

Volatiles sulphur compounds production by cheese-ripening micro flora: Catabolism of Lcysteine

Micloth Lopez del Castillo - Lozano

▶ **To cite this version:**

Micloth Lopez del Castillo - Lozano. Volatiles sulphur compounds production by cheese-ripening micro flora: Catabolism of Lcysteine. Sciences of the Universe [physics]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0010 . pastel-00003442

HAL Id: pastel-00003442
https://pastel.hal.science/pastel-00003442

Submitted on 27 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

THESE

Présentée et soutenue publiquement par

Micloth LOPEZ DEL CASTILLO - LOZANO

Le 5 avril 2007

Pour obtenir le grade de

Docteur

de L'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Science des Aliments

PRODUCTION D'AROMES SOUFRES PAR LES FLORES D'AFFINAGE : CATABOLISME DE LA L-CYSTEINE

Jury

Rapporteurs	Mme. Anne THIERRY	Chargé de Recherche, INRA Rennes
	M. Gilles DE REVEL	Professeur, Université Bordeaux 2
Membres du jury	Mme. Sophie LANDAUD	Maître de Conférences, AgroParisTech
	M. Henry Eric SPINNLER	Professeur, AgroParisTech
Directeur de thèse	M. Pascal BONNARME	Directeur de Recherche, INRA Grignon

Remerciements

Je souhaite remercier M. Georges CORRIEU, directeur du Laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (LGMPA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Grignon, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

J'adresse des remerciements particuliers à M. Pascal BONNARME, Directeur de recherches à l'INRA de Grignon, pour son appui scientifique et disponibilité pour l'encadrement de ce travail.

J'exprime des remerciements particuliers à Mme Sophie LANDAUD, Maître de conférences à l'AgroParisTech, pour son appui scientifique et les conseils qu'elle m'a prodigués. Je souhaite aussi lui exprimer ma sincère reconnaissance pour sa confiance et son soutien moral témoigné tout au long de ce projet.

Mes remerciements s'adressent également à M. Henry-Eric SPINNLER, Professeur à l'AgroParis Tech, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance et pour ses conseils au cours de cette thèse.

Je remercie Mme Anne THIERRY, Chargé de Recherche de l'UMR 1253 Science et Technologie du lait et de l'œuf INRA Agrocampus Rennes, et M. Gilles DE REVEL, Professeur à l'UMR 1219 Oenologie de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, qui ont bien voulu accepter la tâche d'être rapporteur de cette thèse.

Je tiens à remercier aussi à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et plus particulièrement à :

Armelle DELILE et Roselyne TACHE pour son soutien et connaissanes techniques pendant ce travail de thèse ; à Soulaf MANSOUR pour sa collaboration lors de son stage au LGMPA. Merci à vous toutes pour votre amitié et soutien. Merci de m'avoir écouté.

Un grand merci aussi à tous les membres du LGMPA pour leur accueil chaleureux et aux thésards et stagiaires pour leur encouragements et leur amitié.

Je tiens à remercier particulièrement le “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (Conseil National de Science et Technologie) du Mexique pour la bourse attribuée, sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser cette thèse.

Finalement, j'adresse un immense remerciement à ma chère épouse Carmen ; à mes enfants Adriel et Yared ; mes sœurs Abigail et Jael, et à mes chers parents Carlos et Francisca pour leur inconditionnel soutien, compréhension et exhortations.

Publications et Posters

PUBLICATIONS :

M. López del Castillo-Lozano, R. Tâche, P. Bonnarme, S. Landaud. (2007) Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: the first step towards L-cysteine catabolism. *Journal of Microbiological Methods* 69: 70–77.

M. López del Castillo-Lozano, S. Mansour, R. Tâche, P. Bonnarme, S. Landaud. (2007) Effect of cysteine addition on volatile sulphur compound production by cheese-ripening bacteria. (Soumis à *International Journal of Food Microbiology*).

M. López del Castillo-Lozano, M., A. Delile, H.E. Spinnler, P. Bonnarme, S. Landaud. (2007) Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. (Accepté, *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-007-0571-3).

POSTERS :

López del Castillo-Lozano, M., Bonnarme, P., Landaud, S. Première étude du catabolisme de la L-cystéine par les flores d'affinage des fromages. *3ème rencontre de l'Ecole doctorale ABIES,* Mars 2005, Paris, France. Gagnant d'un des quatre prix décernés par l'Ecole doctorale.

López del Castillo-Lozano, M., Bonnarme, P. and Landaud, S. Fisrt study of L-cysteine catabolism by cheese-ripening microorganisms. 11th Weurman Flavour Research Symposium, 21-24 June 2005, Roskilde, Denmark.

López del CastilloLozano, M., Bonnarme, P., Landaud, S. Towards a better understanding of L-methionine and L-cysteine catabolism for the production of volatile sulphur compounds by cheese-ripening microorganisms. International Symposium of Food Microbiology, 24-29 August 2006, Bologna, Italy.

Lejeune, I., L López del Castillo-Lozano, M., Collins, S., Mélotte, L. A new assay for the screening of brewing yeast in their ability to excrete hydrogen sulphide. 31st Congress European Brewery Convention, 6-10 May 2007, Venice, Italy.

Sommaire

SOMMAIRE DES FIGURES ..... *V*
SOMMAIRE DES TABLEAUX ..... *VII*
LISTE DES ANNEXES ..... *IX*
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS ..... *X*

INTRODUCTION **1**

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE PROCESSUS D'AFFINAGE DU FROMAGE *7*

I.1. PROTEOLYSE ET GENERATION DES COMPOSES D'AROMES **7**
I.1.1. Les caséines : principales protéines dans le caillé 8
I.1.2. Complexes enzymatiques impliqués dans la dégradation des protéines 11
I.1.2.1. Activité protéolytique du levain lactique 12
I.1.2.2. Activité protéolytique des flores d'affinage 12
I.1.2.2.1. Des bactéries propioniques 13
I.1.2.2.2. Des bactéries de surface 13
I.1.2.2.3. Des levures et moisissures 14
I.1.3. Principales enzymes impliquées dans le catabolisme des acides aminés libres 15
I.1.3.1. Les transaminases 16
I.1.3.2. Les décarboxylases 19
I.1.3.3. Les déshydrogénases 20
I.1.3.4. Les lyases 22

II. BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES SOUFRES : L-CYSTEINE ET L-METHIONINE *23*

II.1. ASSIMILATION DU SOUFRE **24**

II.2. BIOSYNTHESE DE LA L-CYSTEINE **27**

II.3. BIOSYNTHESE DE LA L-METHIONINE **29**

II.4. CONSERVATION DU SOUFRE REDUIT DANS LE GLUTATHION **30**

II.5. TRANSPORT DU SULFATE, DE LA L-CYSTEINE ET DE LA L-METHIONINE **31**

III. GENESE DES COMPOSES SOUFRES VOLATILS *33*

III.1. CATABOLISME DE LA L-METHIONINE **33**

III.2. CATABOLISME DE LA L-CYSTEINE **40**

III.3. LES COMPOSES SOUFRES VOLATILS DANS LE FROMAGE **47**
III.3.1. Le méthanethiol et le méthional 47
III.3.2. Les polysulfures 49
III.3.3. Les thioesters 52
III.3.4. Le sulfure d'hydrogène ou H_2S 54

III.4. METHODES DE QUANTIFICATION DE L'H_2S **55**

IV. LA FLORE D'AFFINAGE DES FROMAGES A PATE MOLLE *58*

IV.1. LES LEVURES **58**
IV.1.1. *Le genre Debaryomyces* 58
IV.1.2. Le genre Geotrichum 59
IV.1.3. Le genre Kluyveromyces 60

IV.1.4. Le genre Saccharomyces 60
IV.1.5. Le genre Yarrowia 61

IV.2. LES BACTERIES 62
IV.2.1. Le genre Arthrobacter 63
IV.2.2. Le genre Brevibacterium 63
IV.2.3. Le genre Corynebacterium 64
IV.2.4. Le genre Microbacterium 65
IV.2.5. Le genre Staphylococcus 65

B. MATERIELS ET METHODES

V. MATERIEL MICROBIOLOGIQUE 69

V.1. COLLECTION DE SOUCHES UTILISEES 69
V.1.1. Conservation des souches 69
V.1.2. Pureté des cultures 69

VI. CONDITION DE CULTURE DES MICRO-ORGANISMES 71

VI.1. PRE-CULTURES EN MILIEU COMPLEXE 71

VI.2. ETUDE I. CRIBLAGE DES SOUCHES POUR LA PRODUCTION DE SULFURE D'HYDROGENE (H_2S) 71
VI.2.1. Préparation des flacons piège pour l'H_2S 72

VI.3. ETUDE II : EFFET DE LA CYSTEINE SUR LA PRODUCTION DE CSV 73

VII. ANALYSES REALISEES SUR LES CULTURES 74

VII.1. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES 74
VII.1.1. Mesure du pH 74
VII.1.2. Mesure de l'absorbance 74
VII.1.3. Mesure du poids sec 74

VII.2. ANALYSES CHIMIQUES 74
VII.2.1. Dosage de la L-cystéine 74
VII.2.1.1. Méthode par dérivation au DTNB 74
VII.2.1.2. Réaction à la ninhydrine acide 76
VII.2.2. Dosage de l'H_2S par synthèse du bleu de méthylène 77

VII.3. DOSAGES DES COMPOSES NON VOLATILS PAR CLHP 78
VII.3.1. Dosage de la L-méthionine résiduelle 78
VII.3.2. Dosage des cétoacides et des hydroxyacides 79

VII.4. DOSAGES DES COMPOSES PAR CPG-SM 79
VII.4.1. Les composés volatils 79
VII.4.1.1. Extraction par analyse dynamique de l'espace de tête (purge and trap) 79
VII.4.1.2. Extraction par SPME 81
VII.4.2. Séparation, détection et quantification des composés volatils 81
VII.4.3. Les composés non-volatils : Dérivation et analyse par GC-MS 82
VII.4.3.1. Protocole de double dérivation 82
VII.4.3.2. Analyse par CPG-SM 84

VII.5. DOSAGES ENZYMATIQUES 85
VII.5.1. Préparation des extraits acellulaires 85
VII.5.2. Dosage des protéines 85
VII.5.3. Dosage de l'activité déméthiolase 86
VII.5.4. Dosage de l'activité cystathionine β–γ-lyase 87
VII.5.5. Dosage de l'activité transaminase 89

VII.6. ANALYSE STATISTIQUE 92

C. RESULTATS ET DISCUSSION

VIII. MISE AU POINT DES TECHNIQUES 95

VIII.1. MISE AU POINT DU TEST DE CRIBLAGE : DOSAGE DE L'H_2S 95

VIII.1.1. Test de dosage de l'H_2S par précipitation avec des métaux 95

VIII.1.2. Méthode de dosage de l'H_2S par la réaction de synthèse du bleu de méthylène 97

VIII.2. MISE AU POINT DU DOSAGE DE LA CYSTEINE 101

VIII.2.1. Dosage par dérivation au DTNB et séparation par CLHP 101

VIII.2.2. Dosage par réaction à la ninhydrine acide 103

VIII.2.3. Perte de la cystéine par oxydation en milieu complexe 104

IX. CRIBLAGE DES SOUCHES ET PRODUCTION DE COMPOSES SOUFRES VOLATILS DANS DES MILIEUX SYNTHETIQUES ENRICHI EN L-CYSTEINE 109

X. EFFET DE LA CYSTEINE SUR LA PRODUCTION DE CSV DANS DES MILIEUX ENRICHIS EN METHIONINE ET EN CYSTEINE 119

X.1. ETUDE CHEZ LES BACTERIES SELECTIONEES 120

X.1.1. Etude de B. aurantiacum ATCC 9175 et C. glutamicum COD13 121

X.1.1.1. Croissance des bactéries 121

X.1.1.2. Effet de l'addition de cystéine sur la production totale de CSV 121

X.1.1.3. Effet de l'addition de cystéine sur la composition du profil de CSV 123

X.1.1.4. Consommation de la méthionine et de la cystéine 123

X.1.1.5. Recherche des intermédiaires métaboliques de dégradation de la méthionine et la cystéine .. 124

X.1.1.6. Effet de l'addition de cystéine sur des activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme des acides aminés soufrés 125

X.1.1.7. Discussion et Conclusions 127

X.1.2. Etude d'Arthrobacter spp 7(2) et de B. linens BL918 129

X.1.2.1. Effet de l'addition de cystéine sur la production totale de CSV 133

X.1.2.2. Effet de l'addition de cystéine sur la composition du profil de CSV 135

X.1.2.3. Consommation de la méthionine et de la cystéine 135

X.1.2.4. Recherche des intermédiaires métaboliques de dégradation de la méthionine et la cystéine .. 137

X.1.2.5. Effet de l'addition de cystéine sur des activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme des acides aminés soufrés 138

X.1.2.6. Effet de la cystéine sur l'évaluation sensorielle des cultures 140

X.1.2.7. Discussion et Conclusions 141

X.2. ETUDE CHEZ LES LEVURES SELECTIONNEES 143

X.2.1. Résultats 147

X.2.1.1. Croissance des levures 147

X.2.1.2. Production de CSV à partir de la méthionine 147

X.2.1.3. Production d'H_2S et de CSV à partir des mélanges de méthionine-cystéine 148

X.2.1.4. Consommation de la méthionine et de la cystéine 150

X.2.1.5. Recherche des intermédiaires métaboliques de dégradation de la méthionine et la cystéine .. 152

X.2.1.6. Effet de l'addition de cystéine sur des activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme des acides aminés soufrés 154

X.2.1.7. Effet de la cystéine sur l'évaluation sensorielle des cultures 155

X.2.2. Discussion et Conclusions 157

D. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 169

E. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 177

F. ANNEXES 205

SOMMAIRE DES FIGURES

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure A-1. Cycle biologique du soufre 24

Figure A-2. Biosynthèse des acide aminés soufrés L-cystéine et L-méthionine à partir du sulfate 26

Figure A-3. Voie de trans-sulfuration entre l'homocystéine et la cystéine. 28

Figure A-4. Le cycle du glutathion 31

Figure A-5. Catabolisme de la L-méthionine et production de composés soufrés volatils 34

Figure A-6. Types de réactions catalysées par la méthionine γ-lyase. 36

Figure A-7. Dégradation de Strecker des acides aminés et exemple de quelques aldéhydes de Strecker issus de cette réaction 39

Figure A-8. Dégradation de Strecker de la L-méthionine 40

Figure A-9. Voies générales pour le catabolisme de la L-cystéine 42

Figure A-10. Réactions enzymatiques et non-enzymatiques de dégradation du mercaptopyruvate 43

Figure A-11. Dégradation de Strecker de la L-cystéine 44

Figure A-12. Exemple de l'attaque nucléophile de l'H_2S sur les groupes carboxyles 46

Figure A-13. Quantification du sulfure d'hydrogène (H_2S) par la réaction de synthèse du bleu de méthylène 57

B. MATERIELS ET METHODES

Figure B-1. Système de piégeage de l'H_2S mis au point pour le criblage de souches 71

Figure B-2. Principe de la dérivation avec le réactif d'Ellman (DTNB) 75

Figure B-3. Réaction générale des acides aminés avec la ninhydrine 77

Figure B-4. Volatilisation des intermédiaires non volatils par dérivatisation 83

Figure B-5. Activité déméthiolase (méthionine γ-lyase, E.C. 4.4.1.11) 86

Figure B-6. Activités de la cystathionine γ-lyase (E.C. 4.4.1.1) et cystathionine β-lyase (E.C. 4.4.1.8) sur la cystathionine 88

Figure B-7. Principe de dosage de l'activité transaminase 90

C. RESULTATS ET DISCUSSION

Figure C-1. Test pour la quantification de l'H_2S par précipitation avec des métaux 96

Figure C-2. Flacons de culture cellulaire utilisés pour piéger l'H_2S 97

Figure C-3. Gamme étalon de la réaction de bleu de méthylène à 1,0 g/l d'aniline 98

Figure C-4. Gamme étalon de la réaction du BM à 8,0 g/l d'aniline. 100

Figure C-5. Gamme étalon de la cystéine dérivée au DTNB et analysée par CLHP 103

Figure C-6. Gamme étalon pour la quantification de la L-cystéine après réaction à la ninhydrine acide 104

Figure C-7. Cinétique d'oxydation de L-cystéine dans les milieux PDB et BHI pour différentes conditions d'agitation 105

Figure C-8. Consommation de L-méthionine et L-cystéine par BL9175 et COD13 124

Figure C-9. Activités enzymatiques déméthiolase et cystathionine β–γ lyase de BL9175 et COD13 126

Figure C-10. Activités enzymatiques déméthiolase et cystathionine β–γ lyase de AR7(2) et BL918 139

Figure C-11. Spectre de masse du 2-méthyl-tétrahydrothiophèn-3-one et (B) du composé inconnu 150

Figure C-12. CSV totaux, L-méthionine et L-cystéine consommées par les levures sélectionnées 151

Figure C-13. Voie métabolique de formation de composés soufrés volatils 158

SOMMAIRE DES TABLEAUX

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau A-1. Les principales transformations biochimiques au cours de l'affinage 8

Tableau A-2. Principales caractéristiques des caséines du lait de vache 11

Tableau A-3. Composés issus de la dégradation enzymatique ou chimique des acides aminés 17

Tableau A-4. Activités cystathionine β–lyase, cystathionine γ–lyase et méthionine γ–lyase de bactéries lactiques et du genre *Brevibacterium*. 37

Tableau A-5. Composés volatils ayant un impact sur l'arôme des fromages 48

Tableau A-6. Note aromatique et seuil de perception des composés soufrés identifiés dans les fromages 50

Tableau A-7. Méthodologies générales pour la quantification de l'H_2S 56

B. MATERIELS ET METHODES

Tableau B-1. Souches de levures et de bactéries criblées pour la production d'H_2S 70

Tableau B-2. Composition de l'agar "piège" utilisé pour le criblage des souches 72

Tableau B-3. Concentrations en L-cystéine et en L-méthionine utilisées lors de l'étude de l'effet de la L-cystéine sur la production de CSV 73

Tableau B-4. Paramètres du "Purge and Trap" pour l'analyses des composés volatils 80

Tableau B-5. Programme du four pour l'analyse des composés volatils par Purge and Trap et SPME 82

Tableau B-6. Programme du four pour l'analyse des composés silylés. 85

Tableau B-7. Composition du mélange réactionnel de dosage de la déméthiolase 87

Tableau B-8. Composition du mélange réactionnel de dosage de la cystathionine β–γ-lyase 88

Tableau B-9. Composition du milieu réactionnel de la transaminase 90

Tableau B-10. Composition du milieu réactionnel de dosage de l'acide glutamique 91

C. RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau C-1. Effet de la congélation pendant 48h à -20°C sur la L-cystéine résiduelle dans les milieux PDB et BHI 107

Tableau C-2. Composés soufrés et H_2S produits par *B. linens* 9175 et *C. glutamicum* D13 122

Tableau C-3. Concentration en HMBA déterminée sur des cultures de COD13 enrichis en L-cystéine, L-méthionine, ou en mélange 125

Tableau C-4. Concentrations (ppm) des polysulfures, des thioesters, et de l'H_2S produits par les souches de bactéries AR7(2) et BL918 134

Tableau C-5. Consommation de L-cystéine et de L-méthionine par des bactéries dans des milieux de culture enrichis avec de L-méthionine, L-cystéine ou les deux 136

Tableau C-6. α-Cétoacides produits par AR7(2) dans des cultures enrichies en cystéine, méthionine, ou leur mélange 137

Tableau C-7. Descripteurs qualitatifs des cultures réalisées avec les souches AR7(2) et BL918. 140

Tableau C-8. Composés soufrés volatils (CSV) produits par les levures sélectionnées 149

Tableau C-9. Concentration (mgl^{-1}) en pyruvate accumulé dans les cultures des levures étudiées. 153

Tableau C-10. Concentration (mgl^{-1}) en KMBA et en HMBA accumulés dans les cultures des levures étudiées 154

Tableau C-11. Activité déméthiolase (DML) déterminées sur des extraits acellulaires des levures étudiées 155

Tableau C-12. Description de l'odeur des cultures de KL640 et YL200 156

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. Distribution des différentes formes de l'H_2S en solution aqueuse en fonction du pH 207

ANNEXE 2. Composition des milieux de culture PDB et BHI 208

ANNEXE 3. Formulation du tampon de phosphate 209

ANNEXE 4. Chromatogramme de la cystéine dérivée au DTNB et séparée par CLHP 210

ANNEXE 5. Spectre de masse des composés purs derivés 211

ANNEXE 6. Chromatogramme et spectre de masse des intermediaires métaboliques chez *S. cerevisiae* 45(3) 213

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ArAA	Acides aminés aromatiques
AdoMet	S-adénosylméthionine
AdoHC	S-adénosylhomocystéine
BcAA	Acides aminés à chaîne branchée
BcDH	Déshydrogénase spécifique des α-cétoacides à chaîne branchés
BM	Bleu de méthylène
CBL	Cystathionine β-lyase
CGL	Cystathionine γ-lyase
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CSV	Composés Soufrés Volatils
Cys	L-cystéine
DMDS	Disulfure de diméthyle
DMTS	Trisulfure de diméthyle
DMQS	Tétrasulfure de diméthye
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)
DTT	1,4-dithiotritol
GDH	Glutamate déshydrogénase
GMP	Glycomacropeptide
GSH	Glutathion
HMBA	Acide 2-hydroxy-4-méthylthiobutyrique
INT	Chlorure d'iodonitrotétrazolium
KMBA	Acide 2-oxo-4-méthylthiobutyrique
Met	L-méthionine
MGL	Méthionine γ-lyase
MTL	Méthanethiol
OAH	O-acétylhomosérine
OAS	O-acétylsérine
OSH	O-succinylhomosérine
PDC	Pyruvate décarboxylase
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PLP	Pyridoxal-5-phosphate
ppb	Parties par milliard
ppm	Parties par million
P&T	Purge and Trap - extraction dynamique de l'espace de tête
R^2	Coefficient de corrélation
SM	Spectrométrie de Masse
SMTA	S-méthylthio acétate
SMTB	S-méthylthio butyrate
SMTH	S-méthylthio hexanoate
SMTHp	S-méthylthio heptanoate
SMTIB	S-méthylthio isobutyrate

SMTIV	S-méthylthio isovalérate
SPME	Solid phase micro extraction – micro-extraction en phase solide
TPP	Thiamine-pyrophosphate
Tris	Tris hydroxyméthyle aminoéthane

Introduction

La production française de fromages représente 1,8 million de tonnes, soit 10% de la production mondiale. Les écosystèmes microbiens sont des opérateurs majeurs de la construction de leur qualité. Ils sont responsables en autre de la biosynthèse de composés soufrés dont l'impact sensoriel a un rôle décisif sur la typicité des plus réputés de ces produits. Ces composés soufrés volatils (CSV) participent de manière importante à la qualité aromatique et à la typicité des aliments du fait notamment de leur faible seuil de détection et de leur forte réactivité. Une connaissance approfondie et un contrôle accru de leur production par les écosystèmes fromagers sont donc d'un intérêt majeur pour maintenir la grande qualité de ces produits. De plus, les composés soufrés ne sont pas seulement produits dans le fromage mais également dans d'autres produits fermentés par des consortia microbiens (ex: vin, bière), ce qui confère à leur étude un intérêt plus large.

Les thiols ont plusieurs CSV comme précurseurs communs, le méthanethiol (MTL), l'H_2S ou les dérivés cystéinylés. Ces thiols proviennent de la coupure de la liaison carbone/soufre de dérivés de la méthionine ou de la cystéine (Bonnarme et col., 2001b). D'autre part, au rôle d'aromatisation de l'aliment, pourrait s'ajouter l'effet santé de ces composés du fait des propriétés antioxydantes de certains d'entre eux, comme par exemple les thiols (Anwar et col., 2003 ; Bang et col., 2004).

Les CSV tels que le méthanethiol (MTL), le disulfure de diméthyle (DMDS), le trisulfure de diméthyle (DMTS), le *S*-méthylthio acétate (SMTA) et le *S*-méthylthio butyrate (SMTB) (Lamberet et col., 1997a, 1997b ; Sablé et Cottenceau, 1999) ont été identifiés dans différentes variétés de fromage affiné, comme le cheddar, le limburger, le camembert et les fromages de type bleu (Engels et Visser 1994 ; Molimard et Spinnler 1996). Ces CSV proviennent principalement du catabolisme de la méthionine contenue dans les protéines du lait où elles constituent la principale source d'acides aminés soufrés. Ce métabolisme a été étudié depuis plusieurs années et les principales voies de dégradation ont été mises en évidence chez des bactéries et des levures de la flore d'affinage du fromage (Arfi et col., 2002 ; Bondar et col., 2005 ; Bonnarme et col., 2000 ; Amarita et col., 2004). Bien que les travaux concernant la production de CSV dans le fromage se soient essentiellement focalisés sur la flore bactérienne, notamment les bactéries d'affinage (Ferchichi et col., 1986), des résultats plus récents mettent en évidence la contribution significative des levures à la génération de ces composés (Corsetti et col., 2001 ; Spinnler et col., 2001 ; Arfi et col., 2002).

Jusqu'à ce jour, la recherche de l'origine des CSV dans le fromage a été principalement focalisée sur le catabolisme de la méthionine (Ferchichi et col., 1985 ; Dias et Weimer, 1998 ; Bonnarme et col., 2000), sans prendre en compte le possible rôle de la cystéine. Ceci peut être dû à sa faible concentration potentielle dans le caillé où elle se trouve dans un rapport approximatif de 1 : 5 par rapport à la méthionine. (Fox et col., 2000 ; Wood et col., 1985).

Puisque la cystéine est présente dans le caillé dans les α_{Sn2} et κ-caséines, qui ne sont que faiblement hydrolysées pendant l'affinage (Sousa et col., 2001), il est probable qu'une partie de la méthionine soit transformée en cystéine par la voie de transulfuration (Soda, 1987). Les principales enzymes dans cette voie métabolique, la cystathionine β- lyase (CBL) et la cystathionine γ-lyase (CGL), participent également à la biosynthèse de la méthionine à partir de la cystéine (Hwang et col., 2002). En plus de leur activité biosynthétique, il a été démontré que ces deux enzymes peuvent produire du méthanethiol à partir de la méthionine et, dans le cas de la CGL, de l'H_2S à partir de la cystéine. Leurs activités semblent (CBL-CGL) cependant être contrôlées par la méthionine et la cystéine elles-mêmes. En effet, Dias et Weimer (1998a) ont observé que l'activité totale cystathionase (CBL + CGL) de *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* S2 diminuait lorsque la concentration en méthionine dans les milieux de culture augmentait. Ces auteurs ont observé cet effet chez *B. linens* BL2 et *L. lactis* ssp *cremoris* S2 en augmentant légèrement (0,002%) la concentration en cystéine dans leur milieu de culture.

Le rôle de la cystéine comme précurseur de CSV est bien établi dans des boissons fermentées (Hansen et Kielland-Brandt, 1996 ; Duan et Roddick, 2005 ; Marchand et col., 2002 ; Sutherland et col., 2003). Dans la production de bière ou de vin, l'excès de cystéine dans le milieu provoque une formation accrue d'H_2S pendant la fermentation par un mécanisme de désulfhydration de la cystéine (Laurence et Cole, 1968). Les enzymes impliquées dans le catabolisme de la cystéine ont été décrites chez des bactéries, telles que *Bacillus subtilis* (Yoshida et col., 2002), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Aubel et col., 2002) et *Streptococcus anginosus* (Auger et col., 2005b), avec la production récurrente d'H_2S. En raison de leur groupement thiol libre, la cystéine et l'H_2S sont des composés fortement réactifs et peuvent donc contribuer à la génération d'autres composés contenant du soufre.

L'objectif principal de ce travail a donc été de mettre en évidence la contribution de la cystéine dans la production de CSV par des levures et des bactéries de la flore d'affinage.

Dans une première partie bibliographique, les principales caractéristiques des protéines du lait et des enzymes impliquées dans leur dégradation seront abordées. Ainsi, nous décrirons les activités enzymatiques qui réalisent leur dégradation en acides aminés libres, puis en composés d'arôme, ainsi que celles assurant la dégradation des acides gras du lait. L'étude bibliographique se poursuivra par la description des principales voies de biosynthèse des acides aminés soufrés, cystéine et méthionine, ainsi que l'éventuelle accumulation du soufre sous forme de glutathion dans les cellules microbiennes eucaryotes. Enfin, les voies cataboliques de la cystéine et de la méthionine seront abordées en détail ; et pour finir, les principales caractéristiques des levures et des bactéries étudiées lors de ce travail de thèse seront présentées.

Dans une deuxième partie, les méthodologies utilisées tout au long de ce travail seront décrites d'une manière exhaustive.

Dans une troisième partie, les résultats obtenus lors de ce travail de thèse seront présentés sous forme de deux sous-parties.

- Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer la capacité des micro-organismes testés à dégrader la cystéine à travers une quantification simple et rapide de son principal produit de dégradation : l'H_2S. Pour ce faire, la mise à point d'une technique efficace de criblage de souches de micro-organismes a été nécessaire.
- Dans un deuxième temps, l'étude du catabolisme de la cystéine et la génération associée de CSV a été entreprise en étudiant les souches préalablement sélectionnées. L'effet de l'addition de différentes concentrations de cystéine sur la production de CSV à partir de la méthionine a également été abordé, comme une première approche de ce co-métabolisme. Dans un souci de clarté, et compte tenu de la grande diversité des comportements rencontrés, nous présenterons dans deux parties indépendantes les résultats concernant les bactéries d'une part, les levures d'autre part.

Finalement, des conclusions générales de ce travail de thèse et ses perspectives seront présentées et discutées.

A. Etude Bibliographique

I. LE PROCESSUS D'AFFINAGE DU FROMAGE

La transformation du lait en fromage comporte traditionnellement trois étapes : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. Cependant, afin d'assurer une grande diversité au produit, différents paramètres technologiques sont mis en oeuvre à chacune de ces trois étapes.

La coagulation est la première étape de la fabrication fromagère. Elle implique la modification physicochimique des micelles de caséines sous l'action d'enzymes protéolytiques (la présure) et éventuellement de l'acide lactique. Cette modification entraîne la formation du coagulum ou gel (formé principalement de caséines) qui sera ensuite séparé du lactosérum (formé principalement par des protéines hydrosolubles du lait) pendant l'égouttage, deuxième étape de la fabrication fromagère.

L'affinage est la dernière étape de la fabrication et peut durer de trois semaines à plus de deux ans selon la variété du fromage produit. Le caillé subit tout au long de l'affinage de nombreuses transformations biochimiques liées à l'assimilation du lactose résiduel, du lactate et du citrate, la lipolyse des corps gras et la protéolyse des caséines (tableau A-1). Ces transformations sont principalement réalisées par l'action d'enzymes d'origine microbienne, Les différents produits issus de ces transformations primaires peuvent être des précurseurs de nouveaux composés.

A cause du nombre important de composés potentiellement produits par ces mécanismes biochimiques et chimiques complexes, l'affinage reste un processus difficile à maîtriser. Cependant, la qualité organoleptique du fromage produit dépend principalement de cette étape à travers, entre autre, la génération de composés volatils et non-volatils.

I.1. PROTEOLYSE ET GENERATION DES COMPOSES D'AROMES

Dans la plupart des fromages, la protéolyse est la transformation biochimique la plus importante pendant l'affinage. Elle peut différer en intensité et en qualité selon la variété du

fromage considéré, c'est à dire selon la nature du caillé, les paramètres de fabrication et la flore microbienne utilisée (Ramet, 1997).

Tableau A-1. Les principales transformations biochimiques au cours de l'affinage (d'après Lenoir et col., 1985).

Substrats	**Type de transformation**	**Principaux produits formés**
Protéines, Peptides	Protéolyse	Peptides, Acides aminés
Acides aminés	Désamination, Transamination Décarboxylation, Dégradation des chaînes latérales	NH_3, CO_2, amines, acides α-cétoniques, phénols, indole, méthanethiol, et autres composés soufrés volatils
Amines	Désamination oxydative	NH_3, aldéhydes
α-cétoacides	Décarboxylation	Aldéhydes
Triglycérides, Glycérides partiel	Lipolyse	Acides gras, glycérides partiels, glycérol
Acides gras à chaîne moyenne ou courte	β-oxydation	Méthylcétones, CO_2
Méthylcétones	Réduction	Alcools secondaires
Acides gras (à chaîne courte) Ethanol, alcools aliphatiques ou aromatiques Thiols	Estérification	Esters Thioesters
Lactose	Fermentation lactique homofermentative	Acide lactique
Lactose	Fermentation lactique hétérofermentative	Acide lactique, éthanol, acide acétique, CO_2
Lactose	Fermentation alcoolique	Ethanol, CO_2, acide acétique, acétaldéhyde
Acide citrique	Assimilation par les bactéries lactiques	CO_2, acétaldéhyde, acétoine, diacétyle
Acide lactique	Fermentation propionique	Acide propionique, acide acétique, CO_2

I.1.1. Les caséines : principales protéines dans le caillé

Les protéines du lait appartiennent à deux catégories principales : les protéines du sérum et les caséines. Les protéines du sérum sont solubles à pH 4 et 20°C, alors que les caséines restent insolubles dans les conditions physico-chimiques rencontrées durant la phase

de coagulation du lait (Choisy et col., 1997a). Ainsi, elles précipitent pendant cette étape et restent dans le caillé après l'égouttage. Les protéines du sérum (la β-lactoglobuline A et l'α-lactalbumine B), ainsi que le résidu glycosylé hydrosoluble (glycomacropeptide) de la κ-caséine, sont éliminés pendant l'égouttage avec le lactosérum (Fox, 2001). Par conséquent, on peut considérer que les caséines sont la principale source de protéines et donc d'acides aminés dans le caillé.

Dans le lait de vache, quatre types de caséines sont décrites : les α_{S1}-, α_{S2}-, β-, et κ-caséines. Elles représentent en moyenne 38%, 10%, 34%, et 15% de la fraction caséique totale. Même si les caséines sont de petites molécules, avec des masses moléculaires très proches (entre 20 - 25 kDa), elles possèdent des caractéristiques spécifiques, dont certaines sont résumées dans le tableau A-2.

Les caséines α et β sont fortement phosphorylées et contiennent entre 4 à 13 moles de PO_4/mole de protéine. Ces groupements phosphate sont estérifiés en monoester de sérine et fixent fortement les cations polyvalents tel que le Ca^{2+}, principal cation du lait. Ce phénomène entraîne la neutralisation des charges et donc la précipitation des α_{S1}-, α_{S2}-, et β-caséines pour des concentrations en Ca^{2+} inférieures ou égales à 6 mM. La κ-caséine, qui contient en moyenne 1 mole de PO_4/mole de protéine, fixe les cations très faiblement et ne précipite donc pas. Elle peut stabiliser les caséines α et β, sensibles au calcium, par l'intermédiaire de la formation des micelles (Fox et McSweeney, 1996).

Une autre caractéristique des caséines est la faible présence de structures secondaires (hélices α, feuillets β), particulièrement dans la β-caséine. Ce manque de structure secondaire, lié à leur teneur relativement élevée en proline, les rend peu sensibles à des agents dénaturants (la chaleur ou l'urée) mais sensibles à la protéolyse, ce qui est très important pour une phase d'affinage efficace.

A cause de cette structure ouverte, les caséines sont relativement hydrophobes, surtout à la surface de la molécule. En revanche, les résidus hydrophiles, polaires et chargés, ne sont pas uniformément répartis dans la molécule mais définissent des régions hydrophobes ou hydrophiles. Par exemple, les deux tiers de l'extrémité N-terminale de la κ-caséine sont fortement hydrophobes, tandis que le premier tiers de l'extrémité C-terminale est fortement

hydrophile. Le caractère hydrophile de l'extrémité C-terminal de la κ-caséine est d'ailleurs augmenté par la présence d'autres groupes hydrophiles. Contrairement aux caséines α_{S1}, α_{S2}, et β, la κ-caséine est glycosilée par des tri- ou tétra-saccharides de galactose, de galactosamine, et de l'acide N-acétylneuraminique (acide sialique), sur les résidus de thréonine de sa région C-terminale.

Finalement, on peut remarquer que seules les α_{S2}- et κ-caséines contiennent de la cystéine. La présence de cystéine dans l'α_{S2} et la κ-caséine rend leurs structures plus rigides par rapport à celles de l'α_{S1}- et la β-caséine. En effet, l'α_{S2}-caséine est une protéine dimérique, dont les deux sous unités sont reliées par des ponts disulfures. Concernant la κ-caséine, jusqu'à dix molécules peuvent être reliées par de ponts disulfures (Fox et col., 2000a).

La rigidité induit par la cystéine pourrait expliquer la majeure résistance à la protéolyse exhibée par les caséines α_{S2}- et κ pendant l'affinage. En efffet, dans les etudes portant sur l'ampleur de la protéolyse pendant la phase d'affinage aucun peptide issu de la fraction κ-caséine n'a été encore identifié (McSweeney et col., 1999), tandis que seulement quatre ont été formellement identifiés comme issus de l'α_{S2}-caséine (Sing, Fox et Heal, 1997). Toutefois, d'après ces auteurs, ce faible nombre de peptides peut être dû aussi au fait que l'α_{S2}-caséine ne represente que 10% de la caséine totale present dans les caillés.

Quelle que soit la raison, il n'est donc pas surprenant qu'aucune étude n'indique la présence de cystéine libre dans le fromage. Par contre, seulement quelques travaux ont montré la présence d'une très faible quantité de cystine, forme oxydée de la cystéine, dans certains fromages : 8 mg de cystine par 100 g de protéines dans le fromage Edam et entre 50 et 100 μg de cystéine par ml d'extrait aqueux de Cheddar affiné pendant 42 jours à 10°C (Urbach, 1995). Wood et col. (1985) ont rapporté la présence de cystine libre dans des fromages de type Cheddar, Edam et Jarlsberg, mais non dans des fromages de type Gouda, Gruyère, Emmental ou Camembert. Ainsi, la disponibilité de la cystéine ne semble pas être une généralité dans tous les fromages. De ce fait, l'utilisation d'autres composés soufrés, comme par exemple la méthionine, pourrait compenser cette déficience (Urbach, 1995). Cette voie de biosynthèse sera traitée postérieurement.

Tableau A-2. Principales caractéristiques des caséines du lait de vache (adapté de Fox et McSweeney, 2000a).

Caractéristiques	Fraction caséique			
	α_{S1}	α_{S2}	β-caséine	κ-caséine
Poids moléculaire	23 600	25 200	24 000	19 000
Pourcentage dans le lait (%)	38	10	34	15
Degré de phosphorylation (mole de PO_4^{2-}/ mol protéine)	8-9	10-13	4-5	1
Sensibilité au Ca^{2+} (6 mM à 30°C)	+	+	+	-
Sensibilité à la chymosine				
Pendant la coagulation	-	-	-	+++
Pendant l'affinage	+++	+	++	-
Sensibilité à la plasmine	+	++	++	-
Contenu en certains acides aminés (résidus par molécule)				
Proline	17	10	35	20
Isoleucine	11	11	10	13
Leucine	17	13	22	8
Valine	11	14	19	11
Méthionine	5	5	6	2
Cystéine	0	2	0	2
Résidus d'acides aminés	199	207	209	169

I.1.2. Complexes enzymatiques impliqués dans la dégradation des protéines

La protéolyse du fromage en cours d'affinage résulte de l'action d'au moins trois catégories d'enzymes : (1) les enzymes propres du lait (principalement la plasmine) ; (2) les protéases ajoutées pour réaliser la coagulation (principalement chymosine et pepsine) et, (3) les protéases et peptidases microbiennes (Fox et col., 2000b). Dans cette dernière catégorie, sont regroupées les enzymes provenant de la flore microbienne native et des levains ajoutés (bactéries lactiques et flore d'affinage).

I.1.2.1. Activité protéolytique du levain lactique

Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe afin d'assurer leur croissance dans des milieux à très faible concentration en petits peptides et en acides aminés libres, comme dans le lait (Desmazeaud, 1997).

Ce système protéolytique comprend des protéases, des exopeptidases et une large gamme de peptidases intracellulaires (Choisy et col., 1997a). Les protéases sont liées directement à la paroi cellulaire tandis que les exopeptidases sont liées à la membrane cellulaire. Cependant, elles dépassent suffisamment de la paroi cellulaire pour avoir accès aux protéines extracellulaires. De plus elles peuvent aussi être libérées dans le milieu extracellulaire par un phénomène d'autolyse limitée qui est occasionné par des changements de température, de pH et de concentration en ions calcium. Ces deux enzymes prennent en charge l'hydrolyse initiale des protéines et des peptides extracellulaires. (Desmazeaud, 1997 ; Fox et col., 1996).

Les oligopeptides, produits par l'action des protéases, sont alors activement transportés à l'intérieur de la cellule où ils sont hydrolysés par toute une série de peptidases pour donner lieu aux acides aminés libres. A l'instar des exopeptidases, les peptidases intracellulaires peuvent être, suite à la lyse cellulaire, libérées dans le caillé où elles peuvent exercer leur activité hydrolytique. Elles deviennent donc les principales responsables de la formation de petits peptides et d'acides aminés libres dans le fromage (Fox et col., 2000b ; Kok, 1993)

I.1.2.2. Activité protéolytique des flores d'affinage

Dans plusieurs variétés de fromage, des levains constitués de micro-organismes d'affinage sont ajoutés intentionnellement et leur implantation est favorisée en adaptant les conditions environnementales (salage par exemple). Les principaux groupes de micro-organismes utilisés lors de l'affinage des fromages sont les bactéries propioniques, les bactéries de surface incluant les micrococcacées et les bactéries corynéformes, ainsi que diverses souches de levures et de moisissures (Choisy et col., 1997b).

I.1.2.2.1. Des bactéries propioniques

Les bactéries propioniques (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* et subsp. *shermanii*) interviennent dans l'affinage des fromages à pâte pressée cuite de type emmental. Leur principale fonction est la transformation du lactate en acide propionique, en acide acétique et en dioxyde de carbone. Les acides volatils sont des composants de l'arôme typique de ces pâtes, le gaz carbonique assurant la formation des ouvertures dans le fromage.

Ces bactéries sont faiblement protéolytiques mais fortement peptidolytiques ; l'activité peptidolytique, assurée par diverses peptidases intracellulaires ayant des optima de pH entre 5 et 5,6, est particulièrement active sur les peptides contenant de la proline (El-Soda et col., 1991 ; Ezzat et col., 1994 ; Tobiassen et col., 1996 ; Stepaniak et col., 1998a et 1998b ; Thierry et Maillard, 2002a ; Naud et col., 1992).

I.1.2.2.2. Des bactéries de surface

Les bactéries de surface, principalement des micrococcacées et des bactéries corynéformes, appartenant en particulier aux genres *Brevibacterium*, *Arthrobacter* et *Corynebacterium*, représentent la flore superficielle dominante de diverses variétés de fromage à pâte molle, de type croûte lavée ou croûte fleurie et à pâte pressée de type croûte morgée. Etant les micro-organismes majeurs des morges du munster, du limbourg et du comté, ils en assurent la protéolyse (Choisy et col., 1997a). Ces micro-organismes sont également présents à des concentrations élevées à la surface des camemberts au lait cru, du roquefort ou du pont-l'évêque (Bergère et Tourneur, 1992 ; Reps, 1987).

Les activités protéolytiques de ces bactéries d'affinage ont été surtout étudiées chez *Brevibacterium linens*. Cette espèce possède plusieurs protéases exocellulaires et des sérine-protéases. Une aminopeptidase extracellulaire, ayant un pH optimal de 9,6, ainsi que plusieurs peptidases extracellulaires ont été également décrites (Rattray et Fox, 1999 ; Choisy et col., 1997b). Malgré des optima d'activité pour des pH neutre ou alcalin, ces enzymes sont capables de dégrader les caséines des fromages de type pâte pressée, comme le cheddar.

Inversement, très peu d'études ont été menées sur la capacité protéolytique de bactéries fromagères du genre *Arthrobacter*. Récemment, l'activité protéolytique d'une souche typique des fromages à croûte lavée, *Arthrobacter nicotianae*, a été étudiée. Deux protéases extracellulaires ont été purifiées et caractérisées par Smacchi et col. (1999). Ces enzymes présentent un pH optimum de l'ordre de 9, donc légèrement plus alcalin que la majorité des souches de *B. linens*, et une activité protéolytique plus importante sur la β-caséine que sur l'α-caséine.

Chez les micrococcacées, des protéases exocellulaires souvent inductibles sont produites chez plusieurs espèces (*Micrococcus freudenreichii*, *Micrococcus luteus*). Ce sont de métalloenzymes de pH optimal entre 5,5 et 7,5. Des protéases intracellulaires sont également présentes chez les micrococcacées. Elles dégradent préférentiellement l' β-caséine alors que les enzymes exocellulaires sont plus actives sur les α_S-caséines. Finalement, plusieurs peptidases intracellulaires de type aminopeptidases, dipeptidases et proline iminopeptidases ont été décrites chez plusieurs espèces de micrococcacées (Rattray et Fox, 1997, 1999 ; Fox et col., 1995b ; Rattray et col., 1996, 1997).

I.1.2.2.3. Des levures et moisissures

Parmi les levures isolées de différents fromages, les principaux genres identifiés sont *Kluyveromyces*, *Geotrichum*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, et *Yarrowia* ; tandis que *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti* sont les deux espèces de moisissures particulièrement importantes dans les fromages de type camembert, bleu et roquefort (Choisy et col., 1997b ; Lenoir et col., 1992). La forte activité protéolytique des certaines levures et moisissures d'affinage est une caractéristique leur permettant de se développer pendant les premiers jours d'affinage.

Chez les levures, ces activités sont liées à des systèmes complexes : des activités peptidasiques exocellulaires et intracellulaires, avec des optima de pH allant de 3 à 7, ont été décrites chez des levures isolées du camembert, en particulier chez *Kluyveromyces marxianus*.

Cependant, les activités les plus intéressantes pour l'affinage sont liées à l'équipement complet des levures en exopeptidases : des aminopeptidases ayant des pH optimaux entre 7,5 et 8, des carboxypeptidases de pH optimal voisin de 4 et des di et tripeptidases. Grâce à cet

équipement enzymatique, les levures, en particulier *Geotrichum candidum*, peuvent libérer de nombreux acides aminés issus des caséines, et peuvent également assurer la réduction de l'amertume des fromages via le disparition de peptides amérisants (Choisy et col., 1997b).

Penicillium camemberti et *P. roqueforti* sont dotés de systèmes protéolytiques exocellulaires complexes et très actifs. Ils présentent entre eux de très grandes analogies. En effet, les deux espèces sécrètent une aspartyl protéase ayant un pH optimal de 5 et une métalloprotéase de pH optimal proche de 6. Ces enzymes sont actives sur l'α_{S1} et la β-caséine (Bracq et col., 1997 ; Trieu-Cuot et Gripon, 1983 ; Trieu-Cuot et col., 1982).

Il a été également identifié une aminopeptidase alcaline et une carboxypeptidase acide chez ces moisissures. L'aminopeptidase alcaline a un pH optimal de 8 et libère principalement les acides aminés apolaires. La carboxypeptidase acide (pH optimal de 3,5) peut libérer les acides aminés neutres, basiques ou acides mais très peu de proline C-terminale (Choisy et col., 1997a, 1997b ; Gripon, 1993). Même si les niveaux de production de ces enzymes peuvent varier selon les souches (Larsen et col., 1998), elles jouent un rôle déterminant dans des fromages à croûte fleurie ou à pâte persillée où la protéolyse est plus intense que pour d'autres fromages affinés (Hewedi et Fox, 1984; Gonzalez de Llano et col., 1995).

