

Optimisation du métabolisme du lactose et du galactose chez *Streptococcus thermophilus*

Durée : 06/2000 – 06/2002

RÉSUMÉ

Streptococcus thermophilus est une des principales bactéries utilisées pour la fabrication de certains produits laitiers dont le yaourt et les fromages à pâte cuite, notamment la Mozzarella. *S. thermophilus* est incapable de fermenter le galactose, une des composantes du lactose. Cette tare métabolique cause différents problèmes à l'industrie laitière. Par exemple, la présence de galactose dans le fromage Mozzarella cause un brunissement lors d'une cuisson prolongée, altérant ainsi sa texture et son goût. L'élimination du galactose permettrait de produire un fromage ayant une résistance accrue au brunissement causé par la cuisson, accordant ainsi une valeur ajoutée au produit manufacturé. Notre projet consiste à concevoir par ingénierie métabolique et génétique une souche de *S. thermophilus* capable de fermenter le galactose.

OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE

L'objectif du projet est de concevoir, par ingénierie métabolique, une souche de *S. thermophilus* capable de fermenter le galactose. Des expériences d'hybridation et d'analyse de séquence d'ADN ont indiqué une forte similitude sur le plan phylogénétique entre *Streptococcus salivarius*, une bactérie de la bouche, et *S. thermophilus*, qui furent même désignées pendant un certain temps par les vocables *S. salivarius ssp. salivarius* et *S. salivarius ssp. thermophilus*. Fait intéressant, *S. salivarius*, contrairement à *S. thermophilus*, est capable de métaboliser le galactose et ne rejette pas de galactose dans le milieu au cours d'une croissance sur lactose. Un programme de recherche visant à expliquer et à corriger l'insuffisance métabolique de *S. thermophilus* doit tenir compte des éléments suivants :

- 1) *S. salivarius* métabolise le galactose par la voie de Leloir. La présence des gènes codant pour les enzymes de cette voie a été établie chez *S. thermophilus*, mais ces gènes n'ont pas été caractérisés chez *S. salivarius*.
- 2) Le métabolisme du lactose fait appel à la même voie métabolique chez les deux organismes.
- 3) La perméase LacS, responsable du transport du lactose chez *S. thermophilus*, peut être phosphorylée par HPr(His-P), une

protéine du système de transport des sucres PTS. L'effet de cette phosphorylation sur l'activité de LacS n'est pas encore clairement établi et les liens qui pourraient exister entre cette phosphorylation et le rejet de galactose dans le milieu sont inconnus.

Compte tenu des éléments mentionnés ci-dessus, les objectifs suivants ont été définis :

- 1) Caractériser sur une base comparative les gènes de *S. salivarius* et de *S. thermophilus* codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme du galactose et du lactose dans le but d'identifier des éléments de nature génétique ou relatifs à la structure des protéines qui pourraient expliquer l'incapacité de *S. thermophilus* à métaboliser le galactose.
- 2) Étudier sur une base comparative l'expression des gènes du galactose et du lactose chez ces deux bactéries.
- 3) Déterminer si la perméase du lactose de *S. salivarius* est soumise à une phosphorylation par la protéine HPr du PTS.
- 4) À la lumière des résultats obtenus, générer par génie génétique une souche de *S. thermophilus* capable de fermenter le galactose.

RÉSULTATS ET APPLICATIONS

Nous avons déterminé la séquence des gènes de *S. salivarius* impliqués dans le métabolisme du galactose et du lactose, ainsi que des régions du chromosome impliquées dans la régulation de ces gènes. Les gènes sont disposés de façon contiguë sur le chromosome dans l'ordre suivant : galK, galT, galE, galM, lacS et lacZ. Cette disposition est identique à celle retrouvée chez *S. thermophilus*. Les gènes galK, galT et galE codent pour les enzymes de la voie de Leloir, alors que les gènes lacS et lacZ codent respectivement pour la perméase du lactose et la β -galactosidase. Les séquences en acides aminés des produits de ces gènes montrent une identité supérieure à 90 % avec les séquences des protéines homologues de *S. thermophilus*. L'analyse des régions promotrices et des terminateurs a montré

