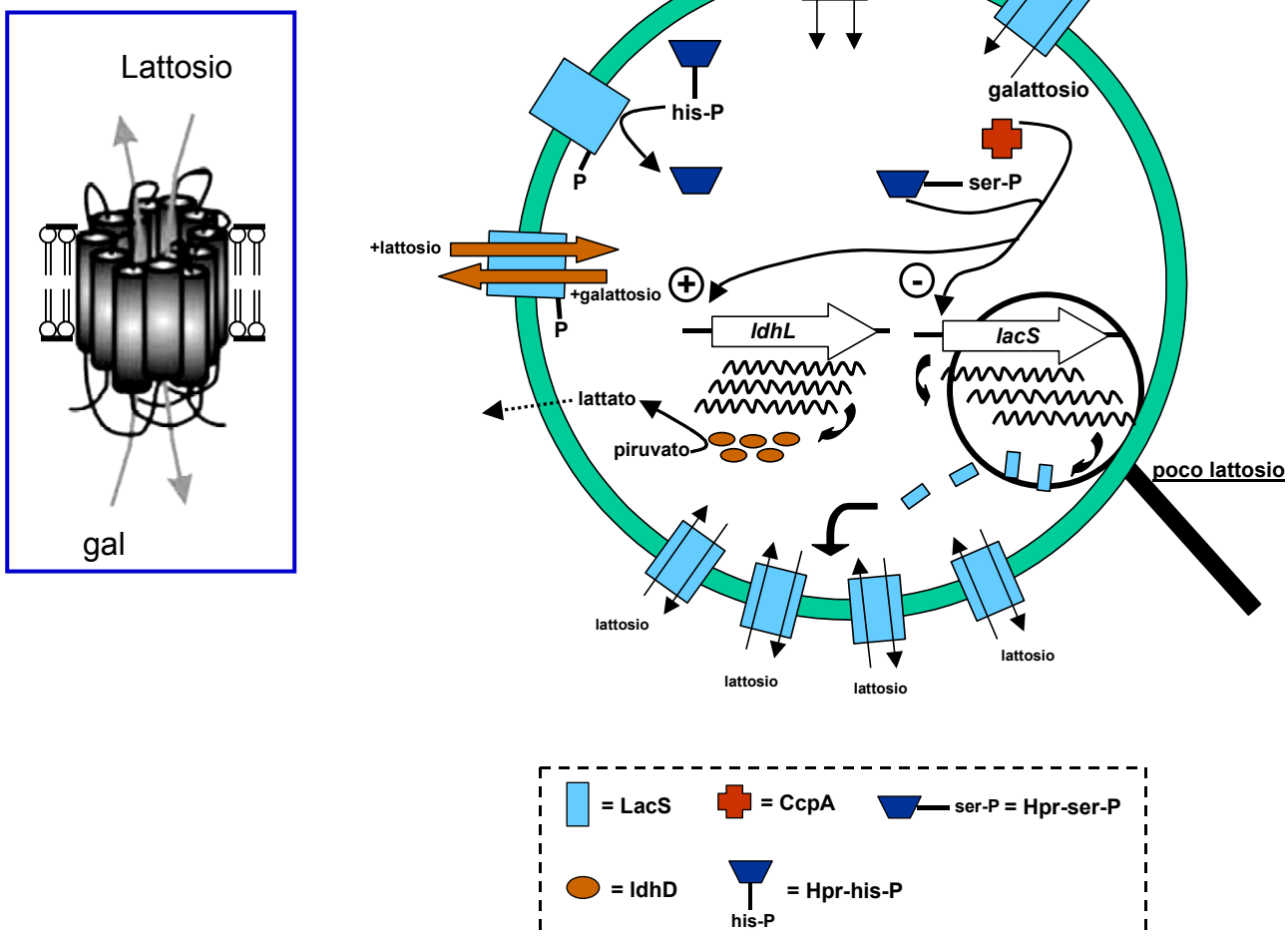
CcpA *nei batteri lattici*

Organism	CcpA (aa)	Target systems	PID[a] / Reference
Enterococcus faecalis[b]	333	↓ galactose operon ↑ lactate dehydrogenase ↓ glc-starvation genes	g3676165 / Leboeuf et al. (2000)
Lactobacillus casei	333	↓ N-acetyl-glucosaminidase ↓ β-galactosidase ↓ sorbose operon ↓ lactose operon	g2668503 / Monedero et al. (1997) Gosalbes et al. (1999 Yebra et al. (2000
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis	333	↑ peptidase genes	g3024388 / Stucky et al. (1996) Schick et al. (1999
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus	333	↑ peptidase Q	g7209172 / Morel et al. (1999) Morel et al. (2001
Lactobacillus pentosus	336	↓ xylose operon ↓ β-glucosidase ↓ β-galactosidase ↓ phosphoketolase	g5823363 / Lokman et al. (1997) Mahr et al. (2000 Chaillou et al. (2001 Posthuma et al. (2002
Lactobacillus plantarum	336	↓ β-glucosidase ↓ β-galactosidase	g14331034 / Muscariello et al. (2001)
Lactococcus lactis	332	↓ galactose operon ↓ β-glucoside operon ↑ glycolytic *las* operon	g4165285 / Luesink et al. (1998) Monedero et al. (2001b
Streptococcus gordonii	334	↓ amylase-binding protein A	g12240237 / Rogers & Scannapieco (2001)