I.1.3. Principales enzymes impliquées dans le catabolisme des acides aminés libres

Les petits peptides et les acides aminés libres générés pour l'hydrolyse des caséines sont alors transportés à l'intérieur de la cellule où les petits peptides sont à leur tour hydrolysés en acides aminés libres. Le pool intracellulaire d'acides aminés est alors en partie transformé en composés d'arôme grâce à l'action de plusieurs enzymes dont des transaminases, des décarboxylases, des déshydrogénases et des lyases. Ces composés d'arôme incluent des alcools, des aldéhydes, des acides, des esters et des composés soufrés (tableau A-3).

I.1.3.1. Les transaminases

Les transaminases (ou aminotransférases) sont des enzymes PLP dépendantes (PLP : pyridoxal-5-phosphate) et sont présentes chez de nombreux micro-organismes. Elles initient la transformation des acides aminés intracellulaires en leurs α-cétoacides correspondants tandis que l'α-cétoacide accepteur, généralement l'α-cétoglutarate, est transformé en l'acide aminé correspondant (le glutamate) (Yvon et Rijnen, 2001). Bien que l'α-cétoglutarate soit le cétoacide préféré des transaminases chez *L. lactis* (Yvon et col., 1997), d'autres cétoacides tels que le pyruvate ou l'oxaloacétate peuvent être utilisés. Dans ce cas, les activités obervées sont beaucoup plus faibles qu'avec l'α-cétoglutarate. Par contre, chez certains lactobacilles, le pyruvate est décrit comme un accepteur aussi efficace que l'α-cétoglutarate (Amarita et col., 2001).

Les transaminases sont plus ou moins spécifiques pour une classe d'acide aminé (par exemple, pour les acides aminés à chaîne branchée ou aromatiques), mais elles peuvent aussi être actives sur d'autres acides aminés, par exemple la méthionine (Smit et col., 2005). Les aminotransférases peuvent aussi catalyser la réaction inverse, c'est-à-dire la formation d'acides aminés à partir des α-cétoacides ; elles participent ainsi à leur biosynthèse.

Chez les bactéries lactiques du genre lactocoque, le catabolisme des acides aminés aromatiques (ArAA), à chaîne branchée (BcAA) et de la méthionine est essentiellement initié par une étape de transamination (Gao et col., 1997 ; Yvon et col., 1997). La transamination est aussi prédominante chez le corynebactéries, en particulier *Brevibacterium linens*, lors du catabolisme des ArAA (Lee et Desmazeaud 1985a, 1985b) et chez les levures lors du catabolisme des ArAA et BcAA (Roger et col., 1988).

Des transaminases aromatiques (AraT) et à chaîne branchée (BcaT) ont été principalement étudiées chez *Lactococcus lactis* (Gao et col., 1997 ; Gao et col., 1998 ; Yvon et col., 1997, 2000). La transaminase aromatique (AraT) de *L. lactis* est active sur les acides aminés aromatiques mais aussi sur la leucine et la méthionine. Elle a une activité optimale pour un pH compris entre 6,5 et 8, et pour une température allant de 35 à 65°C selon la souche considérée. Cependant, cette enzyme est toujours active dans les conditions de pH, de température et de concentrations en sel rencontrées dans le fromage.

Tableau A-3. Composés issus de la dégradation enzymatique ou chimique des acides aminés (adapté de Smit et col., 2005).

Acide aminé	Aldéhydes	Alcools	Acides carboxyliques	Esters	Thiol/Divers
Leucine	3-méthylbutanal (isovaléraldéhyde)	3-méthylbutanol	Acide 3-méthylbutanoïque	Ethyl-3-méthylbutanoate	
Isoleucine	2-méthylbutanal	2-méthylbutanol	Acide 2-méthylbutanoïque		
Valine	2-méthylpropanal (isobutyraldéhyde)	2-méthylpropanol	Acide 2-méthylpropanoïque	Ethyl isobutanoate	
Phénylalanine	Phénylacétaldéhyde Benzaldéhyde	Phenyléthanol Phenylméthanol	Acide phénylacétique Acide benzoïque	Phenylethyl acétate Ethyl benzoate	
Tyrosine	Hydroxyphényl acétaldéhyde Hydroxybenzaldéhyde	Hydroyphényléthanol	Acide hydroxyphénylacétique		p-crésol phénol
Tryptophane	Indol-3-acétaldéhyde indol-3-aldéhyde	Tryptophol	Acide indol-3-acétique		Skatole, indol
Méthionine	3-méthylthiopropanal (méthional)	3-méthylthiopropanol (méthionol)	Acide 3-méthylthiopropanoïque	Ethyl-3-méthylthiopropanoate S-méthylthio acétate	Méthanethiol
Cystéine	2-thioéthanal	2-thioéthanol	Acide 2-thio-acétique		H_2S

La transaminase à chaîne branchée (BcaT) est active sur les trois BcAAs, surtout l'isoleucine, et sur la méthionine. Son pH et sa température optimale sont de 7,5 et de 35-40°C respectivement.

La BcaT et l'AraT sont donc toutes deux actives sur la leucine et la méthionine (Yvon et Rijnen, 2001).

Concernant le contrôle de ces enzymes, il a été démontré chez *L. lactis* NCDO763 que la transcription du gène araT n'est pas régulée tandis que celle du gène bcaT est réprimée en présence des acides aminés libres, en particulier l'isoleucine. L'inactivation du gène araT induit une réduction de 95% de l'activité transaminase sur les ArAA et de 50% et 25% sur la méthionine et la leucine respectivement, sans effet apparent sur l'isoleucine et la valine.

Par ailleurs, l'inactivation du gène bcaT induit également une réduction de 90% de l'activité transaminase sur l'isoleucine et la valine, et de 50 et 40% sur la leucine et la méthionine respectivement. Aucune diminution d'activité n'est observée sur les ArAA. Finalement, les mutants où les deux gènes ont été inactivés, n'ont pas d'activité transaminase résiduelle sur les ArAA ou BcA (Rijnen et col., 1999a, 199b ; Yvon et col., 2000)

Ces résultats montrent qu'AraT et BcaT sont bien les seules enzymes responsables de la transamination des ArAA et des BcAA, ainsi que de la méthionine chez les lactocoques. Ils mettent aussi en avant l'importance de la transamination comme première étape d'assimilation de la méthionine et de production ultérieure de composés soufrés volatils.

Chez les levures d'affinage, les activités de transamination sont encore peu étudiées. Bonnarme et col. (2001) ont démontré que *Geotrichum candidum*, une levure très souvent impliquée dans le processus d'affinage des fromages, pouvait dégrader la méthionine en méthanethiol à partir de l'acide 2-oxo-4-méthylthiobutyrique (KMBA), l'α-cétoacide produit de la transamination de la méthionine.

D'autres travaux ont pu être menés pour étudier plus en détail l'implication des aminotransférases aromatiques et à chaîne branchée dans le catabolisme de la méthionine chez *Yarrowia lipolytica* et *Kluyveromyces lactis*, grâce au séquençage de son génome (http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php).

De ce fait, Bondar et col. (2005) ont démontré en particulier qu'une BcaT était impliquée dans la dégradation de la méthionine chez *Yarrowia lipolytica*.

Chez *K. lactis*, 5 gènes putatifs codant pour une aminotransférase ont été clonés dans un vecteur de surexpression pCXJ10, et les conséquences sur la production de CSVs ont été analysées (Kagkli et col, 2006). Deux gènes, KlARO8.1 et KlARO8.2, sont porteurs d'une activité L-méthionine aminotransférase. Les transformants portant ces gènes clonés dans le vecteur pCXJ10 ont produit 3 fois plus de CSVs par rapport à un transformant contenant le plasmide sans insert. Contrairement à *Y. lipolytica*, l'aminotransferase des acides aminés à chaîne branchée de *K. lactis* (KLBAT1) n'est pas impliquée dans la production des CSVs (Kagkli et col., 2006).

Les α-cétoacides, produits d'une première étape de transamination, peuvent être transformés en hydroxyacides, en aldéhydes, en alcools, en acides ou en esters. Ces différentes réactions sont souvent à catalyse enzymatique même si certaines étapes sont purement chimiques, comme par exemple la formation du benzaldéhyde à partir du phénylpyruvate.

Les aldéhydes formés peuvent être réduits ou oxydés en alcool ou en acide organique correspondant. Ceux-ci sont transformés par des estérases et des acyltransférases en esters.

I.1.3.2. Les décarboxylases

La décarboxylation des α-cétoacides dérivés des BcAA ou ArAA en leurs aldéhydes correspondants a été principalement décrite chez les levures et ne semble pas être très répandue chez les bactéries. Cette transformation correspond à la voie d'Erlich-Neubauer laquelle aboutit finalement à la formation d'alcools supérieurs (Yvon et Rijnen, 2001).

Chez *S. cerevisiae* la décarboxylation de l'acide 2-oxo-isovalerique, dérivé de la valine, et des autres α-cétoacides est principalement catalysée par une pyruvate décarboxylase (PDC). La PDC est une holoenzyme composée de quatre monomères stabilisés par la thiamine-pyrophosphate (TPP) et qui utilise le Mg^{2+} comme cofacteur. (Hohmann et Meacock, 1998 ; Koga et col., 1992). Une autre décarboxylase, l'indole-3-pyruvate décarboxylase, a été purifiée chez *Enterobacter cloacae*. Cette enzyme est hautement spécifique pour l'indole-3-

pyruvate dérivé du tryptophane et présente les mêmes caractéristiques que la PDC de *Saccharomyces* (Koga et col., 1992).

Chez les bactéries lactiques, la décarboxylation des α-cétoacides à chaîne branchée permet la formation d'aldéhydes (2-méthylbutanal, 3-méthylbutanal, 2-méthylpropanal), qui peuvent être caractérisés par des arômes de type malté ou chocolaté avec des seuils de perception très bas (Smit et col., 2005). Cependant, mis à part *Lactoccocus lactis* biovar *maltigenes*, les bactéries lactiques possèdent généralement une faible activité décarboxylase qui est de plus souche dépendante (Gao et col., 1997).

En criblant des souches de bactéries lactiques et d'affinage (*Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Arthrobacter*), Smit et col. (2004) ont montré que le 3-méthylbutanal, aldéhyde dérivé de l'α-cétoacide de la leucine, ne s'accumulait que pour certaines des souches criblées. Par contre, le produit d'oxydation de cet aldéhyde, l'acide 3-méthylbutanoïque, était présent dans la plupart de souches criblées. La formation de cet acide serait due à l'action d'un complexe cétoacide-déshydrogénase, comme cela a été également démontré chez *P. freudenreichii* (Thierry et col., 2002b), et non à une rapide conversion chimique.

I.1.3.3. Les déshydrogénases

La décarboxylation oxydative des α-cétoacides est une autre voie importante de formation de composés à vocation aromatique, où des acides carboxyliques sont produits sans formation d'aldéhydes intermédiaires. Cette réaction est catalysée par des α-cétoacide déshydrogénases en générant des acyl-CoA intermédiaires. Ces enzymes utilisent le NAD, le FAD, le TPP et le Mg^{2+} comme cofacteurs. Elles sont généralement actives à pH 5,5-6,5 et sont partiellement inhibées par le NADH (Bunik, 2003).

Ainsi, les levures, les lactocoques, les microbacterium et *P. freudenreichii* sont capables de produire des acides carboxyliques à partir des BcAA, des ArAA ou de la méthionine (Gao et col., 1997 ; Yvon et col., 1997 ; Thierry et col., 2002b). Chez *S. cerevisiae*, la pyruvate déshydrogénase (PDH), ainsi qu'une déshydrogénase spécifique des α-cétoacides à chaîne branchés (BcDH, E.C. 1.2.4.4), sont les deux enzymes responsables de la décarboxylation oxydative des α-cétoacides (Dickinson et col., 1998). Chez *Bacillus subtilis,*

la PDH catalyse également la décarboxylation des α-cétoacides derivés des BcAA (leucine, isoleucine et valine) (Lowe et col., 1983). La PDH et la BcDH sont des complexes multi-enzymatiques formés par trois sous unités, dont la sous unité déhydrolipoamide déshydrogénase est commune à la PDH, la BcDH et l'α-cétoglutarate déshydrogénase (Hohmann et Meacock, 1998)

L'acyl-CoA produit par la décarboxylation oxydative peut être hydrolysé en acide carboxylique, en une seule étape, par une acide : acyl-CoA hydrolase, comme chez certaines levures (Dickinson et col., 1998), ou en deux étapes successives catalysées par une phosphate-butyrate-CoA transférase et une butyrate kinase, comme décrit chez *E. faecalis* et *B. subtilis* (Yvon et Rijnen, 2001).

Les acides carboxyliques, qui peuvent participer directement à l'arôme des fromages, et les acyl-CoA sont des précurseurs de composés aromatiques variés comme les esters et les aldéhydes. Des aldéhydes sont formés à partir des acyl-CoA ou des acides carboxyliques par l'action d'une acyl-CoA réductase ou d'une réductase d'acide gras. Ces enzymes ont été isolées de bactéries et d'algues vertes (Riendeau et col., 1982 ; Wang et Kolattukudy, 1995).

Chez les bactéries lactiques (*Lactococcus, Lactobacillus*) et les levures (*Saccharomyces*), les α-cétoacides et les aldéhydes, formés par décarboxylation, peuvent être réduits en leurs hydroxy-acides ou alcools correspondants par des déshydrogénases, comme l'hydroxy-isocaproate déshydrogénase, la lactate déshydrogénase ou l'alcool déshydrogénase (Fauconnier et col., 1999 ; Yvon et Rijnen, 2001 ; Smit et col., 2005). Contrairement à la lactate déshydrogénase, hautement spécifique vis-à-vis du pyruvate, les 2-hydroxyacide déshydrogénases peuvent catalyser l'hydrogénation de plusieurs α-cétoacides principalement ceux issus des acides aminés aromatiques et à chaîne branchée.

Les hydroxy-acides n'ont pas d'impact direct sur le profil aromatique des fromages. Toutefois, il est évident que leur formation peut potentiellement diminuer la disponibilité en α-cétoacides et ainsi la formation d'autres composés aromatiques, comme les aldéhydes, les acides organiques et, dans le cas de la méthionine, du méthanethiol. Par exemple, Gao et col. (1998) ont identifié la formation de 2-hydroxy-4-méthylthiobutyrate (HMBA) à partir de 2-oxo-4-méthylthiobutyrate (KMBA), comme principal produit de dégradation de la méthionine

dans plusieurs souches de *Lactoccocus lactis* pour lesquelles la formation de méthanethiol n'a pas été observée.

Il faut noter que les α-cétoacides sont utilisés par les micro-organismes comme un mécanisme de contrôle du potentiel d'oxydoréduction, via la consommation d'un excès de NADH produit par la glycolyse (Smit et col., 2005). La conversion des acides aminés en alcools supérieurs (alcools de chaîne courte branchée ou non) a été très largement décrite chez les levures (Eden et col., 2001 ; Fauconnier et col., 1999 ; Crowell et col., 1961).

I.1.3.4. Les lyases

Une autre voie de dégradation des acides aminés est initiée par des lyases. La cystathionine β-lyase (CBL, E.C. 4.4.1.8), la cystathionine γ-lyase (CGL, E.C. 4.4.1.1), la méthionine γ-lyase (MGL, E.C. 4.1.1.11) et la thréonine aldolase (E.C. 4.1.2.5) sont particulièrement étudiées. La thréonine aldolase est la principale source d'acétaldéhyde via la dégradation directe de la thréonine en glycine et en acétaldéhyde (Yvon et Rijnen, 2001). Ce dernier est une molécule clé de l'arôme des yaourts (Smitt et col., 2000).

L'activité des lyases (MGL, CBL et CGL) sera abordée dans la section concernant le catabolisme de la méthionine (section III.1.).

Finalement, il faut mentionner que la lipolyse est un autre événement biochimique important se produisant pendant l'affinage du fromage et est aussi une voie importante pour la génération des arômes. Bien que la lipolyse soit plus ou moins étendue d'un fromage à l'autre, elle est toujours très importante dans les fromages bleus où la lipolyse atteint des niveaux élevés. Des faibles niveaux de lipolyse contribuent à la maturation du Cheddar, du Gouda et du fromage Suisse, alors que des niveaux excessifs de lipolyse sont indésirables et résultent en une perception de rancidité (McSweeney et Sousa, 2000 ; Collins et col., 2003 ; McSweeney, 2004).

Dans cet etude bibliographique nous n'allons pas developer cette voie de degradation du matiere grasse car elle ne semblait pas participer dans la formation des composés soufrés volatils.

II. BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES SOUFRES : L-CYSTEINE ET L-METHIONINE

Le soufre existe dans la nature dans de nombreux composés stables où son état d'oxydation peut aller de -2 pour sa forme la plus réduite (sulfide ou sulfure d'hydrogène, H_2S) à +6 sous sa forme la plus oxydée (sulfate, SO_4^{2-}). Ces différents états d'oxydation peuvent être inter-convertis par de nombreux micro-organismes (figure A-1.). Les bactéries, les levures, les moisissures et les plantes peuvent donc utiliser comme source de soufre des composés organiques (glutathion, cystéine et méthionine) ou inorganiques très variés (généralement sous forme de sulfates) (Leustek et col., 2000 ; Thomas et Surdin-Kerjan, 1997; Soda, 1987). Les eucaryotes supérieurs (homme) utilisent principalement la cystéine et la méthionine comme source de soufre (Griffith, 1987).

Le soufre est essentiel dans des cofacteurs enzymatiques variés (biotine, coenzyme A, coenzyme M, thiamine et acide lipoïque), dans plusieurs molécules impliquées dans des processus d'oxydo-réduction (p. ex. le glutathion), et dans les protéines sous forme d'acides aminés soufrés (méthionine et cystéine). Le repliement et la stabilité des protéines sont favorisés d'ailleurs par la formation de ponts disulfures entre les groupes soufrés (thiols) libres de la cystéine (Matin et col., 1985). La cystéine joue un rôle central dans le métabolisme général du soufre car elle est un des accepteurs de la voie d'assimilation du soufre inorganique et un métabolite central de la biosynthèse des plusieurs composés soufrés des organismes. La méthionine et son derivé la S-adénosyl méthionine assurent aussi de nombreuses fonctions cellulaires comprenant le processus de méthylation (Sekowska et col., 2000).

La biosynthèse *de novo* de la cystéine et de la méthionine commence par l'activation et la réduction du sulfate en sulfure d'hydrogène (H_2S). L'H_2S peut être incorporé dans une chaîne organique à 3 ou 4 carbones dont les produits finaux sont la cystéine et l'homocystéine. La formation directe de cystéine comme accepteur d'H_2S a été démontrée principalement chez les entérobactéries *E. coli* et *S. typhimorium* (Sekowska et col., 2000), chez les moisissures *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa* (Marzluf, 1997) et les plantes

(Giovanelli, 1987). La formation directe d'homocystéine a été démontrée chez *S. cerevisiae* (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997), *Brevibacterium flavum* (Ozaki et Shiio, 1982), *Pseudomonas aeruginosa*, et chez certaines souches de *Corynebacterium* et *Arthrobacter spp* (Vermeij et Kertesz, 1999). Finalement, la cystéine et l'homocystéine peuvent être aussi inter-converties par la voie de trans-sulfuration (Soda, 1987).

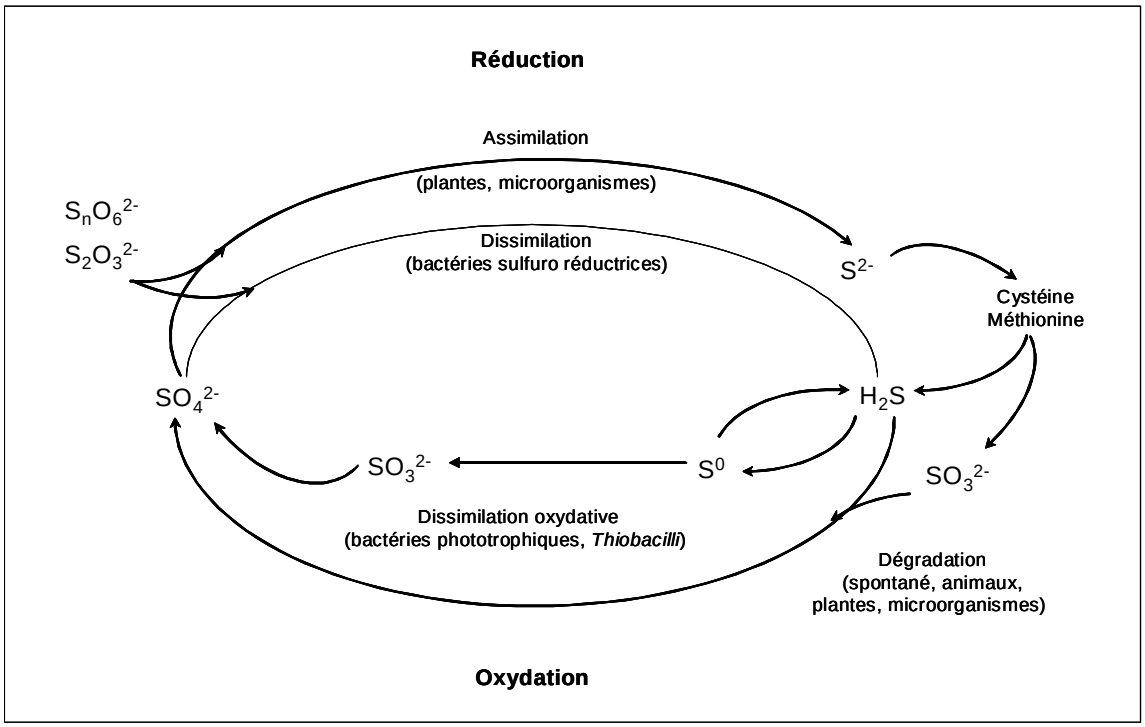


Figure A-1. Cycle biologique du soufre

II.1. ASSIMILATION DU SOUFRE

La voie d'assimilation du sulfate est très fortement conservée parmi les plantes et les micro-organismes capables d'assimiler le sulfate, même s'il existe, selon l'organisme considéré, des différences structurelles et génétiques dans les enzymes impliquées (Soda, 1987 ; Thomas et Surdin-Kerjan, 1997 ; Vermeij et Kertesz, 1999 ; Sekowska et col., 2000 ; Marzluf, 1997).

Une fois transporté à l'intérieur de la cellule, le sulfate doit être activé avant de pouvoir être métabolisé (figure A-2). Le sulfate activé se présente sous deux formes : l'adénosine 5'-phosphosulfate (APS) et le 3'-phosphoadénylsulfate (adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate, PAPS). Ces composés sont formés par deux réactions séquentielles catalysées par les enzymes ATP-sulfurylase (sulfate adényltransférase, E.C. 2.7.7.4) et l'APS-kinase (adenylsulfate kinase, E.C. 2.7.1.25) respectivement.

La formation de l'APS, catalysé par l'ATP-sulfurylase, n'est pas énergétiquement favorisée car l'énergie libre d'hydrolyse du groupe phosphate/sulfate anhydride dans l'APS est relativement élevée (-19 kcal/mol) par rapport au phosphate de l'ATP (-10,7 kcal/mol). Par conséquent, la réaction a lieu à une vitesse raisonnable seulement quand les produits de la réaction, l'APS et le pyrophosphate (PPi), sont éliminés (Liu et col., 1994). Ainsi, des pyrophosphatases et l'APS-kinase sont nécessaires. Les premières transforment le pyrophosphate en phosphate inorganique. L'APS-kinase favorise la première réaction en éliminant l'APS grâce à sa haute affinité pour ce produit. Il assure ainsi des vitesses de formation d'APS élevées pour de basses concentrations en APS (5 µM APS). Sous l'action de l'APS-kinase, l'APS est rephosphorylé en PAPS (Shiff et Saidha, 1987).

Après être activé, le sulfate est réduit en deux étapes. La première étape aboutit à la formation de sulfite par réduction du PAPS. Cette réaction est catalysée par la PAPS réductase (E.C. 1.8.4.8) en utilisant une molécule de NADPH. Dans un deuxième temps, le sulfite est réduit par une sulfite réductase (E.C. 1.8.1.2) en oxydant trois molécules de NADPH. Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est le produit final de cette réaction.

Il est évident que l'assimilation du sulfate a un coût énergétique très élevé pour les organismes (2 molécules d'ATP + 4 molécules de NADPH) et donc l'utilisation de sources organiques de soufre est généralement favorisée car moins « énergivore » (principalement la cystéine, la méthionine et le glutathion) (Sekowska et col., 2000).

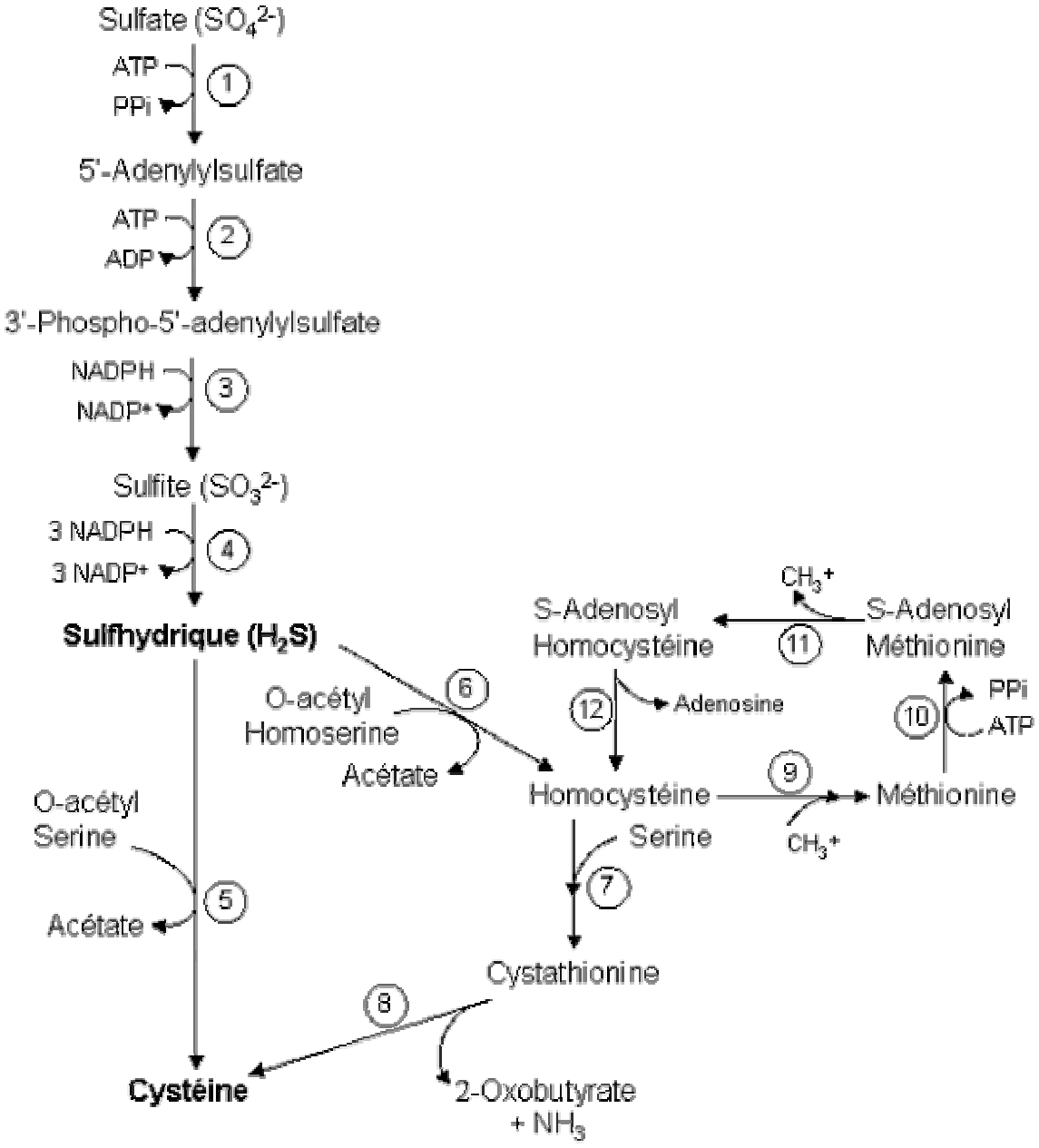


Figure A-2. Biosynthèse des acide aminés soufrés L-cystéine et L-méthionine à partir du sulfate. Enzymes impliquées : 1) ATP sulfurylase (EC 2.7.7.4) ; 2) Adenyl-sulfate kinase (EC 2.7.1.25) ; 3) Phosphoadenyl-sulfate réductase (EC 1.8.4.8) ; 4) Sulfite réductase (EC 1.8.1.2) ; 5) O-acétylsérine sulfhydrylase (EC 2.5.1.47) ; 6) O-acétylhomosérine sulfhydrylase (EC 2.5.1.49) ; 7) Cystathionine β-synthase (EC 4.2.1.22) ; 8) Cystathionine γ-lyase (EC 4.4.1.1) ; 9) Homocystéine méthyltransferase (EC 2.1.1.10) ; 10) S-adenosylméthionine synthase (EC 2.5.1.6) ; 11) DNA-méthyl transférase (EC 2.1.1.37) ; 12) S-adenosyl-homocystéine hydrolase (EC 3.3.1.1) [adapté de Thomas et Surdin-Kerjan (1997) et Sekowska et col., (2000)].

II.2. BIOSYNTHESE DE LA L-CYSTEINE

La cystéine peut être synthétisée de novo par sulfhydration directe ou par trans-sulfuration à partir de l'homocystéine.

Chez les bactéries, les moisissures et les plantes, deux enzymes catalysent l'étape finale de biosynthèse de la cystéine (figure A-2). D'abord, la sérine est activée en O-acétylsérine (OAS) par la sérine acétyltransférase (E.C. 3.1.3.7) qui catalyse la condensation de la sérine avec le groupe acétyle de l'acétyl-CoA. Puis, l'O-acétylsérine sulfhydrylase (cystéine synthase, E.C. 2.5.1.47), enzyme dépendante du pyridoxal, catalyse le transfert de l'H_2S à l'OAS dans une réaction de β-replacement, ce qui aboutit à la formation de cystéine et d'acétate (Sekowska et col., 2000 ; Soda, 1987). Une autre enzyme, la cystathionine β−synthase (sérine sulfhydrylase, E.C. 4.2.1.22) peut catalyser in vitro la formation de cystéine à partir de la sérine et de l'H_2S, mais son importance métabolique dans l'assimilation du soufre inorganique n'a pas été tout à fait démontrée (Soda, 1987).

D'autre part, chez les levures et certaines bactéries, l'H_2S est plutôt incorporé dans l'homocystéine. Pour cela, l'O-acétylhomosérine (OAH) est d'abord formé par activation de l'homosérine avec une molécule d'acétyl-CoA, réaction catalysée par l'homosérine O-acétyltransferase (E.C. 2.3.1.31). L'homocystéine est ensuite formée par réaction de l'OAH avec l'H_2S, réaction catalysée par l'O-acétylhomosérine sulfhydrylase (E.C. 2.5.1.49) (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Une fois formée, l'homocystéine peut être utilisée pour la biosynthèse directe de la méthionine ou pour la biosynthèse de la cystéine par la voie de trans-sulfuration (figure A-3). Le nom de trans-sulfuration a été donné à l'origine chez les mammifères aux deux réactions assurant le transfert du soufre de l'homocystéine à la cystéine via la cystathionine. Le terme a été étendu ensuite aux réactions allant de la cystéine à la méthionine chez les bactéries, et aux réactions chez les levures où le soufre est transféré dans les deux sens (Griffit, 1987).

Ainsi, la synthèse de la cystéine à partir de l'homocystéine comporte deux étapes. La première réaction, catalysée par la cystathionine β-synthase (E.C. 4.2.1.22), assure la formation de cystathione par β-addition de sérine à l'homocystéine. La deuxième réaction est la γ-élimination de la cystathionine, catalysée par la cystathionine γ-lyase (CGL, E.C. 4.4.1.1), en produisant la cystéine, l'acide 2-oxobutyrique et de l'ammonium (Thomas et Surdin-

Kerjan, 1997). La cystéine est alors disponible pour être incorporée dans les divers métabolites soufrés ou dans les protéines (Hesse et col., 2004).

Toutefois, la présence de cystéine peut réprimer le transport et l'assimilation du soufre et inhiber l'activité de la sérine acétyltransférase et donc la formation d'OAS (Ono et col., 1999 ; Sekowska et col., 2000 ; Sperandio et col., 2005). De bas niveaux d'OAS ou d'OAH ont été reliés aux fortes concentrations d'H_2S produits par *S. cerevisiae* (Spiropoulus et Bisson, 2000). La cystéine peut aussi réprimer l'activité de la cystathionine γ-lyase, ce qui semble être un mécanisme de prévention d'une surproduction de cystéine chez *S. cerevisiae* (Ono et col., 1991)

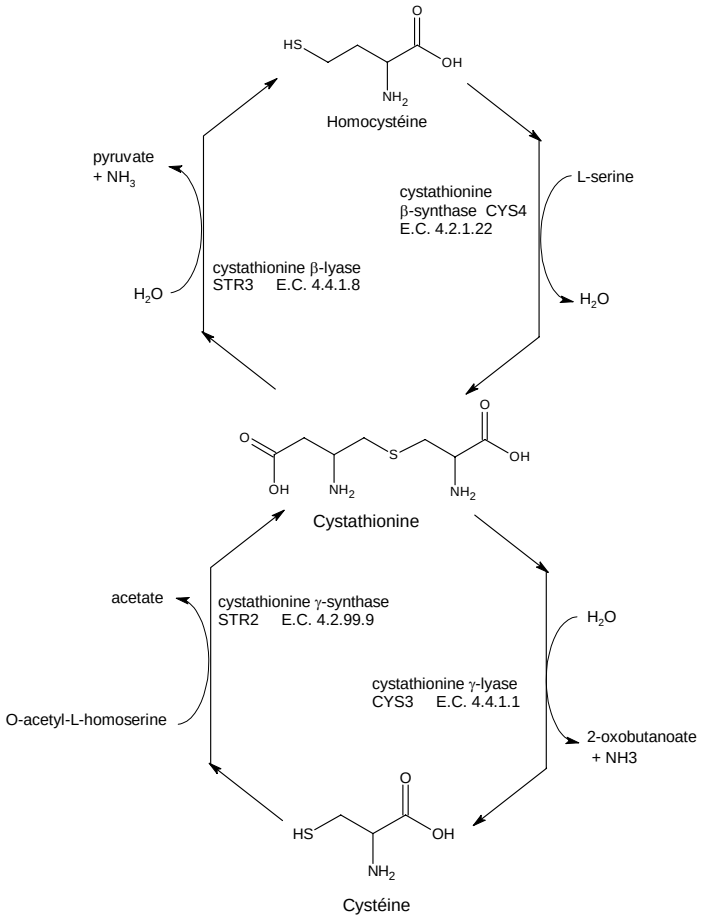


Figure A-3. Voie de trans-sulfuration entre l'homocystéine et la cystéine. Chez *Saccharomyces cerivisiae*, *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa*, les deux voies sont présents et actives (Thomas et Surddin-Kerjan, 1997 ; Marluf, 1997). Chez les entérobactéries *Escherichia coli* et *Salmonella typhimorum*, seule la voie vers l'homocystéine est active et utilise l'O-succinylhomosérine au lieu d'O-acétylhomosérine (Sekowska et col., 2000).

II.3. BIOSYNTHESE DE LA L-METHIONINE

La méthionine peut être synthétisée par méthylation directe de l'homocystéine ou par trans-sulfuration à partir de la cystéine, ce que correspond à la voie inverse de celle décrite dans la section précédente (homocystéine → cystéine) (Hwang et col., 2002 ; Soda, 1987).

En partant de la cystéine, la cystathionine est synthétisée par condensation de l'O-succinylhomosérine (OSH) ou l'O-acétylhomosérine (OAH) avec la cystéine, réaction catalysée par l'O-succinylhomosérine thiol-lyase (cystathionine γ-synthase, E.C. 4.2.99.9) (figure A-3). La cystathionine formée est ensuite hydrolysée par la cystathionine β-lyase (E.C. 4.4.1.8) en produisant de l'homocystéine, de l'acide pyruvique et de l'ammonium (Sekowska et col., 2000 ; Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). L'OSH est utilisée principalement par les entérobactéries et *Pseudomonas putida* (Vermeij et Kertesz, 1999), tandis que l'OAH par les levures et moisissures (Marzluf, 1997 ; Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Les plantes utilisent l'O-phosphorylhomosérine comme forme activée de homosérine, (Giovanelli, 1987). Dans tous les cas, l'homocystéine est synthétisée.

A partir de l'homocystéine, la méthionine est produite par méthylation. Le groupement méthyle provient du métabolisme carboné et peut être produit à partir de méthanol, du formaldéhyde ou de l'acide formique. *E. coli* possède deux enzymes qui catalysent cette méthylation. L'une d'entre elles, le produit du gène metH (E.C. 2.1.1.13), utilise la vitamine B12 (cobalamine) comme cofacteur, et le groupe méthyle peut provenir du 5-méthyltétrahydrofolate ou de son dérivé polyglutamyle (5-méthyltétrahydroptéroyltri-L-glutamate). La deuxième enzyme, produit du gène metE (E.C. 2.1.1.14), est vitamine B12 indépendante et catalyse la méthylation avec le 5-méthyltétrahydroptéroyltri-L-glutamate en tant que donneur du groupe méthyle (Sekowska et col., 2000). Chez les mammifères, l'activité de l'homocystéine méthyltransférase est également vitamine B12 dépendante, contrairement à celle décrite chez *S. cerevisiae*. Cette levure n'a donc pas besoin de cobalamine pour assurer sa croissance (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997 ; Griffit, 1987).

La méthionine peut à son tour être activée avec une molécule d'ATP en formant de S-adénosylméthionine (AdoMet). Cette réaction est catalysée par la S-adénosylméthionine (E.C.

2.5.1.6). L'AdoMet est un composé très important par le nombre de réactions où il intervient en tant que cofacteur, en particulier dans les réactions de transméthylation. Deux des produits de dégradation de l'AdoMet sont la S-adénosylhomocystéine (AdoHC) et la méthyl-thio-adénosine. La S-adénosylhomocystéine peut être ensuite hydrolysée en homocystéine par la S-adénosylhomocystéine hydrolase (E.C. 3.3.1.1), tandis que la méthyl-thio-adénosine peut être recyclée en méthionine dans le cycle de la méthyl-thio-adénosine. Pour cela, la méthyl-thio-adénosine est initialement hydrolysée en 5-méthylthioribose. La position C1 du résidu ribose est ensuite phosphorylée par la méthylthioribose kinase en méthylthioribose 1-phosphate. Après isomérisation et déshydratation, l'intermédiaire dicétonique subit une décarboxylation oxydative pour donner l'acide 2-oxo-4-méthylthiobutyrique (KMBA), précurseur de la méthionine (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997 ; Sekowska et col., 2000).

II.4. CONSERVATION DU SOUFRE REDUIT DANS LE GLUTATHION

Mis à part les mécanismes de recyclage du soufre à partir de S-adénosylméthionine ou dans le cycle de la méthyl-thio-adénosine (section II.3), le soufre peut être conservé chez les micro-organismes dans son état le plus réduit (S^{-2}) dans le glutathion.

Le glutathion (GSH, γ-glutamyl-cysteinyl glycine) est présent jusqu'à des concentrations intra-cellulaires de 10 mM chez la plupart des procaryotes et des eucaryotes. La principale caractéristique du glutathion est son très bas potentiel d'oxydo-réduction (E'o = -240 mV) et le fait qu'il soit conservé dans son état réduit par une glutathion réductase dépendante du NADPH (Meister et Anderson, 1983).

On retrouve le glutathion chez les bactéries aérobies Gram négative mais très rarement chez les bactéries anaérobies ou les bactéries Gram positive. Le glutathion peut être présent dans la cellule dans son état réduit (GSH), oxydé (GS-SG) ou associé par des ponts disulfures à différents composés, par exemple avec le CoenzymeA (GS-SCoA) ou avec la cystéine (GS-SCy).

Le glutathion assure des rôles très importants pour la cellule : de protection contre le stress oxydatif, de désintoxication de métabolites toxiques et xénobiotiques et de transport. Par ailleurs, il intervient dans le métabolisme du soufre et de l'azote (Penninckx, 2002).

Le glutathion est synthétisé (figure A-4) par l'action de la γ-glutamyl-cystéine synthase (γ-GCS, E.C. 6.3.2.2) et la γ-glutamylcystéine-glycine γ-lyase (GSH synthétase, E.C. 6.3.2.3). La γ-GCS est rétro-inhibée par le GSH, ce qui limite sa sur-production. La GSH synthétase est constitutive et n'est donc pas régulée (Meister et Anderson, 1983).

Lorsque les niveaux d'azote ou de soufre deviennent très limitants, le glutathion peut être dégradé. La voie de dégradation du glutathion n'a pas été complétement décrite. Toutefois, la γ-glutamyltranspeptidase (E.C. 2.3.2.2) et la L-cysteinyl glycine dipeptidase (E.C. 3.4.13.6) sont respectivement la première et la dernière enzyme de cette voie de dégradation (figure A-4). La cellule peut alors récupérer de l'azote sous forme de glycine et de glutamate, et du soufre sous forme de cystéine (Penninckx, 2002).

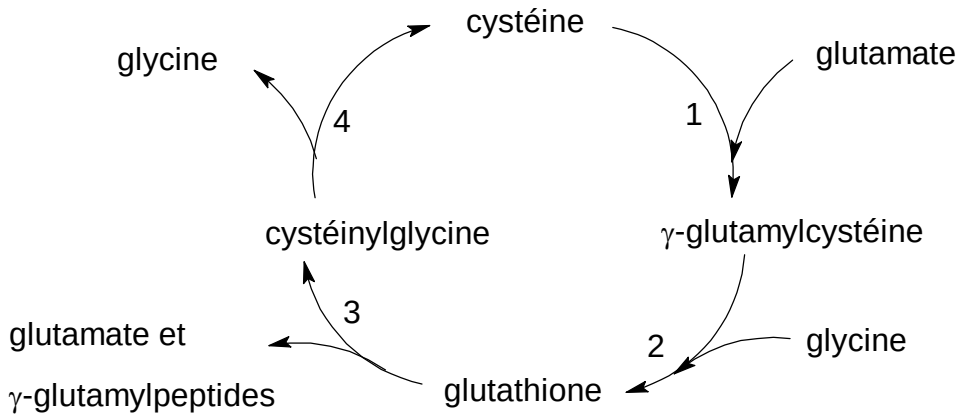


Figure A-4. Le cycle du glutathion. Le glutathion assure des rôles très importants pour la cellule, y compris de protection contre le stress oxydatif, et peut être utilisé aussi comme source d'azote ou de soufre lorsque leurs concentrations sont limitantes. Enzymes : 1) γ-glutamylcystéine synthase ; 2) glutathione synthetase ; 3) γ-glutamyltranspeptidase ; 4) cystéinylglycine dipeptidase. (D'après Penninckx, 2002).

II.5. TRANSPORT DU SULFATE, DE LA L-CYSTEINE ET DE LA L-METHIONINE

L'entrée dans la cellule du sulfate, de la cystéine et de la méthionine exige un système de transport actif. La plupart des systèmes de transport du sulfate et du soufre organique chez les bactéries appartiennent à la ABC-superfamille (ATP Binding Cassette), famille SulT. Leurs fonctions de transport sont activées par hydrolyse de l'ATP. De tels transporteurs sont

constitués généralement de trois composants : une protéine ayant une très grande affinité pour le substrat, située dans le périplasme, une perméase liée à la membrane, généralement dimérique, et une protéine, fixant l'ATP présente sur la face interne de la membrane, également dimérique. En plus des transporteurs ABC, plusieurs transporteurs bactériens du sulfate appartiennent au groupe MFS-superfamille (Major Facilitator Superfamily), famille SulP.

Les transporteurs ABC sont exprimés même pour de faibles concentrations en soufre. Les quantités de substrats soufrés transportés par de tels systèmes sont faibles, puisque les bactéries exigent relativement peu de soufre pour leur croissance : le soufre représente environ 1% du poids sec des cellules bactériennes (Kertesz, 2001). Chez *S. cerevisiae*, le sulfate est transporté dans la cellule par au moins deux systèmes indépendants de haute affinité, SUL1 et SUL2. Les deux systèmes sont formés de protéines liées à la membrane (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997).

Par ailleurs, plusieurs transporteurs pour la cystéine et la méthionine ont été identifiés chez les entérobactéries. *E. coli* posséde un système d'affinité élevée pour la cystéine (Km 0,2 mM) et au moins un autre transporteur de faible affinité (Berger et Heppel, 1972), tandis que *Salmonella typhimurium* en posséde trois (Baptist et Kredich, 1977).

La méthionine est également transportée par plusieurs systèmes. Des études génétiques chez *E. coli* et *S. typhimurium* ont prouvé que ces espèces possédent au moins deux transporteurs de méthionine, avec une affinité élevée (Km 0,1 μM) et basse (Km 40 μM) (Kertesz, 2001). Par contre, chez les levures, chaque acide aminé est transporté par des perméases spécifiques et non spécifiques. La perméase générale des acides aminés (Gap1p) peut transporter tous les acides aminés naturellement retrouvés dans les protéines. Cependant, en présence d'ammonium comme source d'azote, ce transporteur n'est pas actif (André, 1995). Dans ces conditions, les acides aminés sont transportés par des perméases spécifiques. Ainsi, la cystéine est transportée par une perméase (Km 83 μM), laquelle est inhibée par l'homocystéine et la méthionine (Ono et Naito, 1991), tandis que la méthionine est transportée par une perméase de haute affinité (Km 13 μM) et deux de basse affinité (Km 260 μM et 1,0 mM) A la différence des entérobactéries, *S. cerevisiae* peut activement transporter l'adénosylméthionine dans la cellule (Km 3,3 μM) (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997).

III. GENESE DES COMPOSES SOUFRES VOLATILS

Comme nous avons pu le voir dans les sections précédentes, la protéolyse et la lipolyse sont les principales voies cataboliques actives pendant l'affinage. Ces voies aboutissent à la génération d'un grand nombre de composés volatils dont des alcools, des aldéhydes, des esters et des composés soufrés. Parmi ces composés, les composés soufrés volatils (CSV) ont été identifiés comme des molécules clé donnant à l'arôme du fromage sa typicité. Etant donné que la L-méthionine est le principal acide aminé soufré dans le caillé, son rôle dans la génération de la plupart des CSV a été étudié et est désormais en partie établi ; la contribution de la L-cystéine dans leur formation reste par contre à étudier.

III.1. CATABOLISME DE LA L-METHIONINE

Les principaux composés d'arôme produits à partir de la méthionine sont le méthional, le méthionol et le méthanethiol qui peuvent ensuite subir différentes réactions chimiques ou enzymatiques et se transformer en autant d'autres composés soufrés.

Dans un premier temps, la méthionine peut être dégradée suivant deux voies, lesquelles peuvent se réaliser en une ou deux étapes, selon si la L-méthionine est attaquée par une lyase ou une transaminase (figure A-5).

Dans la première voie de dégradation, les phénomènes de désamination et déméthiolation ont lieu simultanément. Chez les bactéries d'affinage du fromage, telles que *Brevibacterium*, cette réaction semble être la principale voie de dégradation de la méthionine grâce à une activité déméthiolase par la méthionine γ-lyase (MGL, E.C. 4.1.1.11) qui catalyse l'élimination simultanée des groupements aminés en position alpha et du méthanethiol en position gamma (α,γ-élimination) de la méthionine et de ses dérivés (notamment l'homocystéine, le précurseur de la méthionine) ; elle n'est active que sur les L- énantiomères des acide aminés (Tanaka et col., 1985).

