Retour au menu

INDUCTION DE LA GALACTOKINASE PAR MUTAGENESE CHEZ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* CNRZ 302

Hellal-Benateya A.
Ecole Nationale Polytechnique, département de Génie de l'environnement, El Harrach, Alger

Résumé : *Streptococcus thermophilus* est une bactérie thermophile utilisée dans la fabrication du yaourt en symbiose avec *Lactobacillus bulgaricus* et de certains fromages. Lors de la fermentation du lactose par *S. thermophilus*, il est constaté que le galactose produit n'est pas dégradé et s'accumule dans le milieu extracellulaire. Le traitement de cette bactérie par la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine a permis l'isolement de mutants plus actifs fermentant le galactose (Gal^+). Le mutant A5 métabolise 70% de galactose produit à partir de l'hydrolyse du lactose. L'activité de la galactokinase est plus élevée chez les souches mutantes. La mutation semble affecter un gène de régulation de la galactokinase.

Mots clés : : *Streptococcus thermophilus*, galactose, galactokinase, mutagenèse

INDUCTION OF GALACTOKINASE BY MUTAGENESIS IN *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* CNRZ 302

Abstract : *Streptococcus thermophilus* is a termophilic bacteria used in yoghurt manufacture in association with *Lactobacillus bulgaricus* and some cheeses . Cultures of *Streptococcus thermophilus* are essentially galactose negative. Therefore, galactose excreted when cultures grown on lactose. Galactose-positive (Gal^{+}) mutants were isolated after treating cells of *S. thermophilus* CNRZ 302 with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. In contrast with the wild type's inability to utilize galactose, the A5 mutant metabolized 70% of the galactose resulting from the hydrolysis of lactose. Galactokinase activities were higher in induced galactose-fermenting strains than in the galactose-negative strain. The mutation seemed to affect a galactokinase regulation gene.

Key words: *Streptococcus thermophilus*, galactose, galactokinase, mutagenesis

Retour au menu

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés et leurs propriétés acidifiantes et aromatiques ont été mises à profit depuis très longtemps.

Ces bactéries n'ont pourtant été mises en évidence que depuis un peu plus d'un siècle, mais les progrès réalisés dans la connaissance de leurs propriétés et de leur structure ont déjà permis d'améliorer les performances industrielles et laissant entrevoir des potentialités de développement intéressantes pour l'industrie laitière.

La principale caractéristique de ces bactéries est la production de quantités importantes d'acide lactique. Cet acide lactique contribue à la texture, la flaveur et la qualité technologique et hygiénique du produit fini.

La connaissance du matériel chromosomique suggère des champs d'intervention visant à l'obtention de nouveaux microorganismes dotés de caractéristiques particulières.

L'importance économique des bactéries lactiques dépend directement de la capacité et la vitesse de fermentation du lactose du lait en acide lactique.

Streptococcus thermophilus est une bactérie homolactique utilisée dans la fabrication de produits laitiers où une température élevée est nécessaire notamment le yaourt. C'est le seul streptocoque lactique qui soit incapable de dégrader le galactose comme substrat libre ou produit d'hydrolyse du lactose puisqu'il est excrété dans le milieu de culture et de ce fait, il s'accumule dans le produit laitier quand ce microorganisme est utilisé (O'LEARY et WOYCHIK, 1976 ; THOMAS et CROW, 1984 ; TINSON et al., 1982). Or, en pratique, la présence de ce glucide dans un produit laitier est nuisible car il serait un bon substrat pour une fermentation hétérolactique et donc une production de métabolites indésirables tels que le CO_2. De plus, il est certain que la dégradation de la totalité du lactose permet une acidification plus rapide du produit fabriqué.

THOMAS et CROW (1984) sont arrivés à induire l'utilisation du galactose chez *S. thermophilus* dans des conditions de fermentation en chémostat en présence de fortes concentrations en galactose et limitantes en lactose. Mais, ces variants étaient instables et perdaient cette capacité après repiquage sur lactose.

Nous avons tenté d'isoler des mutants stables de *S. thermophilus* Gal+ par traitement au N-méthyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). L'efficacité du NTG a été prouvée sur différentes espèces de bactéries lactiques, notamment les streptocoques mésophiles du groupe N (BURROW et al. 1970) et les lactobacilles (MIYAMOTA et al., 1983).