Streptococcus mutans[c]	333	↑ α-galactosidase ↑ mannitol-1-P dh ↑ P-β-galactosidase	g2323342 / Simpson & Russell (1998)
Streptococcus thermophilus	333	↓ lactose operon ↑ lactate dehydrogenase	g7341263 / van den Bogaard et al. (2000)

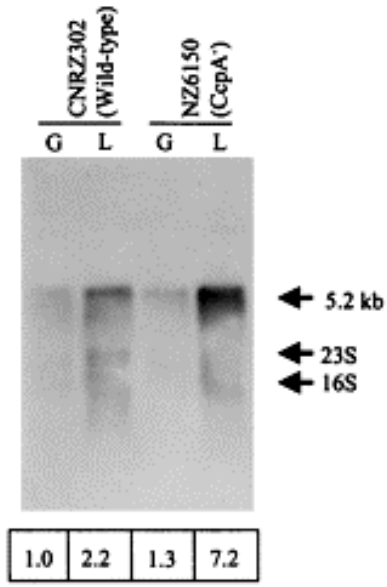
Il sistema CCR in Streptococcus thermophilus

S. thermophilus è una specie di batterio lattico omofermentante utilizzato per la preparazione di colture starter per la produzione di yogurt e mozzarella. Questa specie possiede delle caratteristiche particolari in merito al sistema CCR *e all'utilizzazione del lattosio. In contrasto con quanto mostrato dalla maggioranza degli altri batteri lattici, S. thermophilus preferisce il lattosio al glucosio come fonte di carbonio e utilizza un sistema non-*PTS *per la sua assimilazione dal mezzo di coltura. Infatti, S. thermophilus incorpora lattosio mediante un sistema a simporto permeasico (***LacS***) lattosio/H+ e/o lattosio/galattosio. In quest'ultimo caso, il lattosio penetra nella cellula secondo gradiente e contemporaneamente viene espulso galattosio. Di conseguenza, si può dedurre che S. thermophilus utilizza solo il glucosio presente nella molecola di lattosio per la glicolisi.*