que ces éléments de régulation sont virtuellement identiques chez les deux organismes, aussi bien en termes de séquence nucléotidique qu'en termes d'emplacement sur le chromosome. Des études de type Northern ont confirmé la fonctionnalité de ces éléments de régulation transcriptionnelle et démontré qu'au cours d'une croissance sur lactose, les gènes du galactose et du lactose étaient transcrits aussi bien chez *S. salivarius* que chez *S. thermophilus*. L'incapacité de *S. thermophilus* à métaboliser le galactose ne peut donc être attribuée à une déficience entravant la transcription des gènes codant pour les enzymes nécessaires au métabolisme de ce sucre. Une analyse des séquences nucléotidiques permettant l'attachement des ribosomes (SD) a permis de déceler une différence marquée entre la SD du gène galK ➤

RÉSULTATS ET APPLICATIONS (suite)

de *S. salivarius* et la séquence équivalente chez *S. thermophilus*, suggérant que le gène *galK*, codant pour la galactokinase, serait plus difficilement traduit chez *S. thermophilus*. Des mesures d'activités enzymatiques ont confirmé cette hypothèse. Nous avons donc transformé la souche de *S. thermophilus* SMQ-301 avec un plasmide portant le gène *galK* de *S. salivarius* sous le contrôle de son propre promoteur. Le transformant obtenu possède des activités galactokinase supérieures à la souche sauvage et est capable de croître sur galactose. De plus, la vitesse de croissance de cette souche sur lactose n'est pas modifiée. Cependant, nous avons observé que le transformant rejetait toujours du galactose dans le milieu lors d'une croissance sur 0,2 % lactose. Néanmoins, les quantités de galactose rejetées étaient moindres que celles observées avec la souche sauvage. De plus, la souche transformée métabolisait très rapidement le galactose vers la fin de la croissance. Nous avons également montré que LacS de *S. salivarius* était phosphorylée par HPr (His-P), mais aussi par une forme doublement phosphorylée de cette protéine, HPr(His-P)(Ser-P), ce qui n'a jamais été démontré chez *S. thermophilus*. Des travaux sont en cours présentement pour déterminer si LacS de *S. thermophilus* est également

phosphorylée par HPr(His-P)(Ser-P). Les résultats obtenus nous permettent d'envisager la production d'une souche de *S. thermophilus* capable de fermenter le galactose par modification de la séquence SD de son gène *galK*. Le rejet de galactose par les souches sauvages de *S. thermophilus* au cours d'une croissance sur lactose ne semble pas, cependant, lié uniquement à l'absence d'activité galactokinase. La phosphorylation de la perméase LacS pourrait également être impliquée dans ce phénomène. Nous poursuivons nos études afin de mettre à la disposition de l'industrie de transformation du lait une souche de *S. thermophilus* capable de métaboliser le galactose en présence de lactose. La disponibilité de cette nouvelle souche devrait permettre de fabriquer un fromage Mozzarella résistant au brunissement lors de la cuisson, ajoutant ainsi au produit manufacturé une valeur ajoutée. La disponibilité de souches de *S. thermophilus* Gal+ permettrait aussi de réduire l'utilisation des lacto-bacilles dans les ferments thermophiles simplifiant ainsi leur préparation et réduisant du même coup la protéolyse dans les fromages. Une souche de *S. thermophilus* Gal+ pourrait également trouver des applications dans la fabrication des yaourts.

TRANSFERT DES RÉSULTATS

L'objectif du projet consiste à produire une ou des souches de *S. thermophilus* ayant acquis la capacité de métaboliser le galactose

de façon permanente. Nous estimons que l'obtention d'une telle souche nécessitera encore quelques années de recherche.

PARTENAIRES FINANCIERS

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Novalait inc.

BUDGET TOTAL : 100 000 \$

POINT DE CONTACT

Responsable du projet :
Christian Vadeboncoeur
Université Laval
Faculté des sciences et de génie
Département de biochimie et de microbiologie
Sainte-Foy (Québec) G1K 7P4
Téléphone : (418) 656-2319
Télécopieur : (418) 656-2861
Courriel : Christian.Vadeboncoeur@bcm.ulaval.ca

Collaborateurs :
Sylvain Moineau et Michel Frenette, Université Laval,
Département de biochimie et de microbiologie