Retour au menu

MATERIEL ET METHODES

Microorganisme et conditions de culture

La souche étudiée, *S. thermophilus* CNRZ 302, provient de l'INRA, Jouy en Josas, France. Elle est conservée à –20°C dans du lait écrémé reconstitué à 10%. les cultures sont réalisées à 42°C dans le milieu TPPY bouillon (BRACQUART, 1981) contenant Tryptose, 7g ; protéose-peptone,7g ; extrait de levure, 2g et lactose , 10g, avec un pH ajusté à 7 avant stérilisation.

Traitement à la Nitrosoguanidine

Nous avons utilisé la méthode de MIYAMOTO et al (1983) adaptée à nos conditions. Une culture de *S. thermophilus* CNRZ 302 de 12 heures dans 500 ml de bouillon TPPY est centrifugée pendant 5 minutes à 5000 g à 4°C. Le culot, lavé deux fois avec du tampon phosphate potassium-sodium 20 mM, est remis en suspension dans le même tampon telle que la concentration finale en cellules corresponde à 1 mg (en poids sec) par ml. La suspension est ensuite répartie dans des tubes Falcon de 50 ml. La NTG est additionnée dans chaque tube à une concentration finale de 100 à 500 µg/ml et l'ensemble est agité avec précaution. Un tube de suspension dépourvu de NTG sert de témoin. L'action mutagène dure 1 heure à 42°C à l'abri de la lumière. Les suspensions sont ensuite centrifugées à 6000g pendant 20 minutes à 5°C puis les cellules sont lavées deux fois avec du tampon phosphate potassium-sodium 20 mM. Les cellules remises en suspension dans 5 ml de bouillon TPPY et incubées à 42°C pendant 2 heures.

Après une autre centrifugation et lavage les cellules sont ensemencées sur milieu TPPY solide en boîtes de Pétri puis incubées à 42°C pendant 48 heures, le dénombrement des colonies des cellules traitées et non traitées permet de déterminer le pourcentage de survie. La suspension cellulaire ayant donné 50% de survie était utilisée (ADELBERG et al., 1965) pour la sélection des mutants sur milieu TPPY à base de galactose à 1% comme seule source glucidique.

Dosage du lactose et galactose

Le lactose et le galactose sont dosés dans le milieu de culture après croissance et centrifugation à 5000 g, 4°C pendant 5 minutes selon la méthode enzymatique utilisant le Kit de Boerhinger Mannheim (n°176303).

Dosage de la galactokinase

Après croissance sur bouillon TPPY , les cellules sont lavées deux fois avec du tampon Tris-H_2SO_4 50mM, pH 7,0. Elles sont ensuite perméabilisées avec du triton X-100 selon la méthode de MIOZZARI et al. (1978). Les cellules sont remises en suspension dans le même tampon contenant 0,05% de triton X-100 à une concentration de 0,25 mg de cellules en poids sec par ml, puis congelées à –20°C pendant au moins 15 heures. L'activité de la galactokinase (EC 2.7.1.6.) était mesurée par la méthode de BALLARD (1975) qui consiste à suivre l'oxydation du NADH + H^+ au spectromètre d'absorption moléculaire à 340 nm. L'unité d'activité

de la galactokinase est la quantité d'enzyme qui catalyse l'oxydation de 1 µmole de NADH par minute et par mg de cellules en poids sec.

RESULTATS

Survie de S. thermophilus après traitement au NTG

Le pourcentage de survie après exposition des cellules au NTG pendant 1 heure a été déterminé. Le rapport de survie décroît avec l'augmentation de la concentration en NTG. Ainsi 50% de survie sont obtenus à une concentration de 100 µg de NTG/ml, le nombre passe de 2,6 10^8 à 1,4 10^8/ml.
Le double de cette concentration donne une destruction d'environ 90% de cellules.

Sélection des mutants Gal$^+$

Les mutants sont isolés sur milieu TPPY solide ne contenant que du galactose comme source de carbone. Un nombre de 22 souches Gal$^+$ étaient initialement isolées à partir des cellules traitées au NTG et donnant 50% de survie mais 19 mutants étaient instables et perdaient le caractère Gal$^+$ après passage sur milieu lactosé ou sur lait.

L'utilisation de la galerie biochimique d'identification des microorganismes API50 CHS a montré que les 3 souches restantes (A5, A8 et A10) étaient identiques à la souche mère sauf pour le test de fermentation du galactose. Des observations microscopiques ont, par ailleurs, révélé la même morphologie.