La crescita in lattosio determina un controllo CCR *mediato da* **CcpA** *che interviene positivamente a livello glicolitico sul gene codificante la* ***lattato-deidrogenasi***. **CcpA** *interviene inoltre a livello trascrizionale su* **LacS**. *Infatti, nelle cellule cresciute in presenza di lattosio i livelli di* LacS *cellulari raddoppiano. La variazione del numero di* LacS *a livello di membrana regola il flusso di lattosio cellulare in base alle esigenze energetiche. Un ulteriore livello di controllo a carico di* LacS *è stato recentemente individuato. In specifico, la presenza di un dominio proteico simile a quello di un enzima del sistema* PTS *in* LacS, *rende quest'ultima molecola soggetta a fosforilazione per opera di* Hpr-his-P. LacS *fosforilato diviene più efficiente nella reazione di trasporto/scambio lattosio/galattosio (l'affinità di galattosio e lattosio nel sito di legame citoplasmatico diventa 20 volte più grande e in questa conformazione il galattosio è preferito al lattosio). In condizioni di crescita stazionaria, il rapporto* Hpr-his-P/Hpr-ser-P *diventa favorevole per* Hpr-his-P, *favorendo l'aumento della velocità di trasporto del lattosio che compensa la sua bassa concentrazione nel mezzo colturale.*



A

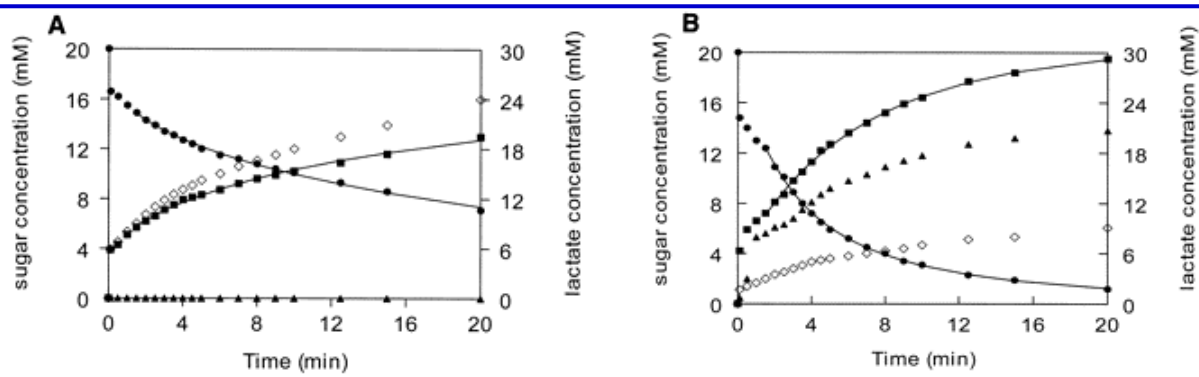


Mutanti CcpA *negativi di S. thermophilus mostrano un aumento di circa 4 volte il livello di uptake di lattosio e escrezione di galattosio, mentre sono caratterizzati da una derepressione dell'espressione di lacS e lacZ (b-galattosidasi) e da un elevato livello di espulsione di glucosio.* Inoltre CcpA *influenza positivamente la trascrizione di ldhL (lattato deidrogenasi)*

B

Strain	β-galactosidase (10^{-1} nM/mg/min)			
	glucose	lactose	galactose	gluc/gal
CNRZ302 (Wild-type)	38 ± 5	58 ± 6	n.d.	n.d.
NZ6150 (CcpA⁻)	41 ± 5	106 ± 12	n.d.	n.d.
NZ6150 + pNZ6103	48 ± 3	56 ± 4	n.d.	n.d.
NZ302G (Gal⁺)	n.d.	n.d.	150 ± 3	123 ± 4
NZ6151 (Gal⁺; CcpA⁻)	n.d.	n.d.	153 ± 2	132 ± 9