Les produits de cette réaction sont donc l'ammoniaque, l'acide α-cétobutyrique et le méthanethiol. Il semble que cette réaction soit la principale voie de dégradation de la méthionine pour des micro-organismes fromagers (tel *Brevibacterium linens*). Amarita et col. (2004) ont montré que la disruption du gène mgl codant pour cette enzyme entraînait une diminution de 97% de la production de CSV. L'expression de ce gène est induit en présence

de méthionine ou de peptides contenant de la méthionine (Ferchichi et col., 1985 ; Weimer et col., 1997). La concentration de méthionine libre dans le lait semble être suffisante pour stimuler l'activité de la MGL et elle est réprimée par la cystéine (Dias et Weimer, 1998a).

La MGL est PLP-dépendante et ne semble pas affectée par les chélateurs d'ions ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'une métallo-protéine. L'activité optimale de cette enzyme est à pH 7,5 et 25°C, mais elle reste active à des valeurs de pH, de température et de concentration en sel proches de celles utilisées pour l'affinage d'un fromage (Collin et Law, 1989; Dias et Weimer, 1998b). Toutefois, elle est très sensible à la protéolyse et son activité dépend donc de l'intégrité cellulaire de la bactérie (Dias et Weimer, 1998a). Dias et Weimer (1999) ont montré que l'ajout de cette enzyme à des caillés de type Cheddar favorise la production de méthanethiol et de DMTS. Par ailleurs, Bonnarme et col. (2000) ont mis en évidence la production d'une telle activité chez différentes espèces de bactéries de surface : *C. glutamicum*, *Arthrobacter* ssp., *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus equorum*, en plus d'une souche de référence de *B. linens* ATCC9175.

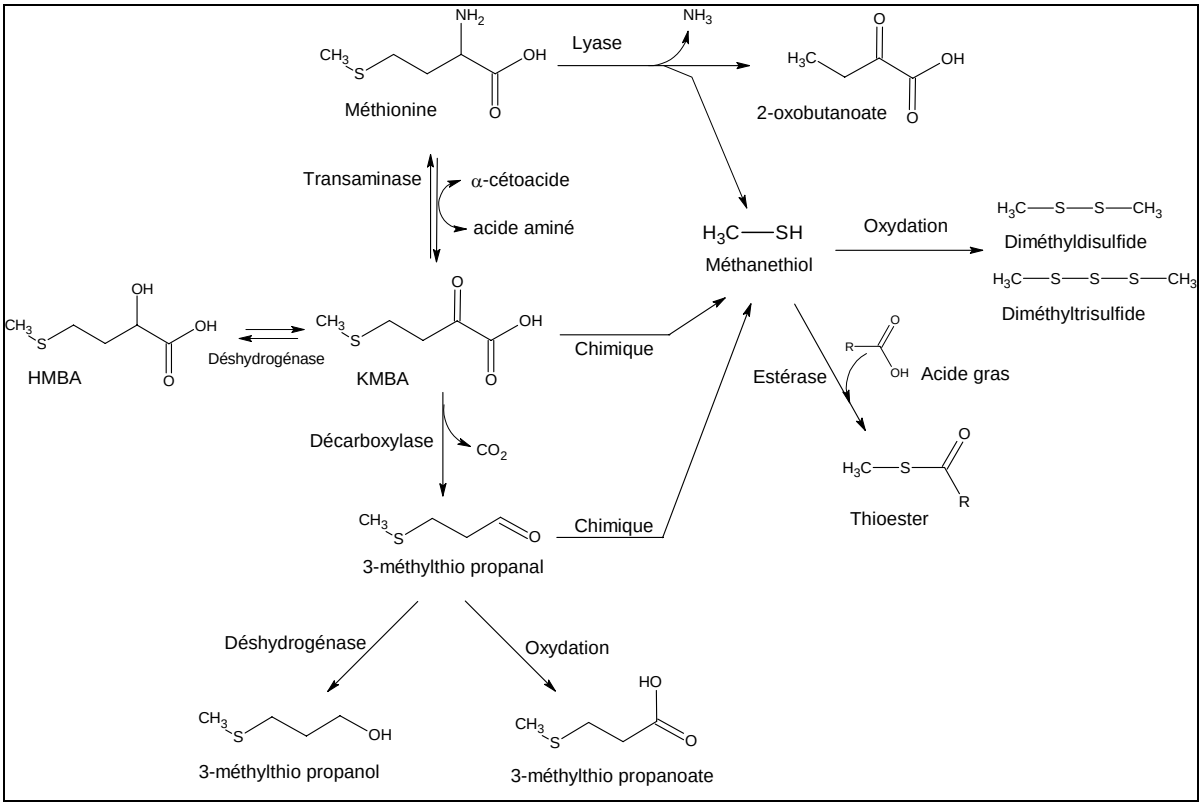


Figure A-5. Catabolisme de la L-méthionine et production de composés soufrés volatils.

Mises à part les études réalisées sur les bactéries utilisées en fromagerie, d'autres auteurs ont démontré aussi une activité MGL analogue chez *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas* sp. (Esaki et Soda, 1983), *Citrobacter intermedius* (Faalev et col., 1996) et *Trichomonas vaginalis* (Lockwood et Coombs, 1991) entre autres micro-organismes (Soda et col., 1983). Dans tous les cas, la MGL reste une enzyme très versatile : elle catalyse aussi bien des réactions d'α–γ-élimination que de réactions d'α–β-élimination, de β-remplacement, de γ-remplacement et de γ-addition (Soda et col., 1983 ; Tanaka et col., 1985).

Ainsi, la MGL peut libérer le méthanethiol de la méthionine (ou de la S-méthylcystéine) et l'H_2S de la cystéine (ou de l'homocystéine) ou substituer le groupement soufré correspondant de ces composés par d'autres groupements soufrés (figure A-6). D'ailleurs, Faalev et col. (1996) ont étudié la stéréo spécificité du mécanisme de γ-remplacement de la MGL de *C. intermedius* sur la L-méthionine. Par des essais de remplacement, ces auteurs ont conclu que cette enzyme dispose de trois espaces utilisés pour le γ-remplacement, qu'ils ont décrit comme "large", "moyen" et "petit". Ainsi, l'espace "large" pourrait contenir de radicaux alkyls possédant au maximum 6 carbones ou un radical aromatique sans substitution ; l'espace "moyen" peut contenir un hydrogène, un radical méthyle ou éventuellement un éthyle, tandis que l'espace "petit" ne peut contenir qu'un hydrogène. Avec cette disposition, la MGL serait hautement stéréo spécifique et limiterait son activité à de "petit" thiols (Faalev et col., 1996).

D'autres lyases sont aussi concernées par la degradation de la méthionine, en particulier la cystathionase β-lyase (CBL, E.C. 4.4.1.8) et la cystathionine γ-lyase (CGL, E.C. 4.4.1.1). Ces enzymes ont été isolées chez *L. lactis* et *B. linens* (Samacchi et Gobetti, 1998 ; Alting et col., 1995 ; Bruinenberg et col., 1997 ; Dias et Weimer, 1998a).

Ces enzymes sont PLP-dépendantes avec un pH optimal proche à 8,0. Dans des conditions proches du début d'affinage (pH 5 et 4% de NaCl) leur activité est drastiquement réduite, voire même perdue dans le cas de *B. linens* (Dias et Weimer, 1998a).

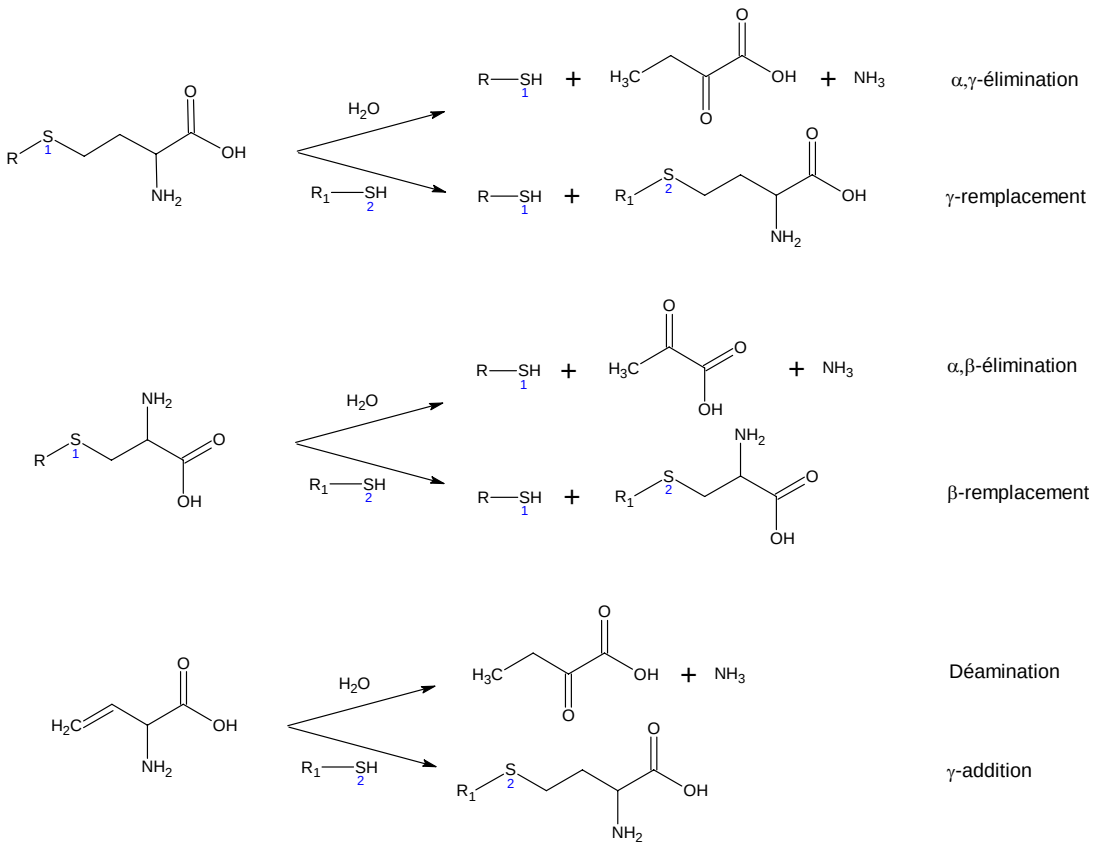


Figure A-6. Types de réactions catalysées par la méthionine γ-lyase (adapté de Tanaka et col., 1985).

Contrairement à la déméthiolase, elles n'ont pas la méthionine comme substrat spécifique : elles catalysent respectivement des réactions d'α–β-élimination et d'α–γ-élimination sur la cystathionine dans la voie de biosynthèse de la méthionine (voir figure A-3), en produisant respectivement de l'homocystéine et de la cystéine, ainsi que de l'acide α-cétobutyrique et de l'ammoniaque. La première fonction de ces enzymes est donc de participer à la biosynthèse de la méthionine, obtenue par transméthylation de l'homocystéine. Toutefois, elles peuvent être aussi actives sur différents substrats (tableau A-4). Par exemple, elles peuvent produire du méthanethiol à partir de la méthionine mais avec une activité de 10 à 100 fois inférieure à celle exercée sur la cystathionine (Alting et col., 1995 ; Bruinenberg et col., 1997 ; Smacchi et Gobetti, 1998).

D'ailleurs, Fernandez et col. (2002), ont montré que l'expression du gène metC, qui code pour la CBL chez *L. lactis*, est fortement inhibée en présence de cystéine, méthionine ou

glutathion. Pour ces raisons, ces auteurs n'ont pas considéré cette enzyme comme étant essentielle pour la production de CSVs chez *L. lactis*.

Tableau A-4. Activités cystathionine β–lyase, cystathionine γ–lyase et méthionine γ–lyase de *L. lactis*, *Lab. fermentum* et de *B. linens.*

	Activité relative (%)			
	Cystathionine β–lyase	Cystathionine γ–lyase	Cystathionine γ–lyase	Méthionine γ–lyase
Substrat	*L. lactis subsp cremoris B78*	*L. lactis subsp cremoris SK11*	*L. fermentum DT41*	*B. linens BL2*
L-cystathionine	100	100	100	0
L-homoserine	96	0	1	n.d
L-cystine	64	45	145	0
L-cystéine	12	73	54	2
L-homocystéine	4	12	27	134
L-méthionine	1	1	14	100
KMBA	0	n.d	n.d.	0
Références	Alting et col., 1995	Bruinenberg et col., 1997	Smacchi et Gobetti, 1998	Dias et Weimer, 1998

La deuxième voie de dégradation de la méthionine implique d'abord sa transamination, suivie par la déméthiolation de l'intermédiaire formé (figure A-5). Cette voie en deux étapes a d'abord été mise en évidence chez des bactéries, actinomycètes et champignons filamenteux isolés du sol (Ruiz-Herrera et Starkey, 1969 ; Segal et Starkey, 1969). Une voie de conversion de la méthionine initiée par une aminotransférase est également connue chez les mammifères (Scislowski et Pickard, 1993).

La première étape de cette voie de dégradation est initiée par la transamination de la méthionine, catalysée par une aminotransférase et conduit à la formation d'un α-cétoacide, l'acide 2-oxo-4-méthylthiobutyrique (KMBA). La transamination nécessite la présence d'un accepteur de groupement amine, généralement l'α-cétoglutarate, qui sera transformé en glutamate lors de la réaction. Les transaminases sont des enzymes PLP-dépendantes, et elles possèdent une plus ou moins grande spécificité pour un acide aminé précis (voir section I.1.3.1, page 16). Le fait que les lactocoques ne possèdent pas d'activité γ-déméthiolase, mais

une activité aminotransférase permettant la formation de KMBA, a été démontré par Gao et col. (1998a) et par Dias et Weimer (1998). Par contre, ces derniers n'ont pas mis en évidence d'activité méthionine transaminase chez la souche *Brevibacterium linens* BL2. Nonobstant, les activités γ-déméthiolase et transaminase ne sont pas mutuellement exclusives, comme il a été démontré chez les bactéries de surface *Brevibacterium linens* ATCC9175, *Micrococcus luteus* et *Corynebacterium glutamicum* par Bonnarme et col. (2000).

Le KMBA produit lors de la transamination subit une déméthiolation pendant la deuxième étape de cette voie de dégradation. La dégradation non-enzymatique du KMBA en méthanethiol a été signalée aussi par plusieurs auteurs (Manning, 1979 ; Soda, 1987 ; Gao et col., 1998 ; Arfi et col., 2003). Cependant, Gao et col. (1998) remarquent qu'une quantité significativement importante de méthanethiol est produite quand des cellules entières de *L. lactis* sont incubées en présence de KMBA dans des conditions proches de celles d'un fromage. Cette activité a été aussi démontrée chez *B. linens* ATCC9175 et *M. luteus* dont l'activité KMBA-déméthiolase serait responsable d'au moins 90% de la production de méthanethiol à partir du KMBA par des cellules entières, contre seulement 10% de formation spontanée (Bonnarme et col., 2000). Cette activité se trouve être beaucoup plus faible chez les autres espèces étudiées par ces auteurs (*Arthrobacter* sp., *C. glutamicum* et *Staphylococcus equorum*) et elle est absente chez la souche *B. linens* BL2 étudiée par Dias et Weimer (1998a). La démethiolation du KMBA a été aussi démontrée par Arfi et col., (2003) chez la levure *Geotrichum candidum*.

Si le KMBA n'est pas directement déméthiolé, il est alors dégradé en suivant deux voies alternatives (figure A-6). Ainsi, dans la première de ces voies, le KMBA peut être réduit par une déshydrogénase en l'hydroxyacide 2-hydroxy-4-méthylthiobutyrique (HMBA) (Sinclair et col., 1993 ; Amarita et col., 2001). La production de HMBA a été démontrée chez différentes souches de lactobacilles et de lactocoques (Gao et col., 1998 ; Amarita et col., 2001) et de levures (Sinclair et col., 1993 ; Arfi et col., 2003), mais pas chez *Brevibacterium* (Arfi et col., 2003). Seuls certains micro-organismes sont capables d'utiliser le HMBA pour produire des CSV, soit par dégradation directe soit par une éventuelle réoxydation en KMBA (Arfi et col., 2003). L'accumulation de HMBA dans les cultures entraine une diminution des CSV produits (Gao et col., 1998).

Dans la deuxième voie alternative, le KMBA est décarboxylé en l'aldéhyde correspondant, le méthional (3-méthylthio propanal). Celui-ci peut être réduit à son tour en méthionol ou oxydé en acide 3-méthylthiopropanoïque. Cette série de réactions est connue comme la voie d'Erlich de dégradation des acides aminés et correspond à la principale voie de production des alcools supérieurs chez les levures (Perpète et col., 2006).

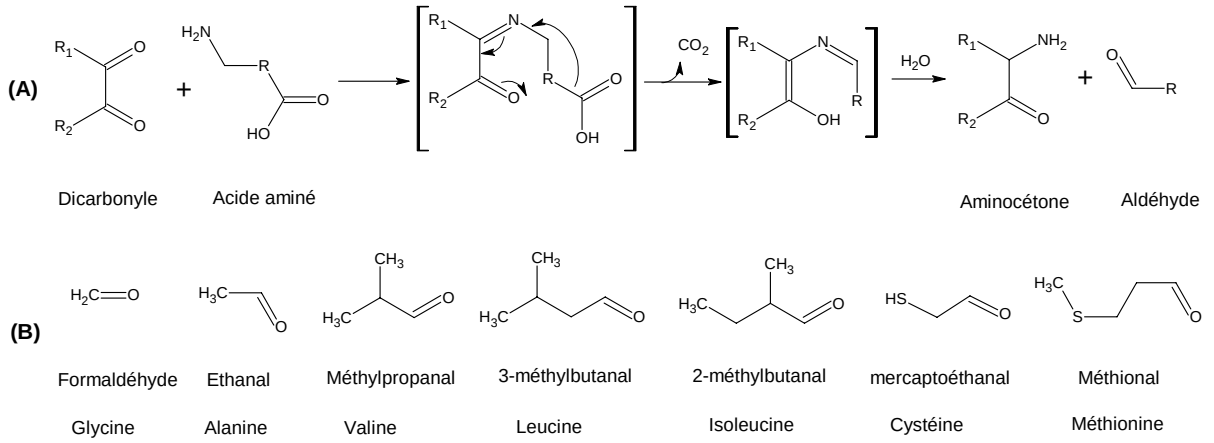


Figure A-7. Dégradation de Strecker des acides aminés (A) et exemple de quelques aldéhydes de Strecker issus de cette réaction (B).

La méthionine peut être également dégradée par voie chimique, par la réaction de Strecker, laquelle peut se développer pour des concentrations élevées en acides aminés libres ou à température élevée ; cette réaction se réalise entre un acide aminé et un composé α-dicarbonyle, par exemple une dicétone (figure A-7). Après désamination et décarboxylation, l'acide aminé est transformé en un aldéhyde (aldéhyde de Strecker) contenant un carbone de moins et la dicétone est transformée en aminocétone (Belitz et Grosch, 1999). Globalement, cette réaction est l'équivalente chimique des premières étapes de la voie d'Erlich (désamination/décarboxylation). Ainsi, en réalisant un bilan global, la dégradation de la méthionine aboutit à la formation de méthional (figure A-8). Si le méthional n'est pas réduit en méthionol, il peut libérer le méthanethiol par un mécanisme chimique en milieu acide (pH<5) ou en présence des ions Fe^{2+} (Wainwright et col., 1972 ; Griffith et Hammond, 1989 ; Vermeulen et col., 2005).

Finalement, le méthanethiol peut se former suite à la dégradation du méthylthioacétaldéhyde (produit par décarboxylation du KMBA). Ce dernier est hydrolysé en méthanethiol et aussi en acétaldéhyde en présence d'oxygène (Bonnarme et col., 2004). Le mécanisme chimique de ces réactions n'a pas été complètement élucidé. Cependant, Smit et col. (2004), ont montré la génération d'aldéhydes avec un ou deux carbones de moins à partir d'α-cétoacides en présence d'oxygène et de manganèse, moyennant la formation d'un peroxyde sur le carbone β des α-cétoacides, la libération concomitante d'acide oxaloacétique et de CO_2 ou de CO. Cette réaction peut s'effectuer dans des milieux acides ou basiques et elle est favorisée par la formation des tautomères énoliques des α−cétoacides et la présence d'un groupe aromatique ou de deux hydrogènes sur le carbone β (Smit et col., 2004).

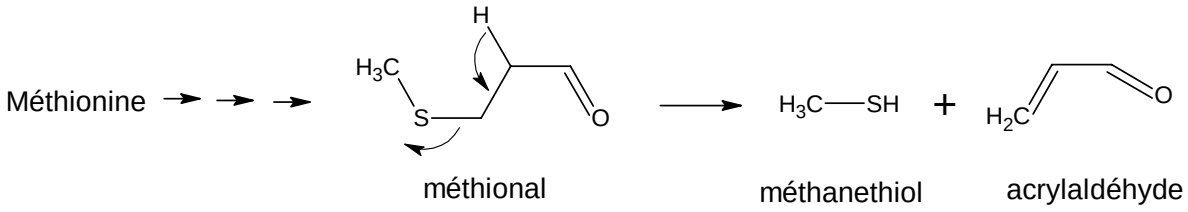


Figure A-8. Dégradation de Strecker de la L-méthionine (d'après Belitz et Grosch, 1999).

III.2. CATABOLISME DE LA L-CYSTEINE

La L-cystéine est un acide aminé avec un groupe thiol en C-3. Ce groupe thiol posséde un pKa de 8,2, ce qui la rend très nucléophile et lui confére une grande réactivité. De ce fait, la L-cystéine peut participer à une série complexe de réactions métaboliques et chimiques, en plus de son incorporation dans la plupart des protéines et le glutathion. Les produits du catabolisme de la L-cystéine sont l'ammoniaque, le pyruvate et le sulfure d'hydrogène ou H_2S, principalement. C'est à cause de la production de ce dernier que la dégradation de la L-cystéine est appelée globalement activité désulfhydrase. Cette activité a été identifiée aussi bien chez les mammifères (Kamoun, 2004) que chez plusieurs micro-organismes, y compris

les bactéries à Gram négative (Collins et col., 1973 ; Fukamachi et col., 2002 ; Awano et col., 2005), à Gram positive (Bloes-Brenton et Bergère, 1997 ; Wada et col., 2002) et des levures (Jiranek et col., 1995 ; Duan et col., 2004).

De part sa nature d'acide aminé, la cystéine peut être dégradée par des enzymes de même spécificité réactionnelle que celles impliquées dans le catabolisme d'autres acides aminés. Ainsi, il est possible d'établir une correspondance avec le catabolisme de la L-méthionine (figure A-9).

De façon similaire à la méthionine, la cystéine peut être dégradée par des réactions en une ou deux étapes. La réaction en une seule étape implique l'action de lyases telles que les cystathionine β et γ lyases (CBL, CGL), la méthionine γ-lyase (MGL), et la tryptophanase ; l'utilisation de l'une ou de l'autre de ces lyases est une caractéristique dépendante de la souche. Toutefois, aucune de ces lyases n'est spécifique pour la cystéine. Ainsi, chez *E. coli*, l'activité désulfhydrase est attribuée à la CBL et à la tryptophanase, même si cette dernière catalyse principalement la dégradation du tryptophane en indol, pyruvate et ammoniaque (Awano et col., 2005).

Comme noté précédemment, les CBL et CGL ont une spécificité de substrat maximale sur la cystathionine, mais elles sont aussi actives sur d'autres composés soufrés, incluant la cystéine (voir le tableau A-4). Ainsi, la CBL de *Corynebacterium* conserve 5 % de son activité sur cystéine par rapport à celle sur cystathionine (100 %) et moins de 1 % sur méthionine (Wada et col., 2002). D'autre part, les CBL et CGL des bactéries lactiques ont une activité comprise entre 10 et 70 % sur la cystéine (Alting et col., 1995 ; Bruinenberg et col., 1997). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'activité désulfydrase est assurée par la CGL (Yamagata et col., 2002), celle-ci étant aussi active sur la cystine (produit d'oxydation de la cystéine). En utilisant la cystine comme substrat, la CGL produit d'abord la thiocystéine (ou cystéine persulfide) qui peut ensuite libérer spontanément l'H_2S (figure A-9). La thiocystéine peut réagir avec des thiols qui, par remplacement, libèrent l'H_2S et produisent des cystéine-disulfures. Si le thiol est la cystéine, la cystine est alors produite (Cooper, 1983).

La MGL produite par divers micro-organismes (*B. linens*, *P. putida* et *Aeromonas*) est aussi active sur la cystéine en générant de l'H_2S ou des produits de S-remplacement (Tanaka et col., 1985). La cystine ne semble pas être dégradée par cette enzyme (Dias et Weimer, 1998).

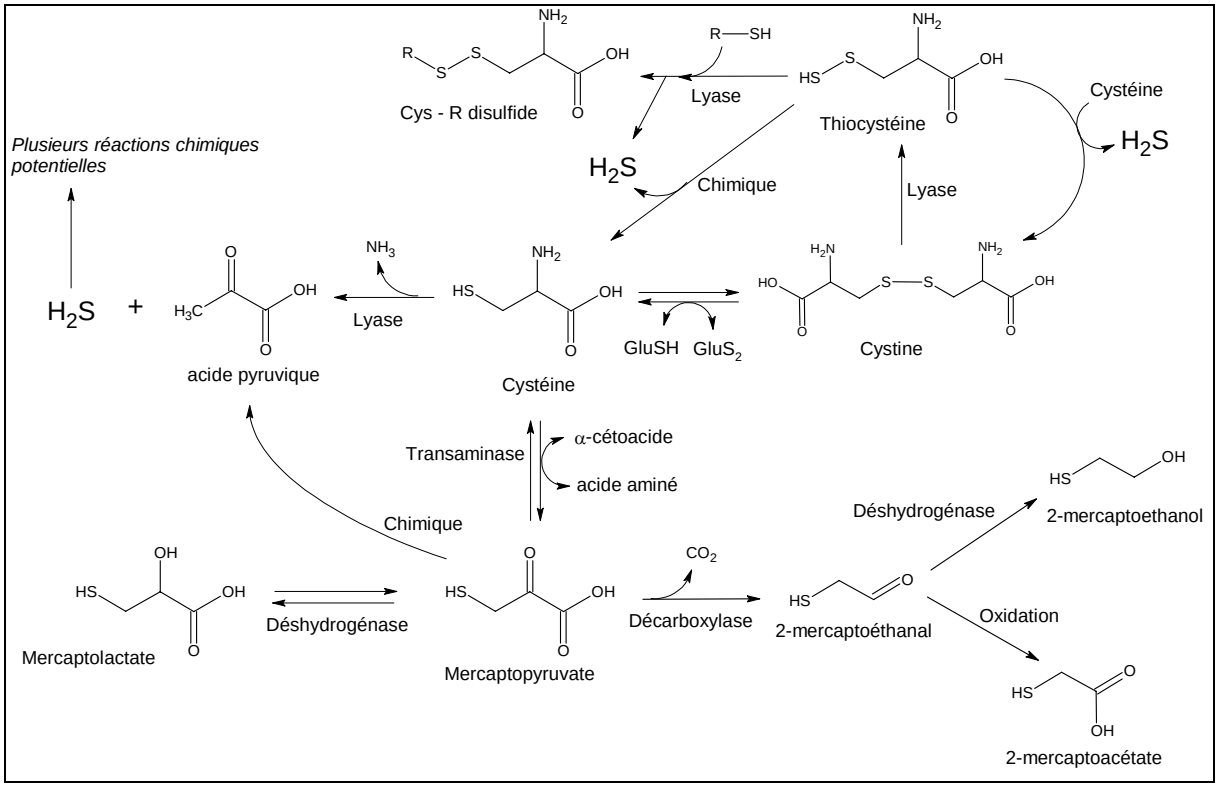


Figure A-9. Voies générales pour le catabolisme de la L-cystéine (adapté de Cooper, 1983). Les voies du thiosulfate et de la taurine, présentes chez les mammifères, ne sont pas représentées.

D'autre part, la voie de transamination de la cystéine aboutit à la formation de l'acide 3-mercaptopyruvique (mercaptopyruvate) (figure A-9). Cette voie catabolique a été largement étudiée chez l'homme en raison des problèmes de santé déclenchés par l'H_2S produit et les thiols libres (Cooper, 1983 ; WHO, 1981). Le mercaptopyruvate est plus labile et réactif que la L-cystéine de départ ; en solution il peut subir rapidement plusieurs réactions chimiques ou enzymatiques (figure A-10). En effet, en plus de pouvoir suivre un transamination réversible vers la cystéine, le mercaptopyruvate peut rapidement perdre le groupe thiol en libérant l'H_2S et le pyruvate. Il forme aussi des disulfures simples avec une autre molécule de mercaptopyruvate, ou mixtes avec la L-cystéine ou d'autres thiols. Le disulfure cystéine-mercaptopyruvate peut substituer la cystine en tant que substrat pour la CGL (Cooper, 1982).

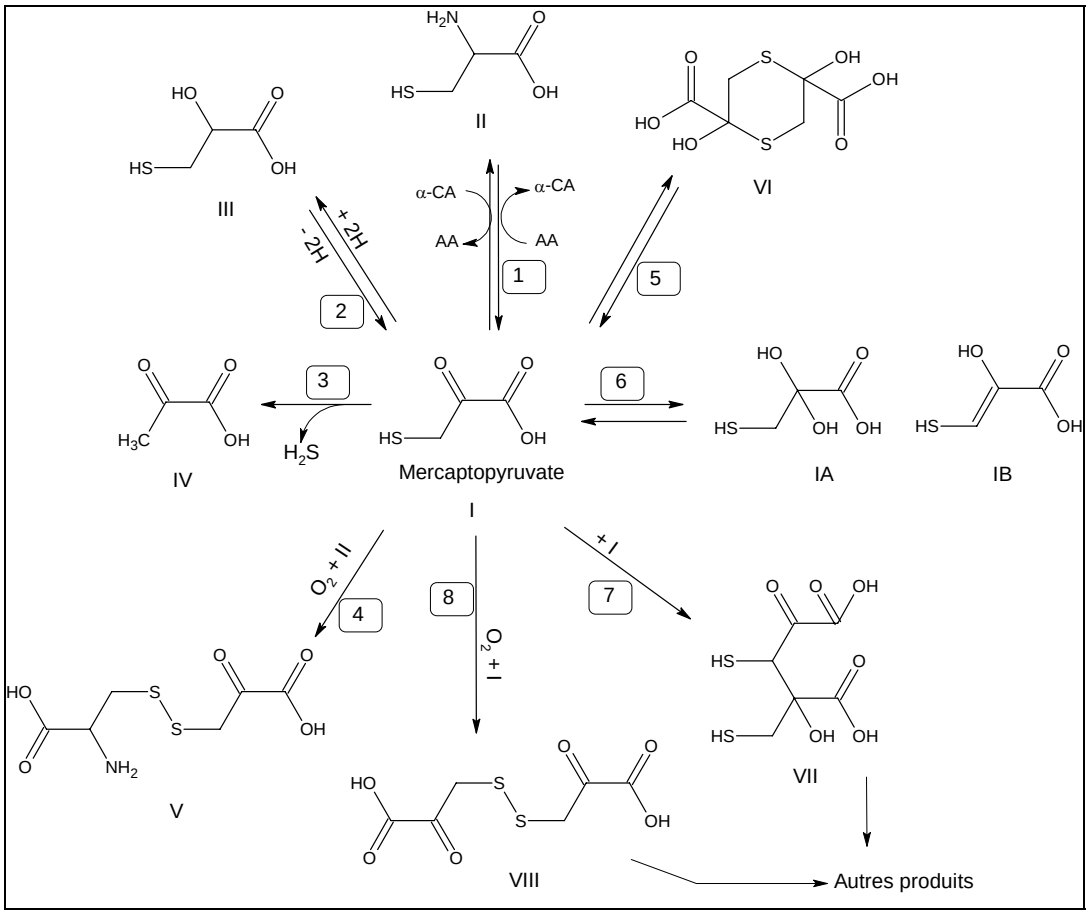


Figure A-10. Réactions enzymatiques et non-enzymatiques de dégradation du mercaptopyruvate (adapté de Cooper et col., 1983).

Le mercaptopyruvate (I) peut suivre une transamination réversible en L-cystéine (II) (réaction 1), réduction réversible en mercaptolactate (III) par la lactate déshydrogénase (réaction 2), ou desulfuration en pyruvate (IV) (réaction 3). En présence d'oxygène et de cystéine, le mercaptopyruvate peut former un disulfide mixte (V) (réaction 4). En solution, le mercaptopyruvate est en équilibre avec sa forme cyclique 2,5-dihydroxy-1,4-dithiane-2,5-dicarboxylate (VI). A un pH inférieur à 7,0, les formes hydratées (IA) et énol (IB) sont en faible concentration, et si l'énol est formé, il peut être éliminé rapidement par d'autres réactions. Le mercaptopyruvate peut subir une condensation aldolique, spécialement dans de conditions basiques, en formant l'aldol dimère (VII) (réaction 7). Les disulfures V et VIII sont formé dans de conditions oxydatives. Les composés VII et VIII sont réactifs et perdent rapidement la réactivité du groupe carbonyle.

En raison de la présence de l'atome de soufre en plus du groupe cétonique, le mercaptopyruvate est aussi plus réactif et instable que son analogue le pyruvate. Toutefois, il peut suivre les mêmes réactions que le pyruvate mais à plus grande vitesse (Cooper et col., 1982). En présence de déshydrogénases, par exemple la lactate déshydrogénase, le mercaptopyruvate est réduit en mercaptolactate (figure A-10). Finalement, de même que le pyruvate, le mercaptopyruvate peut se trouver en solution sous sa forme hydrate ou énolique et suivre des réactions de condensation aldolique avec lui-même ou le pyruvate. Par

conséquent, le mercaptopyruvate est aisément transformé en divers produits dérivés, de même que le pyruvate, dans le métabolisme du carbone.

Mise à part la dégradation enzymatique de la L-cystéine, celle-ci peut être dégradée par diverses réactions chimiques. Les meilleurs exemples de ces réactions sont la réaction de Strecker (décrit dans la section III.1, page 39) et la réaction de Maillard. Issus de cette dernière, de nombreux produits soufrés sont obtenus par traitement thermique des denrées alimentaires (Yoo et col., 1998 ; Schieberle et Engel, 2002 ; van Boekel, 2006). Par la réaction de Strecker, le mercaptoaldéhyde, l'H_2S et des composés de type thiazole peuvent être produits (figure A-11) (Hwang et col., 1997 ; Belitz et Grosch, 1999).

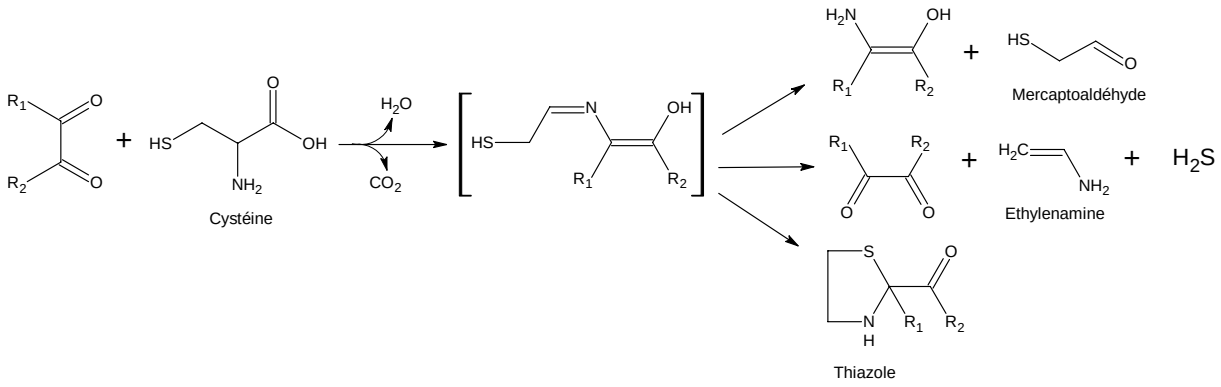


Figure A-11. Dégradation de Strecker de la L-cystéine (adapté de Belitz et Grosch, 1999).

En plus d'être dégradée par des réactions de type Strecker ou Maillard précédemment citées, la L-cystéine peut participer à des réactions d'oxydo-réduction grâce à son groupe thiol libre. La L-cystéine est facilement auto-oxydée en cystine par la formation d'une liaison disulfure entre deux cystéines même en conditions oxydative douce. Cette capacité à former des ponts disulfure la rend d'une part responsable de la structure tertiaire de certaines protéines et d'autre part capable de participer dans les cellules au contrôle des niveaux d'oxydoréduction (Cooper, 1983). Il est bien établi que l'oxydation de la L-cystéine est augmentée à pH basique ou lorsque les conditions d'oxydation sont fortes, par exemple en présence de peroxyde (H_2O_2) ou de radicaux libres (Carlsson et col., 1979).

Ainsi, l'acide cystéine sulfinique (R-SO_2H), l'acide cystéique (R-SO_3H) et l'acide β-sylfinyl pyruvique (R-SO_2H, dérivé du mercaptopyruvate) sont quelques exemples de

produits d'oxydation de la L-cystéine ou du mercaptopyruvate par réaction avec l'oxygène. Ces composés restent pourtant aussi réactifs que la L-cystéine et sont dégradés par voie enzymatique ou chimique avec la libération de sulfite (SO_3^{2-}) ou de sulfate (SO_4^{2-}) et de pyruvate (Kertesz, 1999). Ces mécanismes constituent également les principales voies d'élimination du soufre chez les mammifères (Cooper, 1983 ; Leinweber et Monty, 1987 ; Griffith, 1987).

D'autre part, l'H_2S et les thiols (R-SH) sont des composés très importants dans l'arôme des aliments, en raison de leur odeur intense et leur potentielle réactivité avec d'autres composés couramment présents dans les aliments (Vermeulen et col., 2005).

L'H_2S constitue le principal composé de valence -2 du soufre. Il est très volatil (température d'ébullition -60,3° C) et son odeur déplaisante, caractéristique d'oeuf pourri est perçue à partir de 5 ppb dans l'air. Cependant, sa perception disparaît au dessus de 150-200 ppm (Dales, 1989). En solution aqueuse, la volatilité du sulfure d'hydrogène dépend du pH. Ainsi, les trois formes ioniques de l'H_2S (H_2S, HS^-, S^{2-}) seront à divers niveaux d'équilibre : au-dessus du pK_1 = 13,0, c'est la forme ionique S^{2-} qui prédomine ; entre pH 13,0 et pH 7,0 (pK_2), la forme ionique prédominante est HS^-, tandis qu'au dessous du pK_2 = 7,0, la forme H_2S est prédominante. Cette dernière est la plus volatile des trois et à des pH acides, l'H_2S sera donc majoritairement sous sa forme la plus volatile et sera en conséquence moins disponible pour des réactions en solution (Charlot, 1966)[1].

Par ailleurs, grâce à ses propriétés acido-basiques, d'oxydoréduction et d'agent nucléophile, l'H_2S participe à nombreuses réactions via son atome de soufre ou son atome d'hydrogène : il peut donc agir comme un réducteur ou un oxydant (Oae, 1992). En solution, le sulfure d'hydrogène est lentement oxydé par l'oxygène de l'air et par les halogènes. Par oxydation, le SO_2, l'acide sulfurique (H_2SO_4) et le soufre élémentaire sont produits. Les thiols peuvent aussi suivre des réactions d'oxydation. Ainsi, une oxydation douce catalysée par des ions métalliques (fer ou cuivre) conduit à la formation de disulfures, cette réaction étant facilement réversible. Ce phénomène est particulièrement marqué lorsqu'ils interagissent avec d'autres disulfures, le glutathion ou des protéines dotées de résidus SH (Oae, 1992).

L'action oxydante du sulfure d'hydrogène ne se manifeste qu'en présence de métaux ; et elle est souvent favorisée par la faible solubilité des sulfures produits. En effet, les ions

[1] La distribution d'espèces de l'H_2S en solution aqueuse est développée dans l'Annexe 1.

sulfures peuvent réagir en solution avec des ions métalliques pour former des sels insolubles de fer (FeS), plomb (PbS), zinc (ZnS), argent (Ag_2S), cuivre (CuS) ou mercure (HgS). Les thiols peuvent aussi former des complexes métalliques avec ces métaux (Charlot, 1966 ; Vermeulen et col., 2005).

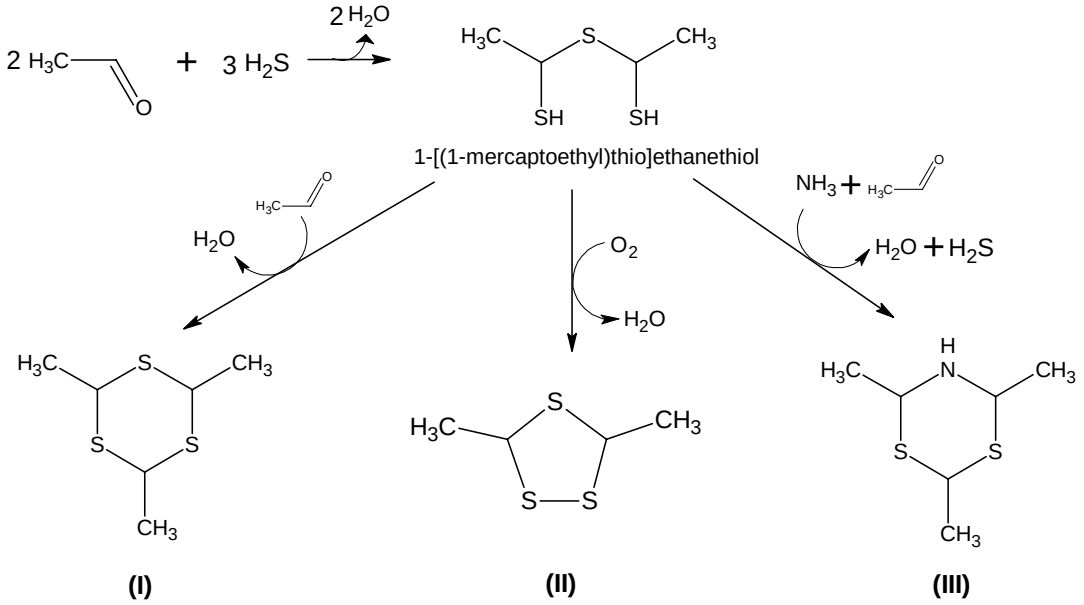


Figure A-12. Exemple de l'attaque nucléophile de l'H_2S sur les groupes carboxyles. Formation de 2,4,6-triméthyl-S-trithiane (I), 3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane (II) par condensation de l'H_2S et l'acétaldéhyde. Un dithiane (III) peut se former en présence d'ammonium, par exemple le 2,4,6-trimethyl-5,6-dihydro-1,3,5-dithiazine (III) (adapté de Belitz et Grosch, 1999).

L'H_2S est aussi un acide faible. Les thiols sont pourtant plus acides que les alcools correspondants en raison de l'atome de soufre qui, étant plus volumineux et polarisable, affaiblit la liaison –SH (Gijs et col., 2003). Une autre réaction caractéristique de l'H_2S est la réaction de substitution ou d'addition nucléophile. L'ion bisulfure (HS^-) étant plus nucléophile que l'ion hydroxyle (^-OH), le sulfure d'hydrogène peut donc le déplacer des alcools pour former le thiol correspondant (Kim, 1992). Les thiols peuvent intervenir aussi dans des réactions de substitution ou d'addition nucléophiles : ils sont capables de réagir sur des sites électrophiles (cation, halogénure, carbonyle) ou sur des liaisons insaturées. Compte tenu de son caractère électrophile, le carbone portant un aldéhyde ou une cétone réagit avec les groupements SH pour former des hémimercaptans. L'addition nucléophile de thiols sur la

double liaison d'un alcène ou la triple liaison d'un alcyne est également possible. Si ces insaturations sont conjuguées (par exemple dans le cas d'aldéhydes ou de cétones α,β-insaturés et de quinones), la réaction est fortement favorisée : l'insaturation sera d'abord attaquée puis le groupe carbonyle (Kim, 1992). Un exemple de l'attaque nucléophile de l'H_2S sur les groupes carboxyle (figure A-12) est la formation des composés 2,4,6-triméthyl-S-trithiane (I) et 3,5-diméthyl-1,2,4-trithiolane (II). Des composés de type thiazine (III) peuvent aussi se former avec la participation d'ammonium libre (Belitz et Grosch, 1999).

De par leur réactivité, on pourrait donc s'attendre à ce que l'addition ou la génération *in situ* de composés thiol (cystéine) et/ou d'H_2S élargisse la gamme des composés produits par voie microbienne ou chimique.

III.3. LES COMPOSES SOUFRES VOLATILS DANS LE FROMAGE

Parmi les divers composés volatils ayant un impact sur l'arôme des fromages (tableau A-5), les composés soufrés volatils (CSV) sont habituellement reconnus comme les principaux responsables de l'arôme de fromage affiné, à l'exception des fromages de type bleu où les produits de la lipolyse sont considérés comme primordiaux.

Le méthanethiol et le méthional sont les CSV retrouvés couramment dans les fromages, l'H_2S n'étant présent que dans certains types de fromage. Ces composés sont à l'origine de plusieurs autres composés ayant des notes aromatiques distinctes. Leur présence et leur concentration dépendent du type de fromage considéré, mais tous résulteraient à la base de la dégradation des acides aminés soufrés, L-méthionine et L-cystéine, déjà abordés précédemment (section III.1et III.2).

III.3.1. Le méthanethiol et le méthional

Le méthanethiol (CH_3SH), principal produit de dégradation de la L-méthionine, est à l'origine d'autres composés qui possèdent des notes aromatiques diverses (tableau A-6). Il peut suivre des réactions d'oxydation pour former les polysulfures ou de réactions d'estérification pour former les S-méthylthioesters. Il est très volatil (point d'ébullition de 6,2°C) et sa concentration a été corrélée avec l'intensité de l'arôme du Cheddar (Manning et

col., 1979) et du Camembert (Kubickova et Grosch, 1998b). A faible concentration, le méthanethiol reflète bien l'arôme d'un fromage affiné (Sablé et Cottanceau, 1999), mais, à plus fortes concentrations, sa note aromatique devient putride ou fécale (Weimer et col., 1999). Mise à part la genèse de méthanethiol à partir de la méthionine, certains auteurs ont décrit d'autres voies potentielles. Ainsi, certains organismes seraient capables de produire le méthanethiol par une réaction de méthylation des sulfures (p. ex., H_2S) en présence de S-adénosylméthionine. Cette réaction serait catalysée par une méthyl-transférase, une enzyme largement répandue chez les bactéries et certains protozoaires (Drotar et col., 1987a, 1987b).

Tableau A-5. Composés volatils ayant un impact sur l'arôme des fromages (adapté de Fox et col., 2000c).