Croissance de S. thermophilus CNRZ 302 et ses mutants

La croissance aussi bien de la souche mère que les mutants sur bouillon TPPY lactosé, glucosé ou galactosé est estimée par mesure directe de l'absorbance à 650 nm. Comme le montre la figure 1, le lactose est la meilleure source glucidique aussi bien pour CNRZ 302 que pour le mutant A5 (les résultats sont les mêmes pour les deux autres mutants). Cependant les variants présentent sur les trois glucides une phase de latence relativement longue, de 4 heures, avant de commencer la croissance exponentielle. Sur galactose, la souche CNRZ 302 ne montre quasiment pas de développement alors que les mutants, malgré la longue phase d'adaptation, donnent une phase exponentielle de croissance aussi importante que celle observée sur lactose.

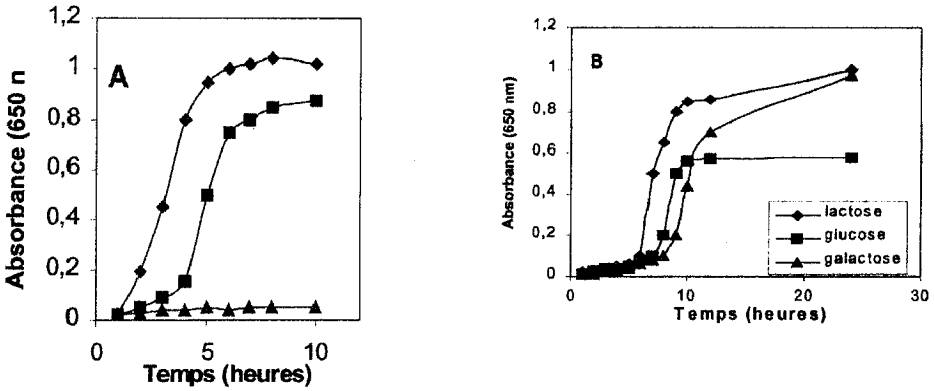

Figure 1 : Croissance de *S. thermophilus* CNRZ 302 (A) et du mutant A5 (B) sur bouillon TPPY lactosé, glucosé ou galactosé à 10% ; température : 42°C

Fermentation du lactose et du galactose

Les vitesses de dégradation du lactose et d'apparition du galactose par CNRZ 302 et son variant A5 ont été déterminées simultanément sur le milieu TPPY lactosé après séparation des cellules par centrifugation. le tableau 1 montre que tout comme CNRZ 302 , le mutant dégrade environ 4 g de lactose par litre en 24 heures de culture puisque nous retrouvons environ 6 g/l dans le milieu contenant au départ 10 g/l. En revanche, la souche mère excrète dans le milieu près de 2 g de galactose /l pour le même temps d'incubation., soit la moitié de la quantité de lactose consommé, d'où l'hypothèse que la totalité du galactose produit par l'hydrolyse du lactose s'accumule dans le milieu de culture et n'est pas réutilisable par la bactérie. Par contre, les 70% de galactose produit par hydrolyse du lactose sont métabolisés par le mutant A5.

Tableau 1 : utilisation du lactose et du galactose par *S. thermophilus* CNRZ 302 et du mutant A5. Croissance sur TPPY à 10g/l de lactose, Température : 42°C

Temps) (heures)	lactose résiduel (g/l)	galactose (g/l)
	Souche CNRZ 302	
0	9,86	0,04
1	9,30	0,08
2	8,98	0,20
3	8,50	0,36
4	7,42	0,50
5	7,26	0,80
6	7,10	1,51
7	6,72	1,63
8	6,03	1,98
	Souche A5	
0	9,80	0,01
4	9,40	0,05
5	8,61	0,07
6	8,11	0,08
7	7,80	0,10
8	7,55	0,12
9	7,23	0,23
10	6,91	0 35
11	6,60	0,51
12	6,30	0,67
13	6,10	0,60

Activité de la galactokinase

Les activités de la galactokinase ont été mesurées sur les cellules de la souche CNRZ 302 et ses mutants en culture sur bouillon TPPY contenant le lactose, glucose ou galactose comme source glucidique. Sur la figure 2, nous représentons la croissance et l'activité de la galactokinase de CNRZ 302 sur lactose et A5 sur galactose.

Un niveau considérable de galactokinase est observé pour A5 ; ce mutant présente un taux d'enzyme 3,5 fois plus élevé par rapport au taux existant dans les cellules de la souche mère. Le maximum d'activité est observé dans les deux cas en début de phase exponentielle.