pNZ6103 contiene *ccpA sotto controllo del suo promotore.*



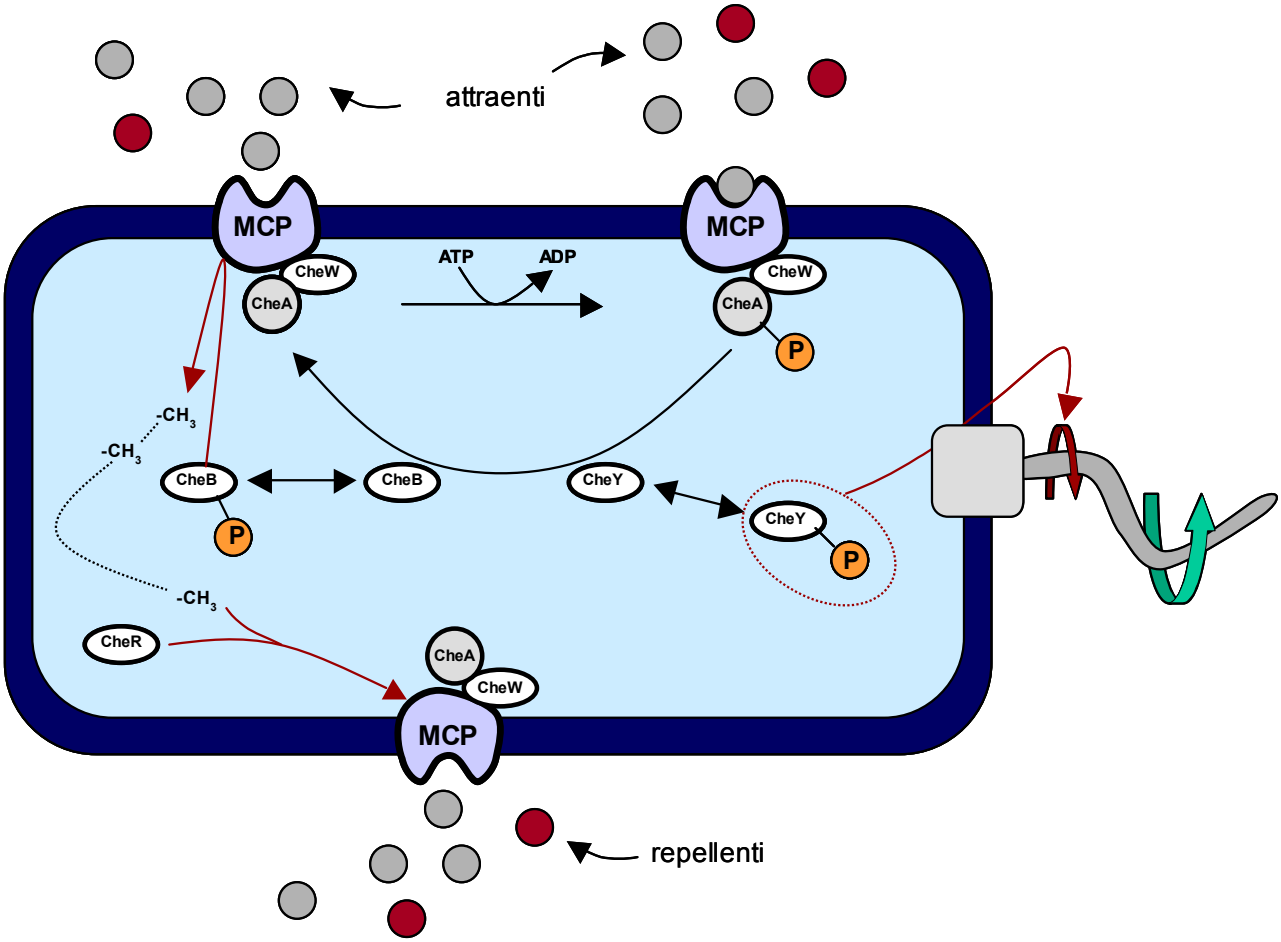
Small-scale fermentation of lactose of CNRZ302 (wild type) (A) and NZ6150 (*ccpA* disruption mutant) (B). Strains were grown to an OD_{600} of 1.0 in lactose-containing medium and resuspended in a 4% -glycerophosphate buffer. Fermentation was started by addition of 20 mM lactose. Medium components were analyzed by HPLC. ●, lactose; ■, galactose; ▲, glucose; ◇, lactate.