Fromage	Composés
Cheddar	Méthanethiol
Camembert	Méthanethiol, 2-nonanone, 2-nonanol, 1-octen-3-ol, 2-phényléthyl-acétate, 2-phenyléthanol, 2-heptanol, NH_3, N-isobutylacétamide, acides : isovalérique, isobutyrique, hydroxyphénylacétique.
Emmental	Méthional, 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone (furaneol), 5-éthyl-4-hydroxy-2-méthyl-3(2H)-furanone
Limburg	Méthanethiol
Fromage à croûte fleurie	Méthylthioesters
Livarot	Phénol, méta- et para-crésol, diméthyl disulfure, 2-nonanone, acétophénone, 2-phényletanol, 2-phényléthyl-acétate, indole, acides : isobutyrique, 3-méthylvalérique, isovalérique, benzoïque, phényleacétique
Munster	Diméthyl disulfure, acides : isobutyrique, 3-méthylvalérique, isovalérique, benzoïque, phénylacétique.
Trappist	H_2S, méthanethiol
Brie	Méthylcétones, divers composés soufrés, 1-octen-3-ol.
Fromages Bleu	2-Heptanone, 2-nonanone, méthylesters des acides C4, 6, 8, 10, 12 ; éthylesters des acides C1, 2, 4, 6, 8, 10.
Epoisses	2-phenyléthanol

Le méthional est un composé soufré retrouvé dans de nombreux fromages comme le camembert, le cheddar et le parmesan, où il peut être associé à des défauts d'arôme (Weimer et col., 1999 ; Kubickova et Grosch, 1998b ; Fox et Wallace, 1997). Le méthional possède

une note odorante caractéristique rappelant la pomme de terre cuite (Curioni et Bosset, 2002) et il est à l'origine d'autres composés volatils. Il peut être réduit en méthionol, ayant une note aromatique de chou-fleur, ou être oxydé en acide 3-méthylthiopropanoïque. Ce dernier, ayant une note aromatique de fromage (Cuer, 1982), contribue à l'arôme défectueux des vins oxydés (Anocibar-Beloqui et col., 1995 ; Escudero et col., 2000). Certains auteurs ont établi des corrélations entre les concentrations en méthional et en sulfures (disulfure de diméthyle et trisulfure de diméthyle) dans les boissons de type spiritueux (Prentice et col., 1998). Gijs et col. (2000) ont trouvé que dans la bière seulement 0,1% du trisulfure de diméthyle proviendrait du méthional, la formation initiale de méthanethiol à partir du méthional étant considérée comme le mécanisme le plus probable.

III.3.2. Les polysulfures

Les polysulfures constituent une famille de composés souvent rencontrés dans les fromages (Curioni et Bosset, 2002). Ils résultent généralement de l'oxydation du méthanethiol dans des conditions de haut potentiel d'oxydo-réduction (Aston et Dulley, 1982). De nombreuses études ont établi la forte corrélation existant entre la production de méthanethiol par des micro-organismes et les concentrations en disulfure de diméthyle (DMDS, CH_3-S-S-CH_3) et en trisulfure de diméthyle (DMTS, CH_3-S-S-S-CH_3), par exemple chez *G. candidum* (Bergère et col., 1999a). Ces deux composés ont des notes aromatiques de choux fleur, d'ail ou d'oignon (tableau A-6).

Différentes hypothèses ont été établies pour expliquer leur formation. Le disulfure de diméthyle peut se former directement par auto-oxydation du méthanethiol ou enzymatiquement grâce à l'action d'une lyase sur l'acide méthyle méthanethiosulfonique (Chin et Lindsay, 1994b). Le trisulfure de diméthyle peut résulter d'une réaction de l'acide méthanethiosulfique (issu de l'oxydation du méthanethiol) et du sulfure d'hydrogène. En présence d'acide ascorbique et de fer ferrique, le méthanethiol réagit avec le sulfure d'hydrogène pour donner le trisulfure de diméthyle. Cette réaction peut aussi s'effectuer en présence uniquement de peroxyde d'hydrogène (Chin et Lindsay, 1994a, 1994b). Nedjma et col. (1996) ont montré que cette réaction pouvait aussi s'effectuer à température ambiante en présence de cuivre II.

Tableau A-6. Note aromatique et seuil de perception des composés soufrés identifiés dans les fromages (adapté de Sablè et Cottenceau, 1999).

Composés	Note aromatique	Seuil de perception [a] (ppb)	Quantité dans le fromage (ppm)
Sulfure d'hydrogène	Soufré, œuf pourri	5 – 80 [b]	0,031-1,9
Méthanethiol	Chou cuit	0.06 - 2,0	0,031-2,3
Disulfure de diméthyle	Chou-fleur, oignon, fromage affiné	12 - 120	tr-+++ [c]
Sulfure de diméthyle	Chou bouilli, sulfureux	9 - 170	0,008-0,41
Trisulfure de diméthyle (2,3,4-tritiapentane)	Ail, fromage affiné	0,1 – 2,5	tr - +++
Tétrasulfure de diméthyle	Oignon, soufré, légumes cuits	0,2	tr
Méthyléthyl disulfure			tr - +++
2,4-dithiapentane	Oignon	60	tr
3-méthylthio-2,4-dithiapentane	--	--	tr
2,4,5-trithiahexane	--	--	tr
Diéthyl disulfure (3,4-dithiahexane)	Caoutchouc brulé	0,4-30	tr
Méthional (3-méthylthio propanaldéhyde)	Pomme de terre cuit	0,2	tr – 0,0125
Methionol (3-méthylthiopropanol)	Chou-fleur	1,2	Tr
Méthylthio propanoate	Fromage	100	tr
Méthylthio acétate	Chou-fleur cuit	5	tr - +++
Benzothiazole	quinoléine, caoutchouc	0,08	tr
Méthylthiobenzothiazole	--	--	tr
Thiophène-2-aldéhyde	--	--	tr

[a] déterminé dans l'eau ou le lait. ; [b] selon la matrice considérée (ppb) : dans l'air 30, dans l'eau 50, dans la bière 5-60, dans le vin 50-80 (Gijs et col., 2003) ; [c] tr, traces ; +++ abondant.

D'autres polysulfures ont été identifiés à faibles concentrations dans le fromage. Le 3,4-dithiahexane ou disulfure de diéthyle (DEDS, CH_3-CH_2-S-S-CH_2-CH_3) proviendrait de l'oxydation entre deux molécules d'éthanethiol, composé isolé dans le Cheddar (Dumont et col., 1976 ; Cuer, 1982). Ce dernier pourrait se former par réaction de substitution de l'H_2S sur l'éthanol. Un autre composé, le 2,4-dithiapentane, serait le produit de condensation de deux

molécules de méthanethiol avec une de formaldéhyde (Cuer, 1982 ; Desmazeaud et Adda, 1989). La présence dans le fromage de différents thiols et de sulfure d'hydrogène pourrait générer des polysulfures symétriques (DMDS, DMTS, DEDS) ou asymétriques tels que ceux identifiés dans des solutions modèle par Nedjma et col (1996).

Par ailleurs, le sulfure de diméthyle (fréquemment trouvé dans la bière à des concentrations de 5 à 90µg/L) possède une odeur très caractéristique de maïs, d'oignon ou de cassis (Gijs et col., 2003). Contrairement aux autres sulfures, la synthèse du sulfure de diméthyle (CH_3-S-CH_3) est probablement indépendante de celle du méthanethiol. Les travaux de De Mora et col. (1986) sur la dégradation de la cystéine marquée (^{35}S) ont montré que le sulfure de diméthyle pouvait provenir de la dégradation de la cystéine par *S. cerevisiae*. Dans cette étude, le méthanethiol n'a pas été détecté dans les produits de dégradation de la cystéine. Ces résultats ont été confirmés par les travaux menés par Demarigny et col. (2000) sur la dégradation de la méthionine deutérée par *G. candidum*. Ces essais ont montré que les extraits acellulaires sont capables de générer du disulfure de diméthyle marqué à partir de la méthionine marquée mais pas capable de produire du sulfure de diméthyle marqué. Par contre, les cellules entières produisent, à partir de méthionine marquée, à la fois du disulfure de diméthyle et du sulfure de diméthyle marqués. L'hypothèse d'une méthylation du méthanethiol (ou une double méthylation de l'H_2S) en sulfure de diméthyle par l'action d'une méthyle transférase a été soutenue par certains auteurs (Drotar et col., 1987a, 1987b). Néanmoins, les voies les plus consensuelles de formation du sulfure de diméthyle demeurent celles de la réduction du diméthyle sulfoxyde catalysée par une diméthyle sulfoxyde réductase (Bray et col., 2001) et de la dégradation de la S-méthylméthionine (Spinnler et col., 2001). L'intervention de la diméthyle sulfoxide réductase dans la formation de sulfure de diméthyle a été démontrée chez *S. cerevisiae*. En effet, l'inactivation du gène MXR1 qui code pour cette enzyme a conduit à la suppression de la réduction du diméthyle sulfoxyde en sulfure de diméthyle (Hansen, 1999). La réaction inverse a été observée chez certaines bactéries, telles que *Pseudomonas sp*., qui possèdent des oxygénases capables d'oxyder le sulfure de diméthyle en diméthyle sulfoxyde (Horinouchi et col. 1999). La dégradation de la S-méthylméthionine peut se faire spontanément à haute température ou via une réaction enzymatique catalysée par une S-méthylméthionine hydrolase. Cette enzyme a été mise en évidence chez les plantes et *Corynebacterium* sp. Cette réaction a été observée chez des levures d'affinage comme *D. hansenii* et *G. candidum* (Spinnler et col., 2001).

III.3.3. Les thioesters

Les thioesters (R-C(O)-S-R') sont des analogues des alkylesters (R-C(O)-O-R'): ils contiennent un soufre à la place d'un oxygène. Les S-méthylthioesters (par exemple, S-méthylthio-acétate, -propanoate, -butyrate, -isobutyrate et -isovalérate) sont dérivés de l'estérification d'un acide organique par le méthanethiol. Ils sont fréquemment trouvés dans plusieurs variétés de fromages (Urbach, 1997), spécialement dans les fromages à croûte fleurie (Berger et col., 1999b ; Khan et col., 1999 ; Sablé et Cottenceau, 1999 ; Lecanu et col., 2002). Ce sont des composés très odorants avec des notes de type fromage et chou-fleur cuit. Ils peuvent contribuer très largement à l'arôme du fromage étant donné leurs seuils de perception très bas, allant de 5 à 20 ppb (Sablé et Cottenceau, 1999). Par analogie aux alkylesters, les thioesters seraient formés par des voies semblables à celles aboutissant aux esters non soufrés, quelles soient enzymatiques ou chimiques (Lieu et col., 2004). Ainsi, on peut considérer que leur production dépendra du type de micro-organisme, des enzymes mis en place et de la disponibilité en réactants (thiols, acides gras, etc..).

Plusieurs souches de bactéries et de levures fromagères produisent des S-méthylthioesters. Par exemple, il a été démontré que les brévibactéries et les microcoques peuvent produire des S-méthylthioesters lors de leur croissance sur milieu complexe ou par bioconversion d'acides gras à chaîne courte (jusque six carbones) (Lamberet et col., 1997a, 1997b). De plus, les espèces d'*Arthrobacter* sp. et de *B. linens* sont les plus fortes productrices de S-méthylthioesters parmi les bactéries de surface des fromages (Bonnarme et col., 2001b). Parmi les levures, les souches de *G. candidum* sont celles que produisent les plus de S-méthylthioesters (Berger et col., 1999a). Cependant, la production de thioesters varie considérablement selon l'espèce considérée (Spinnler et col., 2001), mais également entre souches d'une même espèce (Berger et col., 1999a). Cette variabilité est vraisemblablement liée à leur capacité à produire du méthanethiol à partir de la méthionine.

Ainsi, les levures fromagères *G. candidum*, *K. lactis*, *D. hansenii* et *S. cerivisiae* sont incapables de produire du S-méthylthioacétate en absence de méthionine dans le milieu de culture (Spinnler et col., 2001). Walker et Simpson (1993) ont remarqué que l'ajout de méthanethiol favorisait la formation du S-méthylthioacétate par *S. cerevisiae*. Le potentiel élevé de *G. candidum* à produire des S-méthylthioesters, particulièrement du S-

méthylthioacétate, est attribué à sa capacité à produire de relativement grandes quantités de méthanethiol, le précurseur critique des S-méthylthioesters (Berger et col., 1999a ; Bonnarme et col., 2001a ; Spinnler et col., 2001). Par aillleurs, Arfi et col. (2002) ont démontré que le méthanethiol (généré à partir de la méthionine) est un facteur limitant pour la synthèse de S-méthylthioacétate chez *K. lactis.*

Le besoin en méthanethiol ou de son précurseur, la méthionine, pour la synthèse de S-méthylthioesters a été aussi démontré chez les bactéries. Par exemple, la production de S-méthylthioacétate par *Micrococcus* se fait exclusivement en présence de méthanethiol exogène ou d'une souche de *B. linens* productrice de méthanethiol (Cuer et col., 1979b).

En présence de méthanethiol, la synthèse de thioesters peut avoir lieu spontanément par voie chimique, et d'une manière plus efficace si les acides gras sont activés en acyl-CoA (Helinck et col., 2000). Cependant, dans le fromage, leur synthèse par voie enzymatique est leur principale voie de formation. Plus de 50% du S-méthylthioacétate synthétisé en présence de méthanethiol et d'acétyl CoA à pH 7 est attribué à l'activité de *G. candidum* (Helinck et col., 2000). Lamberet et col. (1997) ont montré que le pH optimal pour la biosynthèse de S-méthylthioesters dépendait du composé considéré mais qu'un même composé pouvait présenter des maxima à deux pH différents. Ceci a conduit à l'idée que la synthèse des thioesters pouvait être catalysée par plusieurs enzymes distinctes. Toutefois, les enzymes responsables de la synthèse des S-méthylthioesters n'ont pas encore été identifiées chez les micro-organismes fromagers.

Certains auteurs considèrent la possibilité qu'une enzyme de type thiol (ou méthanethiol) acyl-transférase soit impliquée dans la formation des thioesters (Walker et Simpson, 1993) en plus des lipases, estérases et acyl-transférases, amplement impliquées dans la formation des alkylesters (Liu et col., 2004). Cette enzyme, thiol acyl-transférase, serait semblable ou identique aux alcools acyl-transférases responsables de la formation des esters d'acétate chez les levures de brasserie et de vinification (Mason et Dufour, 2000). Les acyl-transférases sont des enzymes sulfhydriques qui catalysent le transfert d'acétyl-CoA (et probablement des acyl-CoA à chaîne carbonée plus longue) aux alcools en formant les esters. Leur activité est réduite dans de conditions d'aérobiose et par la présence d'acides gras, principalement insaturés (Mason et Dufour, 2000).

En plus de ces mécanismes, il a été démontré la possibilité de synthétiser des thioesters par des réactions de thio-estérification (acide carboxylique + thiol) ou thio-trans-estérification (ester + thiol) catalysées par des lipases fongiques immobilisées (Cavaille-Lefebvre et Combes, 1997 ; Caussette et col., 1997). Ces résultats suggèrent que les lipases peuvent jouer un rôle dans la biosynthèse des thioesters dans les matrices laitières, à condition que les précurseurs principaux, les thiols (par exemple, le méthanethiol) et les acides gras soient disponibles à des concentrations suffisantes et que l'activité de l'eau soit faible (Liu et col., 2004). En milieu aqueux, les lipases aussi bien que les estérases tendent plutôt à hydrolyser les esters qu'à les former (Liu et col., 2004).

En conclusion, la génération des S-méthylthioesters est contrôlée par la disponibilité des précurseurs, principalement les thiols (méthanethiol) et les acides gras, et les conditions physicochimiques (pH, température, activité de l'eau, potentiel d'oxydoréduction) du milieu fromager ou du milieu de culture liquide. La présence d'oxygène et d'autres composés chimiques risque de réduire la formation de thioesters, par la formation des produits alternatifs, pour exemple le DMDS et le DMTS (produits d'oxydation du méthanethiol) ou des alkylesters. De plus, la formation spontanée et la formation enzymatique des esters peuvent contribuer au développement de la flaveur des fromages, bien qu'il soit difficile de mesurer leurs contributions relatives.

III.3.4. Le sulfure d'hydrogène ou H_2S

L'H_2S est généralement considéré comme un sous-produit indésirable du métabolisme des micro-organismes dans les aliments à cause de sa forte odeur d'œuf pourri (tableau A-6). Des concentrations très faibles en H_2S peuvent être détectées en raison de son seuil de perception particulièrement bas, de 5 à 80 ppb selon la matrice (Gijs et col., 2003). Par contre, il n'y a pas de consensus sur la contribution de l'H_2S à l'arôme du fromage. Certains auteurs l'associent à l'arôme global du Cheddar, tandis que d'autres lui attribuent un simple rôle d'indicateur du maintien des activités enzymatiques dans le caillé (Urbach, 1995).

Par ailleurs, l'origine de l'H_2S dans le fromage pose de nombreuses questions. Bien qu'il soit admis que la cystéine soit le principal précurseur de l'H_2S, cet acide aminé n'est pas abondant dans le fromage. En effet, seulement deux résidus de cystéine font partie des caséines α_{S2} et la κ-caséine, mais ces deux fragments sont très faiblement dégradés pendant

l'affinage (voir section I.1.1). Toutefois, Kristoffersen et col. (1964) ont trouvé des corrélations entre la production d'H_2S et l'accumulation d'acide pyruvique dans le Cheddar, ce que correspondrait aux produits de dégradation de la cystéine. De ce fait, l'utilisation d'autres composés soufrés, comme la méthionine ou le glutathion (présents dans le lait ou apportés par les cultures microbiennes) comme source d'H_2S a été donc proposée (Urbach, 1995).

III.4. METHODES DE QUANTIFICATION DE L'H_2S

Un certain nombre de méthodologies analytiques sont disponibles pour quantifier l'H_2S dans différents types d'échantillons (EPA, 1993 ; Volkan et col., 1998 ; Lawrence et col. 2000 ; Duan et col., 2004). Dans le tableau A-7, les principales méthodologies sont répertoriées. Elles sont regroupées selon le type d'équipement utilisé pour réaliser l'analyse.

La méthode la plus classique, correspond à la quantification de l'H_2S par réaction avec de l'iode. Même si cette méthode est toujours utilisée pour sa simplicité, elle n'est pas très sélective dans le cas d'échantillons complexes.

Parmi les méthodes basées sur la détermination spectrophotométrique UV/Visible de l'H_2S, la méthode de synthèse du bleu de méthylène est la plus utilisée grâce à sa simplicité, sa sélectivité et sa sensibilité. Dans cette réaction (figure A-13), l'H_2S réagit d'abord avec l'aniline N,N-diméthylbenzene-1,4-diamine et forme un intermédiaire incolore. L'intermédiaire est ensuite oxydé, à l'aide d'ions ferriques, en un composé coloré : le bleu de méthylène. Cette méthodologie a été adaptée par divers auteurs aux besoins spécifiques des travaux de recherche (Fogo et Popowski, 1949 ; Jiranek et col., 1995 ; Lawrence et col., 2000 ; Fukamachi et col., 2002 ; Bowles et col., 2003).

Par réaction chimique, l'H_2S provoque la décoloration de certains composés colorés comme le magenta, la para rosaniline, la fenantroline, le cristal violet et le vert brillant. Cette propriété a été utilisée dans beaucoup d'autres méthodes spectrophotométriques ou adaptée à la CLHP (Lawrence et col., 2000).

Tableau A-7. Méthodologies générales pour la quantification de l'H_2S.

	Méthodologie	Limite de détection (ppb)	Concentration maximale quantifiable (ppb)	Références
1	Classique (iode)	200	400	Pawlak et col., (1999)
2	Spectrophotométrique	0,1	2000	Kuban et col., (1992) ; Shanthi et Balasubramanian, (1996)
3	Cinétique par spectrophotométrie	0,015	6000	Safavi et Ramezani, (1997)
4	Fluorescence	1,7	640	Choi et Hawkins, (1997)
5	Potentiométrique	1,92	320 ppm	Ma et col., (1994) ; Tse et col., (1994)
6	Chromatographie d'échange d'ions	0,14	50	Miura et col., (1998) ; van Staden et Kluever, (1998)
7	Chromatographie capillaire	0,5	19	Font et col., (1996) ; Saloman et Romano, (1992)
8	CPG	$6,4x10^{-4}$	0,004	Radford-Knoery et Cutter, (1993)
9	CLHP	0,32	96	Ogasawara et col., (1991)
10	Papier imprégné de plomb	0,11 ppm	1,1 ppm	EPA (1993)
11	Papier imprégné d'argent	0,05 ppm	10 ppm	Duan et col., (2004)
12	Tubes en silice + cadmium	0,08 ppm	1,3 ppm	Volkan et col., (1998)

* Les limites de détection des méthodologies 1-9 correspondent aux maxima / minima de plusieurs variantes de chaque méthodologie.

L'identification et la quantification de l'H_2S par précipitation avec des métaux a été utilisée depuis très longtemps. La sensibilité et la sélectivité de cette méthode varient selon le métal et le support utilisés. Ainsi, les bandes de papier imprégnées de plomb subissent une décoloration si elles entrent en contact avec des composés à caractère oxydant (courant d'air par exemple) (EPA, 1993). Par ailleurs, l'utilisation d'argent demande de prendre beaucoup de précautions : protection / la lumière et lecture instantannée des résultats car les précipités de AgS sont très instables (Duan et col., 2004). Si la formation de sulfure de cadmium est assez

stable, elle demande l'utilisation d'une lumière UV et d'un détecteur à fluorescence pour mesurer le signal fluorescent produit par le sulfure (Volkan et col., 1998).

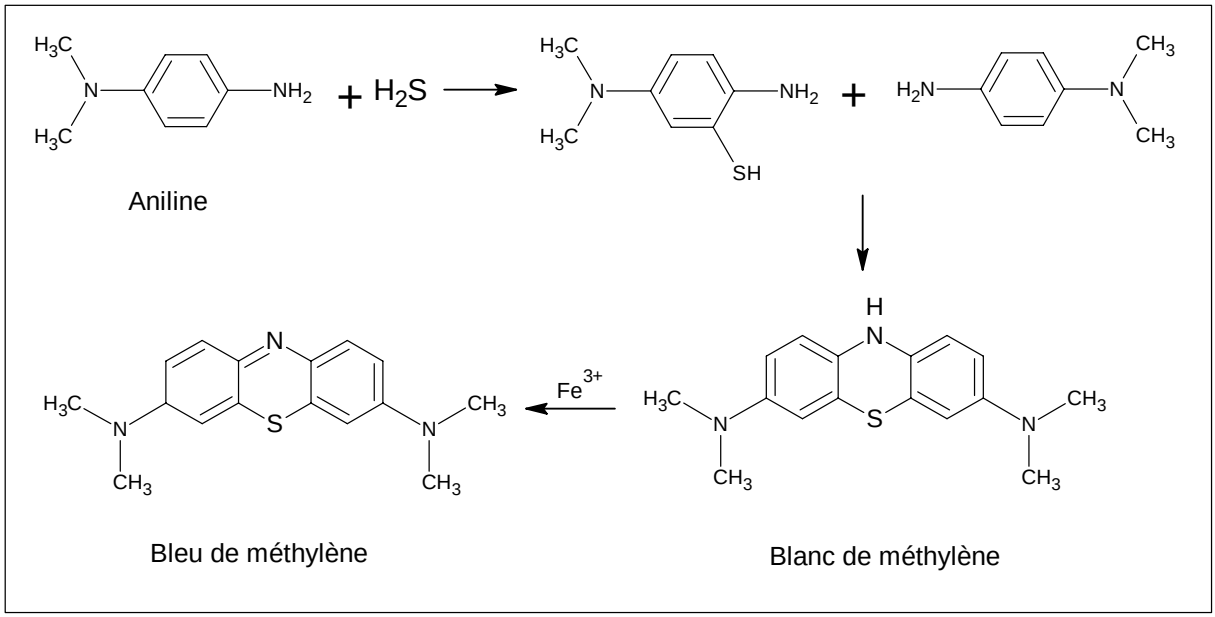


Figure A-13. Quantification du sulfure d'hydrogène (H_2S) par la réaction de synthèse du bleu de méthylène (Fogo et Popowski, 1949). L'H_2S réagit avec deux molécules d'aniline (N,N-diméthylbenzene-1,4-diamine) et forme un intermédiaire incolore (blanc de méthylène). Celui-ci est alors oxydé par le Fe^{3+} et forme ainsi le Bleu de méthylène.

Les possibilités de séparation des techniques chromatographiques sont évidemment un avantage significatif lorsque l'analyse est appliquée à des milieux complexes. Une bonne séparation entre les anions du soufre, les différentes espèces de thiols et les autres composés de l'échantillon peut être couplée à l'utilisation de différents détecteurs (de conductivité, photométriques de flamme et fluorimétriques) (Lawrence et col., 2000), ce qui améliore encore les performances de ces techniques de détection/quantification de l'H_2S.

De toute évidence, on peut considérer que la décision d'utiliser l'une ou l'autre des méthodologies disponibles pour la quantification de l'H_2S dépendra, entre autres, de l'origine de l'échantillon, sa composition, la quantité à analyser et la disponibilité des équipements exigés.

IV. LA FLORE D'AFFINAGE DES FROMAGES A PATE MOLLE

IV.1. LES LEVURES

Diverses espèces de levures sont retrouvées fréquemment dans les produits laitiers où elles sont responsables des changements biochimiques souhaitables ou non (Eliskases-Lechner, 1995a). Elles sont souvent retrouvées dans le fromage où leur principale contribution est l'utilisation de l'acide lactique, ce qui permet la désacidification du caillé et donc la croissance, dans une deuxième étape, des bactéries d'affinage acido-sensibles (Corsetti et col., 2001 ; Rhom et col., 1992).

La présence des levures dans le fromage peut être attribuée à leur capacité à assimiler/fermenter le lactose, assimiler les acides organiques comme l'acide succinique, lactique et citrique, leurs activités protéolytiques et lipolytiques, et leur résistance à des concentrations élevées en sel (Fleet, 1990 ; Jakobsen et Narvhus, 1996 ; Ferreira et Viljoen, 2003).

Les levures ont aussi la capacité de se développer à basses températures et tolérer des basses valeurs de pH et d'activité de l'eau (Wyder et Puhan, 1999). En outre, elles peuvent restreindre l'implantation de micro-organismes indésirables (Kaminarides et Laskos, 1992) et excréter des facteurs de croissance comme les vitamines-B, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique, la riboflavine et la biotine (Lenoir, 1984 ; Fleet, 1990 ; Jakobsen et Narvhus, 1996). Quelques espèces de levures jouent un rôle important dans la formation des précurseurs d'arôme (tels que des acides aminés, des acides gras et des esters) en raison des leurs activités protéolytiques et lipolytiques (Lenoir, 1984).

IV.1.1. *Le genre Debaryomyces*

Le genre *Debaryomyces* appartient à la classe des *Ascomycètes*, sous classe des *Hémiascomycètes*. L'espèce *Debaryomyces hansenii* est un de quatre taxons qui forment ce genre (Lepingle et col. 2000). *D. hansenii*, et sa forme anamorphe *Candida famata* (Barnett et col. 1983), est une levure d'origine marine ce qui lui confère ses propriétés de cryotolérance et d'halotolérance (jusqu'à de niveaux de salinité de 12-15% (Gueguen et Schmidt, 1992)). Cependant, la combinaison d'une basse température et d'une concentration élevée en cations

Na^+ et K^+ est défavorable à sa croissance (Almagro et col., 2000). *D. hansenii* est une espèce acidophile pouvant croître à un pH compris entre 3 et 7 (Prapahilong et Fleet, 1997). C'est une levure aérobie stricte présentant un métabolisme exclusivement oxydatif. Cependant, l'aptitude de cette levure à fermenter le glucose a été observée (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995b ; Rohm et col., 1992). Les tests de fermentation du lactose sont négatifs pour de nombreuses souches isolées du fromage, tandis que l'assimilation de lactose et du lactate est variable (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995b ; Roostita et Fleet, 1996b). En outre, l'assimilation du lactose et du galactose par certaines souches de *D. hansenii* est inhibée par des taux de sel supérieurs à 4% et 12% respectivement (van den Tempel et Jakobsen, 2000). En revanche, la dégradation du lactate n'est pas affectée par le taux de sel, jusqu'à un taux de 14% (van den Tempel et Jakobsen, 2000). Cette espèce assimile le citrate et le glycérol (Roostita et Fleet, 1996a; van den Tempel et Jakobsen, 2000).

IV.1.2. Le genre Geotrichum

Le genre *Geotrichum* comprend 24 espèces dont *G. candidum* (forme anamorphe ou imparfaite) et sa forme téléomorphe (ou parfaite) *Galactomyces geotrichum* (Gueguen et Schmidt, 1992). *G. candidum* est présent dans de nombreux habitats. Elle a été isolée de produits laitiers, et notamment les fromages (Bartschi et col., 1994 ; Rohm et col.,1992). De façon générale, *G. candidum* catabolise de nombreux hydrates de carbone presque exclusivement par voie oxydative, parmi lesquels le galactose, le glucose, le fructose, le lactate, et selon les souches, le glycérol et l'amidon ; mais elle n'assimile pas le saccharose et le lactose (Soulignac, 1995 ; Gueguen et Schmidt, 1992). Cette espèce utilise de préférence l'azote organique et les sulfates. Elle désamine la tryptophane, la leucine, la méthionine et la phénylalanine (Choisy et col., 1997b) ; elle peut aussi utiliser les acide aminés et les peptones comme source d'énergie et de carbone (Aldarf et col., 2002). Comme toutes les levures, *G. candidum* a un pH optimal de développement compris entre 5 et 6 mais elle peut tolérer de très grandes variations de pH (de 3 à 10). *G. candidum* est l'un des micro-organismes d'affinage les plus sensibles au sel. Sa croissance diminue brutalement dès que la concentration en sel atteint 1-2% et lorsqu'elle atteint 5-6%, sa croissance est totalement inhibée (Gueguen et Schmidt, 1992).

IV.1.3. Le genre Kluyveromyces

Le genre *Kluyveromyces* appartient à la classe des *Ascomycètes*, sous-classe des *Hémyascomycètes* et à l'ordre des *Endomycétales*. *Kluveromyces lactis* a connu diverses dénominations. D'abord, elle a été nommée *Saccharomyces lactis* en raison de sa similitude morphologique avec *S. cerevisiae*, puis *K. fragilis var lactis* avant d'être classée comme espèce indépendante (Bolotin-Fukuhara et col., 2000 ; Schaffrath et Breunig, 2000, Barnett et col. 1983). *K. lactis* est souvent isolée des produits laitiers. Elle possède un génome de 12 Mb (millions de paires de bases), qui comprend six chromosomes. Elle est capable d'assimiler diverses sources de carbone, principalement le lactose (Schaffrath et Breunig, 2000). Le système d'assimilation du lactose est induit par la présence de ce substrat dans le milieu de culture, ou du galactose, produit de dégradation du lactose (Bolotin-Fukuhara et col., 2000). *K. lactis* est une levure aérobie facultative et peut fermenter le lactose en éthanol. Cependant, seulement 30% du glucose est fermentée en présence d'oxygène contre 70% assimilé via le cycle de Krebs (Soulignac, 1995). Ceci permet de classer la majorité des espèces appartenant au genre *Kluyveromyces* parmi les levures de type respiratoire, à l'exception de *K. marxianus* qui appartient aux levures de type fermentaire c'est-à-dire dégradant majoritairement le glucose par voie fermentaire en condition d'aérobiose (le cas typique étant celui de *S. cerevisiae*). Les bases génétiques de la régulation du métabolisme respiro-fermentaire chez K. lactis a fait l'objet de nombreuse revues bibliographiques très complètes (Gonzales-Siso et col., 2000 ; Schaffrath et Breunig, 2000 ; Breunig et col., 2000)

IV.1.4. Le genre Saccharomyces

Le principal représentant du genre *Saccharomyces* est *S. cerevisiae* (Barnett et col., 1983). Cette levure est utilisée dans l'élaboration du vin et de la bière où elle est responsable de la fermentation des hydrates de carbone en alcool (Fleet, 2003). *S. cerevisiae* a été aussi identifiée dans différents types de fromage dont le camembert, le gouda, le cheddar, la mozzarella, la feta et le parmesan (Romano et col., 1989, 2001 ; Viljoen et Greyling, 1995 ; Roostita et Fleet, 1996a ; Suzzi et col., 2000). *Saccharomyces cerevisiae* peut fermenter le glucose, le galactose, le saccharose et le maltose. Cependant, cette levure n'assimile pas le lactose, le tréhalose, le mannitol, l'acide citrique et le lactate (Hansen et Jakobsen, 2001, Roostita et Fleet, 1996). Sa croissance rapide dans le lait semble être associée à sa capacité à utiliser les acides aminés comme source de carbone et d'azote. Dans ces conditions, *S.*

cerevisiae produit des quantités réduites d'éthanol, d'acide lactique et de glycérol (Roostita et Fleet, 1996b, Neviani et col., 2001). Finalement, *S. cerevisiae* est faiblement tolérante à de fortes concentrations en sel (> 2%), mais l'adaptation de souches retrouvées dans les fromages ayant des concentrations en sel élevées (>4%) ne peut pas être exclue (Hansen et Jakobsen, 2001).

Bien que *S. cerevisiae* ait été identifiée dans le fromage, peut d'attention a été donnée à sa possible contribution à l'affinage. Au même titre que d'autres levures, il est probable que *S. cerevisiae* participe au développement d'autres micro-organismes dans le fromage en fournissant des facteurs de croissance, tels que les acides aminés et les vitamines (Viljoen, 2001), ou en exerçant une activité protéolytique accrue (Hansen et Jakobsen, 1998; Hansen et col., 2001). Dans le cas de *S. cerevisiae*, la production de protéases extra-cellulaires n'a pas été clairement établie (Ogrydziak, 1993). Certains auteurs considèrent plutôt que l'activité protéolytique extra-cellulaire est provoquée par des enzymes intracellulaires libérées après lyse cellulaire (Rosi et Costamagna, 1987). Le système protéolytique intracellulaire de *S. cerevisiae* est assez complexe et inclut des caboxypeptidases, des endopeptidases, des aminopeptidases et des aspartylprotéases (Jones, 1991 ; Meussdoerffer et col., 1980 ; Slaughter et Nomura, 1992).

IV.1.5. Le genre Yarrowia

Yarrowia lipolytica, anciennement dénommée *Candida* ou *Saccharomyces lipolytica* (Barnett et col., 1983), peut être isolée à partir de plusieurs sources (maïs, salades, viande) et également de produits laitiers. *Y. lipolytica* est une levure aérobie stricte que peut utiliser le glucose, le lactate, le citrate, le succinate, l'acétate, des alcools et plusieurs substrats hydrophobes (acides gras et alcanes) comme source de carbone. Cependant, elle ne peut pas utiliser le saccharose, le lactose, le galactose ou l'amidon, (Kreger-van Rij, 1984). La capacité de *Y. lipolytica* à se développer en utilisant des acides gras et des alcanes a été très largement exploitée en industrie (Waché et col., 2003). *Y. lipolytica* ne produit pas d'éthanol mais elle peut l'utiliser comme source de carbone, à des concentrations inférieures à 3%. Elle utilise alors plusieurs alcools déshydrogénases dépendantes de NAD^+ ou $NADP^+$ (Barth et Gaillardin, 1997).

Y. lipolytica a été isolée des plusieurs variétés de fromage, principalement de camembert, de gouda et de fromages de type bleu. Les activités biochimiques de *Y. lipolytica* peuvent jouer un rôle important dans les caractéristiques organoleptiques de ces fromages, grâce à la production de composés d'arôme et/ou de leurs précurseurs tels que les cétones, les alcools, les lactones et les esters méthyliques (Viljoen et Greyling, 1995 ; Roostita et Flet, 1996a ; Corsetti et col., 2001). D'ailleurs, la capacité de *Y. lipolytica* a être dominante par rapport à d'autres levures naturelles et sa compatibilité avec des bactéries de surface ont été démontrées (van den Tempel et Jakobsen, 2000 ; Addis et col., 2001). Cette capacité serait due à ses activités enzymatiques extracellulaires. En effet, *Y. lipolytica* sécrète plusieurs enzymes : une protéase alcaline (pH 6,8), une protéase acide (pH 4,0), des phosphatases acides, des estérases et des lipases.

La régulation des protéases et des phosphatases est assez complexe et elles reflètent, entre autres, les niveaux de carbone, d'azote, de soufre, de phosphate et la valeur de pH de la cellule (Barth et Gaillardin, 1997). Parmi ces nombreuses enzymes, les lipases de *Y. lipolytica* ont été les plus étudiées. Elles sont actives sur les résidus 1 et 3 des triglycérides ; elles sont activées et stabilisées par l'acide oléique mais elles sont réprimées par le glucose. De plus, l'activité des lipases est souche-dépendante et est influencée par le contenu en sel, en lipides, en lactate et le pH du milieu (Suzzi et col., 2001 ; Guerzoni et col., 2001).

IV.2. LES BACTERIES

La surface du fromage est dominée, vers la fin de l'affinage, par diverses espèces de bactéries, comprenant principalement les genres *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* et *Corynebacterium* (Corsetti et Gobetti, 2001). Ces genres représentent une part importante de la flore de surface de divers types de fromage à pâte molle, à croûte lavée ou à croûte fleurie, et à pâte pressée à croûte morgée. Ils dominent à la surface des fromages grâce à leur caractère aérobie, à leur résistance au sel et à leur croissance à basse température (10-12°C). Cependant, ces bactéries sont en général acido-sensibles et elles se développent donc tardivement, lorsque le pH de surface est supérieur à 5,5 (Choisy et col., 1997b).

IV.2.1. Le genre Arthrobacter

Ce genre classé actuellement dans la famille des *Micrococcaceae* comprend des bactéries aérobies strictes, catalase positif, parfois mobiles, au métabolisme respiratoire (jamais fermentaire) et capables de se développer à de basses températures et à de fortes concentrations en sel. Ce genre est phénotypiquement hétérogène et inclut plus de 35 espèces (Irlinger et col., 2005). Ces bactéries saprophytes sont très répandues dans le sol (agent minéralisant, dégradation des herbicides et pesticides) et dans l'environnement (Jones et Keddie, 1981). Les souches d'origine fromagère utilisent des acides aminés comme source d'azote et certaines souches peuvent aussi les utiliser comme source de carbone. En surface de fromages, pour exemple le Tilsit ou le Munster, l'espèce *A. nicotianae* représenterait environ 30% des bactéries autres que *B. linens*. Leurs activités protéolytiques et aminopeptidasique sont souche dépendantes (Choisy et col., 1997b).

Etant donné la grande similitude entre les genres *Arthrobacter* et *Brevibacterium,* la correcte assignation des souches à un de ces deux groupes a été difficile et dans certains cas erroné. Il est possible que l'utilisation des nouvelles techniques d'analyse génomique basées sur le rRNA et DNA (pour exemple, la RT-PCR-SSCP, retrotranscription-PCR-single-strand conformation polymorphism) peut permettre une meilleure identification et classification des souches retrouvées dans le fromage (Bonaïti et col., 2006 ; Irlinger et col., 2005 ; Mounier et col., 2005).

IV.2.2. Le genre Brevibacterium

Les bactéries du genre *Brevibacterium* appartiennent au groupe des bactéries corynéformes, dont les genres *Corynebacterium*, *Caseobacter*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Aureobacterium* et *Brevibacterium* sont des micro-organismes d'intérêt laitier (Bergère et Tourneur, 1992). Elles font partie de la classe des *Actinobacteria*, sous-classe des *Actinobacteridae*, ordre des *Actinomycetales*. Elles sont divisées en deux sous-ordres *Micrococcineae* et *Actinobacteridae* (Stackebrandt et col., 1997). Les bactéries du genre *Brevibacterium* sont présentes dans de nombreux habitats, et particulièrement dans des lieux à haute concentration en sel tels que la surface des fromages (Collins, 1981). *Brevibacterium linens,* l'espèce type de ce genre, peut se développer pour des concentrations en sel allant de 8% à 15% (Reps, 1987). Elle possède une couleur orangée ou beige orangée due à des pigments caroténoïdes uniques chez les bactéries corynéformes, et elle se colore en rouge à

pH basique (test à la soude ou à la potasse). Cette caractéristique mise à part, *B. linens* est très proche des *Arthrobacter* (Fiedler et col., 1981). *B. linens* est très fréquente à la surface des fromages à pâte molle et croûte lavée où il peut représenter jusqu'à 30% de la flore totale (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995a).

De façon générale, *B. linens* se présente sous forme de bâtonnets pendant les stades jeunes et se transforme en coques simples ou en paire aux stades avancés (3 à 7 jours de culture). Cette bactérie est aérobie stricte, catalase positive, non mobile et ne forme pas d'endospore (Rattray et Fox, 1999). *B. linens* produit peu ou pas d'acide à partir du glucose ; elle est aussi acido-sensible et ne peut se développer qu'à un pH supérieur à 5,8. Elle peut utiliser l'acétate, le lactate, le glucose et le galactose comme source de carbone alors que le saccharose et le lactose sont peu utilisés et le citrate et l'amidon non utilisés (Boyaval et Desmazeaud, 1983).

B. linens est aussi capable d'utiliser les acides aminés comme source d'azote et de carbone. Cependant, en présence d'acide lactique, les acides aminés ne sont métabolisés qu'après épuisement de celui-ci (Moreau et col., 1998). L'ammoniaque est une source d'azote consommée préférentiellement par rapport aux acides aminés et c'est sa disparition qui accélère la consommation de ces derniers (Moreau et col., 1998 ; Famelart et col., 1987a). Les acides aminés phénylalanine, tyrosine, arginine, proline, acide glutamique, et histidine constituent des facteurs limitant à la croissance de *B. linens* (Famelart et col., 1987a).

Outre sa participation à l'affinage des fromages, *B. linens* présente une action inhibitrice sur la croissance des moisissures et de nombreux germes Gram-positifs ou négatifs, potentiellement responsables d'intoxications alimentaires. Elle serait également capable de dégrader certains pesticides sur le fromage (Rattray et Fox, 1999).

IV.2.3. Le genre Corynebacterium

Les espèces de *Corynebacterium* sont aérobies ou anaérobies facultatives, Gram-positives et présentent fréquemment des granules métachromatiques. Certaines espèces possèdent une pilosité mais pas de flagelle. Le genre *Corynebacterium* est l'un des plus étudié chez les bactéries corynéformes. Ce genre fait partie de la famille des *Corynebacteriaceae* qui appartient au sous-ordre des *Corynebacterineae* (Stackebrandt, 1997). Ces bactéries sont largement rencontrées dans la nature puisqu'on les trouve dans le sol, les produits laitiers, les

plantes et fréquemment chez l'homme et les animaux. Les espèces utilisées dans l'industrie servent à la production d'acides aminés et de nucléotides par fermentation. Elles comprennent les espèces suivantes : *C. flavescens*, *C. glutamicum*, *C. amycolatum*, *C. ammoniagenes* et *C. variabilis*. Il semblerait que ces mêmes espèces soient présentes en surface des fromages et y assurent un rôle non négligeable lors de l'affinage.

IV.2.4. Le genre Microbacterium

Comme chez les *Brevibacterium*, les bactéries de ce genre montrent un cycle morphologique de croissance bâtonnet/coque qui est toutefois moins marqué. Ces sont des bactéries aérobies strictes, Gram-positives et catalase-positives. La plupart de ces espèces ont été isolées d'habitats variés : eaux usées, produits laitiers, sol, végétaux ou insectes. Les espèces *M. lacticum* et *M. liquefaciens*, pigmentées respectivement en jaune blanc et jaune brillant, ont été trouvées dans le lait, les fromages et d'autres produits laitiers (Jones et Collins, 1986).

IV.2.5. Le genre Staphylococcus

Pendant longtemps, les staphylocoques ont été associés, d'un point de vue taxonomique, aux microcoques. A partir de 1997, la nouvelle classification hiérarchique de la classe des *Actinobacteria* par Stackebrant et col., (1997), redéfinit la famille des *Micrococcaceae*, dont le genre *Staphylococcus* ne fait plus partie. Ce genre appartient désormais à la sous-branche des *Clostridium-Bacillus* qui comprend toutes les espèces à Gram-positif dont l'ADN présente un G+C % inférieur à 55. Certaines espèces, productrices de coagulase et/ou d'entérotoxines, sont potentiellement pathogènes (ex. *Staphylococcus aureus*). Par contre, les espèces à coagulase-négative ne sont pas pathogènes ou alors uniquement de façon opportuniste, et ce sont ces bacteries que l'on retrouve le plus fréquemment dans les écosystèmes fromagers.

Staphylococcus equorum, *Staphylococcus vitulinus* et *Staphylococcus xylosus* sont les espèces les plus fréquemment rétrouvées sur les fromages à croûte lavée (Irlinger et col., 1997 ; Hoppe-Seyler et col., 2004). Bien que la répartition des espèces soit fonction du type de fromage considéré, il est toutefois admis que ces staphylocoques à coagulase- négative

sont principalement rencontrés en debut d'affinage et en très petit nombre en comparaison aux bactéries corynéformes (Brennan et col., 2002). Ainsi, dans le Tilsit, l'ensemble des souches de staphylocoques isolées représente entre 5 et 15 % de la microflore présente (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001) et seulement 2,5 % dans le Gubbeen (Brennan et col., 2002).

B. Matériels et Méthodes

V. MATERIEL MICROBIOLOGIQUE

V.1. COLLECTION DE SOUCHES UTILISEES

Trente-sept souches, de levures et de bactéries ont été étudiées pendant la première partie de cette étude (tableau B-1). Elles ont été isolées des fromages ou proviennent d'autres collections de micro-organismes. Actuellement, elles sont répertoriées et conservées dans la collection de l'UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR-GMPA, INRA, Thiverval-Grignon).

Les souches de levures étudiées appartiennent aux genres *Debaryomyces* (3), *Kluyveromyces* (5), *Geotrichum* (5), *Saccharomyces* (2) et *Yarrowia* (5) ; tandis que les souches de bactéries appartiennent aux genres *Arthrobacter* (4), *Brevibacterium* (6), *Corynebacterium* (4), *Micrococcus* (1) et *Staphylococcus* (2).

Elles ont été préalablement retenues en se basant sur leurs bonnes aptitudes technologiques dans le contexte fromager (bonne implantation, désacidification, aromatisation, etc…).

V.1.1. Conservation des souches

Les souches issues de la collection, conservées dans de l'azote liquide, sont ensemencées sur milieu gélosé spécifique : YEGC pour les levures, TSYE pour les bactéries. Après une culture de 3 jours à 25°C, une colonie est prélevée puis utilisée pour réaliser une culture en milieu liquide (bouillon de pomme de terre et glucose (PDB) pour les levures ou bouillon de cerveau-cœur (BHI)) pour les bactéries. Après 48h d'incubation à 25°C, les cultures sont aliquotées dans des cryotubes (2mL) après mélange volume à volume avec du lait glycérolé à 10%. Elles sont conservées à -80°C.

V.1.2. Pureté des cultures

Des tests sont réalisés régulièrement à plusieurs niveaux (cryotubes, pré-cultures, cultures) afin d'en assurer la pureté. Les tests sur boîtes de Pétri sont ainsi conduits sur milieux YEGC et BHI contenant respectivement un antibactérien, le chloramphénicol, et un antifongique, l'amphotéricine. La culture à tester est ainsi étalée sur le milieu gélosé adapté,

puis incubée pendant au moins 48h à 25°C. Les colonies isolées sont ensuite comparées aux colonies obtenues de la collection.

Tableau B-1. Souches de levures et de bactéries criblées pour la production d'H_2S[1].

Type de microorganisme	Genre- espèce	Souches	Total de souches criblées
Levures	*Debaryomyces hansenii*	47(8), 142, 304	3
	Geotrichum candidum	UCMA108[a], UCMA103[a], UCMA77[a], D, G[e]	5
	Kluyveromyces lactis	44(8), CLIB640[b], CLIB643[b], C15, C22	5
	Saccharomyces cerevisiae	SC42, SC45(3)	2
	Yarrowia lypolytica	200, 274, 370, 136463[b], W29[b],	5
Bactéries	*Arthrobacter spp*	7(2), 225	2
	Arthrobacter arilaitensis	269, 175[c]	2
	Brevibacterium linens	CNRZ918[c], 1939[d], ATCC9175[d], C308, C206, C212	6
	Corynebacterium spp	C45, C55, C74	3
	Corynebacterium glutamicum	D13	1
	Micrococcus luteus	790	1
	Staphylococcus equorum	1265	1
	Staphylococcus xylosus	J870[c]	1
	Total des souches criblées		37

a) LMA: Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Caen, France.
b) CLIB: "Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique", Unité de Microbiologie et génétique moléculaire (INRA-CNRS-INA PG), Grignon, France.
c) CNRZ: Centre National de Recherche en Zootechnie, Collection de bactéries d'intérêt technologique, INRA Jouy en Josas, France.
d) ATCC: American Type Culture Collection, LGC Promochem Sarl, Molsheim, France.
e) Souche commerciale (Degussa, La Ferté-sous-Jouarre, France).