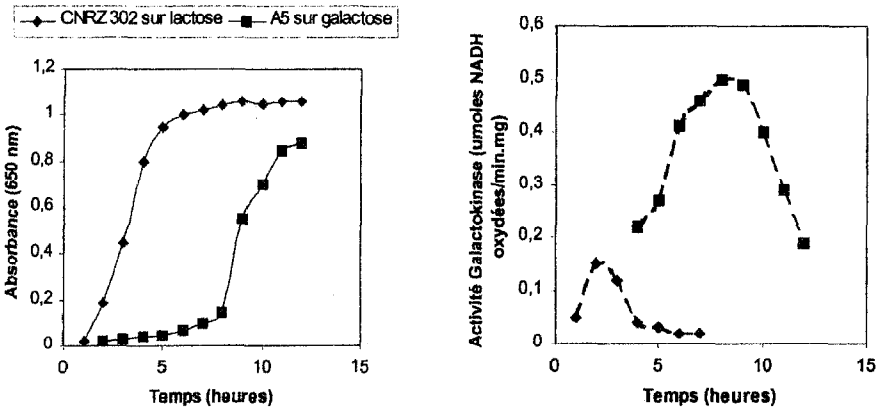

Figure 2 : Croissance et activité de la galactokinase de *S. thermophilus* CNRZ 302 et le mutant A5

DISCUSSION

Les streptocoques du groupe N possèdent le potentiel enzymatique nécessaire au métabolisme du galactose via deux voies séparées (tagatose 6Phosphate et Leloir) (MARSHALL et LAW, 1984 ; THOMAS et al., 1980). La voie impliquée dépend du mécanisme du transport membranaire du substrat. Quand le galactose est transporté par le système PEP-PTS (phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant), il est phosphorylé lors du transport et se retrouve dans la cellule sous forme de galactose 6Phosphate, qui est ensuite métabolisé selon la voie du tagatose 6phosphate. Au contraire s'il emprunte le système Perméase, sa phosphorylation se produit, sous l'action d'une galactokinase, dans la cellule selon la voie de Leloir (figure 3).

Les souches de *S. thermophilus* sont généralement galactose-négative. THOMAS et CROW (1984) ont mis en évidence les activités de deux enzymes de la voie de Leloir et n'ont pu détecter aucune activité des enzymes de la voie du tagatose 6P chez les mêmes souches étudiées et ont suggéré alors que seule la voie de Leloir est impliquée dans le métabolisme du galactose chez *S. thermophilus*. Et par conséquent, le transport du glucide s'effectue par un système de type perméase. Nos résultats rejoignent ceux de HUTKINS et al. (1985a) et HUTKINS et MORRIS (1987) selon lesquels le transport du galactose s'effectue par un système galactose-perméase également présent dans les cellules gal⁻ mais dont l'activité est faible et dépend de la source d'énergie exogène. Par ailleurs, aucune activité d'un système PEP-PTS spécifique du galactose chez la souche CNRZ 302 n'est enregistrée (BENATEYA et al., 1991). Le transport du galactose chez *S. thermophilus* se produit via un système spécifique ATP dépendant de type perméase impliquant une force motrice protonique.

Contrairement aux streptocoques mésophiles du groupe N qui catabolisent conjointement le glucose et le galactose produits d'hydrolyse du lactose, *S. thermophilus* dégrade uniquement le glucose, le galactose est excrété dans le milieu de culture. TINSON et al. (1982) ont montré que certaines souches de *S. thermophilus* peuvent utiliser faiblement le galactose et ont suggéré que les enzymes du métabolisme du galactose soient présentes mais sont de faible activité. D'autre part, THOMAS et CROW (1984) ont isolé des variants de *S. thermophilus* fermentant le galactose en chémostat en présence de fortes concentrations en galactose et limitant en lactose, mais une réversion au phénotype Gal$^-$ était observée après passage sur lait. En 1989, AMOROSO et al. ont montré que ni *S. thermophilus* ni *L. bulgaricus* ne poussent sur galactose mais, associées, ils acquièrent le caractère de fermenter le galactose. Plus récemment, CATZEDDU et al. (1996) ont mis en évidence l'existence de gènes codant pour la synthèse des enzymes de la voie de Leloir et ont montré que ces gènes ne sont pas transcrits. L'expression de ces gènes est sous le contrôle de la régulation de la galactokinase par le glucose et le lactose. Par ailleurs, Le clonage de la galactokinase d'une souche de *S. thermophilus* gal$^-$ chez *E. coli* par MUSTAPHA et al. (1995) a montré une activité de l'enzyme dix fois plus importante chez le microorganisme transformé ; ces auteurs attribuent alors le phénotype naturel gal$^-$ de *S. thermophilus* à la répression du gène de la galactokinase par le glucose puisque leurs résultats indiquent une réduction importante de la transcription du gène de la galactokinase en présence de glucose.