In conclusione …

La permeasi LacS *di S. thermophilus costituisce un sistema rapido ed efficiente per il trasporto di lattosio e il successivo flusso di glucosio nel sistema glicolitico. Quando S. thermophilus è alla sua velocità massima di crescita* Hpr-Ser-P *è la specie molecolare fosforilata di* Hpr*, mentre* Hpr-His-P *è prevalente in fase stazionaria. Questi livelli di* Hpr-P *sono in accordo con gli elevati quantitativi di* FBP *intracellulari che inducono il sistema* CCR *di LacS. Esperimenti di fermentazione hanno messo inoltre in luce la funzione di regolazione negativa di CcpA sul trasporto e sull'utilizzazione del lattosio e su alcune reazioni del metabolismo centrale della cellula. Infatti, in assenza di* CcpA *funzionante, le cellule assumono lattosio e espellono galattosio a velocità quattro volte superiori a quelle normali (*CcpA *funzionante), ma mostrano anche una forte riduzione della quantità di acido lattico prodotto. Inoltre, l'aumento della quantità di lattosio incorporato, non si riflette in un aumento della velocità di crescita. A conferma di questa osservazione e a chiudere il bilancio del carbonio, si deve anche riportare un contemporaneo alto livello di espulsione di glucosio in quantità comparabili con il lattosio incorporato e l'acido lattico prodotto (l'assenza di* CcpA *aumenta anche il livello di attività* β*-galattosidasica).*

L'espressione di <u>*ldhL*</u> *in S. thermophilus è anch'essa regolata dal sistema* CCR *e mediata da* CcpA. *Il livello di espressione di ldh è massimo durante la crescita delle cellule in presenza di lattosio e decresce durante la crescita su glucosio e galattosio. L'interazione tra* Hpr-Ser-P *e* CcpA *determina un aumento del livello di espressione di* <u>*ldhL*</u>*. Tuttavia, siccome* IdhL *catalizza l'ultima reazione del fermentazione omolattica, appare improbabile che* CcpA *controlli solo questo step delle reazioni glicolitiche. In ceppi privi di* CcpA *è stato dimostrato che i livelli di trasporto di lattosio sono decisamente più elevati se paragonati con quelli di ceppi con* CcpA *funzionante, mentre l'espulsione di lattato si riduce di della metà. Questo indica che durante la fase esponenziale di crescita, l'efficienza del trasporto di lattosio supera quella della sua metabolizzazione nel ciclo glicolitico indicando che la glicolisi rappresenta lo step limitante del metabolismo degli zuccheri in S. thermophilus. Questi dati sono decisamente in contrasto con quanto riportato per gli altri batteri lattici dove lo step limitante è principalmente dovuto ai sistemi di trasporto di tipo* PTS*.*

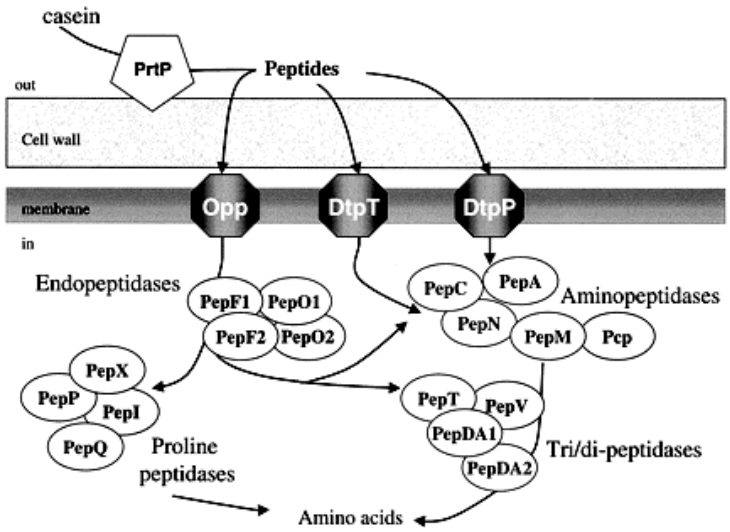
Il meccanismo della <u>Chemiotassi</u>, un sistema analogo a quello CCR/CcpA!