[1] Vers la fin de ce travail les souches d'*Arthrobacter* spp 7(2) et *B. linens* ATCC9175 ont été reclassifiées comme *Microbacterium* spp et *Brevibacterium aurantiacum* respectivement. Nous avons toutefois conservé l'ancienne clasification dans ce document

VI. CONDITION DE CULTURE DES MICRO-ORGANISMES

VI.1. PRE-CULTURES EN MILIEU COMPLEXE

Les pré-cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 20 ml de milieu PDB pour les levures ou BHI pour les bactéries, après ensemencement à 1% (v/v) par la culture cryoprotégée et conservée à -80°C. Les milieux inoculés sont alors incubés pendant 48h à 25°C et 150 rpm.

VI.2. ETUDE I. CRIBLAGE DES SOUCHES POUR LA PRODUCTION DE SULFURE D'HYDROGENE (H_2S)

Vingt souches de levures et dix-sept de bactéries (tableau B-1) ont été criblées pour leur capacité à produire du sulfure d'hydrogène (H_2S) à partir de la L-cystéine. Etant donné la forte volatilité et la perte potentielle d'H_2S, nous avons mis au point un nouveau système fermé (flacons de culture cellulaire) afin de piéger l'H_2S sans perte et pouvoir quantifier précisément sa production.

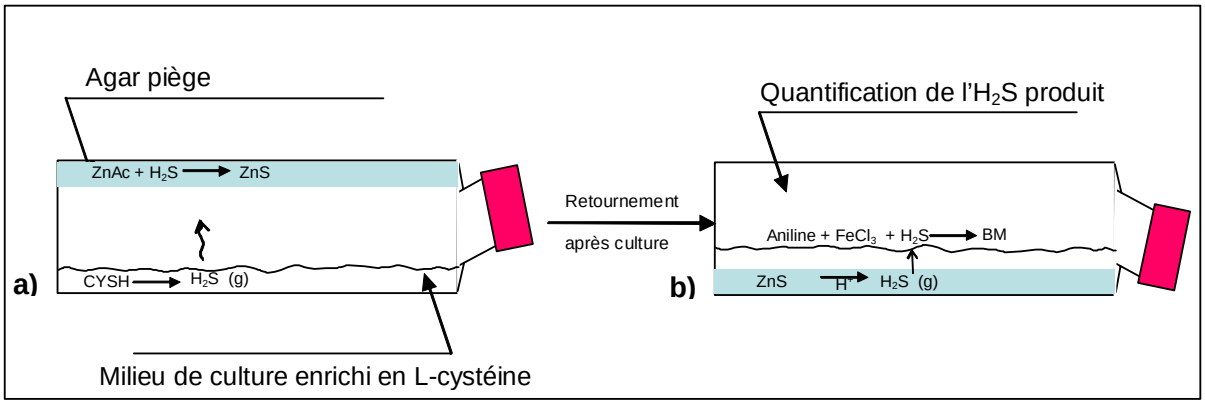


Figure B-1. Système de piégeage de l'H_2S mis au point pour le criblage de souches. (a) L'H_2S généré à partir de la cystéine (CYSH) est piégé dans une couche d'agar contenant de l'acétate de zinc (ZnAc) et NaOH. (b) Le milieu est récupéré après culture et l'H_2S quantifié directement dans le flacon par la réaction de synthèse du bleu de méthylène (BM).

Les flacons piège contenant 5 ml de milieu de culture PDB ou BHI enrichis en L-cystéine à 1,0 g/l sont ensemencés avec 4% (v/v) de pré-culture. Ils sont ensuite mis à incuber pendant 48 heures à 25°C et 90 rpm. En fin de culture, les milieux liquides sont retirés et échantillonnés pour procéder aux différentes analyses. La quantification de l'H_2S généré est réalisée directement dans les flacons piège en adaptant la réaction de synthèse du Bleu de méthylène décrite par Fogo et Popowski (1949) (voir section III.4).

VI.2.1. Préparation des flacons piège pour l'H_2S

Des flacons de culture cellulaire d'un volume de 50 ml (Greiner Bio-one) sont remplis avec une couche d'agar-zinc (figure B.1), qui piègera l'H_2S produit par la culture. L'agar-zinc (table B-2) est préparé en ajoutant stérilement à un volume de 100 ml d'agar 1% (p/v), préalablement stérilisé par autoclavage, 20 ml d'acétate de zinc 1% (p/v) et 5 ml d'hydroxyde de sodium NaOH 12% (p/v). Le tout est alors mélangé doucement. Ces deux solutions sont stérilisés séparément par filtration sur de filtres 0,2µm (Whatman). Ensuite, 5 ml du mélange agar-zinc sont introduits dans chaque flacon de culture cellulaire avant leur prise en masse (température moyenne de 40-45° C pour éviter la condensation sur les parois du flacon). Après solidification de l'agar, les flacons sont retournés et les milieux de cultures peuvent alors être ajoutés. Ainsi, l'agar-zinc a une fonction de piège d'H_2S en adhérant au flacon de culture cellulaire au-dessus du milieu de culture.

Tableau B-2. Composition de l'agar "piége" utilisé pour le criblage des souches. Les solutions sont préparées séparément. L'agar est stérilisé par autoclavage et les solutions de zinc et NaOH par filtration (filtre de 0,2 µm de diamètre de pore).

Réactifs	Volume (ml)	Concentration finale (%)
Agar 1% (p/v)	100,0	0,80
Acétate de zinc 1% (p/v)	20,0	0,16
Hydroxyde de sodium 12%	5,0	0,48
Volume total	125,0	

VI.3. ETUDE II : EFFET DE LA CYSTEINE SUR LA PRODUCTION DE CSV

Afin de déterminer l'influence de la cystéine sur la production de CSVs, les meilleures souches productrices d'H_2S, (levures ou bactéries), ont été cultivées en présence de différentes concentrations de L-cystéine et/ou de L-méthionine.

Des cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu PDB (levures) ou BHI (bactéries) enrichis en différentes concentrations de L-cystéine et de L-méthionine : sans enrichissement, enrichis en L-cystéine (1,0 g/l) ou en L-méthionine (1,0 g/l), enrichis en L-cystéine (0,2 ou 1,0 g/l) et L-méthionine (1,0 g/l) (tableau B-3). Les erlenmeyers sont ensemencés avec 1% des pré-cultures et cultivés pendant 48h à 25°C et 150 rpm. Des prélèvements sont réalisés à 5°C. Ils sont conservés à -80°C jusqu'à leur analyse (HPLC ou CPG) ou traités immédiatement (pH, absorbance et poids sec).

La quantification de l'H_2S produit par les souches sélectionnées a été réalisée parallèlement sur les milieux enrichis en L-cystéine et/ou L-méthionine. Pour ce faire, des flacons-piège contenant 5 ml des milieux enrichis en acides aminés soufrés (tableau B-3) sont ensemencés avec 1% de pré-cultures et incubés pendant 48h à 25°C et 90 rpm. L'H_2S produit est ensuite quantifié par la réaction de synthèse du bleu de méthylène (voir section VII.2.2).

Tableau B-3. Concentrations en L-cystéine et en L-méthionine utilisées lors de l'étude de l'effet de la L-cystéine sur la production de CSV.

Culture	**Concentration d'acide aminé soufré (g l^{-1})**	
	Cystéine	**Méthionine**
A (sans enrichissement)	--	--
B	1,0	0,0
C	0,2	1,0
D	1,0	1,0
E	0,0	1,0

VII. ANALYSES REALISEES SUR LES CULTURES

VII.1. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

VII.1.1. Mesure du pH

Un échantillon est prélevé pour chaque culture et le pH est mesuré directement à l'aide d'un potentiomètre (HI 8418, Hanna Instruments).

VII.1.2. Mesure de l'absorbance

L'absorbance des cultures est mesurée à 660 nm (spectromètre UV-2100, Shimadzu) en utilisant de l'eau comme blanc. Pour des valeurs d'absorbance supérieures à 0,8, les échantillons sont dilués avec de l'eau désionisée.

VII.1.3. Mesure du poids sec

Pour mesurer le poids sec, 10 ml de culture sont filtrés sur des filtres en fibres de verre de 0,2 µm (Whatman) en appliquant le vide. La biomasse récupérée est mise à sécher jusqu'à poids constant dans l'étuve à 60°C pendant au moins 48h. Les poids secs sont alors calculés en soustrayant le poids des filtres séchés dans les mêmes conditions.

VII.2. ANALYSES CHIMIQUES

VII.2.1. Dosage de la L-cystéine

Nous avons utilisé deux méthodes pour le dosage de la L-cystéine. Premièrement, nous avons essayé la méthode de Russell et col. (1997) basée sur la dérivation du groupe thiol de la cystéine par le DTNB suivie de leur séparation par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Dans un deuxième temps, la réaction à la ninhydrine acide suivie d'une quantification au spectrophotomètre a été utilisée (Gaitonde, 1967).

VII.2.1.1. Méthode par dérivation au DTNB

Cette méthode est basée sur la propriété chimique de capacité d'échange de pont disulfure entre des groupements thiols (figure B-2). Ainsi, le réactif d'Ellman (DTNB - acide

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) réagit avec le groupe thiol de la cystéine en libérant l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). Les produits de cette réaction sont ensuite séparés par CLHP et quantifiés grâce à leur absorbance à différentes longueurs d'ondes : le DTNB résiduel absorbe à 325 nm, la cystéine dérivée à 357 nm et le TNB à 412 nm.

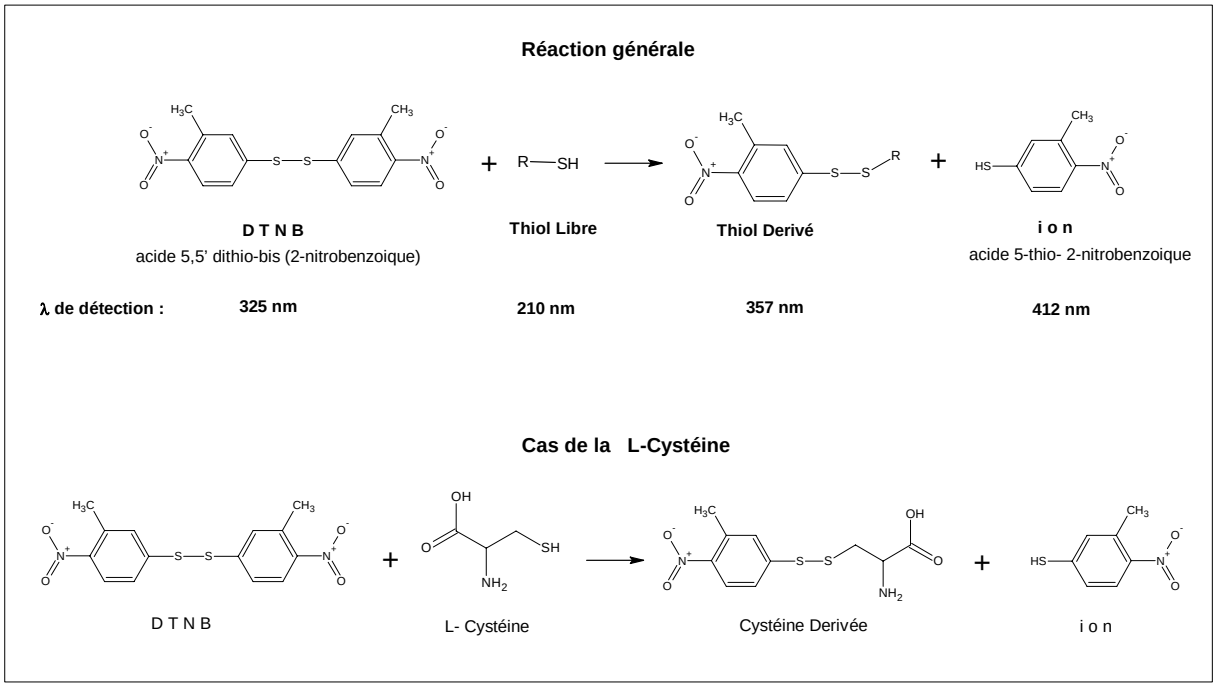


Figure B-2. Principe de la dérivation avec le réactif d'Ellman (DTNB).

Sachant que la L-cystéine s'oxyde très rapidement en solution en L-cystine, nous avons effectué tout d'abord la réaction inverse (réduction de la L-cystine) à l'aide du dithiotritol (DTT). L'objectif était d'assurer le dosage de la L-cystéine totale (L-cystéine+L-cystine) . 250 µl d'échantillon de culture préalablement décongelé et filtré (fibres de verre, 0,2 µm, Whatman) ont été réduits par 250 µl de DTT 8 mM pendant 30 minutes à température ambiante. La cystéine résiduelle totale a été ensuite dérivée avec 1500 µl de DTNB 8 mM pendant 20 minutes. Le DTT et le DTNB sont préparés dans du tampon phosphate PBS[2] préparé à 0,125 M et un pH de 7,4 et sans ajout de sel.

[2] *Le tampon phosphate contient normalement du NaCl (0,154 M). Nous l'avons enlevé suite à des problèmes de cristallisation rencontrés pendant les essais.*

La cystéine dérivée est ensuite analysée par CLHP. 75 µl du mélange de dérivation est donc injecté automatiquement (injecteur SIL-9A, Shimadzu). La séparation est réalisée sur phase inverse (colonne Waters Symmetry C18, tailles de particules 3,5 µm, tailles de pores 100 °A, longueur 100 mm, diamètre 4,6 mm).

La phase mobile, conservée à température ambiante, est constituée d'un mélange de PBS et de méthanol. Deux pompes (Waters, modèle 510) permettent de contrôler le débit des deux solvants, tandis qu'un contrôleur de gradient automatique (Waters 600) réalise le gradient de solvants. Le gradient appliqué est le suivant : 100% PBS pendant 20 minutes à 0,25 ml/min, passage à un gradient de PBS/méthanol pendant 40 minutes à 1,0 ml/ min jusqu'à 82,5% de PBS et 17,5% de méthanol, et enfin 100% de PBS pendant 5 minutes à 1,0 ml/min.

La détection est réalisée grâce à un spectrophotomètre à balayage de diodes (Photodiode 996, Waters) dont les longueurs d'ondes ont été ajustées à 325, 357 et 412 nm.

VII.2.1.2. Réaction à la ninhydrine acide

Les acides aminés peuvent réagir avec la ninhydrine dans des conditions de pH ≥ 5 pour donner un composé de couleur pourpre caractéristique, ayant une absorbance maximale à 570 nm (figure B-3). Pourtant, dans de telles conditions de pH, la L-cystéine ne réagit pas et la L-cystine ne réagit pas complètement (50% de la réaction totale).

La réaction de la ninhydrine avec la L-cystéine devient spécifique et plus sensible à un pH compris entre 0,0 et 1,0, en abaissant le pH avec de l'acide chlorhydrique concentré (Gaitonde, 1967). Dans ces conditions, la L-cystéine réagit et donne un produit de couleur rose caractéristique qui présente un maximum d'absorbance à 560 nm. Par ailleurs, à ce pH, les autres acides aminés ne réagissent pas. La relation absorbance/concentration en L-cystéine est linéaire pour des concentrations en L-cystéine inférieures ou égales à 1,0 mM.

Un volume de 500 µl de DTT 10mM et 20 µl de NaOH 1N sont ajoutés à 500 µl d'échantillon, précédemment dilué à un dixième avec de l'eau désionisée. L'ensemble est laissé pendant 30 minutes à l'obscurité[3]. La ninhydrine est préparée extemporanément en

[3] *De tests préliminaires ont montré que la réduction de cystine en cystéine est maximale à partir de 30 minutes et reste stable jusque 60 minutes.*

diluant 250 mg de ninhydrine dans 10 ml d'une solution formée par 6 ml d'acide acétique concentré (99.5%) et 4 ml d'acide chlorhydrique concentré (36%). Le mélange est ensuite agité de 20 à 30 minutes jusqu'à complète dissolution de la ninhydrine. 0,5 ml d'échantillon réduit, 0,5 ml d'acide acétique concentré et 0,5 ml de réactif de ninhydrine sont alors mélangés dans des tubes en verre à vis. Après agitation, les tubes sont placés dans un bain d'eau bouillante pendant 10 min. Ils sont ensuite refroidis rapidement à l'eau froide et 3,5 ml d'éthanol sont alors ajoutés.

L'absorbance du mélange est mesurée à 560 nm (spectromètre UV-2100, Shimadzu) dans les 30 minutes suivantes. Un blanc est systématiquement réalisé en suivant la même procédure mais en utilisant 0,5 ml d'eau[4].

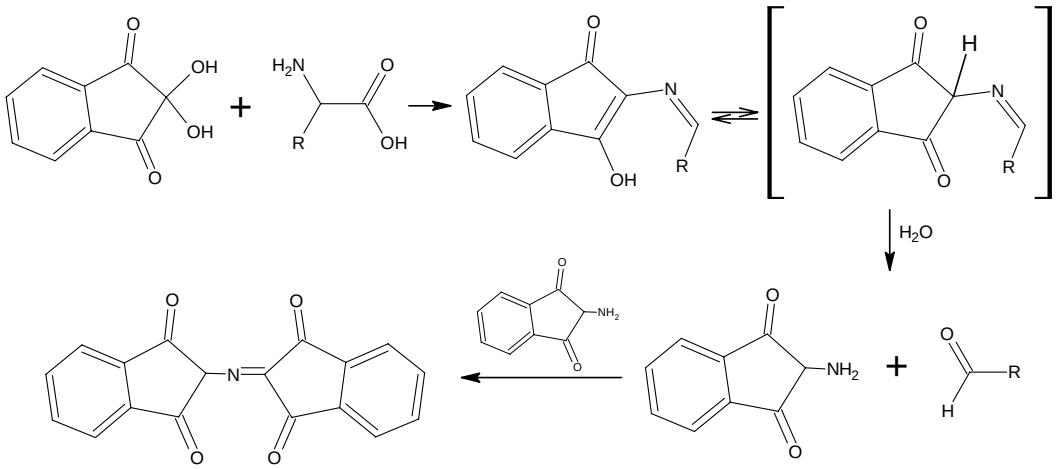


Figure B-3. Réaction générale des acides aminés avec la ninhydrine. Le produit de couleur pourpre est détecté à 570 nm (Belitz et Grosch, 1999).

VII.2.2. Dosage de l'H_2S par synthèse du bleu de méthylène

Le dosage de l'H_2S est basé sur la réaction de synthèse du bleu de méthylène (Fogo et Popowski, 1949). L'H_2S réagit avec deux molécules d'aniline (N,N-diméthylbenzene-1,4-

[4] *Il faut prendre plusieurs précautions. Tout d'abord, éviter tout contact du réactif de ninhydrine avec la peau ; les 10 min de chauffage sont à respecter très précisément : si le mélange réactionnel est chauffé moins de temps la couleur caractéristique de la cystéine ne se développe pas complètement, par contre, s'il est surchauffé une forte coloration violacée est observée et la concentration en cystéine peut alors être surestimée. Une autre précaution à prendre est de bien agiter les tubes avant de procéder à la lecture de l'absorbance car l'éthanol ne se mélange pas immédiatement avec la solution acide. Finalement, la lecture d'absorbance doit se réaliser dans les 30 minutes suivant l'addition de l'éthanol car après ce temps la coloration se modifie.*

diamine) et forment un intermédiaire incolore, le blanc de méthylène. Celui-ci est alors oxydé par le Fe^{3+} en formant le bleu de méthylène (figure A-13).

Nous avons suivi la même procédure pour le dosage de l'H_2S dans toutes les cultures, sauf en ce qui concerne la concentration d'aniline. En effet, une concentration de 0,5 g/L d'aniline est utilisée pour les cultures réalisées sans cystéine (faible production d'H_2S) et de 8,0 g/L d'aniline pour les cultures sur cystéine. Les solutions d'aniline (0,5 g/l ou 8,0 g/l) sont préparées dans de l'HCl 5,5 M. Le chlorure de fer ($FeCl_3$) 0.023 M est préparé dans de l'HCl 1,2 M.

Après récupération du milieu de culture, 2 ml de réactif d'aniline sont ajoutés dans les flacons piège sur la couche d'agar. Après 10 minutes, 400 µl de chlorure de fer sont ajoutés et laissés pendant 20 minutes. Puis, le mélange est transvasé dans une cuvette spectrophotométrique et l'absorbance est déterminée à 670 nm. Dans le cas de solutions troubles, le mélange est préalablement centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 rpm et 25°C. Les absorbances obtenues sont reportées sur une gamme étalon de sulfide de sodium (Na_2S) faite au préalable pour calculer les concentrations en H_2S de chaque culture.

VII.3. DOSAGES DES COMPOSES NON VOLATILS PAR CLHP

La chromatographie liquide haute performance a été utilisée pour doser divers composés dans les cultures.

Avant analyse, les échantillons conservés à -20°C sont décongelés à température ambiante puis filtrés à l'aide d'une seringue sur un filtre en polyethersulfone (PES) d'un diamètre de pores de 0,20 µm (Whatman). Cette opération permet d'éliminer les particules insolubles susceptibles de gêner l'analyse.

VII.3.1. Dosage de la L-méthionine résiduelle

Les flacons en verre contenant 1,5 ml d'échantillon filtré sont placés dans l'injecteur automatique (Sil-9A, Shimadzu) qui réalise l'injection de 5 µl d'échantillon. La phase mobile (eau et acétonitrile) est conservée à température ambiante et son débit est de 0,6 ml/min.

Un contrôleur de gradient automatique (Waters) permet de modifier la composition de la phase mobile selon le gradient suivant : 100% eau pendant 2,5 min, passage à 90% eau-

10% acétonitrile en 0,5 min, puis passage à 60% eau-40% acétonitrile en 7 min, et enfin remontée jusqu'à 100% d'eau en 4 min. La colonne est alors nettoyée pendant 10 min par de l'eau.

La colonne utilisée est une Symmetry C18 (Waters) (tailles des particules 3,5 µm, tailles des pores 100 A, longueur 100 mm et diamètre 4,6 mm). La détection est réalisée grâce à un détecteur UV (Waters, model 486) dont la longueur d'onde est ajustée à 210 nm.

VII.3.2. Dosage des cétoacides et des hydroxyacides

Les cétoacides et hydroxyacides potentiellement présents dans les échantillons filtrés sont séparés sur une colonne à exclusion d'ions (Aminex HPX 87 H^+, Biorad; diamètre, 7,8 mm; longueur, 300 mm) thermostatée à 35°C. La phase mobile H_2SO_4 0,01 N a un débit constant de 0,6 ml/min. Les échantillons sont conservés à 10°C dans la chambre de l'injecteur (Waters, model 717) qui injecte automatiquement 20 µl de chaque échantillon. Les composés sont détectés à 210 nm (détecteur Waters 490).

VII.4. DOSAGES DES COMPOSES PAR CPG-SM

L'analyse de la production d'arômes soufrés volatils par les différentes souches étudiées est réalisée par une extraction dynamique de l'espace de tête (Purge & Trap, P&T) ou par SPME (Solid Phase Micro Extraction), suivie d'une étape de séparation par chromatographie en phase gazeuse (CPG), et d'identification par spectrométrie de masse.

VII.4.1. Les composés volatils

VII.4.1.1. Extraction par analyse dynamique de l'espace de tête (purge and trap)

Les échantillons de culture non filtrés, stockés à -80°C, sont décongelés dans de la glace. Après agitation, un volume de 5 ml est prélevé et introduit dans le tube d'analyse relié au "Purge and Trap" (Tekman Dohrmann, 3100 sample concentrator). Cet appareil assure l'extraction et la concentration des composés volatils présents dans l'échantillon. Cette étape comprend plusieurs phases successives dont les paramètres de température et de durée sont précisés dans le tableau B-4.

Avant la phase de purge, les échantillons à analyser sont soumis à un préchauffage afin d'améliorer la répétabilité et l'efficacité de l'extraction. Puis, les composés volatils sont entraînés par un flux d'hélium (Purge) de débit contrôlé (15 ml/min) jusqu'au piège où ils sont adsorbés (Trap). Le piège est un polymère hydrophobe d'oxyde de 2,6-diphényl-p-phénylène - Tenax ® TA (Teckmar Inc.). Les composés volatils sont alors désorbés par chauffage du piège à 220°C et sont entrainés par un flux d'hélium via une ligne de transfert chauffée (150°C) vers un cryo-concentrateur refroidi à -150°C par de l'azote liquide sous pression. Lors de cette étape, les composés sont concentrés en tête de colonne. Un chauffage du cryoconcentrateur à 180°C et son balayage par de l'hélium assure ensuite une injection rapide des composés sur la colonne de chromatographie.

Tableau B-4. Paramètres du "Purge and Trap" pour l'analyses des composés volatils.

Paramètres	**Condition**
Chauffage de l'échantillon	actif
Durée de pré-purge	8,0 min
Durée de préchauffage	2,0 min
Température de l'échantillon	60°C
Durée de purge	15,0 min
Durée de purge de séchage	6,0 min
Durée de désorption du piège	2,0 min
Température de désorption	225°C
Température ligne de transfert	150°C
Température vanne de transfert	150°C
Température d'attente de la cryo-concentration	100°C
Température de cryo-concentration	-150°C
Durée d'injection	1,0 min
Température à l'injection	180°C
Durée de chauffage du piège (nettoyage)	10,0 min
Température de nettoyage	225°C

VII.4.1.2. Extraction par SPME

L'extraction a été réalisée par SPME dans l'espace de tête de l'échantillon grâce à un système automatisé, le COMBIPAL, commandé par un logiciel PAL (CTC Analytics). Les échantillons ont été décongelés lentement et maintenu à 5°C sur un portoir refroidi. Une fibre de Carboxen-PDMS de 75 µm d'épaisseur préalablement conditionnée (1h 30 à 250°C) a été utilisée pour réaliser l'extraction dans les conditions suivantes : température d'incubation : 30°C ; durée d'extraction : 35 minutes ; agitation : 500 rpm ; pénétration de la fibre dans le flacon : 22 mm.

Après extraction, les composés ont subi une désorption pendant 1 minute dans l'injecteur du chromatographe HP 6890 (Agilent Technology). L'injection a été réalisée en mode «splitless» à une température de 250°C (température de désorption) en utilisant l'hélium comme gaz vecteur avec un débit de 30 ml/min.

VII.4.2. Séparation, détection et quantification des composés volatils

Les composés d'arôme extraits par P&T ou SPME sont ensuite séparés par chromatographie en phase gazeuse, sur une colonne capillaire apolaire HP5-MS (formé par un copolymère de diphényl-diméthylsiloxane (5%-95%) ; 30 m, 0,25 mm de diamètre et d'une épaisseur de film de 0,25 µm). Le débit d'hélium est fixé à 1,6 ml/min.

Le programme de température du four utilisé est le suivant (tableau B-5) : 5°C pendant 8 minutes ; 5°C à 40°C à 3°C/min ; 40°C à 50°C à 1°C/min ; 50°C à 65°C à 5°C/min ; 65°C à 75°C à 3°C/min ; 75°C à 150°C à 10°C/min. Finalement, la température est maintenue à 150°C pendant 1 min.

Les composés ainsi séparés sont identifiés en sortie de colonne par un spectromètre de masse à impact électronique (HP model 6890A Quadruple Mass Spectrometer). Cette technique est basée sur la production d'ions spécifiques par un bombardement électronique, puis leur séparation en fonction du rapport de la masse sur charge (m/z) des ions générés. Le mode de fonctionnement utilisé dans notre cas est le SCAN qui détecte les ions dont le rapport masse/charge (m/z) est compris entre 29 à 300, avec une vitesse de balayage de 5,17 scan/seconde. Les ions sont ensuite détectés par un photomulplicateur d'électrons. Chaque composé sera donc caractérisé par un spectre de masse (ensemble des ions formés). Des chromatogrammes sont reconstitués à partir du flux ionique total ou T.I.C par un logiciel (MSD-Chemstation, Agilent Technologies).

Les composés sont identifiés par comparaison des spectres obtenus avec les spectres existants dans des banques (Wiley ou Nist). La quantification des arômes se fait par étalonnage externe avec des solutions de produits purs de concentrations définies.

Tableau B-5. Programme du four pour l'analyse des composés volatils par Purge and Trap et SPME.

Vitesse de montée en température (°C/min)	Consigne de température (°C)	Temps de maintien (min)
	5	8
3	40	0
1	50	0
5	65	0
3	75	0
10	150	1
Temps total (min)		44,5

VII.4.3. Les composés non-volatils : Dérivation et analyse par GC-MS

Afin d'analyser les composés non volatils issus du catabolisme de la L-cystéine, la méthode de double dérivation décrite par Arfi (2005) a été utilisée (figure B-4). Cette méthode permet d'analyser les céto-acides, les alcools et les acides carboxyliques. Dans une première étape de dérivation en phase aqueuse, les fonctions cétoniques des céto-acides sont dérivées formant des oximes. Puis après extraction et concentration dans une phase organique, les fonctions hydroxyles des oximes, des alcools et des acides sont silylées dans une deuxième étape de dérivation (Xie et col., 1993; Yu et col., 1995; Munch et col., 1998; Yu et col., 1998).

VII.4.3.1. Protocole de double dérivation

Premièrement, pour la formation du dérivé oxime, un échantillon de culture, stocké à -20°C après prélèvement, est décongelé à température ambiente. Un volume de 5 ml de l'échantillon à dérivatiser (échantillon de culture ou solution de composés purs) est introduit

dans un tube en verre de 20 ml avec bouchon en polytétrafluoréthylène (PTFE) préalablement nettoyé à l'hexane et séché sous une hotte Sorbonne. L'échantillon est incubé à 45°C pendant 2h après ajout de 1 ml d'une solution de pentafluorobenzylhydroxylamine (PFBHA) à 5 g/l et homogénéisation manuelle pendant 1 minute. Le volume de PFBHA ajouté a été préparé extemporanément dans un mélange d'eau : acétronitrile (1:9). Pendant cette étape, les fonctions C=O réagissent avec le PFBHA pour former une oxime (figure B-4A). Cette réaction permet d'éviter la transformation des carbonyles en énols qui risquent de réagir avec l'agent de silylation et de compliquer l'interprétation des spectres.

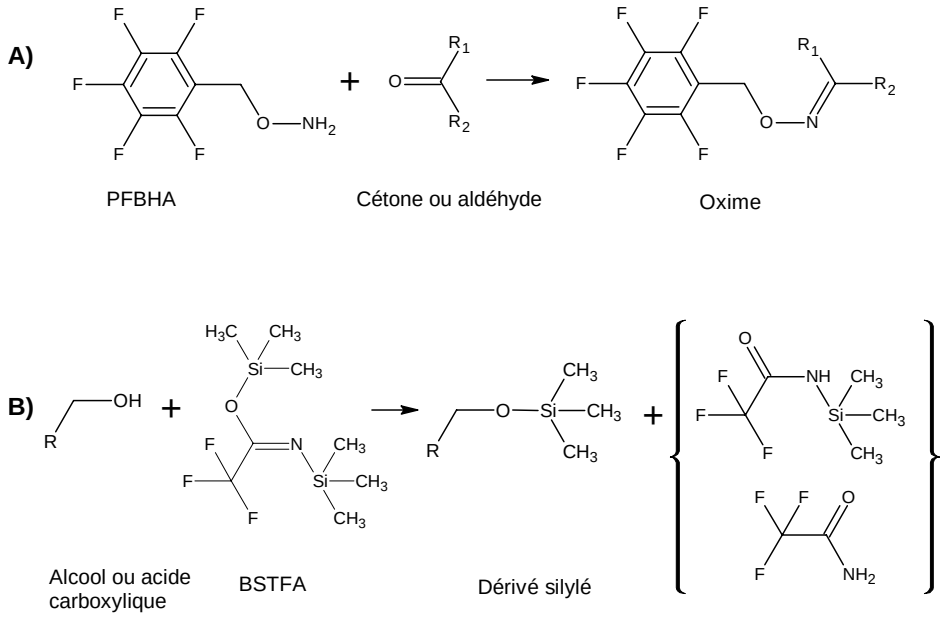


Figure B-4. Volatilisation des intermédiaires non volatils par dérivatisation. (A) Blocage du groupe cétone ou aldéhyde avec la formation d'une oxime. (B) Remplacement de protons acides par silylation.

Le dérivé oxime est ensuite extrait dans une phase organique où toute trace d'eau doit être éliminée étant donné la grande instabilité du réactif de silylation qui sera ajouté à l'étape suivante. Après incubation, les échantillons sont refroidis puis acidifiés avec 50 µl d'acide sulfurique concentré. Cette acidification prévient l'extraction d'un excès de réactif PFBHA, qui risque de perturber l'analyse chromatographique. Elle améliore également l'extraction des acides (Munch et col., 1998). Un volume de 2 ml d'acétate de butyle est ensuite ajouté à la

solution. Le mélange est agité manuellement pendant 3 minutes puis mis à décanter pendant 5 minutes. Après décantation, la phase organique est prélevée puis séchée par ajout de sulfate de sodium anhydre. L'extrait séché est transvasé alors dans un flacon en verre de 2 ml, fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon en PTFE. Il est ensuite concentré sous un léger flux d'azote pour être ensuite repris dans 100 µl d'un mélange de dichlorométhane : hexane (1 : 1).

Dans la deuxième étape de dérivation, l'échantillon ainsi concentré est silylé avec un volume de 100 µl de bis-(triméthylsilyle)-trifluoroacétamide (BSTFA) contenant 1% de triméthylchlorosilane comme catalyseur. Le mélange est ensuite incubé dans une étuve à 60°C pendant 40 minutes. La réaction de silylation consiste à remplacer le proton acide (H^+) se trouvant sur les fonctions hydroxyle, amine ou amide, par un trimétyle silyle (figure B-4B).

Après refroidissement, un volume de 1,5 µl d'échantillon est injecté directement en tête de colonne.

VII.4.3.2. Analyse par CPG-SM

Une colonne HP-5 a été utilisée pour la séparation des dérivés, laquelle est préalablement conditionnée par injections répétées du réactif de silylation et utilisée exclusivement pour cette analyse.

La température du four suit le programme suivant (tableau B-6) : température initiale 60°C pendant 1 minute, puis augmentation jusqu'à 280°C à 10°C/min et maintien pendant 5 min. Un délai de 6 min (*Solvant Delay*) est appliqué afin de réduire l'encrassement de la source du spectromètre de masse par le solvant. L'analyse de solutions standards nous a permis d'obtenir pour chaque composé le temps de rétention et le spectre de masse correspondant.

Le bon déroulement des étapes de dérivation a été validé par l'analyse des spectres de masse d'après les données de la littérature (Xie et col., 1993 ; Yu et col., 1995 ; Munch et col., 1998 ; Yu et col., 1998).

Dans l'annexe 5, sont présentés les spectres de masse du pyruvate, du mercaptopyruvate et de l'α-cétoglutarate, obtenus sur des solutions modèle. Les ions obtenus sur chaque spectre correspondent bien à ceux attendus suivant le composé et la dérivation appliquée (Yu et col., 1998).

Tableau B-6. Programme du four pour l'analyse des composés silylés.

Vitesse d'augmentation de la température (°C/min)	Consigne de température (°C)	Temps de maintien (min)
	60	1
10	280	5
Temps total (min)		28,0

VII.5. DOSAGES ENZYMATIQUES

VII.5.1. Préparation des extraits acellulaires

Après avoir cultivé les micro-organismes sur des milieux complexes, les cellules sont récupérées par centrifugation à 10000 rpm pendant 15min à 4°C. La biomasse obtenue est alors rincée deux fois avec 20 ml de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 1 mM d'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique).

Un aliquot (500 mg) de biomasse est introduit dans un tube de broyage contenant 0,6 g de billes de verre, (billes de 0,5 mm pour les levures et de 0,1 mm pour les bactéries), 1ml de tampon tris HCl à 50 mM et pH 8 et, comme inhibiteur de protéases, de l'EDTA à 1 mM.

Le broyage s'effectue en 4 cycles de 30 secondes, à une vitesse de 6,5 m/s dans un broyeur Fast Prep FP 120 (Bio 101, Savant). Après chaque cycle de broyage, les tubes ont été placés 5 minutes dans la glace afin de limiter la dénaturation due à la chaleur générée par le frottement à l'intérieur du tube. Les tubes contenant le broyat cellulaire ont été centrifugés pendant 5 minutes, à 14000 rpm et 4ºC. Le surnageant formant l'extrait acellulaire a été ensuite récupéré par pipetage. Pendant la durée des analyses, les surnageants sont conservés dans de la glace pilée.

VII.5.2. Dosage des protéines

Le dosage de la quantité de protéines présentes dans l'extrait acellulaire, se fait selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le réactif utilisé (Protein Assay, Bio-Rad) est un mélange de bleu de Coomassie, d'acide phosphorique et de méthanol. L'analyse des protéines

est basée sur le changement de couleur du colorant brillant du bleu G-250 de Coomassie en réponse à diverses concentrations en protéines.

Un mélange de 800 µl d'extrait acellulaire (dilué 1:1000) et 200 µl de réactif est mis dans des cuvettes spectrophotométriques de 1,5 ml à usage unique. Les cuvettes sont incubées 5 min à température ambiante (environ 20°C). Le dosage se fait par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV-2100, Shimadzu) en lisant l'absorbance à 595 nm par rapport à un mélange témoin contenant 200 µl de réactif et 800 µl d'eau. Les absorbances obtenues sont reportées sur une gamme étalon de sérum albumine bovine, réalisée en parallèle, afin de calculer les concentrations en protéines de chaque extrait.

VII.5.3. Dosage de l'activité déméthiolase

La méthode de dosage de la déméthiolase (méthionine γ-lyase, E.C. 4.4.1.11) utilisée dans ce travail a été décrite précédemment par plusieurs auteurs qui ont étudié le catabolisme de la L-méthionine notamment chez les bactéries (Sharpe et col., 1977 ; Ferchichi et col., 1986). L'activité déméthiolase est dosée par la mesure du méthanethiol (CH_3SH) formé par l'action de l'enzyme sur la L-méthionine (figure B-5). Le groupement –SH du méthanethiol réagit avec le réactif d'Ellman (DTNB-acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) pour former l'acide thionitrobenzoïque qui absorbe fortement à 412 nm (voir la réaction générale sur la figure B-2).

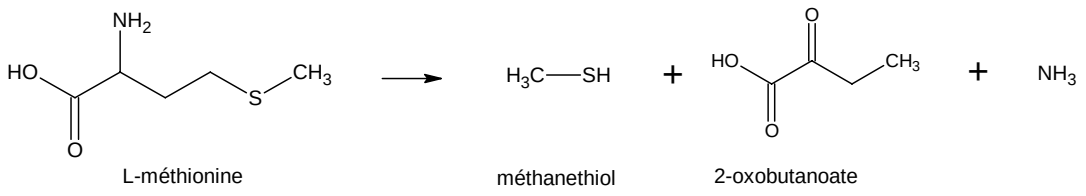


Figure B-5. Activité déméthiolase (méthionine γ-lyase, E.C. 4.4.1.11). Le méthanethiol produit est dosé par dérivation au DTNB.

Le mélange réactionnel (tableau B-7) composé de 50 mM Tris-HCl (pH 8), pyridoxal phosphate (PLP) 0,05 mM, DTNB 1,2 mM, L-méthionine 5 mM, et 10% v/v d'extrait acellulaire est introduit dans les puits d'une plaque allant au lecteur multiplaque Powerwave

X340 (BioTek Instruments, Inc.). En parallèle, un blanc est préparé suivant la même procédure, mais avec ajout d'extrait acellulaire dénaturé (20 minutes à 90°C) pour prendre en compte les réactions purement chimiques.

Une lecture d'absorbance, en mode cinétique sur 60 minutes, est lancée immédiatement après l'ajout du substrat. La plaque est maintenue à 30°C. Afin d'assurer une bonne homogénéisation du mélange, une agitation d'intensité moyenne et d'une durée de 3 secondes est programmée avant chaque lecture. A la fin de la lecture, la pente maximale des droites de réponse obtenues est utilisée dans les calculs d'activité. Un étalonnage préalable avec des solutions de méthiolate de sodium de concentrations croissantes a permis de montrer qu'une variation d'une unité de DO à 412 nm correspondait à une quantité en méthanethiol de 0,36 mM à pH 8. L'activité spécifique de l'échantillon est exprimée en nmole de méthanethiol formé par seconde et par gramme de protéines.

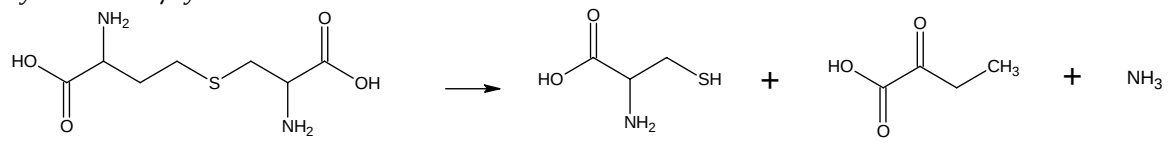
Tableau B-7. Composition du mélange réactionnel pour la mesure de l'activité déméthiolase.

Réactif	**Volume (µl)**		**Concentration finale (mM)**
	Echantillon	**Témoin**	
Tampon Tris HCl 100mM (pH 8)	200	200	50
PLP (2mM)	10	10	0,05
L-méthionine (50 mM)	40	40	5
DTNB (8mM)	60	60	1,2
H_2O	50	50	
Extrait acellulaire	40	40	10% (v/v)
Volume Total	400	400	

VII.5.4. Dosage de l'activité cystathionine β–γ-lyase

Nous avons utilisé la réaction au DTNB afin de mesurer l'activité cystathionine β-γ-lyase. Le substrat utilisé est la cystathionine (substrat commun à la cystathionine β-lyase et la cystathionine γ-lyase). D'une part, la cystathionine en présence de la cystathionine β-lyase est dégradée en homocystéine et pyruvate. D'autre part, sous l'action de l'activité cystathionine γ-lyase, la cystathionine se dégrade en L-cystéine et 2-oxobutanoate. Ces produits présentent tous un groupement thiol libre (figure B-6) qui réagit en présence du DTNB.

a) *cystathionine γ-lyase*



b) *cystathionine β-lyase*

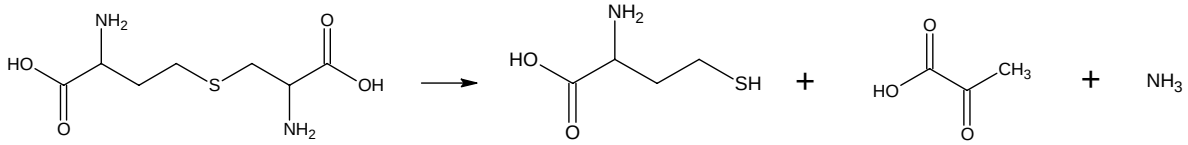


Figure B-6. Activités de la cystathionine γ-lyase (E.C. 4.4.1.1) et cystathionine β-lyase (E.C. 4.4.1.8) sur la cystathionine avec la formation de cystéine et d'homocystéine respectivement.

Le mélange réactionnel (tableau B-8) est composé de Tris-HCl (pH 8) 50mM, de PLP 0,05mM, DTNB 1,2 mM, cystathionine 5 mM et 10% (v/v) d'extrait acellulaire. Le blanc est préparé avec l'extrait acellulaire dénaturé (20 min à 90°C). Une lecture d'absorbance, en mode cinétique sur 60 minutes, est lancée immédiatement après l'ajout du substrat à 30°C, avec lecture chaque 5 minutes. Le mélange est homogénéisé par une agitation d'intensité moyenne et d'une durée de 3 secondes avant chaque lecture. A la fin de la lecture, la pente maximale des droites de réponse obtenues a été comparé par rapport à une courbe d'étalonnage de L-cystéine préalablement préparée (1 unité d'absorbance à 412 nm= 0,32 mM de cystéine).

Tableau B-8. Composition du mélange réactionnel de dosage de la cystathionine β–γ-lyase.

Réactif	**Volume (µl)**		**Concentration finale (mM)**
	Echantillon	**Témoin**	
Tampon Tris HCl 100mM (pH 8)	200	200	50
PLP (2mM)	10	10	0,05
L-méthionine (50 mM)	40	40	5
DTNB (8mM)	60	60	1,2
H_2O	50	50	
Extrait acellulaire	40	40	10% (v/v)
Volume Total	400	400	

VII.5.5. Dosage de l'activité transaminase

L'activité transaminase a été dosée sur la L-cystéine en suivant une méthode en deux étapes. La première étape consiste en une réaction de transamination durant laquelle la L-cystéine perd sa fonction amine (et se transforme en α-cétoacide) en faveur de l'acide α-cétoglutarique (α-KG), qui se transforme en acide glutamique (figure B-7). La seconde étape a pour but de doser le glutamate formé pendant la transamination. Cette étape est elle-même constituée d'une série de réactions enzymatiques qui aboutissent à la formation d'un composé qui absorbe à 492 nm. D'abord, le glutamate soumis à l'action d'une glutamate déshydrogénase (GDH), en présence de NAD^+, qui le transforme en acide α-cétoglutarique avec génération de NADH. Ensuite, sous l'action d'une diaphorase, le NADH perd son proton H^+ en faveur du chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) qui se transforme en formazan, composé qui absorbe à 492 nm.

La réaction de transamination est réalisée dans de tubes Eppendorf en présence des composés suivants : Tris-HCl (pH 8) 80 mM, L-cystéine 30 mM, α-cétoglutarate 30 mM, PLP 0,05 mM et l'extrait acellulaire 20% v/v (tableau B-9). Le mélange est mis à incuber dans un bain-marie à sec pendant 1 h. Des prélèvements de 250 µl sont réalisés à T0 puis toutes les 15 min. Les prélèvements sont inactivés par chauffage à 95°C pendant 15 minutes afin de stopper la réaction de transamination. Le glutamate produit est dosé à l'aide d'un kit Boehringer (Roche Diagnostics, GmbH). Le tampon phosphate-EDTA (pH 8,5), le NAD, la diaphorase, l'INT et l'eau milliQ sont mélangés dans les puits d'une microplaque (tableau B-10). L'échantillon désactivé est ajouté dans les puits immédiatement avant de lancer la première lecture à 492 nm. Une deuxième lecture est réalisée après ajout de la GDH et une incubation de 15 minutes à l'obscurité au sein du compartiment de lecture du lecteur de microplaque. Une agitation d'intensité moyenne et d'une durée de 3 secondes est appliquée avant chaque lecture. L'activité transaminase est exprimée en nmole de glutamate formé s^{-1} g de protéine^{-1}.

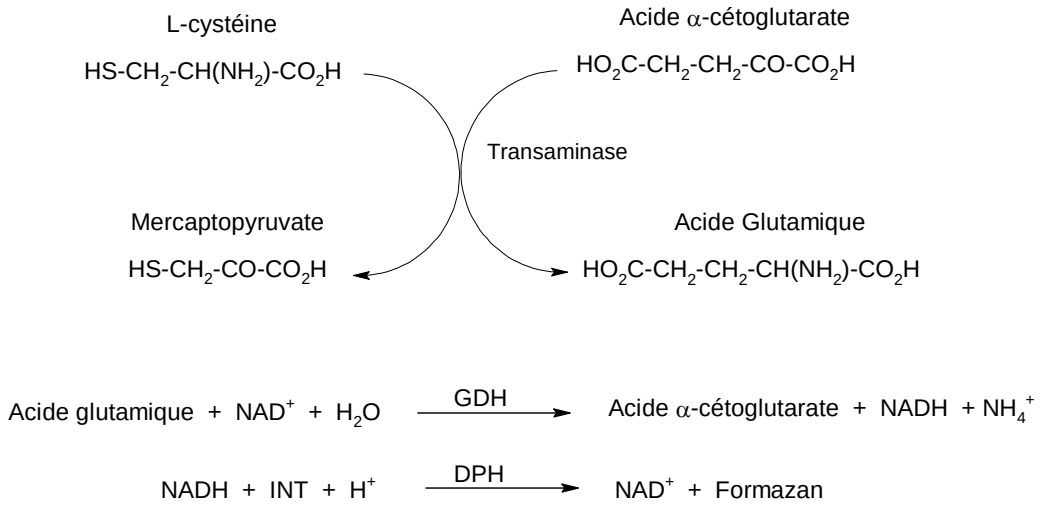


Figure B-7. Principe de dosage de l'activité transaminase (GDH : glutamate déshydrogénase ; DPH : Diaphorase).