Dans la présente étude, trois mutants stables gal$^+$ ont été isolés à partir des cellules de *S. thermophilus* CNRZ 302 traitées à la nitrosoguanidine. A titre d'exemple le mutant A5 dégrade près de 70% de galactose produit d'hydrolyse du lactose alors que la souche mère l'excrète presque totalement dans le milieu de culture. L'activité croissante de la galactokinase des mutants gal$^+$, comparée à celle de la souche mère corrobore l'existence des enzymes de la voie de Leloir montrée par CATZEDDU et al. (1996), laissant penser à une induction possible par mutation.. La suggestion de HUTKINS et al. (1985b) selon laquelle la galactokinase chez *S. thermophilus* gal$^+$ serait soumise à un mécanisme de induction-répression et que cette enzyme ne serait pas induite chez les souches gal$^-$ semble se confirmer à travers nos résultats. En effet, l'activité de cette enzyme chez le mutant A5 était plus élevée quand la culture a lieu sur galactose par rapport au glucose, indiquant donc que l'enzyme était induite par le galactose. Ainsi, la faible activité de la galactokinase de CNRZ 302 cultivé sur lactose comparée à celle du mutant indique que l'enzyme est sous la dépendance d'une répression catabolique. Cette répression est levée chez le mutant par l'action de l'agent mutagène. La nitrosoguanidine, semble impliquer une mutation au niveau du gène de régulation de la galactokinase.

Il est cependant important, de noter en conclusion, que la dégradation complète du lactose du lait étant une propriété désirée dans les différents processus de fermentation par les bactéries lactiques, l'élucidation des mécanismes de régulation des gènes codant pour les enzymes de la voie de Leloir chez *S. thermophilus* gal$^-$ en particulier, permettrait sans doute de mieux maîtriser les moyens d'arriver à obtenir des mutants stables fermentant le galactose.