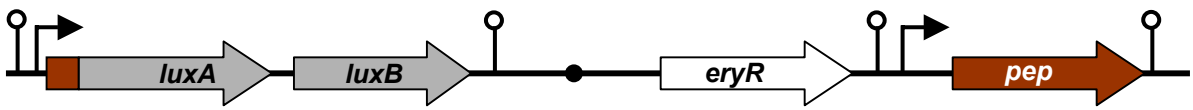
CheA *è una chinasi sensore che cambia conformazione quando un composto chimico si lega al* ***trasduttore*** **MCP** *(proteine metil-accettrici). Il cambio di conformazione che avviene assieme a* **CheW** determina *l'autofosforilazione di* **CheA** *(***CheA-P***). Se il composto chimico che si lega a* MCP *è un* ***attraente*** *la frequenza di autofosforilazione si abbassa, se è un* ***repellente*** *si alza.*
CheA *può fosforilare con buona efficienza* **CheY** *e con bassa efficienza* **CheB**. **CheY-P** *può legarsi al motore del flagello determinando un cambio di rotazione (da antiorario a orario). Il cambio di rotazione determina una capriola e quindi un cambio di direzione; l'aumento della concentrazione cellulare di* **CheY-P** *determinerà quindi un susseguirsi di cambi di direzione.* **CheR** *metila* **MCP** *utilizzando come donatore l'S-adenosilmetionina. In presenza di attraenti il livello di* **CheA-P** *è basso (e di conseguenza sarà basso il livello di* **CheY-P** *e* **CheB-P***); ne consegue una lenta ma continua metilazione di* **MCP** *che raggiunto il massimo livello di metilazione non sarà più in grado di rispondere agli* ***attraenti*** *(aumenteranno di conseguenza le concentrazioni di* **CheB-P** *e* **CheY-P** *che provocherà variazioni di direzione.* **MCP** *al massimo livello di metilazione sarà invece ipersensibile ai* ***repellenti***. **CheB-P** *agisce demetilando* **MCP**.

Il sistema CCR influenza anche il sistema proteolitico

Molti batteri lattici possiedono un sistema proteolitico molto complesso che utilizzano per degradare le caseine del latte. In Lactococcus lactis, ed in diverse specie di batteri lattici, il sistema proteolitico è composto da una proteasi ancorata alla parete, da diversi trasportatori di peptidi localizzati a livello di membrana e da più di una dozzina di peptidasi citoplasmatiche. Nei batteri lattici è stato sovente osservata la vicinanza dei geni codificanti per pepQ *(peptidasi) e* PepR1 (*omologo di* CcpA) *e si è di conseguenza ipotizzata una funzione di controllo di* PepR1 *su pepQ e altri geni codificanti proteine del sistema proteolitico. Inoltre in molti geni pep sono stati individuate regioni cre. L'effettivo controllo di PepR1 sull'espressione di alcune peptidasi è stata dimostrata in Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis e* subsp. *bulgaricus e in Lactococcus lactis.*



Schematic representation of the *L. lactis* proteolytic system. The cell wall proteinase (pentagon), three transport systems (hexagon), and 18 intracellular peptidases (oval) are represented in their relative locations in the cell. Peptidases are classified on the basis of their cleavage specificity. White and grey ovals represent peptidases that were included and not included, respectively, in this study.



General scheme of the luciferase fusion integrated on the chromosome by single crossover. Upon insertion, the promoter is duplicated and drives expression of the *luxAB* genes and of the functional gene denoted in grey. The small circle represents the origin of replication of the integrative plasmid.