Tableau B-9. Composition du milieu réactionnel de la transaminase.

Réactif	Volume (µl)	Concentration finale (mM)
Tampon Tris HCl (200 mM, pH 8)	400	80
PLP (1 mM)	50	0,05
L-cystéine (100 mM)	300	30
α-cétoglutarate (600 mM)	50	30
Extrait acellulaire	200	
Volume Total	1000	

Interférences rencontrées lors de l'utilisation de ce dosage sur L-cystéine :

Le dosage du glutamate, formé lors de la réaction de transamination, est réalisé par le kit commercial. Pour ce faire, le glutamate est déshydrogéné en α-cétoglutarate avec la formation de NADH ; celui-ci réagit avec le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) en formant le formazan. La solution réactionnelle change de couleur, et passe du jaune- marron très clair à une couleur rose. Plus la couleur est foncée, plus une quantité importante de glutamate a été formée pendant l'étape de transamination. Toutefois, il semble que certains composés à

caractère réducteur, comme l'acide ascorbique ou la cystéine (par son groupe thiol), peuvent aussi réagir directement avec le chlorure d'iodonitrotétrazolium, ce qui donne des mesures spectrophotométriques plus élevées.

Dans nos essais, une couleur rose très foncée a été produite au moment de l'addition de l'INT aux extraits acellulaires. Cette coloration apparaît également dans les extraits acellulaires témoin (sans substrat) dénaturés et non dénaturés. Nous avons considéré que la L-cystéine résiduelle (dans les cas où elle a été utilisée comme substrat), l'H_2S produit (qui se sentait pendant les essais) ou d'autres composés contenus dans les extraits acellulaires (CoA-SH par exemple) ont créé des interférences durant la détermination du glutamate. Nous n'avons donc pas pu utiliser le kit enzymatique pour le dosage de l'activité transaminase, alors qu'il avait été utilisé auparavant (Arfi, 2005) pour doser l'activité transaminase sur méthionine.

Tableau B-10. Composition du milieu réactionnel de dosage de l'acide glutamique.

Réactif (Kit Bohringer)	**Volume (µl)**	
	Echantillon	Témoin
Tampon phosphates-EDTA	60	60
NAD	20	20
INT	20	20
Echantillon	20	0
Eau	180	200
Première lecture d'absorbance (A1) à 492 nm		
GDH	3	3
Seconde lecture d'absorbance (A2) à 492 nm		
Volume Total	303	303

VII.6. ANALYSE STATISTIQUE

Les données sont traitées par un logiciel (Statistica version 6,1, Stasof Inc.) afin d'estimer la répétabilité des résultats et ainsi de les interpréter correctement. Une analyse de variance (ANOVA) a été appliquée à toutes les données. Afin de comparer les moyennes, le test de Tukey a été réalisé ce qui a permis d'établir des groupes statistiques auxquels ont été attibuées différentes lettres (a, b, c). Les moyennes appartenant au même groupe ne présentent pas de différence significative, au seuil de probabilité considéré (0,05).

C. Résultats
et
Discussion

VIII. MISE AU POINT DES TECHNIQUES

VIII.1. MISE AU POINT DU TEST DE CRIBLAGE : DOSAGE DE L'H_2S

Notre objectif étant d'étudier le catabolisme de la cystéine, il nous a fallu mettre au point une méthode fiable permettant de quantifier le produit principal de cette dégradation : le sulfure d'hydrogène (H_2S). De nombreuses méthodologies ont déjà été décrites (voir la revue de Lawrence et col., 2000), allant de méthodes simples (dosages colorimétriques, précipitation en présence de métaux lourds..) à des méthodes demandant des équipements spécifiques (électrodes spécifiques pour l'H_2S, détection par fluorimétrie, etc..). Dans tous les cas, la méthodologie peut être adaptée au contexte spécifique d'analyse (type d'échantillon, minimisation de la méthode, sensibilité requise, etc..).

Pour notre travail de sélection de micro-organismes producteurs d'H_2S, nous avons testé deux méthodologies très largement utilisées pour l'analyse de l'H_2S : (I) la précipitation de l'H_2S avec des métaux et (II) la réaction de synthèse du bleu de méthylène. D'après la littérature, ces méthodologies étaient décrites comme étant simples, sensibles et rapides.

VIII.1.1. Test de dosage de l'H_2S par précipitation avec des métaux

Nous avons utilisé le plomb et le fer pour nos tests de précipitation de l' H_2S avec des métaux. Ce sont, avec l'argent, les deux métaux les plus utilisés pour la détection et la quantification de ce composé. Par exemple, des bandelettes de papier imprégnées de plomb sont utilisées pour la quantification de l'H_2S présent dans l'air. Le seuil de détection est alors de l'ordre de 0,1 ppm (EPA, 1993). Par ailleurs, le fer est incorporé dans les milieux de culture TSI ou Wilson-Blair pour la détection de routine d'entérobactéries productrices d'H_2S (MacCoy, 1962).

Dans notre cas, nous avons imprégné des disques de papier filtre d'une solution d'acétate de plomb ou de chlorure de fer à 1,0 g/l. Une fois secs, ils ont été fixés sur le couvercle de boîtes de Pétri contenant une couche d'agar PDB supplémenté en cystéine à 1,0 g/l. Des cultures de *S. cerevisiae* et *G. candidum* ont été utilisées pour étudier les performances de cette méthode. En effet, ces espèces sont connues par leur capacité à produire de l'H_2S et de CSVs respectivement (Duan et col., 2004 ; Arfi et col., 2003).

La figure C-1 présente un exemple de coloration noire, produite lors de cultures de ces levures sur des milieux enrichis en cystéine. Cette coloration est produite par la formation de sulfure de plomb ou de sulfure de fer selon le métal utilisé ; les filtres imprégnés de plomb donnant les meilleurs résultats. Par ailleurs, les témoins (milieu non inoculé enrichi en cystéine ou culture sur PDB sans cystéine) ne produisent aucun précipité. Ces résultats confirment donc la formation d'H_2S à partir de la cystéine par l'action des levures testées.

Cependant, comme il peut être observé sur la figure C-1, les précipités ne sont pas homogènes, ni reproductibles quel que soit le métal utilisé. Nous avons aussi observé la décoloration des précipités pendant la lecture des résultats, lorsque les filtres sont retirés des cultures. Cette décoloration rapide a déjà été observée par d'autres auteurs sur des précipités de sulfure d'argent (Duan et col., 2004). Cette décoloration pourrait être le résultat de la présence d'oxygène, ou d'autres composés oxydants du milieu, qui peuvent rapidement oxyder l'H_2S et donc interférer avec les précipités de sulfure de métaux (EPA, 1993).

Le manque de reproductibilité et la décoloration rapide des précipités rendent cette méthodologie peu appropriée pour réaliser une quantification fiable de l'H_2S dans nos conditions. Toutefois, ces tests nous ont fourni une première confirmation qualitative de la production d'H_2S par les levures testées. De plus, cette méthode a pu être utilisée dans d'autres travaux réalisés au laboratoire, où les capacités de micro-organismes à produire du sulfure d'hydrogène étaient testées qualitativement (Sourabié, 2005).

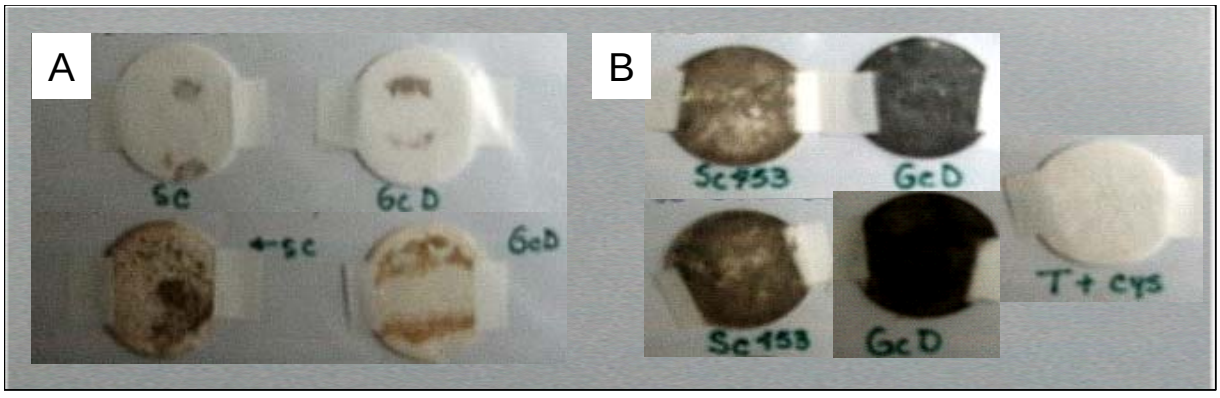


Figure C-1. Test pour la quantification de l'H_2S par précipitation avec des métaux. (A) Réaction avec le fer III (chlorure de fer, $FeCl_3$) ; (B) réaction avec le plomb II (acétate de plomb II). On peut observer que la coloration est non reproductible et non homogène sur les deux cultures réalisées avec la même souche. Les images ont été prises après 48 h de culture.

VIII.1.2. Méthode de dosage de l'H_2S par la réaction de synthèse du bleu de méthylène

Cette méthode est basée sur la formation d'un composé coloré, le bleu de méthylène (BM), par oxydation par des ions ferriques de l'hétérocycle incolore formé lors de la réaction d'une mole d'H_2S avec deux moles d'aniline (N,N-diméthylbenzene-1,4-diamine) (voir III-4 fig. A-13). Parmi les nombreux auteurs utilisant ce principe, nous avons choisi d'adapter la méthode décrite par Fogo et Popowski en 1949, quantifiant l'H_2S dans un volume de gaz. Cette méthodologie est basée sur la réalisation des étapes suivantes. Le gaz contenant de l'H_2S est pompé à travers une solution alcaline d'acétate de zinc où l'H_2S est piégé sous forme de sulfure de zinc (ZnS). L'H_2S est ensuite libéré par addition d'une solution acide d'aniline, ce que permet en même temps la réaction entre l'aniline et l'H_2S. Après addition d'un volume de solution de chlorure de fer, il y a formation du bleu de méthylène. Les auteurs ont déterminé que la gamme de détection se situait entre 0,014 et 2,0 mg/L (4,1-58,8 µM) d'H_2S, dans leurs conditions d'analyse.

L'utilisation de cette méthodologie n'était pas directement adaptable à une culture de micro-organismes, principalement à cause du pH très alcalin de la solution d'acétate de zinc. Par ailleurs, les quantités d'H_2S potentiellement produites (dégradation de 0 à 100% de cystéine, soit 0 à 286 mg/L d'H_2S), étaient beaucoup plus élevées que celles rencontrées dans la méthode de référence (Fogo et Popowski, 1949). Nous avons donc dû modifier deux aspects de cette méthode pour pouvoir l'utiliser lors de criblage des micro-organismes d'affinage : (I) le système de capture de l'H_2S et (II) la gamme de détection de la réaction.

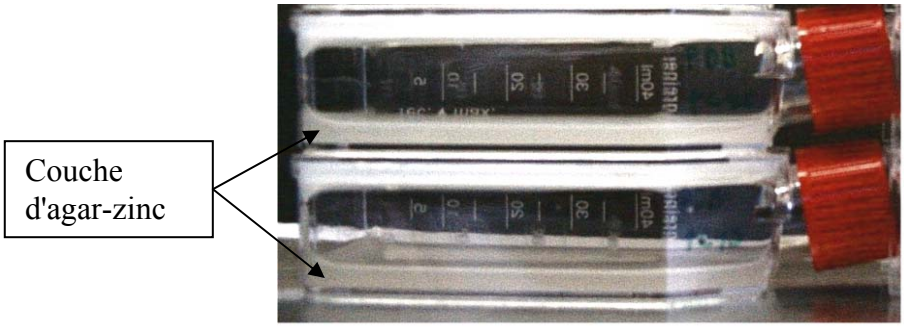


Figure C-2. Flacons de culture cellulaire utilisés pour piéger l'H_2S.

Tout d'abord, nous avons adapté le système de capture de l'H_2S. Nous avons utilisé des flacons de culture cellulaire, dans lesquels l'acétate de zinc alcalin a été ajouté à une solution d'agar et déposée sur la face inférieure des flacons (figure C-2). Après sa prise en masse, la boîte est retournée. Le milieu de culture liquide est introduit dans la boîte, sans être au contact avec le piège (agar - acétate de zinc) puisque celui-ci est fixé sur la face supérieure. Ainsi, l'H_2S produit pendant la culture des micro-organismes est piégé *in situ* par l'action conjointe du milieu alcalin et du zinc. La quantification de l'H_2S peut s'effectuer ensuite dans les mêmes flacons après élimination de la culture[1]. Grâce à ce système fermé, nous avons réussi à éviter une perte massive d'H_2S pendant la croissance des micro-organismes et pendant la réalisation du dosage colorimétrique (synthèse du BM).

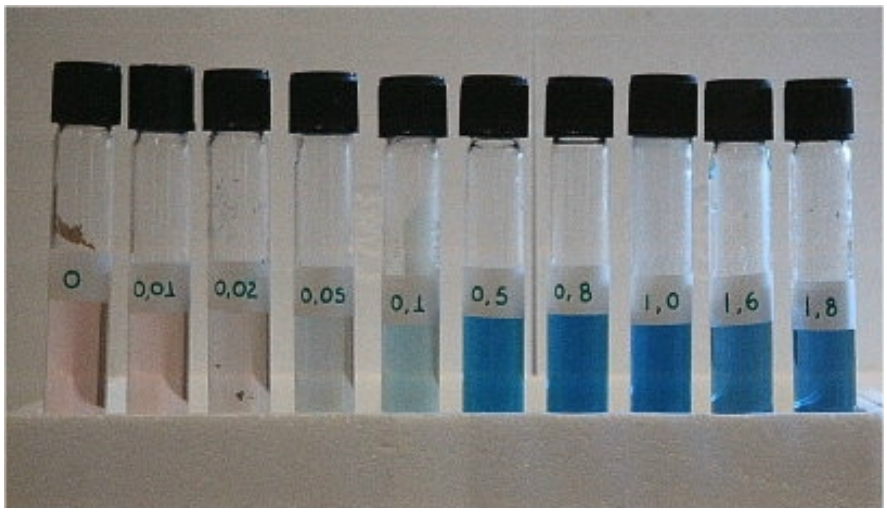


Figure C-3. Gamme étalon de la réaction de bleu de méthylène à 1,0 g/l d'aniline. La gamme est linéaire jusqu'à la concentration de 0,5 mg d'H_2S. Au dessus, apparaît une saturation.

Une fois le système de piège conçu, nous avons abordé le problème de la gamme de détection de l'H_2S. Avec une concentration d'aniline égale à 1,0 g/l (7,3 mM), Fogo et Popowski (1949) ont réalisé un dosage pour des concentrations d'H_2S allant de 0,014 ppm à 2,0 ppm (0,41-58,8 µM). Nous avons confirmé cet intervalle de travail par la réalisation de la gamme étalon correspondante (figure C-3). Ces limites correspondaient, dans nos conditions de screening, à un maximum de 0,7% de cystéine dégradée. En outre, comme nous l'avons

[1] Le schéma de cette procédure est montré dans la figure B-1.

mentionné auparavant, cette réaction est utilisée régulièrement pour la quantification de l'H_2S contenu dans l'air ou des gaz. Dans ce contexte d'utilisation, il est possible d'élargir la gamme (de 0,001 à 50 ppm d'H_2S) en modifiant le volume de gaz prélevé ou le volume de la solution de piège (Fogo et Popowski, 1949 ; WHO, 1981 ; Lawrence et col., 2000). Notre système ne permettait aucune de ces deux possibilités.

Nous avons donc choisi de tester différentes concentrations d'aniline. Finalement, nous avons abouti à une concentration de 8,0 g/l d'aniline, avec laquelle nous avons obtenu une bonne linéarité jusqu'à 68 µgH_2S/ml (2,0 mM, R^2= 0,9996) (figure C-4). La concentration en H_2S ainsi déterminée est 30 fois plus élevée que celle reportée par Fogo et Popowski (1949) et équivalente à la dégradation potentielle de 0,25 g/l de cystéine par les micro-organismes (soit 25%). Nous avons considéré que cette limite serait convenable pour quantifier l'H_2S produit par les cultures à cribler[2]. La limite inférieure de détection (LID) a été aussi calculée ($\varepsilon \leq 0.05$) en utilisant la formule LID = ET*3.28, où ET est l'écart type des mesures à la concentration minimale utilisée dans la courbe standard (Rudy J.L., 1989). Nous avons donc obtenu une LID de 0.2 µgH_2S/ml (6 µM). Lorsque les quantités d'H_2S produites sont faibles, comme dans le cas de cultures sans cystéine ajoutée, la concentration d'aniline à 1,0 g/L peut être utilisée.

En conclusion, nous avons mis à point une méthodologie permettant la quantification de l'H_2S dans un système fermé (flacons de culture cellulaire) avec une quantification adaptée à nos conditions. Cette méthodologie sera utilisée pour la sélection de micro-organismes d'affinage producteurs d'H_2S.

[2] Nous avons constaté expérimentalement, pendant le criblage de souches, que le maximum d'H_2S produit était de 50,63 ppm.

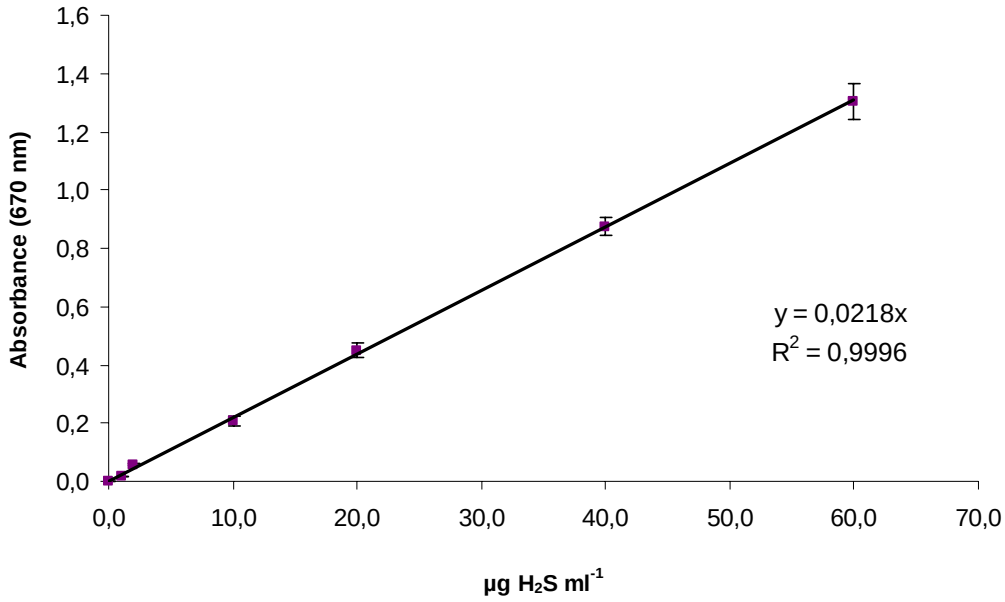


Figure C-4. Gamme étalon de la réaction du BM à 8,0 g/l d'aniline.

VIII.2. MISE AU POINT DU DOSAGE DE LA CYSTEINE

Les méthodes de dosage des acides aminés sont souvent basées sur la réactivité des groupements aminés, carboxyliques ou aromatiques (quantification spectrophotométrique, chromatographie en couche mince, d'échange d'ions, liquide haute pression, etc…). Cependant, ces méthodes ne sont en général pas applicables au dosage de la cystéine à cause de sa forte réactivité. D'autres méthodes plus spécifiques exploitent cette réactivité en formant des dérivés de cysteine qui sont ensuite détectés par fluorescence ou par spectrophotométrie dans le visible ou l'ultraviolet. Le choix de la méthode sera basé ensuite sur l'origine de l'échantillon (absence des composés potentiellement interférents) et de l'équipement disponible au laboratoire. Dans notre cas, nous avons développé deux méthodes : la dérivation au DTNB et la réaction à la ninhydrine acide.

VIII.2.1. Dosage par dérivation au DTNB et séparation par CLHP

Le réactif d'Ellman ou DTNB (ESSE dans l'équation d'ici après), est utilisé généralement pour détecter des composés ayant une fonction thiol (Jocelyn, 1983 ; Katruziak et col., 2001). Grâce à sa capacité d'échange de groupes thiols (I), le DTNB réagit avec le thiol et libère l'ion 5-thio-2-nitrobenzoïque (ES^-) : cet ion est quantifié par spectrophotométrie à 412 nm (Joselyn, 1983).

(I) $ESSE + RSH \leftrightarrow ESSR + ES^-$

(II) $RSSE + RSH \leftrightarrow RSSR + ES^-$

Si le DTNB est fourni en excès, la réaction I est majoritaire (Russell et col., 1997). D'ordinaire, une solution 10 mM de DTNB permet de quantifier jusqu'à 0,05 mM de thiol par spectrométrie (Jocelyn, 1983). Cette limite peut être augmentée par l'utilisation de la CLHP (Katruziak et col, 2001), ce que donne par ailleurs la possibilité de séparer différents composés possédant une fonction thiol et présents dans un mélange (Russell et col., 1997).

Nous avons donc essayé de quantifier la cystéine par dérivation au DTNB et séparation par CLHP. Pour cela, nous avons adapté la méthode de Russell et col., (1997) décrite dans la partie matériels et méthodes. Les principales modifications sont les suivantes.

Nous avons d'abord augmenté la concentration du DTNB à 8 mM, pour 0,4 mM dans la méthode originale, en prenant en compte la concentration maximale de cystéine dans les milieux de culture (1 g/l soit 8,25 mM). Nous avons conservé par contre la relation thiol : DTNB de 1:3 proposée par les auteurs. La concentration plus élevée en DTNB nous a contraint par ailleurs à prolonger de 5 minutes le temps d'analyse dans le but de bien éliminer le DTNB en excès. De plus, nous avons dû supprimer le sel du tampon phosphates-sel (PBS), qui était utilisé dans la préparation des solutions et comme phase mobile, car il précipitait dans la ligne de l'équipement CLHP, malgré de nombreux cycles de nettoyage. Enfin, nous avons ajouté une première étape de réduction de la cystéine à l'aide du DTT. D'après Katrusiak et col. (2001), la réduction des disulfures, produits par oxydation, en leur thiols libres améliore leur quantification et n'interfère pas dans la réaction avec le DTNB.

Ainsi, des gammes étalon de cystéine ont été réalisées dans le tampon phosphate et les milieux de culture utilisés dans notre travail : le PDB (Potatoe Dextrose Broth) et le BHI (Brain Heart Infusion). La réponse est linéaire (R^2= 0,9996) jusqu'à 4 mM de cystéine (figure C-5) dans les trois conditions. Ces résultats montrent donc que les constituants de ces milieux complexes n'interfèrent pas avec la réaction au DTNB.

Une bonne séparation entre les pics correspondants à chaque produit de la réaction, c'est-à-dire la cystéine dérivée, le DTNB résiduel et l'ion libéré, est obtenue. Les temps de rétention pour la cystéine et le DTNB résiduel ont été respectivement de 13,5 et 55 minutes, tandis que l'ion libéré est sorti avec le front de solvant à 5 minutes d'analyse. Un exemple des chromatogrammes obtenus est présenté dans l'annexe 4.

En conclusion, cette méthode est utilisable pour le dosage de la cystéine dans l'intervalle de concentrations correspondant à nos cultures microbiennes. Cependant, le temps d'analyse par échantillon (65 minutes) reste très long pour l'analyse d'un nombre important d'échantillons.

Pour cette raison, nous avons également mis au point une méthode de dosage de la cystéine plus rapide par spectrophotométrie : la réaction à la ninhydrine acide.

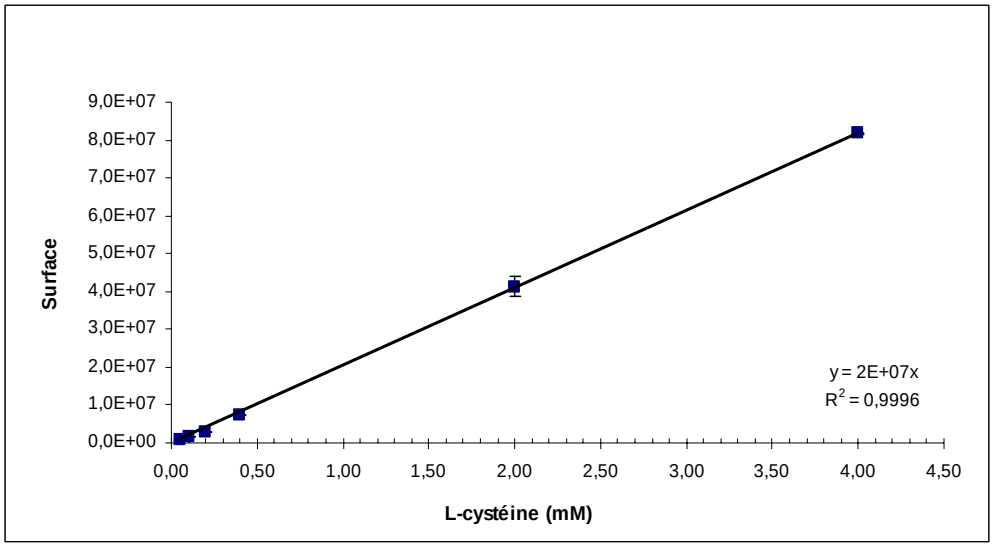


Figure C-5. Gamme étalon de cystéine dérivée au DTNB et analysée par CLHP. Surfaces intégrées à 357 nm (voir matériels et méthodes). Les valeurs sont la moyenne de trois injections.

VIII.2.2. Dosage par réaction à la ninhydrine acide

La réaction entre les acides aminés et la ninhydrine a été largement utilisée à des fins qualitatives et quantitatives. Cependant, dans les conditions décrites dans la méthode de référence, la cystéine ne réagit pas et la L-cystine ne réagit que partiellement (d'après Gaitonde, 1967). Cet auteur a amélioré cette technique afin de permettre la quantification de la cystéine. En effet, la cystéine peut réagir avec la ninhydrine dans des conditions très acides (pH $\leq$ 1,0) en produisant une coloration rose, au lieu de la couleur pourpre normalement obtenue avec les autres acides aminés. Dans ces conditions de pH, les autres acides aminés ne réagissent pas ou produisent une couleur jaune (proline). Cette méthode est donc spécifique pour doser la cystéine (Gaitonde, 1967).

Nous avons, en utilisant cette méthode, réalisé une gamme étalon de cystéine. La coloration rose générée a été mesurée par spectrophotométrie à 560 nm (pour plus de détails voir la section matériels et méthodes).

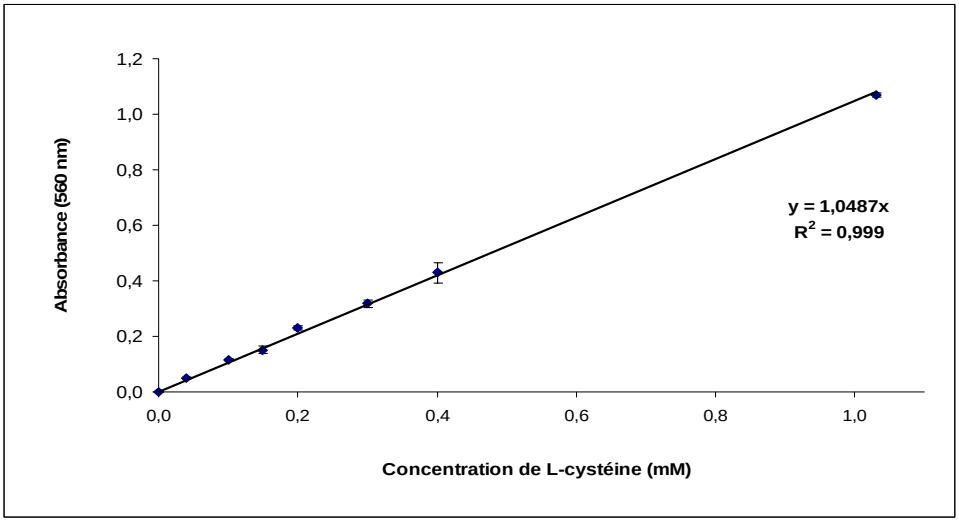


Figure C-6. Gamme étalon pour la quantification de la L-cystéine après réaction à la ninhydrine acide (voir matériels et méthodes).Les valeurs sont la moyenne de trois lectures.

Les résultats montrent que la réponse est linéaire pour des concentrations en cystéine allant de 0,0 à 1,03 mM (figure C-6), avec un coefficient de variation maximal de 8,4 %. En accord avec la littérature, nous n'observons pas d'interférence avec les acides aminés potentiellement présents dans les milieux de culture complexes utilisés, ni avec d'autres composés soufrés (méthionine ou DTT résiduel). De plus, de part sa simplicité de mise en œuvre, cette méthode permet de réaliser plusieurs dosages en un temps réduit (moyenne de 30 dosages par heure).

Nous avons donc utilisé cette méthode pour le dosage de la cystéine lors des essais réalisés dans ce travail.

VIII.2.3.Perte de la cystéine par oxydation en milieu complexe

Lors des premiers essais de quantification de la cystéine résiduelle par la réaction au DTNB, nous avons observé une diminution de la concentration en cystéine par rapport à la concentration initiale ajoutée dans les témoins PDB et BHI (milieux non inoculés mis en agitation). Dans ces témoins sans microorganisme, la cystéine peut avoir subi une réaction d'oxydation ou des réactions secondaires avec les composés du milieu, ces réactions pouvant aussi se produire pendant la congélation des échantillons.

Pour connaître la quantité de cystéine perdue lors de l'agitation et après congélation, nous avons décidé de suivre la perte de cystéine pendant 48 h. Pour cela, nous avons quantifié

la cystéine immédiatement après prélèvement à partir des milieux de culture PDB et BHI enrichis à 1,0 g/l en cystéine et placés sous agitation (90 et 150 rpm). Nous avons suivi aussi la perte de cystéine dans les milieux sans agitation afin d'établir la proportion de cystéine qui réagit directement avec les milieux. Finalement, la quantité de cystéine perdue après 48h de congélation à -20°C a été quantifiée.

L'objectif était de connaître précisément les pertes en cystéine après agitation et après congélation.

Nous observons (figure C-7) que la perte en cystéine est moins rapide et moins importante dans le milieu PDB que dans le milieu BHI dans les conditions d'agitation testées. Ainsi après 12h de suivi cinétique, 8% de la cystéine est perdu dans le milieu PDB sans agitation et à 150 rpm tandis que 17% est perdu dans le milieu BHI dans les mêmes conditions d'agitation. Par ailleurs, la perte en cystéine se poursuivit dans les deux milieux :à 48h de suivi cinétique, une perte maximale de 10% est quantifiée dans le milieu PDB avec et sans agitation. Dans le milieu BHI, la perte en cystéine est de 22% sans agitation et de 28% avec agitation.

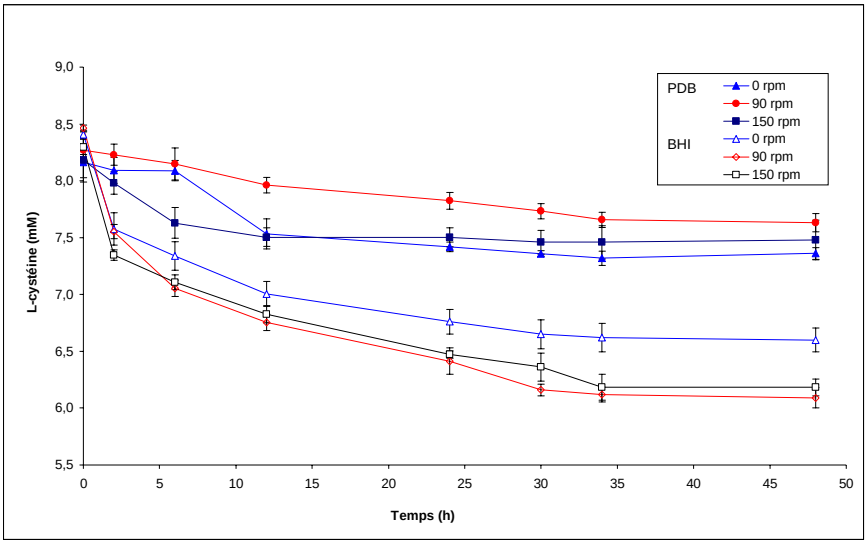


Figure C-7. Cinétique d'oxydation de L-cystéine dans les milieux PDB et BHI pour différentes conditions d'agitation. La L-cystéine résiduelle a été quantifié par la ninhydrine acide. Moyenne de deux mesures indépendantes.

Nous supposons que cette perte serait due à l'oxydation du groupement thiol de la cystéine au-delà du disulfure (cystine), provoquée par l'oxygène dissous dans les deux milieux de culture liquides. En effet, les caractéristiques d'oxydoréduction de l'atome de soufre lui permettent d'avoir plusieurs niveaux d'oxydation. Ainsi, la cystéine peut s'oxyder en acide cystéine sulfinique ($R\text{-}SO_2H$) et en acide cystéique ($R\text{-}SO_3H$) par oxydation de la cystéine en présence d'oxygène et de traces de métaux (tel que le fer ou le cuivre), ou d'autres composés oxydants. Ces réactions sont favorisées en conditions alcalines où le soufre est plus réactif (forme $R\text{-}S^-$), ce qui pourrait expliquer la perte plus importante de cystéine dans le milieu BHI (pH 7,5) par rapport au milieu PDB (pH 5,1). Il faut des réducteurs plus forts que le DTT[1] pour récupérer la cystéine à partir de ces produits d'oxydation. Malgré l'impossibilité de récupérer la cystéine à partir de ces composés, nous n'avons pas développé une nouvelle méthode de dosage de ces formes très oxydées de la cystéine. En effet, il est impossible de savoir, lors des cultures de micro-organismes, quelle part de cystéine sera effectivement transformée en des formes très oxydées car la quantité d'oxygène dissous dans le milieu est probablement très différente dans un milieu non ensemencé (utilisé pour quantifier ces pertes) et ensemencé. Il doit tendre vers zéro dans les conditions de croissance de micro-organismes aérobies (conditions d'agitation douces). Finalement, même si nous ne pouvons pas écarter la perte de cystéine par des réactions parasites (oxydation poussée ou autres réactions de type Strecker ou Maillard) étant donné la richesse en glucose du milieu PDB et la complexité du milieu BHI[2], nous avons considéré lors des dosages de cystéine sur des milieux ensemencés, que, après réduction par le DTT, la différence entre les concentrations en cystéine initiale et finale correspondait à la fraction consommée par les micro-organismes.

Les échantillons du suivi cinétique ont été aliquotés, congelés et conservés à -20° C. Au bout de 48 heures, la cystéine résiduelle a été quantifiée après décongélation à température ambiante. Nous n'avons pas trouvé de différences significatives avant et après congélation, quel que soit le point de cinétique considéré, à l'exception du temps zéro (tableau C-1). Nous pensons que ces résultats indiquent une oxydation incomplète de la cystéine lorsqu'elle a été prélevée à t0. Cette oxydation a donc pu se poursuivre pendant les processus de congélation, de décongélation et d'analyse. Par ailleurs, après 48 h d'agitation, il ne semble plus avoir de

[1] *De test de réduction à l'aide de borohydrure de sodium ($NaBH_4$) ont été réalisés pour récupérer la L-cystéine à partir de ces composés, mais sans succès.*

[2] Nous avons observé lors des tests de criblage la production de traces d'H_2S dans les témoins de milieu BHI mais pas dans ceux de PDB.

processus d'oxydation ; les échantillons prélevés après agitation seraient plus stables durant la congélation. En s'appuyant sur ces résultats, nous avons considéré que la congélation à -20°C avait une effet négligeable sur des échantillons contenant peu d'oxygène dissous, comme dans le cas de nos cultures microbiennes.

En résumé, nous avons constaté que la cystéine réagit dans les milieux de culture testés. La perte associée est plus marquée dans les milieux de culture complexes, comme le BHI, et sous agitation (oxydation poussée). Nous avons aussi montré que la congélation des échantillons à -20°C permettait de conserver convenablement la cystéine résiduelle.

Tableau C-1. Effet de la congélation pendant 48h à -20°C sur la L-cystéine résiduelle dans les milieux PDB et BHI après agitation pendant 48h. Moyenne de deux déterminations indépendantes.

Milieu de culture	Condition d'agitation	Temps d'agitation	Concentration en L-cystéine (mM)	
			Avant congélation	Après congélation
PDB	0 rpm	0h	8,2 ± 0,1	8,0 ± 0,1
		48h	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1
	90 rpm	0h	8,3 ± 0,0	8,1 ± 0,1
		48h	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,1
	150 rpm	0h	8,2 ± 0,2	7,8 ± 0,0
		48h	7,5 ± 0,2	7,1 ± 0,2
BHI	0 rpm	0h	8,4 ± 0,0	8,2 ± 0,0
		48h	6,6 ± 0,1	6,5 ± 0,1
	90 rpm	0h	8,5 ± 0,0	8,0 ± 0,2
		48h	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,1
	150 rpm	0h	8,3 ± 0,1	8,0 ± 0,1
		48h	6,2 ± 0,1	6,0 ± 0,1

IX. CRIBLAGE DES SOUCHES ET PRODUCTION DE COMPOSES SOUFRES VOLATILS DANS DES MILIEUX SYNTHETIQUES ENRICHI EN L-CYSTEINE

"Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulphide production by cheese-ripening microorganisms: The first step towards L-cysteine catabolism"

M. López del Castillo Lozano, R. Tâche, P. Bonnarme, S. Landaud

In press *Journal of Microbiological Methods*

Résumé

Une adaptation pratique de la réaction de bleu de méthylène pour la quantification du sulfure d'hydrogène a été développée pour le criblage des souches microbiennes. Nous proposons l'utilisation de flacons plats fermés, contenant une couche d'agar-zinc au-dessus des cultures liquides, comme système de piège où l'H_2S peut être capturé puis quantifié par la réaction de bleu de méthylène. En utilisant cette méthode quantitative, la capacité à produire de l'H_2S a été étudiée dans plusieurs souches d'affinage des fromages. Notre but était de choisir les souches qui produisaient les quantités les plus élevées d'H_2S comme produit principal du catabolisme de la L-cystéine. Trente-sept souches de levures et de bactéries ont été cultivées avec ou sans L-cystéine. La séparation entre le milieu de croissance et la couche de piégeage de l'H_2S a montré l'efficacité du système : toutes les souches étudiées se sont bien développées et une perte négligeable d'H_2S a été observée pendant les cultures. Les souches ont montré de grandes différences dans leurs possibilités à produire de l'H_2S : les levures ont produit plus d'H_2S que les bactéries, mais dans les deux cas leurs productions ont été souche dépendantes. En outre, le rapport entre la production d'H_2S et la consommation de la L-cystéine a été analysé, ce qui nous a permis de choisir les souches de micro-organismes avec une grande capacité à dégrader la L-cystéine. La production des composés soufrés volatils a été également étudiée. L'effet du pH des milieux de culture et les différences métaboliques entre les souches sont discutés.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Journal of Microbiological Methods 69 (2007) 70–77
Journal of Microbiological Methods
www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: The first step towards L-cysteine catabolism

M. Lopez del Castillo Lozano, R. Tâche, P. Bonnarme, S. Landaud *

Institut National de la Recherche Agronomique, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, CBAI-rue Lucien Brétignère, 78 850 Thiverval Grignon, France

Received 19 October 2006; received in revised form 4 December 2006; accepted 4 December 2006
Available online 23 January 2007

Abstract

A practical adaptation of the methylene blue reaction for hydrogen sulfide quantification was developed to perform microbial selection. Closed plate flasks containing a zinc-agar layer above the liquid microbial culture are proposed as a trap system where the H_2S can be retained and then quantified by the methylene blue reaction. Using this quantitative method, the ability to produce H_2S was studied in several cheese-ripening microorganisms. Our aim was to select strains that produce the highest quantities of H_2S as the main product of L-cysteine catabolism. Thirty seven yeast and bacteria strains were cultivated with or without L-cysteine. The separation between the growth medium and the H_2S trapping layer displayed good performance: all the studied strains grew efficiently and only negligible loss of H_2S was observed during culturing. The strains displayed large differences in their H_2S production capabilities: yeast strains were greater producers of H_2S than bacteria with production strain-related in both cases. Furthermore, the relationship between H_2S production and L-cysteine consumption was analyzed, which made it possible for us to select microorganisms with high capacity in L-cysteine degradation. The production of volatile sulfur compounds was also studied and the possible effect of culture pH and metabolic differences between strains are discussed.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keyword: L-cysteine; Hydrogen sulfide; Volatile sulfur compounds; Screening; Cheese-ripening microorganisms

1. Introduction

Volatile sulfur compounds (VSC) are major flavoring compounds in cheeses and many other fermented foods. They originate mainly from L-methionine catabolism which has been extensively studied in cheese-ripening microorganisms including yeasts (Arfi et al., 2002; Bondar et al., 2005) and bacteria (Bonnarme et al., 2000; Amarita et al., 2004). L-cysteine has a lower concentration than L-methionine in cheese curd (five times lower (Wood et al., 1985)) and probably for this reason has been rather neglected up to now in VSC generation studies. The role of L-cysteine as a potent VSC precursor is, however, well established in some fermented beverages (Hansen and Kielland-Brandt, 1996; Duan et al., 2004; Marchand et al., 2002; Sutherland et al., 2003). In beer or wine production, the excess of L-cysteine in the initial medium leads to increased H_2S formation during fermentation through an L-cysteine desulfhydration mechanism (Lawrence and Cole, 1968). Furthermore, enzymes involved in L-cysteine catabolism have been described in bacteria (Yoshida et al., 2002; Aubel et al., 2002; Auger et al., 2005) with the recurrent production of H_2S.

According to these observations, we decided to develop a screening methodology to evaluate H_2S production from L-cysteine in 37 cheese-ripening microorganisms, including 20 yeast and 17 bacterial strains.

Hydrogen sulfide (H_2S) determination has been done through a large panel of methods, including electrochemical, chromatographic and spectroscopic procedures. Among the spectroscopic detections, methylene blue reaction is the most common approach for H_2S analysis and a number of recent developments

* Corresponding author. Tel.: +33 1 30 81 53 83; fax: +33 1 30 81 55 97.
E-mail address: landaud@grignon.inra.fr (S. Landaud).

0167-7012/$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mimet.2006.12.001

Author's personal copy

Table 1
Yeast and bacterial strains tested in this study

Strains	Reference numbers
Yeasts	
Debaryomyces hansenii (DH)	DH47(8), DH142, DH304
Geotrichum candidum (GC)	GC108[a], GC103[a], GC77[a], GCD, GCG[b]
Kluyveromyces lactis (KL)	KL44(8), KL640[c], KL643[c], KLC15, KLC22
Saccharomyces cerivisiae (SC)	SC42, SC45(3)
Yarrowia lypolytica (YL)	YL200, YL274, YL370, YL136463[c], YLW29[c]
Bacteria	
Arthrobacter spp (AR)	AR7(2), AR225
Arthrobacter arilaitensis (AR)	AR269, AR175[d]
Brevibacterium linens (BL)	BL918[d], BL1939[e], BL 9175[e], BLC308, BLC206, BLC212
Corynebacterium glutamicum (CO)	COD13
Corynebacterium spp (CO)	COC45, COC55, COC74
Micrococcus luteus (ML)	ML790
Staphylococcus equorum (SE)	SE1265
Staphylococcus xylosus (SX)	SXJ870[d]

[a] LMA: Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Caen, France.
[b] Commercial strain (Degussa, La Ferté-sous-Jouarre, France).
[c] CLIB: "Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique", Unité de Microbiologie et Génétique. Moléculaire (INRA-CNRS-INA-PG), Grignon, France.
[d] CNRZ: Centre National de Recherche en Zootechnie, collection de bactéries laitières d'intérêt technologique, INRA Jouy en Josas, France.
[e] ATTC: American Type Culture Collection, LGC Promochem Sarl, Molsheim, France.

have led to substantial improvements in sensitivity, reliability and cheapness (to review see Lawrence et al., 2000).

Few methods have been developed for the direct determination of H_2S production by microorganisms. Due to its high volatility, H_2S is generally trapped in alkaline solutions (pH>10) which can prevent the growth of microorganisms. Consequently, the methods developed usually keep the culture media and trapping solution separated. In this respect, mini-bioreactor-gas collector (Garcia et al., 2003) plates overlaid by specific membrane (Duan et al., 2004) flow analysis combined with spectrophotometric detection (Yuan and Kuriyama, 2000) or a detection tube method (Park and Kim, 2004) have been developed as analytical methods. Nevertheless, no such approach has been used for screening purposes due to complexity and/or expense, even though these methods share good specificity, sensitivity and reliability. Furthermore, in conventional tests for microbial identification where selective media for H_2S detection has been formulated, for example in *Salmonella* spp. detection (Shelef and Tan, 1998), no precise quantification of H_2S has been achieved even though high sensitivity has been obtained.

To evaluate H_2S production from L-cysteine by cheese-ripening microorganisms, a closed system based on an original double layer method was therefore developed and H_2S was quantified *in situ* using the methylene blue reaction. An initial approach to VSC generation from L-cysteine by the most efficient H_2S-producing stains was also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

Twenty yeast and seventeen bacterial strains used in the study (Table 1) were originally isolated from cheeses and belong to our laboratory's own collection (unless otherwise indicated). The microorganisms were stored in Difco-skim milk (BD-Difco, Le Pont de Claix, France) containing 10% glycerol at −80 °C. Yeasts were grown in potato dextrose broth (PDB, BD-Difco) and bacteria in a brain heart infusion broth (BHI, Biokar Diagnostic, Beauvais, France), respectively. Preculturing was carried out in 100 ml flasks containing 20 ml of a medium PDB or BHI inoculated with 200 µl of the strain stock suspension. They were agitated (150 rpm) for 48 h at 25 °C and subsequently used for the inoculation of screening-flasks or cultures where production of VSC was analyzed. In the screening test, 5 ml of PDB or BHI supplemented or not with L-cysteine (1.0 g/l final concentration) were dispensed into the screening-flasks (see below) and inoculated with 200 µl of each preculture strain. The screening-flasks were then incubated at 25 °C and 90 rpm for 48 h. Flasks without inoculation were prepared to take into account the spontaneous degradation of L-cysteine. Each culture was made in triplicate. Apart from the determination of H_2S, the absorbance, dry weight and pH of the cultures were also determined at the beginning and after 48 h.

In addition, cultures for the analysis of VSC were prepared in triplicate: 100 ml of media in 500 ml flask were supplemented or not with L-cysteine (1.0 g l^{-1} final concentration) and inoculated with 200 µl of precultures. After 48 h incubation (150 rpm, 25 °C), 5 ml of each microbial culture were transferred into solid phase microextraction (SPME) vials at 4 °C and stored at −80 °C until analysis.