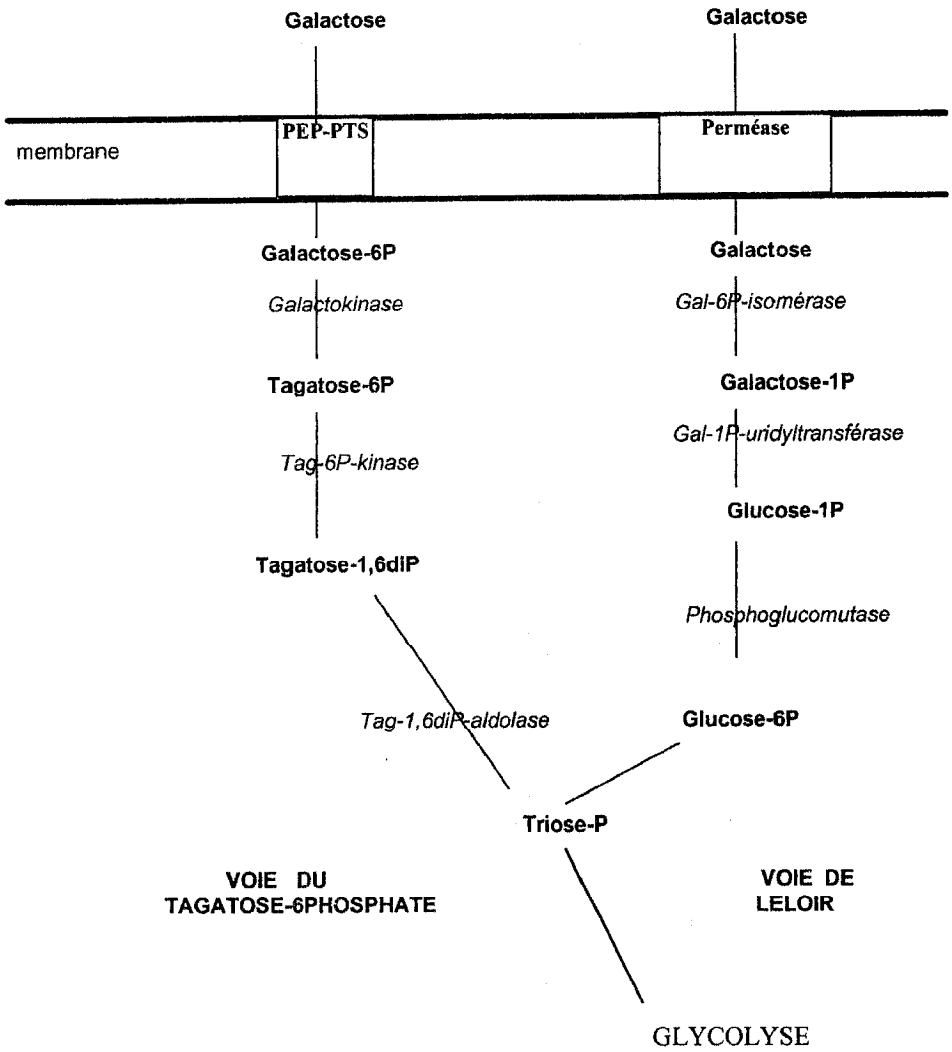

Figure 3 : Voies possibles d'utilisation du galactose par les bactéries lactiques (GROSSIORD et al., 1998)

Retour au menu

Références

ADELBERG E.M., MANDEL M. et CHEN G.C. (1965). Optical conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitrosoguanidine in K12. Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, 788-790.

AMOROSO M.J., MANCA DE NADRA M.C. et OLIVER G. (1989). The growth and sugar utization by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from market yogurt. Lait, 69, 579-528.

BALLARD F.J. (1975). Galactokinase from pig liver. In Methods in enzymology. Vol. XLII. Edited by W.A. WOO. Academic Press, New York. pp. 43-47.
BENATEYA A., BRACQUART P. et LINDEN G. (1991). Galactose-fermenting mutans of *Streptococcus thermophilus*. Can. J. Microbiolo., 37,136-140.

BRACQUART P., (1981). An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. J. Appl. Bacteriol., 51, 303-305.

BURROW C.D., SANDINE W.E., ELLIKER P.R. et SPECKMA C. (1970). Characterization of negative mutans of *Streptococcus diacetylactis*. J. Dairy Sci., 53, 121-125.

CATZEDDU P., VAUGHAN E.E., DEIANA P. et DE VOS W.M. (1996). Why *Streptococcus thermophilus* cannot metabolize galactose. Fifth symposium on lactic acid bacteria, Veldhoven, The Netherlands, Abstract G49.

GROSSIORD B., VAUGHAN E.E., LUESINK E. et DE VOS W.M. (1998). Genetics of galactose utilization via the leloir pathway in lactic acid bacteria. Lait, 78, 77-84.

HUTKINS R. W. et MORRIS H. A. (1987). Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus* : a review. J. Food Prot., 50, 876-884.

HUTKINS R., MORRIS H.A. et McKAY L.L. (1985a). Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 50, 772-776.

HUTKINS R., MORRIS H.A. et McKAY L.L. (1985b). Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiolo., 50, 777-780.

MARSHALL V.M.E. et LAW B.A. (1984). The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria. In Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk . Edited by F.L. Davies and B.A. Law. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York. pp. 67-98.

MIOZZARI G.F., NIEDERBERGER P. et HUTTER R. (1978). Permeabilization of microorganisms by triton X-100. Anal. Biochem., 90, 220-233.

Retour au menu

MIYAMOTO T., REDDY N.S. et NAKAE T. (1983). Induction of mutation in Lactobacillus casei subsp. alactosus by nitrosoguanidine. Agric. Biol. Chem., 47, 2755-2759.

MUSTAPHA A., HUTKINS R.W. et ZIRNSTEIN G.W. (1995). Cloning and characterization of the galactokinase gene from *Streptococcus thermophilus*. J. Dairy Sci., 78, 989-997.

O'LEARY V.S. et WOYCHIKJ.H. (1976). Utilization of lactose, glucose and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. Appl. Environ. Microbiol., 32, 89-94.

THOMAS T.D. et CROW V.L. (1984). Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose limited chemostat cultures. Appl. Environ. Microbiol., 48, 186-191.

THOMAS T.D., TURNER K.W. et CROW V.L. (1980). Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products and regulation. J. Bacteriol., 144, 672-682.

INSON W., HILLIER A.J. et JAGO G.R. (1982). Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. I. Utilization of lactose, glucose and galactose. Aust. J. Dairy Technol., 37, 8-13.