In Lactococcus lactis, l'effetto del sistema di CCR *sul sistema proteolitico è stato valutato operando delle fusioni dei geni* pep *con una coppia di geni reporter luxA e luxB. Sono stati analizzati 16 differenti geni codificanti peptidasi e solo pepP (contenente quattro regioni cre) avere livelli di espressione dipendenti dalla fonte di carbonio.*

Sistemi di* <u>Induzione per Esclusione/Espulsione</u> *nei batteri lattici

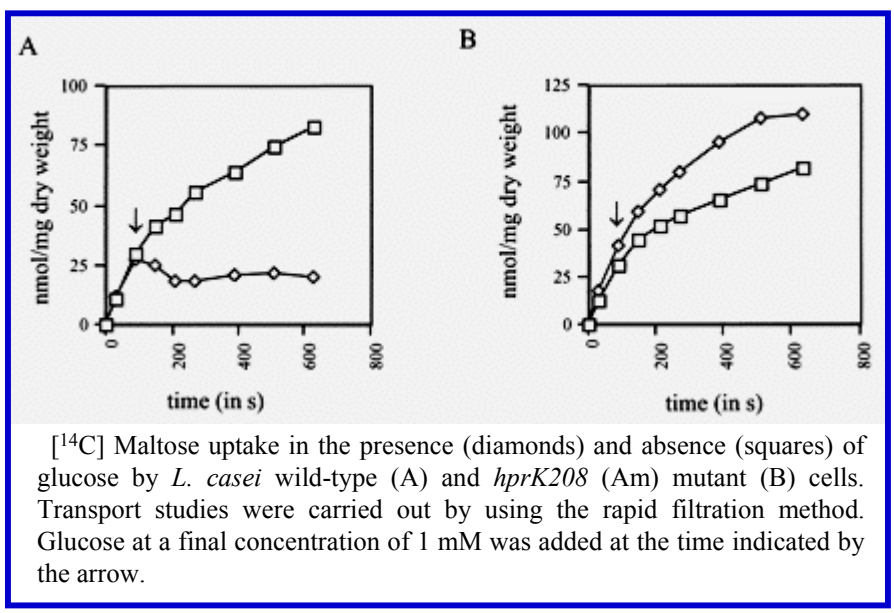
Nei batteri lattici sono stati descritti due sistemi di regolazione del metabolismo del carbonio che agiscono a livello proteico, il sistema di induzione per **esclusione** *e il sistema di induzione per* **espulsione**. *Entrambe i sistemi, in cui sembra avere un ruolo fondamentale* **Hpr-ser-P**, *non sono mai stati osservati in altri batteri Gram positivi a basso contenuto di GC ad eccezione dei batteri lattici.*

Induzione per esculsione

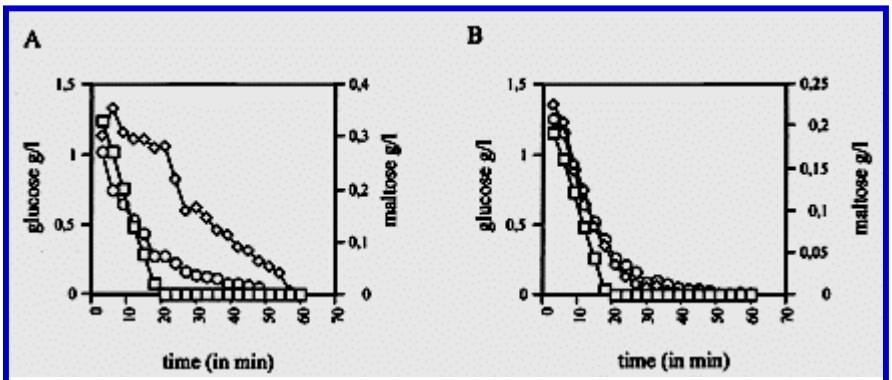
Questo sistema di regolazione si basa su inibizioni di tipo allosterico di una proteina catabolica (permeasi) che prevengono l'entrata nella cellula dell'induttore di specifici geni catabolici. Ad esempio, in Lactobacillus casei, studi effettuati su mutanti Hpr *suggeriscono che* Hpr-ser-P *è coinvolto direttamente nella regolazione del livello di trasporto di maltosio in presenza di glucosio. Nonostante analoghi risultati sono stati ottenuti in Lactococcus lactis e Lactobacillus brevis, non esistono ancora prove certe di una interazione allosterica tra* Hpr-ser-P *e una permeasi.*