The purity of each culture was checked by plating the yeasts on Yeast-chloramphenicol-dextrose agar (YGC, BD-Difco) and the bacteria on BHI with amphotericin B (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Initial and residual L-cysteine was quantified using the ninhydrine acid method (Gaitonde, 1967).

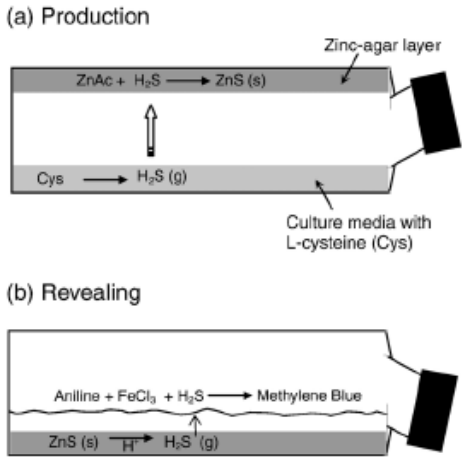


Fig. 1. Trap system for the capture of the H_2S (a) and quantification by the methylene blue synthesis reaction (b). See the text for explanation.

Author's personal copy

The cysteine being spontaneously oxidized to cystine in solution, we quantified the total residual cysteine (cysteine+cystine) using dithiotritol (DTT) to promote the reduction of cystine to cysteine before quantification by the ninhydrine acid method: 500 µl of the sample were mixed with 500 µl of DTT (10 mM prepared in NaOH 1 N) and left in darkness for 30 min.

2.2. Screening procedure

The method of Fogo (Fogo and Popowsky, 1949) was adapted to screen H_2S production. Setting a zinc-agar layer inside 50 ml tissue culture flasks (Greiner Bio-One, Elancourt, France) facilitated recovery of the volatile H_2S produced from L-cysteine by the microorganisms tested (Fig. 1). The H_2S was then quantified with an optimized aniline solution using the methylene blue reaction. All the chemical compounds were of the highest purity available and were purchased from Sigma-Aldrich or Prolabo (Fontenay sur Bois, France).

2.2.1. Screening-flask preparation

All solutions were sterilized by filtration (0.2 µm sterile filter — Sartorius, Goettingen, Germany) except agar, which was sterilized (20 min at 120 °C) and kept at 60 °C until utilization. The zinc-agar solution was prepared by adding 20 ml of zinc acetate (1% w/v) and 4.5 ml of NaOH (12% w/v) to 100 ml of agar (1% w/v, Biokar Diagnostic). The solution was then stirred gently until complete homogeneity was reached. Five milliliters of this solution were then immediately poured into each flask. The flasks were then left horizontally until solidification. Once the zinc-agar layer had solidified, the flasks were turned up and were ready for screening tests.

2.2.2. Methylene blue reaction

The H_2S produced from L-cysteine degradation was trapped as zinc sulfide in the zinc-agar layer (Fig. 1a). After removing the media, the flasks were turned down (Fig. 1b) and the H_2S was liberated and quantified *in situ* using the methylene blue reaction. However, in preliminary tests we had found that the reported aniline concentration (7.3 mM) was not high enough to make it possible to quantify the highest H_2S production in our trapping system. We therefore used a more concentrated solution of aniline (×8). Hence, 2 ml of 4-amino-*N*,*N*-dimethylaniline (58 mM in HCl 6 N) were added on the agar layer and left for 5 to 10 min. 400 µl iron chloride reagent (23 mM in HCl 1.2 M) were then added and left for another 20 min. In order to reduce the interference due to the residual aniline, the solution was diluted (1:8) with water before the absorbance was measured at 670 nm with a UV–Visible Shimadzu UV-2100 (Kyoto, Japan) spectrophotometer. A blank was created the same way without H_2S addition. The sulfide concentration was calculated against a standard curve (0–80 µg ml^{-1}) of sodium sulfide (Na_2S) prepared following the same procedure.

2.3. Volatile sulfur compounds extraction and analysis

VSC extraction and analysis were carried out using an automatic SPME method coupled to a gas chromatograph (HP 6890, Agilent) and a mass spectrophotometry detector (HP 6890A quadrupole mass spectrometer, Agilent). Defrosted samples (5 ml) kept at 5 °C were pre-incubated for 5 min at 30 °C with agitation at 500 rpm. The extraction was carried out with a 75 µm carboxen-PDMS fiber (Supelco, Bellefonte, USA) for 45 min at 30°C and equal agitation conditions. After desorption at 250 °C for 60 s in the chromatograph injection port (helium flow: 30 ml/min), the volatiles were transferred onto a non-polar capillary column (HP-5 MS, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) swept by helium at a constant flow rate (1.6 ml/min). The compounds were then separated using the following temperature program. First, the temperature was maintained at 5 °C for 8 min. Subsequently, the temperature reached 75 °C with an increment of 5 °C/min. The temperature was then raised to 150 °C with an increment of 10 °C. Separated compounds were detected with an MS detector. Data were collected in the range of 29–300 atomic mass units at a rate of 1.68 scans/s. Volatile compounds were identified by comparing their mass spectra with references (Wiley Library, Agilent Technologies). The concentration of sulfur compounds was determinated using a calibrated standard of dimethyldisulphide (DMDS). Known amounts of reference compound were added at various final concentrations (0–100 ppb), and for each of the concentrations, triplicate samples were analyzed. Linear regression was then performed to accurately determine the concentration of DMDS in each culture. The concentrations of dimethyltrisulphide (DMTS), dimethyltetrasulphide (DMQS) and *S*-methyl thioacetate (MTA) were extrapolated using DMDS calibration.

2.4. Data analysis

Data were analyzed using Statistica software (Statsoft, France). Values are presented as means of three replicates ± standard deviations. When capacities to produce H_2S were investigated, data were submitted to the one-way analysis of variance. LSD-Fisher tests ($p \leq 0.0.5$) were applied to the individual variables to compare means and to assess whether their difference was significant.

3. Results

3.1. Improvement of the screening method

Preliminary tests based on methods previously described for the detection of H_2S (precipitation with iron or paper stick saturated with plumb) did not give satisfactory results when applied to our culture conditions: the instability of the sulfur complexes formed inhibited accurate quantification of H_2S (data not shown). On the other hand, the reaction of methylene blue with H_2S was simple to perform, specific and stable. Hence, a standard curve of hydrogen sulfide was prepared (as described in Section 2.2.2). The lower detection limit (LDL) was calculated ($\epsilon \leq 0.05$) using the formula LLD = SD*3.28, where SD is the standard deviation of measures at the minimal concentration employed in the standard curve (Rudy, 1989). The LDL was thus set at 0.2 µg H_2S/ml (6 µM). This LDL is adequate for microbial selection because it corresponds to the

Author's personal copy

degradation of only 0.08% of the added cysteine. In other methods, where hydrogen sulfide was detected or quantified, lower detection limits were obtained (less than 0.5 µM, (Garcia et al., 2003; Yuan and Kuriyama, 2000)) but with a restricted range of analysis (less than 100 µM). In our screening method, a large range of quantification was absolutely necessary because the production of H_2S can vary extensively among the studied strains. Hence, aniline concentration was optimized to improve accuracy; methylene blue reaction could indeed be limited by this reagent whose theoretical concentration has to be in the molecular proportion 2:1 with H_2S. Increased concentrations were tested for a maximal concentration of fixed H_2S (2 mM) corresponding to 25% of cysteine degradation. The optimal concentration of aniline was obtained at 58 mM, eight times higher than in the reported method (Fogo and Popowsky, 1949). Under these conditions, linearity was good up to 68 µg H_2S ml^{-1} (2 mM) (regression coefficient=0.9996).

It was therefore possible to perform reliable microbial selection and the production of H_2S by 37 cheese-ripening yeasts and bacteria was tested.

3.2. Production of hydrogen sulfide

Microbial growth was identical in the presence or absence of L-cysteine, regardless of the strain used.

Final concentrations (dry weight) were in the range of 3 to 3.5 g/L for yeasts or bacteria.

In the following sections the microbial production of H_2S or VSC will therefore be expressed in concentrations (µg/ml or µM).

3.2.1. Bacterial production of H_2S

Bacterial strains produced H_2S at trace levels (<2.0 µg H_2S ml^{-1}) in BHI with no addition of L-cysteine. This H_2S was probably produced from the initial L-cysteine (3.6 µg ml^{-1}) contained in this complex medium.

Table 2
Sulfide production (µg H_2S/ml) by bacterial strains in BHI culture media without and with cysteine (1.0 g l^{-1})

Strains	H_2S (µg ml^{-1}) Without cysteine	With cysteine
AR175	$0.15\pm0.01^{a,*}$	13.60 ± 1.14^{d}
AR225	0.60 ± 0.12^{a}	12.07 ± 2.59^{c}
AR269	0.40 ± 0.03^{a}	21.07 ± 0.72^{h}
AR7(2)	0.41 ± 0.01^{a}	22.58 ± 2.73^{i}
BL1939	0.11 ± 0.02^{a}	0.000 ± 0.00^{a}
BL9175	0.75 ± 0.09^{a}	17.31 ± 0.99^{f}
BL918	0.97 ± 0.08^{a}	15.36 ± 0.98^{e}
BLC206	0.28 ± 0.01^{a}	0.84 ± 0.04^{a}
BLC212	0.04 ± 0.00^{a}	0.71 ± 0.02^{a}
BLC308	0.22 ± 0.02^{a}	$14.64\pm0.68^{d,e}$
COC45	0.00 ± 0.00^{a}	0.55 ± 0.05^{a}
COC55	0.62 ± 0.07^{a}	4.45 ± 0.95^{b}
COC74	0.52 ± 0.01^{a}	0.39 ± 0.02^{a}
COD13	0.05 ± 0.01^{a}	19.46 ± 1.00^{g}
ML790	0.05 ± 0.00^{a}	0.64 ± 0.04^{a}
ST1265	0.05 ± 0.00^{a}	0.000 ± 0.00^{a}
SXJ870	0.05 ± 0.01^{a}	0.63 ± 0.02^{a}

*An assessment of significantly different means was performed according to the LSD-Fisher test ($\alpha \leq 0.05$); means without common superscript were significantly different.

With the exception of ST1265 and BL1939, all the bacteria produced H_2S in BHI with L-cysteine added (1.0 g l^{-1}) albeit in significantly different quantities ($p \leq 0.05$) (Table 2): AR269 (21.07 µg $ml^{-1}\pm0.72$), AR7 (2) (22.58 µg $ml^{-1}\pm2.74$), BLC9175 (17.31 µg $ml^{-1}\pm0.99$), BLC918 (15.36 µg $ml^{-1}\pm0.98$) and COD13 (19.46 µg $ml^{-1}\pm1.00$) were the highest producers of H_2S.

Eight strains (more than 45%) did not produce hydrogen sulfide or did so at very low levels. The other nine strains displayed major differences with respect to H_2S production since they belong to six statistically different groups. Nevertheless, except for the COC55 strain, the other eight strains produced high levels of H_2S (12 to 22.5 µg/ml). Within the same species, for example *Brevibacterium linens*, the capacity to produce H_2S is, moreover, highly variable (three statistically different groups for six studied strains).

Table 3
Sulfide production (µg H_2S/ml) by yeast strains in PDB culture media without and with cysteine (1.0 g l^{-1})

Strains	H_2S (µg ml^{-1}) Without cysteine	With cysteine
DH142	$0.00\pm0.000^{a,*}$	$0.40\pm0.01^{a,b,c}$
DH304	0.00 ± 0.001^{a}	$1.01\pm0.08^{a,b,c,d}$
DH47(8)	0.02 ± 0.01^{a}	42.77 ± 0.99^{j}
GC103	0.04 ± 0.02^{a}	$1.94\pm0.05^{c,d,e}$
GC108	0.00 ± 0.00^{a}	$1.99\pm0.09^{c,d,e}$
GC77	0.00 ± 0.00^{a}	8.78 ± 1.78^{g}
GCD	0.03 ± 0.00^{a}	$2.51\pm1.04^{d,e,f}$
GCG	$0.06\pm0.02^{b,c,d,e}$	$1.88\pm0.09^{b,c,d,e}$
KL448	$0.18\pm0.03^{a,b}$	7.19 ± 1.84^{g}
KL640	0.07 ± 0.00^{a}	21.17 ± 3.86^{i}
KL643	0.03 ± 0.01^{a}	22.09 ± 2.19^{i}
KLC15	0.107 ± 0.00^{a}	$1.65\pm0.90^{a,b,c,d,e}$
KLC22	0.000 ± 0.00^{a}	$1.36\pm0.85^{a,b,c,d}$
SC42	0.09 ± 0.01^{a}	$1.22\pm0.01^{a,b,c,d}$
SC45(3)	0.01 ± 0.01^{a}	50.69 ± 2.88^{k}
YL136364	0.02 ± 0.00^{a}	$2.08\pm0.96^{c,d,e}$
YL200	0.07 ± 0.00^{a}	53.00 ± 1.37^{l}
YL274	0.01 ± 0.00^{a}	17.61 ± 0.13^{h}
YL370	$0.17\pm0.02^{a,b}$	3.88 ± 1.28^{f}
YLW29	0.05 ± 0.00^{a}	$3.20\pm1.92^{e,f}$

*An assessment of significantly different means was performed according to the LSD-Fisher test ($\alpha \leq 0.05$) (Statistica sofware version 6.1, Statsoft, France); means without common superscript were significantly different.

3.2.2. Yeasts production of H_2S

Although PDB contains a low concentration of L-cysteine (6.0 µg ml^{-1}), yeast strains did not produce detectable H_2S in this medium. Nevertheless, in PDB supplemented with L-cysteine (1.0 g l^{-1}), all of the 20 yeast strains produced H_2S and their production was also significantly ($p \leq 0.05$) strain dependent (Table 3): KL640 (21.17 µg $ml^{-1}\pm1.93$), KL643 (22.09 µg $ml^{-1}\pm1.09$), SC45(3) (50.69 µg $ml^{-1}\pm2.88$), DH47(8) (42.77 µg $ml^{-1}\pm0.99$) and YL200 (53.00 µg $ml^{-1}\pm1.37$) were the most efficient H_2S-producers.

Ten strains (50%) produced hydrogen sulfide at low levels, ranging from 0.4 to 2.5 µg/ml. The other strains displayed

Author's personal copy

significant differences concerning H_2S production, forming eight statistically different groups. Furthermore, within the same species such as *Yarrowia lipolytica*, the production of H_2S was highly variable (four statistically different groups for five studied strains).

We should also underline that yeast strains were greater producers of H_2S than bacteria: the maximal production obtained with the SC45(3) strain (50.69 μg ml^{-1} ± 2.88) was two times higher than with the AR7(2) one (22.58 μg ml^{-1} ± 2.74).

3.3. L-cysteine consumption versus H_2S production

Our aim was to select cheese-ripening microorganisms with improved capacities concerning L-cysteine degradation. Consequently, we developed and used a method based on H_2S production as the main product of L-cysteine catabolism. To validate this approach, we quantified the L-cysteine consumption of each strain in our conditions.

3.3.1. L-cysteine consumption by bacterial strains

As shown in Fig. 2a, the relationship between L-cysteine consumption and H_2S production was linear. Our strategy for bacteria selection was therefore validated. The following bacterial strains were then selected for VSC analysis and further studies: AR7 (2), BL9175, BL918 and COD13. We should point out that the two *B. linens* strains were also selected due to their ability to degrade L-methionine as previously described (Bonnarme et al., 2000; Amarita et al., 2004).

We must, however, recognize that the yield (produced H_2S/consumed cysteine) is very low (0.17 mM/mM), which can perhaps be explained by a significant dissolution of H_2S in the media at the neutral pH of BHI (pH average 7.37±0.10 after 48 h incubation). Furthermore, other metabolic pathways could be involved with no H_2S generation (see the Discussion section). Finally, loss of H_2S during culturing was not considered significant because the screening-flasks were hermetically sealed and no typical H_2S odor was perceived during the experiments (detection threshold of H_2S<5 ppb in water (Gijs et al., 2003)).

3.3.2. L-cysteine consumption by yeast strains

The relationship between cysteine consumption and H_2S production displays two yeast behaviors (Fig. 2b): a linear relation for the ten yeast strains (group 1), while the others strains produced no H_2S even if L-cysteine was consumed (group 2). Our strategy for yeast selection was consequently partially validated.

We focused on group 1 and the following yeast strains were selected for VSC analyses and further studies: YL200, SC 45 (3), DH47 (8), KL640. Strain GC77 was also selected (group 2) because this yeast specie has been extensively studied in our laboratory with respect to methionine catabolism.

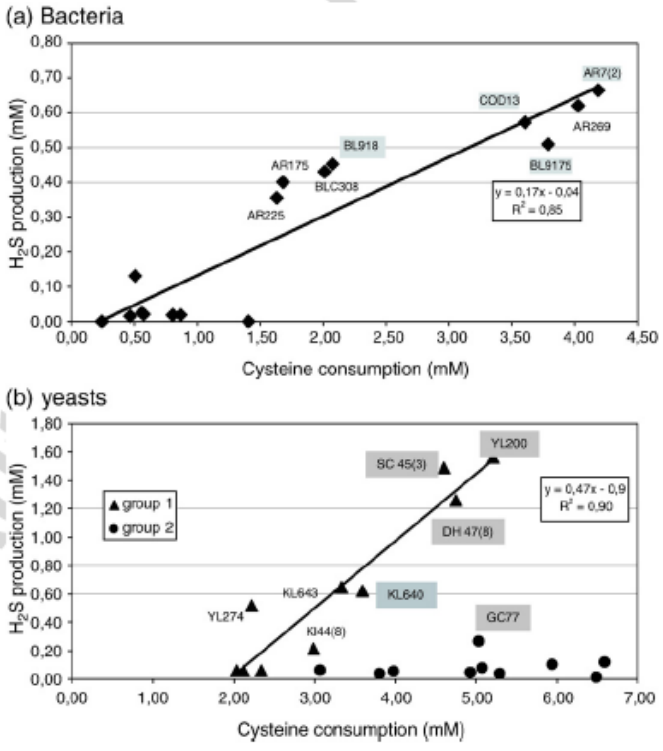


Fig. 2. Relationship between L-cysteine consumption and H_2S production: for studied bacteria: (a); for studied yeasts: (b); the yeasts have been separated in two groups and the correlation coefficient for the highest H_2S producers (group 1) was calculated.

The yield (produced H_2S/consumed cysteine −0.47 mM/mM) is 2.8 higher than that of the bacterial strain. This difference can be partially explained by a lower dissolution of H_2S in the PDB media (pH average 4.42±0.35, after 48 h incubation) than in BHI.

3.4. Volatile sulfur compounds production

The selection of nine cheese-ripening microorganisms (4 bacteria and 5 yeasts) with high L-cysteine degradation capability allowed us to carry out our first study concerning VSC production from L-cysteine in cheese-ripening microorganisms.

Table 4 shows the main VSC detected and quantified in the 4 bacterial strains with and without cysteine. They were no different from the VSC generally found in cultures implemented with L-methionine.

In culture media with no addition of L-cysteine, DMDS was the major compound produced, whereas MTA was produced mainly by BL918 and to a lesser extent by AR7(2).

By adding L-cysteine to the culture media, we observed at least a 50% decrease in BL918, BL9175 and CoD13 DMDS production. MTA produced by BL918 was reduced by 85%. As far as the other two polysulfides, DMTS and DMQS, are concerned, their concentrations increased (~2 times) in BL9175 while they remained stable in BL918.

On the other hand, DMDS and MTA increased 20 and 10 times respectively in AR7(2) culture with added cysteine.

Moreover, in the AR7 (2) and BL918 cultures, traces of *S*-methyl-3-methyl thiobutanoate, *S*-ethyl-3-methyl thiobutanoate, 2-methylthio-2-methyl propane and 2-methylthio-2-methyl butane were detected. These compounds, such as DMQS, are not generally found in cheese-ripening bacterial cultures supplemented with L-methionine and could have resulted from L-cysteine catabolism.

Concerning the selected yeasts, VSC were not detected in cultures without cysteine, except for GC77 that produced detectable levels of DMDS (5.3 ppb±1.25). Furthermore, DMDS and MTA were the sole sulfur compounds detected in yeast cultures with L-cysteine but in low quantities and for few strains: MTA was detected in DH47(8) culture (23.0 ppb±5.9) and DMDS in the KL640 culture (4.1 ppb±0.33). As observed in *B. linens* and COD13 cultures, DMDS was lower in GC77 culture implemented with L-cysteine.

Hence, even if yeast strains demonstrated high capabilities as far as H_2S production is concerned, it was not related to their production of VSC.

Finally, we emphasize the absence of any direct relationship between H_2S and VSC production by the studied yeasts and bacteria in our culture conditions.

Table 4
Volatile sulfur compounds (VSC) produced by selected bacteria strains in BHI culture media without or with cysteine (1.0 g l^{-1})

Bacteria	Condition	Polysulfides			Thioester
		DMDS (ppb)	DMTS (ppb)[a]	DMQS (ppb)[a]	MTA (ppb)[a]
AR7(2)	Without cysteine	62.1±8.8	n.d	n.d	7.6±1.2
	With cysteine	1382.1±385.2	n.d	n.d	77.9±4.2
BL918	Without cysteine	699.9±79.5	41.7±18.9	0.8±0.6	171.8±10.5
	With cysteine	317.4±57.1	37.6±17.7	0.8±0.6	26.5±3.1
BL9175	Without cysteine	754.2±33.5	54.1±14.2	0.8±0.2	n.d
	With cysteine	408.6±50.7	80.0±9.3	1.2±0.2	n.d
COD13	Without cysteine	26.1±5.1	n.d	n.d	n.d
	With cysteine	13.6±7.8	n.d	n.d	n.d

n.d. not detected.
[a] DMTS, DMQS and MTA were expressed in ppb (µg/kg) relative to DMDS concentration.

4. Discussion

In the present study, we have adapted a trap system accurately quantify H_2S production during microbial growth. This system made it possible to select nine cheese-ripening microorganisms from among the 37 studied on the basis of their capacity to produce hydrogen sulfide.

From the studied yeasts, the highest producer of H_2S was a strain of *S. cerevisiae*. Its level of H_2S production (~50 µg H_2S/ml) was 300 times higher than the highest level published for *S. cerevisiae* brewing yeast (0.15 µg H_2S/ml, (Park and Kim, 2004)). It is well-known that the capacity to produce H_2S is strain dependant, even if the composition of the culture media has to be taken into account (Park and Kim, 2004).

We also wish to point out that H_2S production was not homogeneous between different genera of yeasts or between strains of the same species. Thus, only one strain of *Debaryomyces hansenii* DH47(8), two strains of *Kluyveromyces lactis* (KL640 and KL643) and two strains of *Yarrowia lypolytica* (YL200 and YL274) produced high amounts of H_2S in culture with L-cysteine.

Considering the four *Geotrichum candidum* strains, only GC77 displayed a high level of L-cysteine consumption with an intermediate production of H_2S (8.78 H_2S µg/ml±1.78). We decided to select this strain for further studies because it is well-known for VSC production during ripening (Arfi et al., 2003).

From among the bacteria tested, the *Arthrobacter* species presented a more homogeneous H_2S production pattern than the other bacterial genera. Thus, four strains of *Arthrobacter* (AR7 (2), AR225, AR269, AR923), three strains of *B. linens* (BL918, BL9175, BLC308) and two strains of *Corynebacterium* (COC55 and COD13) produced high levels of H_2S in cultures implemented with L-cysteine. The selected genera *Brevibacterium* and *Arthrobacter* are known to contribute significantly to VSC production during ripening (Arfi et al., 2003; Bloes-Breton and Bergère, 1997).

We would emphasize that catabolic capabilities are often strongly strain dependant. This result points out the difficulty or impossibility of extrapolating the metabolic behavior of one selected strain to other strains of the same specie.

Considering the relationship between L-cysteine consumption and H_2S production, we can hypothesize that the direct degradation of L-cysteine by γ-elimination is perhaps not the

Author's personal copy

only pathway: among the studied yeasts, some strains actively consumed L-cysteine without producing H_2S. As a matter of fact, a transamination step could be involved leading to mercapto-pyruvate. Furthermore, the chemical degradation of mercapto-pyruvate could lead to H_2S and pyruvate but it could also be reduced to the corresponding aldehyde (mercapto-ethanal) as described in the model yeast *S. cerevisiae*. Furthermore, the trans-sulfuration pathway and glutathion synthesis cannot be ruled out, especially in eukaryotic cells. Moreover, when the studied strains produce H_2S, they also consume L-cysteine. Consequently, our selection strategy was validated as an improved screening method.

In addition, the pH media might explain the greater production of H_2S in yeast cultures with respect to bacteria. Depending on environmental pH, H_2S could be present in three forms: non-ionized (H_2S), partially ionized (HS^-) or totally ionized (S_2^-). The non-ionized form of sulfide (H_2S) is the most volatile form and is the main form at acid pH ($pH \leq 6$). It is then possible that the acid pH of yeast cultures (pH average 4.42 ± 0.35) allowed a higher level of quantification of H_2S (volatile form) than in the culture of bacteria (pH average 7.37 ± 0.10), even if the total hydrogen sulfide (three forms) was produced in the same range in both cultures. This situation could explain the higher yield (cysteine consumed/H_2S produced) obtained for yeasts (0.47 mM/mM) than bacteria (0.17 mM/mM). Nevertheless, the comparison within bacteria or yeasts is valid because the pH was identical in all the bacterial (pH ~7.4) and yeast cultures (pH ~4.5).

Results concerning VSC production were quite surprising as the main VSC detected were not original and they have generally been reported in L-methionine-enriched cultures. Furthermore, in most of the strains, VSC production was lowered in the presence of L-cysteine and was not correlated with H_2S production. Considering these results, we could hypothesize that L-methionine concentration (0.13 mg ml^{-1}) in yeast media (PDB) is probably too low to promote VSC production by the selected yeast. Only GC77 was capable of producing DMDS, confirming its high capacity for L-methionine degradation. With added L-cysteine, MTA and DMDS were produced by KL640 and DH47(8). These compounds are known to be products of L-methionine catabolism and they could therefore indicate the biosynthesis of L-methionine from L-cysteine (trans-sulfuration like mechanism) in these yeasts strains. The trans-sulfuration pathway of L-cysteine towards L-methionine has already been described in prokaryotes and eukaryotes (Soda, 1987; Hwang et al., 2002; Griffith, 1987).

On the other hand, L-methionine concentration (0.2 mg ml^{-1}) in bacterial media (BHI) seems to be sufficient to allow the production of DMDS and MTA without addition of L-cysteine. With added L-cysteine, their production was strongly reduced, except in AR7(2).

The decrease in the biosynthesis of L-methionine catabolism products might be explained by an inhibition of enzymes involved in L-methionine catabolism by L-cysteine. As a matter of fact, the inhibition of cystathionine-γ-lyase by L-cysteine *in vitro* has been reported (Dias and Weimer, 1998). Apparently, AR7(2) did not undergo such inhibition in our work.

Finally, in bacteria we observed that the production of the polysulfides DMTS and DMQS were maintained or increased in media with added L-cysteine, whereas DMDS concentrations were strongly decreased. The presence of a highly reactive ionic form of H_2S (mainly HS^-), due to BHI neutral pH, could promote the production of DMTS and DMQS by activating methanethiol and/or DMDS, even if the DMDS concentration was lowered. Such activation has already been demonstrated in model solutions (Chin and Lindsay, 1994). It is important to notice that DMTS and DMQS possess very low sensorial thresholds (<0.1 ppb, (Soltoft, 1988)) and could consequently modify the global aroma due to minute variations in their concentration.

In conclusion, our results show the tight relationship between L-cysteine and L-methionine concerning their catabolism, their likely inter-conversion and concomitant VSC production. Furthermore, due to its strong reactivity H_2S could modify the composition and/or concentration of sulfur compounds produced by microbial activities. These results underline the possible role of L-cysteine on affecting the aromatic quality of cheese and give us valuable incentive to carry on with the study of cysteine in the cheese-making context.

Acknowledgement

M. Lopez del Castillo is grateful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (National Council of Science and Technology, Mexico) for a PhD scholarship.

References

Amarita, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J., Bonnarme, P., 2004. Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-γ-lyase in *Brevibacterium linens*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7348–7354.

Arfi, K., Spinnler, H.E., Tache, R., Bonnarme, P., 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 503–510.

Arfi, K., Amarita, F., Spinnler, H.E., Bonnarme, P., 2003. Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. J. Biotechnol. 105, 245–253.

Aubel, D., Germond, J.A., Gilbert, C., Atlan, D., 2002. Isolation of the patC gene encoding the cystathionine β-lyase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and molecular analysis of inter-strain variability in enzyme biosynthesis. Microbiology 148, 2029–2036.

Auger, S., Gomez, M.P., Danchin, A., Martin-Verstraete, I., 2005. The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase. Biochimie 87, 231–238.

Bloes-Breton, S., Bergère, J.L., 1997. Production de composés soufrés volatils par des *Micrococcaceae* et des bactéries corynéformes d'origine fromagère. Lait 77, 543–559.

Bondar, D.C., Beckerich, J.M., Bonnarme, P., 2005. Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4585–4591.

Bonnarme, P., Psoni, L., Spinnler, H.E., 2000. Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5514–5517.

Chin, H.W., Lindsay, R.C., 1994. Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. Food Chem. 49, 387–392.

Dias, B., Weimer, B., 1998. Convertion of methionine to thiols by *Lactococci*, *Lactobacilli*, and *Brevibacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3320–3326.

Author's personal copy

Duan, W., Roddick, F.A., Higgins, V.J., Rogers, P.J., 2004. A parallel analysis of H_2S and SO_2 formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. J. Am. Soc. Brew. Chem. 62, 35–41.

Fogo, J.K., Popowsky, M., 1949. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide: methylene blue method. Anal. Chem. 21, 732–734.

Gaitonde, M.K., 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Biochem. J. 104, 627–633.

Garcia, A.H., Vazquez, E.P., Campos, J.M., 2003. Minibioreactor-gas collector for determining bacteria-produced hydrogen sulphide. Electron. J. Biotechnol. 6, 223–232.

Gijs, L., Vermeulen, C., Collin, S., 2003. Review-Occurence et voies de formation des arômes soufrés dans la bière. 1. les sulfures et les polysulfures. Cerevisia 28, 37–46.

Griffith, O.W., 1987. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. Methods Enzymol. 143, 366–376.

Hansen, J., Kielland-Brandt, M.C., 1996. Modification of biochemical pathways in industrial yeast. J. Biotechnol. 49, 1–12.

Hwang, B.J., Yeom, H.J., Kim, Y., Lee, H.-S., 2002. *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. J. Bacteriol. 184, 1277–1286.

Lawrence, W.C., Cole, E.R., 1968. Yeast sulphur metabolism and the formation of hydrogen sulphide in brewery fermentations. Wallerstein Commun. 21, 95–113.

Lawrence, N.S., Davis, J., Compton, R.G., 2000. Analytical strategies for the detection of sulfide: a review. Talanta 52, 771–784.

Marchand, S., de Revel, G., Vercauteren, J., Bertrand, A., 2002. Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine. J. Agric. Food Chem. 50, 6160–6164.

Park, S.K., Kim, J.Y., 2004. New development for measuring hydrogen sulfide during brewing —preliminary data. Tech. Q.-Master Brew. Assoc. Am. 41, 310–316.

Rudy, J.L., 1989. Determination of the lower limit of detection [Letter]. Clin. Chem. 35, 2152–2153.

Shelef, L.A., Tan, W., 1998. Automated detection of hydrogen sulfide release from thiosulfate by *Salmonella* spp. J. Food Prot. 61, 620–622.

Soda, K., 1987. Microbial sulfur amino acids: and overview. Methods Enzymol. 143, 453–459.

Soltoft, M., 1988. Flavour active sulphur compounds. Brygmesteren 2, 18–24.

Sutherland, C.M., Henschke, P.A., Langridge, P., Barros-Lopes, M., 2003. Subunit and cofactor binding of *Saccharomyces cerevisiae* sulfite reductase — towards developing wine yeast with lowered ability to produce hydrogen sulfide. Aust. J. Grape Wine Res. 9, 186–193.

Wood, A.F., Aston, J.W., Douglas, G.K., 1985. The determination of free aminoacids in cheese by capillary column gas liquid chromatography. Aust. J. Dairy Technol. 40, 166–169.

Yuan, Y.Y., Kuriyama, H., 2000. Determination of hydrogen sulfide in a yeast culture solution by flow analysis utilising methylene blue spectrophotometric detection. Biotechnol. Lett. 22, 795–799.

Yoshida, Y., Nakano, Y., Amano, A., Yoshimura, M., Fukamachi, H., Oho, T., Koga, T., 2002. lcd from *Streptococcus anginosus* encodes a C–S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades l-cysteine. Microbiology 148, 3961–3970.

Author's personal copy

X. EFFET DE LA CYSTEINE SUR LA PRODUCTION DE CSV DANS DES MILIEUX ENRICHIS EN METHIONINE ET EN CYSTEINE

Nous avons vu dans la section précédente que l'H_2S est le principal produit du catabolisme de la L-cystéine et que d'autres CSV ne sont produits qu'en faibles concentrations. Nous avons aussi avancé l'hypothèse que la faible concentration de la L-méthionine dans les milieux de cultures en était la principale source. Par ailleurs, lorsque la L-cystéine a été ajoutée dans les cultures de bactéries, il semblait y avoir différents effets sur la génération des CSV selon la souche concernée.

Sur la base de ces observations, nous avons vérifié quel était le comportement des souches sélectionnées lors de cultures dans de conditions non limitantes en L-cystéine et L-méthionine. Les résultats de cette étude sont présentés séparément pour les bactéries et les levures.

Ces résultats ont été soumis sous forme de deux articles. Ils sont en cours d'évaluation.

"Effect of cysteine addition on volatile sulphur compounds production by cheese-ripening bacteria"
M. López del Castillo-Lozano, S. Mansour, R. Tâche, P. Bonnarme, S. Landaud
Soumis à *International Journal of Food Microbiology*

"Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures".
M. López del Castillo-Lozano, A. Delile, H.E. Spinnler, P. Bonnarme, S. Landaud
Acepté pour sa publication dans *Applied Microbiology and Biotechnology*
(DOI 10.1007/s00253-007-0571-3)

X.1. ETUDE CHEZ LES BACTERIES SELECTIONEES

Dans nos premiers résultats concernant la production de CSV par les bactéries sélectionnées, nous avons observé que la concentration totale en CSV était plus faible dans les cultures enrichies en cystéine, par rapport aux cultures sans enrichissement. Par ailleurs, aucun composé original n'avait été identifié : ils étaient tous identiques à ceux produits à partir de la méthionine. Cependant, les proportions relatives de ces CSV produits étaient modifiées par l'ajout de cystéine. Nous avons donc décidé d'étudier plus en détail cet effet chez les bactéries sélectionnées.

Pour ce faire, nous avons enrichi les milieux de culture avec de la cystéine (8,25 mM, 1,0 gl^{-1}), de la méthionine (6,67 mM, 1,0 gl^{-1}) ou avec des mélanges de méthionine-cystéine. Dans ce dernier cas, la concentration en méthionine a été maintenue à 6,67 mM tandis que deux concentrations de cystéine ont été utilisées : 8,25 mM (1,0 gl^{-1}) et 1,65 mM (0,2 gl^{-1}). Les bactéries étudiées sont celles sélectionnées dans la partie précédente de notre travail : *Arthrobacter spp* 7(2) (AR7(2)), *Brevibacterium linens* CNRZ918 (BL918), *Brevibacterium. aurantiacum* ATCC9175 (BL9175) et *Corynebacterium glutamicum* COD13 (COD13).

Les résultats concernant les bactéries seront présentés dans deux parties distinctes. La première partie concerne les résultats de BL9175 et COD13, alors que les résultats concernant AR7(2) et BL918 seront abordés dans une deuxième partie. Cette séparation s'est faite sur la base des CSV produits : BL9175 et COD13 ne produisent que des polysulfures, tandis que AR7(2) et BL918 produisent une plus grande variété de composés soufrés, allant des polysulfures aux thioesters.

X.1.1. Etude de B. aurantiacum ATCC 9175 et C. glutamicum COD13

X.1.1.1. Croissance des bactéries

Les croissances de BL9175 et COD13 ont été déterminées par la mesure du poids sec après 48h de culture. Aucune différence significative n'est observée entre ces deux bactéries et entre les conditions de cultures appliquées (moyenne de 3,45 ± 0,27 gl^{-1}). Le pH des cultures à 48h est de 8,19 ± 0,19. Les résultats présentés dans les parties suivantes seront donc exprimés en concentration (gl^{-1}) et non pas en consommations et productions spécifiques.

X.1.1.2. Effet de l'addition de cystéine sur la production totale de CSV

BL9175 et COD13 produisent de très faibles concentrations en CSV dans les milieux témoins (non enrichis) ou enrichis uniquement en cystéine. Dans les milieux témoins, BL9175 produit 1,6 ppm de CSV tandis que COD13 ne produit que des traces (≤ 0,05 ppm). L'addition de cystéine (1,0 gl^{-1}) provoque une diminution des CSV produits par ces deux bactéries. De plus, ces composés sont les produits principaux de dégradation de la méthionine. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que, dans le cas des cultures témoins et avec ajout de cystéine seule, les CSV sont générés à partir de la méthionine contenue dans le milieu BHI (2,2 mg/ml de méthionine). La production de CSV étant moindre en présence de cystéine, nous pouvons penser que l'ajout de cystéine limite la dégradation de la méthionine naturellement présente dans le milieu BHI.

Lors de l'addition de méthionine, la concentration en CSV augmente fortement pour BL9175 (11,85 ppm) et dans une moindre mesure pour COD13 (0,26 ppm) (tableau C-2). Par ailleurs, lorsque les milieux de culture sont enrichis avec un mélange méthionine/cystéine, la production totale de CSV augmente encore de 30% chez BL9175. Pour COD13, la production de CSV reste faible, sans différence significative entre les trois conditions de culture.

Tableau C-2. Composés soufrés et H_2S produits par *B. linens* ATCC9175 et *C. glutamicum* D13 dans des milieux enrichis en L-méthionine (1,0 gl^{-1}), L-cystéine (1,0 gl^{-1}) ou en L-méthionine – L-cystéine. Les valeurs sont exprimées en ppm.

	BL9175				COD13			
	1,0 Cys	1,0 Met	1,0Met - 0,2 Cys	1,0Met - 1,0Cys	1,0 Cys	1,0 Met	1,0Met - 0,2 Cys	1,0Met - 1,0Cys
CSV								
DMDS	0,22±0,02 ^{b}	11,34±0,91 ^{a}	13,65±0,38 ^{d}	11,65±0,17 ^{a}	0,03±0 ^{a}	0,25±0 ^{b}	0,24±0,02 ^{b}	0,22±0,03 ^{b}
DMTS	0,05±0,01 ^{a}	0,38±0,04 ^{a}	1,7±0,31 ^{a}	3,82±0,35 ^{b}	n.d ^{a}	n.d ^{a}	0,004±0 ^{b}	0,004±0 ^{b}
DMQS	0,002±0 ^{a}	0,01±0 ^{a}	0,04±0 ^{a}	0,09±0 ^{a}	n.d ^{a}	n.d ^{a}	n.d ^{a}	n.d ^{a}
CSV Totaux	*0,28±0,03* ^{a}	*11,85±0,86* ^{c}	*15,46±0,7* ^{b}	*15,6±0,52* ^{b}	*0,05±0* ^{a}	*0,26±0* ^{b}	*0,26±0,02* ^{b}	*0,24±0,03* ^{b}
H_2S	32,4±1,26 ^{a}	19,16±0,74 ^{c}	29,96±1,16 ^{a}	33,69±1,31 ^{a}	34,88±1,35 ^{d}	1,71±0,07 ^{a}	10,34±0,4 ^{b}	28,3±1,1 ^{c}
CSV + H_2S	*32,59±1,4* ^{a}	*31,02±0,12* ^{a}	*40,27±8,02* ^{a}	*44,09±10,22* ^{a}	*34,91±1,38* ^{d}	*1,88±0,22* ^{b}	*10,6±0,39* ^{b}	*28,46±1,22* ^{c}

Une même lettre dans une même ligne indique que les résultats ne sont pas significativement différents pour une souche au risque d'erreur α de 5% (test de Tukey, ANOVA – Statistica). DMDS, Disulfure de diméthyle ; DMTS, Trisulfure de diméthyle ; DMQS, Tétrasulfure de diméthyle ; N.d = non détecté.

X.1.1.3. Effet de l'addition de cystéine sur la composition du profil de CSV

Pour COD13, seul le DMDS est present en très faible concentration (≤0,25 ppm), ainsi que des traces de DMTS, qui n'apparaît que dans les cultures enrichies en méthionine/cystéine (tableau C-2).

Concernant BL9175, il y a production de trois polysulfures : DMDS, DMTS et DMQS. Parmi ceux-ci, le DMDS représente plus des deux tiers (75%) du total des CSV produits, même sans ajout de méthionine (tableau C-2). Sur le mélange méthionine/cystéine (1,0-0,2 gl^{-1}), la concentration de tous les polysulfures augmente : de 20% pour le DMDS et de 400% pour le DMTS et le DMQS. Avec une concentration plus élevée en cystéine (1,0-1,0 gl^{-1}), nous observons encore une augmentation de la production de DMTS et de DMQS, mais pas de celle de DMDS. Nous constatons que, parallèlement à cette augmentation remarquable des concentrations en polysulfures, une forte production d'H_2S est quantifiée dans les milieux de culture.

X.1.1.4. Consommation de la méthionine et de la cystéine

La consommation de méthionine par BL9175 est plus importante dans les conditions de culture où les deux acides aminés sont présents en mélange (figure C-8). En effet, BL9175 augmente sa consommation de méthionine de 0,15 ± 0,01 gl^{-1} (méthionine 1,0 gl^{-1}) à 0,41 ± 0,02 et 0,23 ± 0,01 avec l'ajout respectivement de 0,2 gl^{-1} et 1,0 gl^{-1} de cystéine. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de la production de DMDS observée chez cette bactérie dans les mêmes conditions.

Concernant la cystéine, BL9175 en consomme moins dans les conditions d'addition simultanée de cystéine/méthionine (0,14 et 0,09 gl^{-1}) que dans la condition d'ajout de cystéine seule (0,39 ± 0,02 gl^{-1}). Concernant la relation quantité de cystéine consommée / production d'H_2S, on constate une mauvaise corrélation. De plus, sur méthionine seule, 19 ppm d'H_2S sont produits. Il est possible que d'une part la cystéine soit consommée par cette bactérie pour son anabolisme (réactions de synthèse comme par exemple la production de méthionine), sans dégradation directe, en particulier dans les conditions de culture où elle est le principal acide aminé soufré. A l'inverse, sur méthionine seule, la méthionine peut être aussi transformée en cystéine, avec une production simultanée d'H_2S.

Contrairement à BL9175, chez COD13 la consommation de méthionine diminue de 0,34 ± 0,01 gl^{-1} à 0,20 gl^{-1} avec l'ajout de cystéine, même à de faibles concentrations, tandis que sa consommation en cystéine augmente. Ainsi, cette bactérie consomme 0,2 ± 0,0005 gl^{-1} de cystéine sur le mélange méthionine/cystéine (1,0-0,2) et 0,72 ± 0,02 gl^{-1} en moyenne dans les conditions de cystéine seule et méthionine/cystéine (1,0-1,0). En dépit de ces fortes consommations, COD13 produit en général moins d'H_2S et de CSV que BL9175.

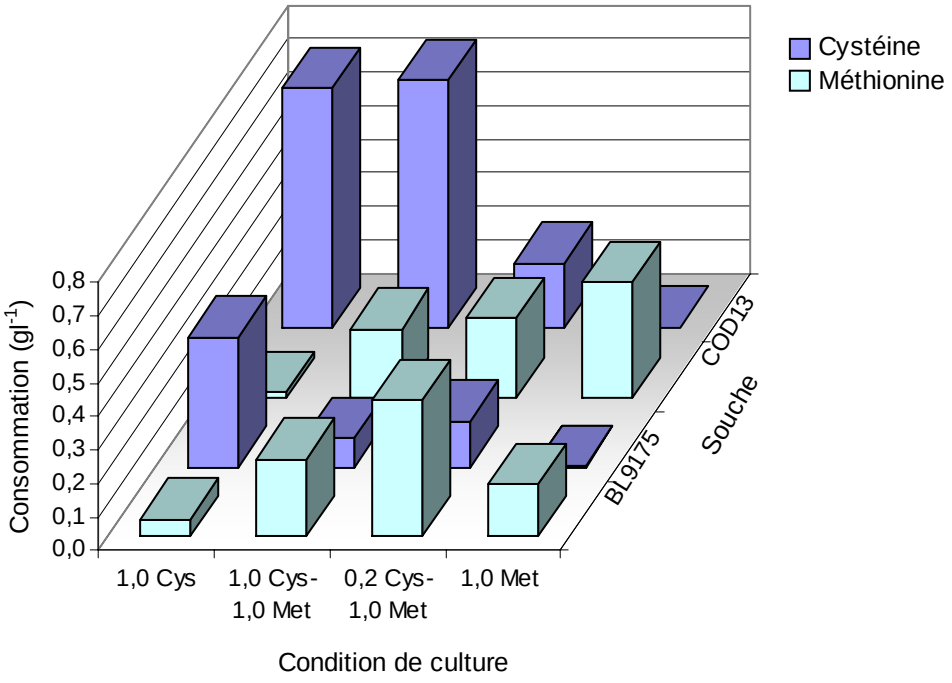


Figure C-8. Consommation de L-méthionine et L-cystéine par BL9175 et COD13.

X.1.1.5. Recherche des intermédiaires métaboliques de dégradation de la méthionine et la cystéine

Les cétoacides produits par la dégradation de la méthionine (KMBA, HMBA et α-KB) et de la cystéine (l'acide pyruvique ou mercaptopyruvate), ont été identifiés et quantifiés par RP-HPLC. L'éventuelle formation du mercaptopyruvate, l'α-cétoacide produit par voie de transamination de la cystéine et équivalent du KMBA pour la méthionine, a été étudiée en

utilisant une méthode d'analyse plus sensible (dérivation et séparation par chromatographie en phase gazeuse (CPG-MS) ; voir matériels et méthodes – partie VII.4.3.).

Seule l'accumulation de l'HMBA est observée chez COD13 (de 0,037 à 0,051 gl^{-1}) mais sans différence significative entre les différentes conditions de culture (tableau C-3). L'absence de KMBA ou α-KB dans les cultures de BL9175 enrichis en méthionine a été aussi observée par Arfi et col., (2003).

Tableau C-3. Concentration en HMBA déterminée sur des cultures de COD13 enrichis en L-cystéine, L-méthionine, ou en mélange.

Conditions des cultures (gl^{-1})	HMBA (gl^{-1})
Sans enrichissement	0,046±0,002 ^{ab}
1,0 Cys	0,051±0,003 ^{b}
1,0 Met	0,051±0,003 ^{b}
0,2 Cys - 1,0 Met	0,047±0,001 ^{ab}
1,0 Cys – 1,0 Met	0,037±0,003 ^{ab}

Une même lettre indique que les résultats ne sont pas significativement différents au risque d'erreur α de 5% (test de Tukey, ANOVA – Statistica).

X.1.1.6. Effet de l'addition de cystéine sur des activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme des acides aminés soufrés

Les activités déméthiolase (DML) et cystathionine β-γ lyase (CBGL) ont été quantifiées dans des extraits acellulaires en utilisant les méthodes décrites dans la partie VII.5 de la section matériels et méthodes.

Chez BL9175, l'activité déméthiolase est maximale dans les cultures témoin et sur méthionine seule (641,5 ± 115,7 nmol de thiol·g protéine^{-1}·s^{-1}), alors qu'une forte diminution de cette activité est observée lors de l'addition de cystéine, en moyenne d'un facteur dix (figure C-9). L'activité déméthiolase chez COD13 est plus faible et ne présente pas de différence significative d'une condition de culture à l'autre (de 69 à 170 nmol de thiol·g protéine^{-1}·s^{-1}).