Induzione per espulsione

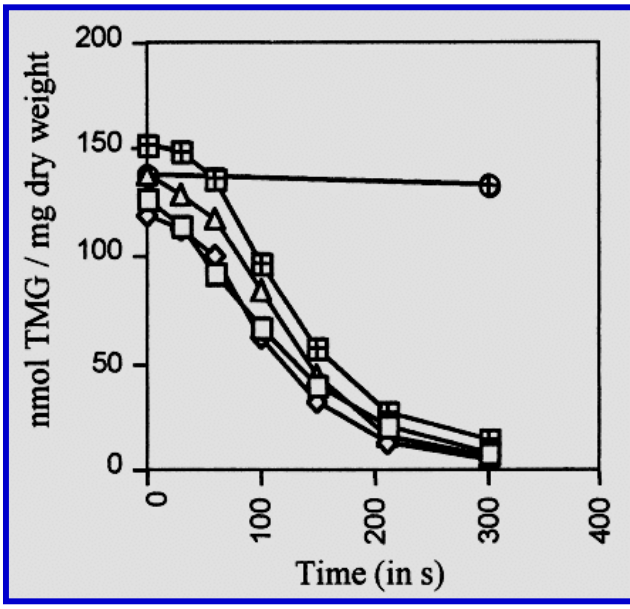
Questo sistema di regolazione si basa sulla rapida espulsione della fonte di carbonio precedentemente assunta dalla cellula ma non più considerata "preferenziale" su un'altra più disponibile. Un derivato del lattosio, il metil - β - tiogalattoside (TMG) viene espulso in presenza di una migliore fonte di carbionio).



[^{14}C] Maltose uptake in the presence (diamonds) and absence (squares) of glucose by *L. casei* wild-type (A) and *hprK208* (Am) mutant (B) cells. Transport studies were carried out by using the rapid filtration method. Glucose at a final concentration of 1 mM was added at the time indicated by the arrow.



Consumption of maltose (0.025%) and glucose (0.15%) by resting *L. casei* wild-type (A) or *hprK208*(Am) mutant (B) cells. The cell suspension containing 18 mg of cells (dry weight) in 5 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7, was incubated at 37°C. Samples of 300 µl were withdrawn at the indicated time intervals and were centrifuged. The maltose concentration in experiments carried out in the presence (diamonds) or absence (circles) of glucose and the glucose concentration (squares) were determined in the supernatant.



Expulsion of preaccumulated [^{14}C]TMG-6-P in different *L. casei* strains. Cells preloaded with [^{14}C]TMG-6-P were washed and resuspended in 1 ml of transport buffer. At time 0, glucose was added at a final concentration of 5 mM, and 100-µl aliquots were withdrawn at the indicated time intervals. The radioactivity remaining inside the cells was measured with the wild-type strain BL23 (squares) and the *ptsH1* (triangles), the *ptsH2* (cross within squares), and the *hprK208*(Am) (diamonds) mutant strains. Two control samples were taken before glucose was added. One was immediately filtered and provided time point 0, the other was incubated at 37°C and was filtered at the end of the experiment (crosses within circles). This end point is shown only for the experiment with the *ptsH1* mutant. A similar leakage (less than 5%) of [^{14}C]TMG-6-P in the absence of glucose was observed with all other strains.