En ce qui concerne l'activité CBGL, nous avons obtenu des résultats peu reproductibles, avec des coefficients de variation allant de 30 à 123% chez BL9175 et de 11 à

38% chez COD13. Chez BL9175, cette activité reste très faible quelles que soient les conditions de culture, alors que pour COD13, cette activité assez élevée, semble diminuer lors de l'ajout de cystéine à 1,0 gl^{-1}.

Par ailleurs, nous avons tenté de quantifier l'activité transaminase des extraits acellulaires de BL9175 et COD13 sur la cystéine. Cependant des interférences lors du dosage n'ont pas permis d'obtenir des résultats exploitables (voir partie matériels et méthodes).

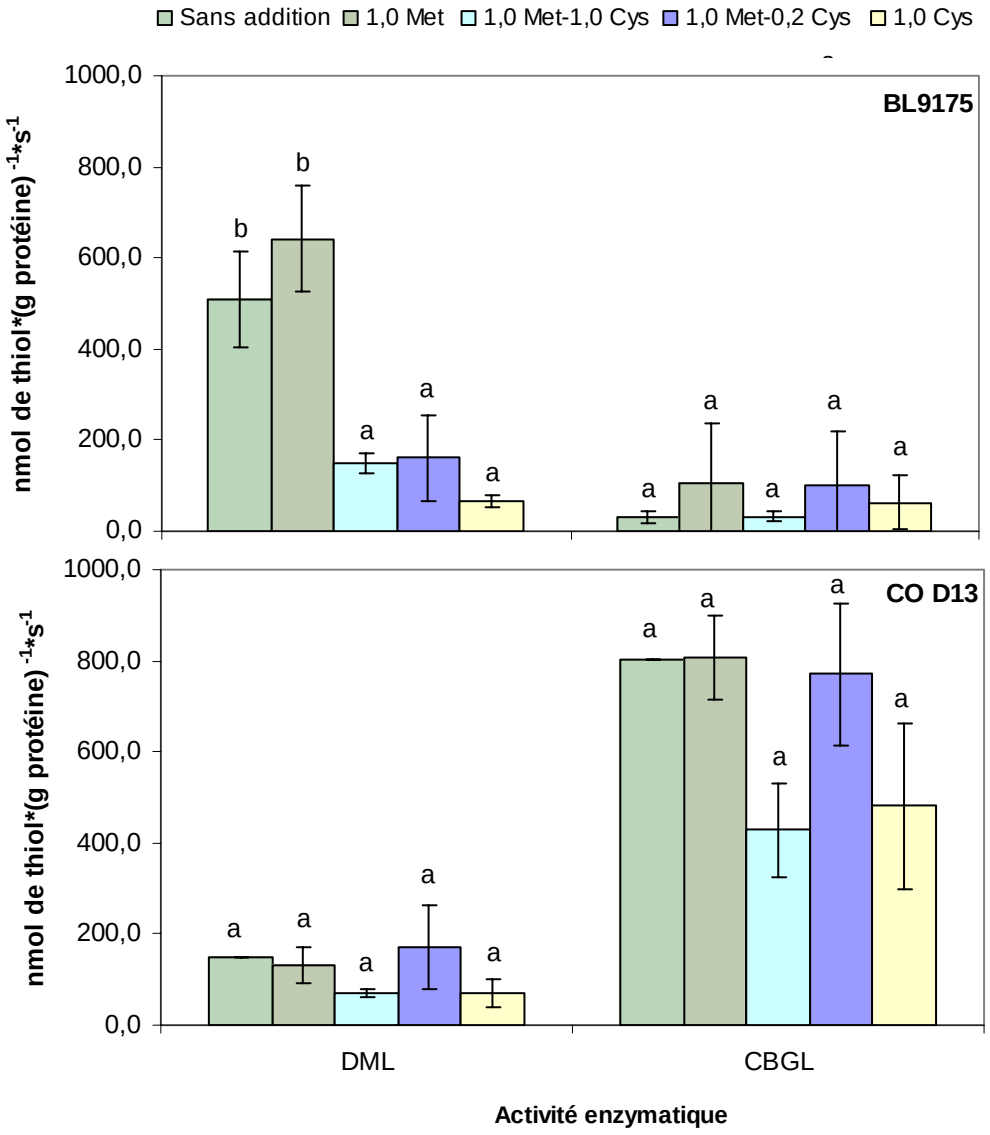


Figure C-9. Activités enzymatiques déméthiolase (DML) et cystathionine β–γ lyase (CBGL) déterminées sur des extraits acellulaires de BL9175 et COD13 obtenus sur des milieux enrichis avec de la méthionine, de la cystéine ou leur mélange, ou temoin sans enrichissement.

X.1.1.7. Discussion et Conclusions

La production de CSV par BL9175 et COD13 a été étudiée en enrichissant le milieu de culture en cystéine en présence ou non de méthionine. Globalement, BL9175 est la meilleure productrice de CSV tandis que COD13 n'en produit que des traces. Concernant les CSV, nous avons observé la production des polysulfures suivants, DMDS, DMTS et DMQS, tous générés à partir du méthanethiol, principal produit de dégradation de la méthionine. Quantitativement, le DMDS reste le principal polysulfure produit. D'autre part, l'ajout de cystéine aux milieux de culture a généré clairement de l'H_2S et en conséquence a favorisé la production du DMTS. Ce composé serait produit par réaction d'une molécule de DMDS ou de deux molécules de méthanethiol avec une molécule d'H_2S (Chin et Lindsay, 1994). Le DMQS serait formé de manière similaire. Nous observons d'ailleurs, dans les cultures de BL9175 sur le mélange méthionine-cystéine (1,0-1,0), qu'une augmentation des concentrations en DMTS et DMQS va de pair avec une diminution de la concentration en DMDS.

L'absence de production de thioesters par ces deux souches n'est pas surprenante. En fait, même si la plupart des bactéries d'affinage sont capables de produire du méthanethiol à partir de la méthionine, seules quelques unes sont capables de produire des thioesters (Lamberet et col., 1997). De plus, ces mêmes auteurs ont montré que BL9175 ne produisait pas de S-méthylthio acétate.

Une autre différence entre BL9175 et COD13 concerne la consommation de méthionine et de cystéine : pour une croissance comparable, COD13 consomme beaucoup plus d'acides aminés soufrés et produit une faible concentration en CSV et en H_2S. Cette caractéristique peut être un désavantage pour son implantation sur le fromage car la méthionine et surtout la cystéine sont faiblement disponibles dans le caillé.

Finalement, à l'exception de l'HMBA chez COD13, les principaux produits de dégradation de la méthionine n'ont pas été identifiés chez BL9175. L'HMBA retrouvé chez COD13 est sûrement produit par transamination de la L-méthionine car cette activité a été décrite auparavant chez cette souche (Bonnarme et col., 2000). Il a été par ailleurs démontré que le KMBA et l'HMBA pouvaient être utilisés comme substrats pour la production de méthanethiol par BL9175 (Arfi et col., 2003). Il semblerait que l'ajout de cystéine aux milieux

de culture ne modifie pas la capacité de BL9175 à utiliser le KMBA et HMBA comme substrats. L'ajout de cystéine ne semble pas non plus avoir un effet sur l'activité hydroxyacide dehydrogénase de COD13 qui réduit le KMBA en HMBA. La présence de ce type d'activité a été démontrée chez des bactéries lactiques (Amarita et col., 2001) et *B. linens* (Arfi et col., 2003).

Les essais pour identifier le mercaptopyruvate par CPG-MS n'ont pas donné de résultat positif chez ces bactéries. Toutefois, l'instabilité de ce composé a été confirmée sur des solutions modèles préparées dans l'eau : il se dégrade spontanément en pyruvate et en H_2S. Si le mercaptopyruvate est produit par une transamination de la cystéine, il peut facilement être dégradé par voie chimique lors des incubations. Ainsi, malgré divers essais pour améliorer l'extraction des produits de dérivation formés (extractions réalisées avec divers solvants), nous avons obtenu un très faible pourcentage de récupération du mercaptopyruvate en solution modèle. Il est donc pour nous difficile d'affirmer ou d'infirmer la présence de ce composé dans nos milieux de culture.

En résumé, nous avons mis en évidence que l'ajout de cystéine aux milieux de culture de BL9175 et COD13 n'induit pas la formation de CSV nouveaux, autres que le méthanethiol et les polysulfures DMDS, DMTS et DMQS. Ils proviennent tous de la dégradation de la méthionine endogène ou ajoutée au milieu de culture. D'autre part, nous avons démontré que les concentrations obtenues en H_2S, principal produit de dégradation de la cystéine, ne sont pas modifiées par la présence de méthionine. Par contre, la consommation de méthionine est modifiée par la cystéine, ainsi que les concentrations et les profils des CSV produits. Ceci reste vrai même pour de faibles concentrations en cystéine (0,2 gl^{-1}). Ainsi, nous pouvons penser qu'un tel effet peut avoir lieu dans le caillé où les proportions cystéine/méthionine sont très semblables à celles utilisées dans cette étude. Une étude plus approfondie dans le milieu caillé permettra d'évaluer plus précisément l'influence réelle de la cystéine sur la production de CSV par les bactéries d'affinage.

X.1.2. Etude d'Arthrobacter spp 7(2) et de B. linens BL918

"Effect of cysteine addition on volatile sulphur compounds production by cheese-ripening bacteria"

M. López del Castillo-Lozano, S. Mansour, R. Tâche, P. Bonnarme, S. Landaud

Soumis à *International Journal of Food Microbiology*

Résumé

L'effet de l'ajout de cystéine sur la capacité de deux bactéries d'affinage, *Brevibacterium linens* et *Arthrobacter spp.*, à produire des composés soufrés volatils (CSV) à partir de la méthionine a été étudié. Ces bactéries ont été cultivées dans un milieu complexe supplémenté avec diverses concentrations en cystéine en présence ou non de méthionine. Sur cystéine seule, des concentrations très faibles en CSV (< quelques ppm) ont été obtenues, avec cependant une forte production d'H_2S. Sur des mélanges de méthionine/cystéine, les quantités de CSV produits, et les proportions relatives de chaque composé, sont souches dépendantes. Cependant, pour ces deux souches, les concentrations en diméthyle disulfure, en diméthyle trisulfure et en diméthyle tétrasulfure sont significativement plus élevées sur les mélanges méthionine/cystéine en proportion égale (1/1). En revanche, les concentrations obtenues en thioesters, en particulier le S-méthylthio acétate, ont été réduites de 50 à 80% dans ces conditions. Une première approche sensorielle a montré qu'un tel effet pourrait avoir un impact positif sur l'arôme global des fromages affinés.

Abstract

The effect of cysteine on the ability of smear cheese-ripening bacteria (*Brevibacterium linens* and *Arthrobacter spp*) to produce volatile sulphur compounds (VSC) from methionine was studied. These bacteria were cultivated in a synthetic medium supplemented with various cysteine concentrations with or without methionine. Cultures with only cysteine showed slightly neglected levels of VSC and unpleasant rotten eggs like odour consequence of the H_2S produced. The production levels and profiles of VSC with supplemented methionine-cysteine mixtures had strain dependent behaviours. However, highest levels of dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide and dimethyl tetrasulfide were observed by raising the cysteine concentration at the same methionine concentration. In contrast, production levels of thioesters, especially S-methylthio acetate, were reduced by fifty and eighty per cent in these conditions. A first sensory approach showed that such an effect could have a strong impact in the global odour of ripened cheeses.

X.1.2.1. Effet de l'addition de cystéine sur la production totale de CSV

Les souches *Arthrobacter spp* 7(2) (AR7 (2)) et *Brevibacterium linens* CNRZ918 (BL918) utilisées dans cette étude ont été choisies parmi 17 souches bactériennes pour leur capacité à produire de grandes quantités de sulfure d'hydrogène (H_2S) à partir de la cystéine.

Ces souches bactériennes produisent des traces d'H_2S (<2,0 ppm) dans le milieu BHI sans addition de méthionine ou de cystéine. Ce composé est probablement produit à partir de la cystéine initialement contenue dans ce milieu complexe (3,6 µg ml^{-1}). D'autre part, la concentration en méthionine (0,2 mg ml^{-1}) du BHI semble être suffisante pour permettre la production de faibles concentrations de CSV (López del Castillo et col., 2007).

Quand la méthionine est ajoutée au milieu de culture, une production importante de CSV est observée pour les deux souches (tableau C-4). BL918 en produit des quantités très élevées (95 ppm), tandis que AR7(2) en produit significativement moins (36 ppm). Ces résultats sont en accord avec le fait généralement admis que les principaux CSV sont produits à partir de la méthionine, et que *B. linens* est un fort producteur de ces composés d'arôme.

Comme dans notre étude précédente, des concentrations élevées en H_2S sont obtenues sur cystéine (~37 ppm). En revanche, même si les CSV sont identiques à ceux produits sur méthionine, ils sont présents en très faible concentration : 6,79 ppm et 2,2 ppm respectivement pour AR7(2) et BL918. Nous avons supposé que ces CSV sont principalement produits à partir de la méthionine contenue dans le BHI (0,2 gl^{-1}, 1,34 mM). Cependant, il est intéressant de noter que leurs concentrations sont encore plus basses que celles obtenues sur BHI sans enrichissement en cystéine (López del Castillo et col., 2007). Ainsi, la production de CSV semble être limitée quand la cystéine est présente en forte concentration par rapport à la méthionine. Nous avons donc étudié l'apport de méthionine sur des milieux déjà enrichis en cystéine ; et nous avons réalisé des cultures avec des enrichissements en méthionine (1,0 gl^{-1}) et en cystéine (1,0 gl^{-1} ou 0,2 gl^{-1}).

Sur des cultures avec méthionine et avec méthionine/cystéine, les productions de CSV par AR7(2) ne présentent pas de différence significative ($p>0,05$), tandis que celles de BL918 sont fortement réduites sur le mélange des deux acides aminés. Par exemple, la concentration en CSV chute presque de 47% sur méthionine-cystéine (1,0-1,0). En dépit d'un tel effet, BL918 demeure le plus fort producteur de CSV.

Tableau C-4. Concentrations (ppm) des polysulfures, des thioesters, et de l'H_2S produits par les souches de bactéries AR7(2) et BL918 à partir de la L-méthionine (1,0 gl $^{-1}$), de la L-cystéine (1,0 gl $^{-1}$), ou les deux méthionine-cystéine (1,0-1,0 et 1,0-0,2 gl $^{-1}$). DMDS : disulfure de diméthyle ; DMTS : trisulfure de diméthyle ; DMQS : tétrasulfure de diméthyle ; SMTA : S-méthylthioacetate ; SM3MB : S-méthylthio-3-méthylbutanoate.

	Bactérie et condition de culture							
	B. linens 918				*Arthrobacter spp* 7(2)			
	1,0 Met	1,0 Cys	1,0Met-0,2Cys	1,0Met-1,0Cys	1,0 Met	1,0 Cys	1,0Met-0,2Cys	1,0Met-1,0Cys
Polysulfures								
DMDS	12,19±1,46^{b}	0,66±0,04^{a}	12,96±1,44^{b}	11,52±1,40^{b}	8,51±2,28^{b}	2,62±0,73^{a}	13,91±2,28^{b}	13,55±2,86^{b}
DMTS	0,33±0,07^{a}	0,05±0,01^{a}	0,72±0,02^{b}	1,96±0,31^{b}	0,05±0,02^{a}	0,37±0,07^{a}	0,16±0,03^{a}	8,06±1,86^{b}
DMQS	0,01±0,0^{a}	n.d*	0,02±0,0^{c}	0,08±0,01^{b}	n.d	0,01±0,0^{a}		0,19±0,01^{b}
Thioesters								
SMTA	45,79±4,07^{c}	0,80±0,03^{a}	27,43±3,79^{b}	19,45±2,92^{c}	11,94±3,99^{b}	2,36±0,81^{a}	3,54±0,57^{a}	1,60±0,10^{a}
SM3MB	36,74±4,40^{c}	0,69±0,01^{a}	24,68±2,40^{b}	27,00±1,13^{b}	14,00±3,22^{c}	1,43±0,38^{a}	5,65±1,35^{a}	6,23±0,75^{b}
CSV Totaux	95,06±21,14^{c}	2,2±0,34^{a}	65,81±12,88^{bc}	60,01±11,44^{b}	34,5±6,15^{b}	6,79±1,16^{a}	23,26±5,85^{b}	29,63±5,37^{b}
H_2S	7,56±0,29^{a}	36,82±1,43^{b}	31,76±1,23^{b}	38,24±1,48^{b}	1,04±0,04^{a}	37,56±1,45^{c}	15,87±0,61^{b}	18,18±0,70^{b}
CSV + H_2S	102,62±19,48^{b}	39,02±16,22^{a}	97,57±13,80^{b}	98,25±14,81^{b}	35,54±6,31^{a}	44,35±14,82^{a}	39,13±6,77^{a}	47,81±6,92^{a}

*n.d = non détecté

Une même lettre dans une même ligne indique que les résultats ne sont pas significativement différents pour une souche au risque d'erreur α de 5% (test de Tukey, ANOVA – Statistica).

X.1.2.2. Effet de l'addition de cystéine sur la composition du profil de CSV

Les concentrations en DMDS ne sont pas modifiées par l'addition de cystéine (tableau C-4). Cependant, sur le mélange cystéine/méthionine, les concentrations en DMTS et de DMQS augmentent de manière significative : la concentration en DMTS augmente de six fois chez BL918 et de 161 fois chez AR7(2). La formation de DMQS semble être dépendante de la formation initiale de DMTS car une forte corrélation (r^2=0,9688) est observée entre ces deux composés ($p<0,05$). Par ailleurs, les concentrations en H_2S présentent également une corrélation avec le DMTS et le DMQS. Finalement, les concentrations en thioesters sont réduites considérablement par l'addition de cystéine. En effet, dans les cultures sur méthionine-cystéine, le SMTA est réduit de 86% et 58% pour AR7(2) et BL918 respectivement, tandis que le S-méthyl-3-méthyl-butanthioate (SM3MB) est réduit de 56% et 27% respectivement.

X.1.2.3. Consommation de la méthionine et de la cystéine

Nous observons que la consommation de méthionine par BL918 est plus importante que celle d'AR7(2), dans toutes les conditions de culture testées (tableau C-5). Ce résultat est en accord avec la capacité des brévibactéries à cataboliser la méthionine et à produire une grande quantité des CSV. En ce qui concerne la consommation de cystéine, il n'y a pas de différence significative entre ces deux souches.

Dans le milieu BHI sans enrichissement, les deux acides aminés soufrés contenus naturellement dans ce milieu (0,2 gl^{-1} de méthionine et 0,003 gl^{-1} de cystéine) sont efficacement consommés par les deux souches : BL918 consomme 100% de la méthionine et 67% de la cystéine tandis que AR7(2) consomme 43% de la méthionine et 100% de la cystéine.

Dans le cas de cultures sur cystéine seule (1,0 gl^{-1}), la quantité de méthionine consommée diminue fortement pour BL918 (6,5%) et dans une moindre mesure pour AR7(2) (33%). Ces résultats sont en accord avec la diminution en CSV observée.

Lorsque la méthionine est ajoutée seule (1,0 gl^{-1}), cet acide aminé est efficacement consommé par BL918 (70%), tandis que seulement 13% est consommé par AR7(2).

Quand la cystéine est également ajoutée, la consommation de méthionine est modifiée différemment selon la souche considérée. La méthionine consommée par BL918 reste à 65% pour 1,0 gl^{-1} de cystéine ajoutée, mais chute à un niveau de 46% pour un apport faible en cystéine (0,2 gl^{-1}). En revanche, chez AR7(2), avec l'addition de 1,0 gl^{-1} de cystéine, la méthionine consommée augmente jusqu'à 26%. En réduisant la concentration en cystéine (méthionine-cystéine 1,0-0,2), ce niveau est encore plus important, allant jusqu'à 40% de méthionine consommée.

Tableau C-5. Consommation de L-cystéine et de L-méthionine (gl^{-1}) par des bactéries dans des milieux de culture enrichis avec de L-méthionine, L-cystéine ou les deux.

	Souche			
	B. linens 918		*Arthrobacter spp* 7(2)	
Condition de culture [§] (gl^{-1})	Méthionine	Cystéine	Méthionine	Cystéine
Sans enrichissement	0,201±0,0 [b]	0,002±0,001 [a]	0,087±0,019 [a]	0,003±0,0 [a]
1,0 Cys	0,013±0,005 [a]	0,334±0,007 [d]	0,067±0,012 [a]	0,403±0,004 [d]
1,0 Met	0,707±0,006 [d]	0,003±0,001 [a]	0,133±0,0 [b]	0,001±0,0 [a]
1,0 Met – 1,0 Cys	0,653±0,03 [d]	0,181±0,013 [c]	0,259±0,00 [c]	0,310±0,008 [c]
1,0 Met – 0,2 Cys	0,461±0,046 [c]	0,133±0,004 [b]	0,393±0,023 [d]	0,173±0,001 [b]

[§] Les milieu de cultures contient naturellement méthionine (0,2 gl^{-1}) et cystéine en traces (0,003 gl^{-1}).

Une même lettre indique que les résultats ne sont pas significativement différents au risque d'erreur α de 5% (test de Tukey, ANOVA – Statistica).

D'autre part, la cystéine est fortement consommée à de basses concentrations en méthionine : 66% et 100% pour BL918 et AR7(2) respectivement dans BHI ; 33% et 40% pour BL918 et AR7(2) respectivement sur le milieu supplémenté en cystéine seule. Quand la méthionine est ajoutée (méthionine-cystéine 1,0-1,0), la consommation de cystéine est significativement réduite pour les deux souches : 18% et 31% pour BL918 et AR7(2) respectivement.

Ces résultats montrent l'influence de ces deux acides aminés sur leur consommation respective. Cette influence peut être le résultat d'une compétition entre ces deux acides

aminés comme source potentielle d'azote et/ou d'énergie (génération de α-cétobutyrate ou de pyruvate), ou une compétition vis-à-vis des systèmes enzymatiques impliqués dans leur catabolisme. Ces deux hypothèses ne peuvent pas être mutuellement exclues.

X.1.2.4. Recherche des intermédiaires métaboliques de dégradation de la méthionine et la cystéine

Les cétoacides KMBA, HMBA, α-KB (produit de la dégradation de méthionine) et le pyruvate (produit de la cystéine) ont été quantifiés par RP-HPLC. L'identification du mercaptopyruvate, l'α-cétoacide produit par voie de transamination de la cystéine et équivalent du KMBA pour la méthionine, a été réalisée par dérivation et séparation par chromatographie en phase gazeuse (CPG-MS).

Aucun produit de dégradation de la méthionine n'est détecté dans les cultures de BL918. L'absence d'accumulation de ces composés a déjà été observée par d'autres auteurs (Arfi et col., 2005). En revanche, le pyruvate (0,049-0,122 gl^{-1}) et l'α-KB (0,035-0,074 mM) sont identifiés chez AR7(2) (tableau C-6). La concentration de ces intermédiaires métaboliques diminue légèrement avec un enrichissement en cystéine ou en méthionine, mais sans différence significative entre ces conditions.

Les essais pour identifier le mercaptopyruvate par CPG-MS n'ont pas donné de résultat positif. Cependant, par cette technique très sensible, des traces de pyruvate ont été détectées dans les cultures enrichies en cystéine chez BL918.

Tableau C-6. α-Cétoacides produits par AR7(2) dans des cultures enrichies en cystéine, méthionine, ou leur mélange.

	Concentration α-cétoacides (gl^{-1})	
Conditions de culture	Acide pyruvique	α-Cétobutyrate
Sans enrichissement	0,112±0,003 a	0,074±0,002 b
1,0 Cys	0,122±0,004 a	0,042±0,001 a
1,0 Met	0,049±0,002 a	0,035±0,001 ab
0,2 Cys-1,0 Met	0,097±0,002 a	0,048±0,001 ab
1,0 Cys – 1,0 Met	0,072±0,002 a	0,044±0,001 ab

Une même lettre indique que les résultats ne sont pas significativement différents au risque d'erreur α de 5% (test de Tukey, ANOVA – Statistica).

X.1.2.5. Effet de l'addition de cystéine sur des activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme des acides aminés soufrés

Différentes enzymes peuvent participer à la production de CSV à partir de la méthionine, en particulier la méthionine γ-lyase ou déméthiolase très étudiée chez *B. linens*. Par ailleurs, la cystathionine γ-lyase (CGL) a été identifiée chez plusieurs bactéries comme étant responsable de la production d'H_2S à partir de la cystéine ; elle est aussi impliquée dans la biosynthèse de la cystéine à partir de la méthionine, via la cystathionine, par la voie de transsulfuration. A partir de la cystathionine, la cystathionine β-lyase (CBL) libère également l'homocystéine qui peut soit générer de la méthionine, soit être hydrolysée par la CGL avec une production d'H_2S et d'α-KB. Ainsi, ces deux enzymes peuvent diminuer la concentration en méthionine et ainsi la production de CSV. Pour cette raison, nous avons décidé de mesurer les activités déméthiolase et l'activité globale de CBGL des extraits acellulaires (CFE) dans nos conditions de culture.

L'activité déméthiolase est déterminée en suivant la formation du methanethiol à partir de la méthionine. Les extraits acellulaires des deux souches bactériennes, obtenues à partir des cultures supplémentées en méthionine, présentent les plus fortes activités, allant de 245-641 nmol MTLg de protéine^{-1}s^{-1}. Par ailleurs, cette activité diminue très fortement dans les extraits acellulaires des cultures supplémentées en méthionine-cystéine ou en cystéine seule (figure C-10). Ainsi, sur méthionine-cystéine, l'activité déméthiolase diminue de 53% et de 40% dans les CFEs de BL918 et AR7(2) respectivement. Sur cystéine seule, cette diminution est encore plus marquée pour le CFE de BL918 (10% de l'activité maximale), tandis que le CFE d'AR7 (2) conserve 50% de l'activité maximale. Les résultats concernant BL918 sont en accord avec la bibliographie au sujet de l'induction de la méthionine γ-lyase par la méthionine. En outre, la diminution d'activité déméthiolase, observée dans le cas des CFE provenant des cultures avec cystéine, pourrait être due à un effet inhibiteur sur la méthionine γ-lyase et/ou répresseur sur le gène correspondant (*mgl*). D'autres enzymes impliquées dans le catabolisme de la méthionine peuvent également subir le même effet.

La production des thiols libres (cystéine ou homocystéine), à partir de la cystathionine, par action des CFE des deux souches bactériennes a été suivie durant une heure par détection au DTNB. Ainsi, les CFE d'AR7(2) possèdent une activité totale plus élevée (260-333 nmol

thiol libre·g de protéine^{-1}·s^{-1}) que ceux de BL918, quelles que soient les conditions de culture (figure C-10). Cependant, cette activité ne présente aucune différence significative ($p>0.05$) d'une condition de culture à l'autre pour aucune des deux souches étudiées.

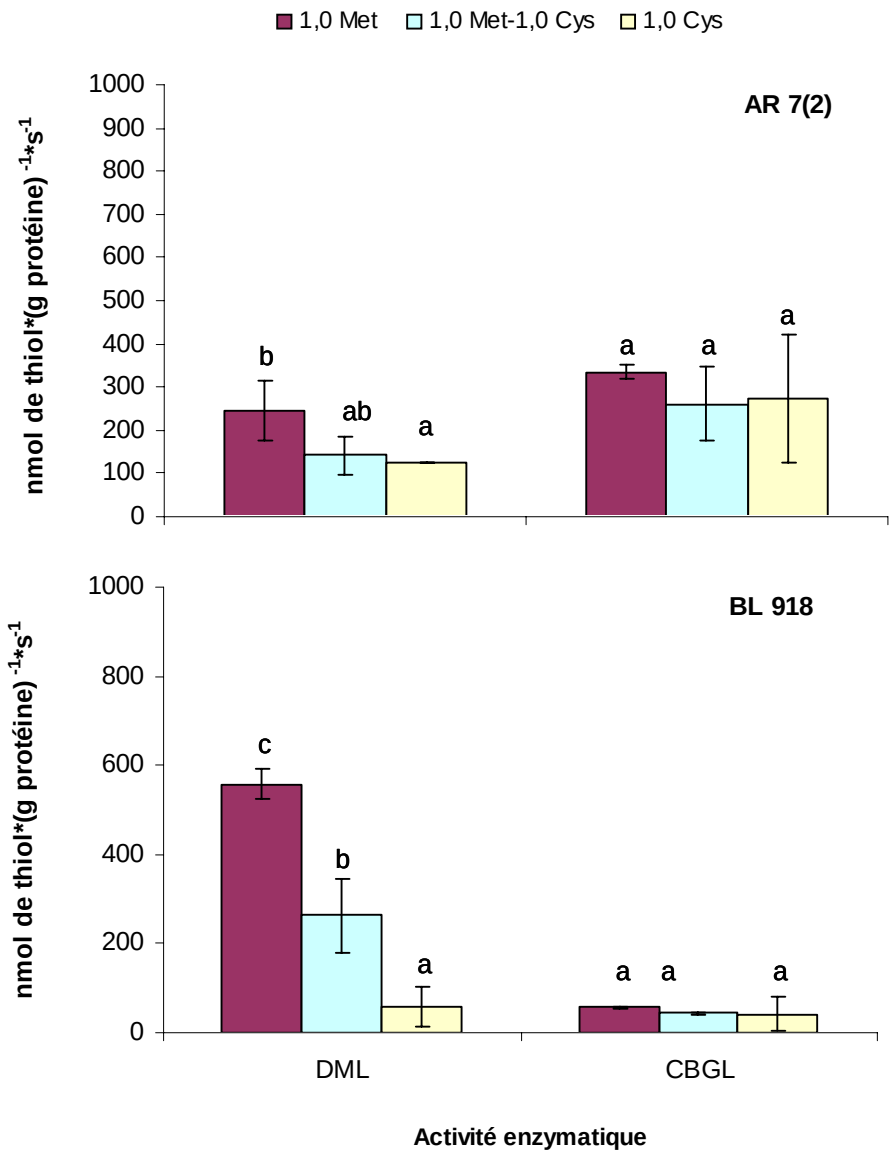


Figure C-10. Activités enzymatiques déméthiolase (DML) et cystathionine β–γ lyase (CBGL) déterminées sur des extraits acellulaires de *Arthrobacter spp* 7(2) (AR7(2)) et *B. linens* 918 (BL918) obtenus sur des milieux enrichis avec de la méthionine, de la cystéine ou leur mélange.

X.1.2.6. Effet de la cystéine sur l'évaluation sensorielle des cultures

Des échantillons de cultures de BL918 et AR7(2) ont été aléatoirement évalués par quatre sujets. Ils ont décrit l'odeur de chaque culture avec leur propre vocabulaire (description libre).

D'une manière générale, les cultures supplémentées en cystéine sont décrites comme ayant une odeur répulsive d'œuf pourri, alors que les cultures supplémentées en méthionine seule sont perçues comme ayant une odeur soufrée forte mais peu typique d'un fromage affiné.

D'autre part, les échantillons de cultures supplémentées avec le mélange méthionine-cystéine sont décrits comme ayant une odeur intense soufrée et avec des différences sensibles entre souches et conditions de culture (tableau C-7). Pour les échantillons de culture sur méthionine-cystéine (1,0-1,0), les cultures de deux souches sont décrites comme ayant une odeur intense soufrée de fromage trop affiné. Au contraire, les échantillons de culture sur méthionine-cystéine (1,0-0,2) sont décrits comme légèrement soufrés avec une odeur d'urine pour BL918, et une odeur équilibrée de fromage affiné type Munster pour AR7(2).

Tableau C-7. Descripteurs qualitatifs des cultures réalisées avec les souches AR7(2) et BL918. Les descripteurs ont été produits par flairage.

	Descripteur d'odeur	
Condition de culture (gl^{-1})	*Arthrobacter spp*. 7(2)	*B.linens* 918
1,0 Cys - 1,0 Met	Soufré très intense, fromage trop affiné (Munster)	Soufré très intense, fromage trop affiné, œuf pourri, urine
0,2 Cys – 1,0 Met	Soufré, bon équilibre de fromage bien affiné (Munster)	Légèrement soufré

X.1.2.7. Discussion et Conclusions

Le métabolisme de la méthionine et de la cystéine par des bactéries d'affinage peut remplir différentes fonctions, par exemple leur incorporation directe ou indirecte dans les protéines bactériennes, comme sources d'azote, avec la récupération éventuelle de la chaîne carbonée (pyruvate dans le cas de la cystéine ou α-cétobutyrate pour la méthionine). Ces composés sont ensuite incorporés dans le métabolisme central avec la génération concomitante d'énergie. L'existence de la voie de transsulfuration permet l'inter conversion d'une partie de la méthionine et de la cystéine et réciproquement. Sachant que les principaux CSV (thioesters et polysulfures), reconnus actuellement comme composés clé de l'arôme des fromages affinés, sont produits à partir de la méthionine, leur production est donc intimement liée à la disponibilité et au catabolisme de la méthionine.

La diminution du catabolisme de la méthionine, correspondant à une moindre production de CSV, chez *B. linens* 918, après ajout de cystéine, pourrait être due à une diminution de l'activité déméthiolase, comme observé dans nos expériences. Cette réduction pourrait être un effet direct de la concentration élevée de cystéine sur la méthionine γ–lyase ou d'autres enzymes. L'implication de la CBGL est à exclure car des activités comparables ont été trouvées pour toutes les conditions de culture étudiées, contrairement aux résultats publiés par Dias et Weimer (Dias et Weimer, 1998), sur des cultures de *Lactococcus lactis* subs *cremoris* et *B. linens* BL2, où une diminution de l'activité totale CBGL par une légère augmentation (0,002%) de la concentration en cystéine avait été observée.

En ce qui concerne *Arthrobacter* AR7(2), l'addition de cystéine a aussi provoqué une diminution de la production de CSV et de l'activité déméthiolase, mais à un moindre degré. Par ailleurs, la consommation de méthionine est augmentée par l'ajout de cystéine. Par conséquent, nous pouvons supposer que AR7(2) et BL918 possèdent des voies cataboliques différentes ou différents mécanismes de régulation du métabolisme des acides aminés soufrés. Le futur séquençage du génome de *A. arilaitensis* (isolé à partir de fromage affiné) devrait nous permettre de comparer plus en détail ces deux métabolismes (GENOSCOPE project AP06/AP07-Projet D66-Irlinger/Vallaeys - *A. arilaitensis*).

Sur les cultures supplémentées en méthionine-cystéine, nous avons observé une production accrue des polysulfures DMTS et DMQS, avec la diminution concomitante des concentrations en thioesters. Cet effet peut être le résultat d'une réactivité importante de l'H_2S, produit à partir de la cystéine ajoutée, par sa dissolution partielle dans le BHI grâce à son pH neutre. En effet, au pH neutre, les formes ioniques fortement réactives de l'H_2S (principalement HS^-) favorisent la production de DMTS et de DMQS par réaction avec le méthanethiol ou DMDS. Une telle réaction a été déjà démontrée dans des solutions modèles (Chin et Lindsay, 1994). Il est important de noter que le DMTS et le DMQS possèdent des seuils sensoriels très bas (<0,1 ppb ; Soltoft, 1988) et peuvent par conséquent modifier l'arôme global même pour des variations très faibles de leurs concentrations.

Cette concentration accrue en polysulfures se fait au détriment du méthanethiol qui devient alors moins disponible pour la production des thioesters. Il est possible que ces changements aient un fort impact sur la perception de l'arôme de fromage, les thioesters étant liés à des notes de type fromage (Berger et col., 1999b ; Martin et col., 2004). Dans notre approche sensorielle qualitative, nous avons constaté qu'une modification dans la proportion polysulphides/thioesters implique une grande modification dans la perception sensorielle : d'une odeur soufrée déséquilibrée à l'odeur équilibrée de fromage bien affiné.

En conclusion, une meilleure connaissance du rôle de la cystéine dans la production de CSV doit être considérée dans le contexte fromager (croissance sur caillé avec un écosystème complexe) afin d'évaluer son implication dans un contexte technologique. Par ailleurs, le rôle des souches d'*Arthrobacter* dans l'aromatisation du caillé doit être pris en considération, en raison de son ubiquité dans le processus d'affinage des fromages et ses différences métaboliques en comparaison à *B. linens*.

X.2. ETUDE CHEZ LES LEVURES SELECTIONNEES

"Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures".

M. López del Castillo-Lozano, A. Delile, H.E. Spinnler, P. Bonnarme, S. Landaud

Soumis à *Applied Microbiology and Biotechnology*

Résumé

La production des composés soufrés volatils (CSV) par *Kluyveromyces lactis* KL640, *Debaryomyces hansenii* DH47(8), *Geotrichum candidum* GC77, *Yarrowia lipolytica* YL200 et *Saccharomyces cerevisiae* SC45 (3), cinq levures d'affinage, a été évaluée dans des milieux de culture enrichis en méthionine ou sur des mélanges de méthionine-cystéine. Ces levures produisent des CSV dans toutes les conditions de culture, mais avec des profils de CSV différents d'une souche à l'autre et d'une condition de culture à l'autre. Ainsi, GC77 et YL200 produisent principalement du disulfure de diméthyle et des traces de trisulfure de diméthyle, tandis que DH47(8), KL640 et SC45(3) produisent du méthionol et, dans une moindre mesure, du methional. Concernant le *S*-méthylthioacétate, toutes ces levures en produisent mais à différentes concentrations. Par ailleurs, d'autres CSV mineurs sont obtenus sur les cultures de DH47(8), KL640 et SC45(3) : le 3-méthylthiopropyl acétate, l'ethyl-3-méthylthiopropanoate, une thiophènone, et un oxathiane.

Concernant les conditions de culture, la production de CSV est réduite lorsque la cystéine est ajoutée aux milieux de culture, même à faible concentration (0.2 gl^{-1}). Cependant, cette diminution de CSV est souche dépendante. Cet effet semble être principalement dû à une diminution significative de la consommation en méthionine, effet observé sur toutes les levures à l'exception de YL200. Le sulfure d'hydrogène, produit du catabolisme de la cystéine, ne semble pas contribuer à la génération de CSV ; le pH acide des cultures de levure semble en être la principale raison. La signification de tels résultats dans le contexte de l'affinage des fromages est abordée.

Abstract

Production of volatile sulphur compounds (VSC) was assessed in culture media supplemented with L-methionine or L-methionine/L-cysteine mixtures, using five cheese-ripening yeasts: *Debaryomyces hansenii* DH47(8), *Kluyveromyces lactis* KL640, *Geotrichum candidum* GC77, *Yarrowia lipolytica* YL200 and *Saccharomyces cerevisiae* SC45(3). All five yeasts produced VSC with L-methionine or L-methionine/L-cysteine but different VSC profiles were found. GC77 and YL200 produced dimethyldisulphide and trace levels of dimethyltrisulphide while DH47(8), KL640 and SC45(3) produced mainly methionol and low levels of methional. S-methylthioacetate was produced by all the yeasts but at different concentrations. The last three strains also produced other minor VSC including 3-methylthiopropyl acetate, ethyl-3-methylthiopropanoate, a thiophenone, and an oxathiane. However, VSC production diminished with a strain-dependent behaviour when L-cysteine was supplemented, even at a low concentration (0.2 gl^{-1}). This effect was due mainly to a significant decrease in L-methionine consumption in all the yeasts except YL200. Hydrogen sulphide produced by L-cysteine catabolism did not seem to contribute to VSC generation at the acid pH of yeast cultures. The significance of such results in the cheese- ripening context is discussed.

X.2.1. Résultats

X.2.1.1. Croissance des levures

Les levures se sont développées de manière similaire avec ou sans l'addition de la cystéine, indépendamment de la concentration utilisée. Les poids secs finaux sont dans la gamme de 2,5 à 3,2 gl^{-1} avec un pH moyen 4,12±0,49. Ainsi, dans les parties suivantes, la production de H_2S et de CSV sera exprimée en concentrations (mgl^{-1}).

X.2.1.2. Production de CSV à partir de la méthionine

Les CSV produits par les cinq souches de levures cultivées sur méthionine sont détaillés dans le tableau C-8. A partir de ces résultats, nous pouvons mettre en évidence l'existence des deux voies cataboliques de la méthionine et, par conséquent, les levures sont classées en deux groupes métaboliques.

Un premier groupe est constitué par les levures SC45(3), KL640, et DH47(8), qui produisent principalement du méthionol (de 13,51 à 25,70 mgl^{-1}). SC45(3) et DH47(8) produisent également du SMTA à une concentration élevée (4,93 ± 0,27 et 10,03 ± 1,03 mgl^{-1} respectivement). Les traces de DMDS sont aussi identifiées (< à 10 μgl^{-1}). Par contre, KL640 a produit du SMTA à des niveaux très faibles (0,77 ± 0,07) et n'a pas produit de DMDS.

D'autres CSV mineurs sont egalement produits par ces trois levures (tableau C-8). Ces composés sont le méthional, le 3-méthylthiopropyl acétate (l'ester acétique du méthionol) et l'éthyl-3-méthylthiopropanoate (ester éthylique de l'acide 3-méthylpropanoique). En outre, la 2-méthyl-tétrahydrothiophène-3-one (une thiophènone) et le 1,3-oxathioane sont également identifiés (figure C-11). Ces composés sont correctement identifiés (à 95 % et 80 %) par comparaison aux spectres de masses de référence.

Un deuxième groupe est constitué par les levures YL200 et GC77 qui produisent principalement du DMDS à partir de la méthionine mais à des concentrations très variables (1,01±0,16 et 5,70±0,70 mgl^{-1} respectivement). On peut raisonnablement dire que puisque le DMDS est le produit d'oxydation du méthanethiol (Chin et Lindsay, 1994a), ces levures produisent principalement du méthanethiol. Concernant GC77, du DMTS est également

produit (0,03 mgl^{-1}) ainsi que du SMTA (0,92 ± 0,12 mgl^{-1}), alors que YL200 produit du 2-méthyl-tétrahydrothiophèn-3-one (0,13 ± 0,02 mgl^{-1}).

X.2.1.3. Production d'H_2S et de CSV à partir des mélanges de méthionine-cystéine

Une bonne corrélation entre la concentration en cystéine ajoutée et la production d'H_2S est observée. Ainsi, de faibles concentrations d'H_2S sont quantifiées dans les cultures contenant de la cystéine à 0,2 gl^{-1}. Lorsque la concentration de cystéine est augmentée (1,0 gl^{-1}), les levures KL640, SC45(3), et DH47(8) produisent des quantités élevées d'H_2S (45,8 ± 1,87, 41,9 ± 1,72, et 46,9 ± 1,91 mgl^{-1} respectivement) (tableau C-8). Ces levures produisent aussi de l'H_2S dans les cultures sur méthionine seule (1,0 gl^{-1}). Ainsi, KL640 produit autant d'H_2S (14,5 ± 0.66 mgl^{-1}) dans ces conditions que sur cystéine à 0,2 gl^{-1} (17,6 ± 0,74 mgl^{-1}). Au contraire, YL200 et GC77 ne produisent que des traces d'H_2S sur méthionine.

Bien qu'aucun CSV différent ne soit identifié en ajoutant un mélange cystéine-méthionine aux milieux de culture, nous observons toutefois des variations dans les concentrations de CSV produits, par rapport aux résultats sur méthionine seule (tableau C-8). Concernant KL640, SC45(3) et DH47(8), des concentrations inférieures en methionol et en methional sont obtenues avec un ajout croissant de cystéine. Ainsi, lorsque cette dernière est ajoutée à 1,0 gl^{-1} à la méthionine, le méthionol est diminué respectivement de 68% et 55% chez KL640 et SC45(3). De plus, il n'est plus détecté chez DH47(8) dans cette condition.

Les autres CSV produits par ces levures ont des tendances très souche dépendantes. Par exemple, à basse concentration en cystéine (0,2 gl^{-1}), la concentration en SMTA est diminuée chez KL640 et SC45(3) mais augmentée chez DH47(8). Lorsque la cystéine est ajoutée à 1,0 gl^{-1}, le SMTA reste stable chez KL640 et DH47(8) mais diminue chez SC45(3). Par contre, la concentration en thiophènone est augmentée lors de l'accroissement de la concentration en cystéine, et ceci pour les trois levures, (tableau C-8).

Tableau C-8. Composés soufrés volatils (CSV) produits par les levures sélectionnées sur milieu PDB enrichis en L-méthionine (1,0 gl^{-1}) ou sur les mélanges L-méthionine-L-cystéine (1,0-0,2 et 1,0-1,0 gl^{-1}) après 48h de culture.

Souche de Levure	Condition de culture	Concentration en CSV (mgl^{-1})									
		H_2S	DMDS [a]	DMTS	SMTA	Méthionol	Méthional	Et-3MTP	3MTPyl-Ac	2M-Thiophènone	1,3 Oxathiane
KL640	1,0Met	14,5±0,66	nd[b]	nd	0,77±0,07	14,51±0,35	1,07±0,17	0,06±0,00	0,13±0,03	0,62±0,02	0,18±0,03
KL640	1,0Met-0,2Cys	17,6±0,74	nd	nd	0,30±0,05	9,83±1,18	0,90±0,13	nd	0,41±0,07	0,98±0,14	0,21±0,04
KL640	1,0Met-1,0Cys	45,8±1,87	nd	nd	0,82±0,10	4,57±0,20	nd	nd	0,14±0,03	1,12±0,14	0,13±0,02
SC45(3)	1,0Met	8,41±0,42	tr[c]	nd	4,93±0,27	25,70±2,02	0,57±0,08	0,09±0,01	0,13±0,01	0,55±0,09	0,23±0,01
SC45(3)	1,0Met-0,2Cys	17,3±0,76	nd	nd	4,06±0,05	17,05±0,40	0,17±0,00	nd	nd	2,16±0,12	0,17±0,03
SC45(3)	1,0Met-1,0Cys	41,9±1,72	tr	nd	2,08±0,33	11,36±2,56	nd	nd	nd	1,17±0,13	0,14±0,02
DH47(8)	1,0Met	1,99±0,17	tr	nd	10,03±1,03	13,51±4,57	0,23±0,05	0,04±0,01	0,12±0,02	0,41±0,01	0,16±0,01
DH47(8)	1,0Met-0,2Cys	11,5±0,54	tr	nd	13,52±1,33	nd	0,65±0,07	nd	nd	1,69±0,30	0,13±0,02
DH47(8)	1,0Met-1,0Cys	46,9±1,91	tr	nd	10,21±1,59	nd	nd	nd	nd	1,78±0,41	0,15±0,03
YL200	1,0Met	0,26±0,04	1,01±0,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,13±0,02	nd
YL200	1,0Met-0,2Cys	15,5±0,70	0,57±0,03	nd	0,12±0,04	nd	nd	nd	nd	0,11±0,02	nd
YL200	1,0Met-1,0Cys	22,5±0,97	0,17±0,04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,12±0,01	nd
GC77	1,0Met	0,66±0,11	5,70±0,70	0,03±0,00	0,92±0,12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GC77	1,0Met-0,2Cys	5,64±0,31	2,20±0,12	0,02±0,01	2,57±0,32	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GC77	1,0Met-1,0Cys	19,2±0,84	0,06±0,01	tr	2,67±0,47	nd	nd	nd	nd	nd	nd

[a] DMDS, disulfure de diméthyle ; DMTS, trisulfure de diméthyle ; SMTA, S-méthylthioacétate ; Et-3MTP, Ethyl-3(méthylthio)-propanoate ; 3MTPyl-Ac, 3(méthylthio)-propyl-acétate ; 2M-Thiophènone, 2-méthyl-tétrahydrothiophèn-3-one.
[b] nd = Non détecté ;
[c] tr = traces (≤10.0 ppb).

Concernant les deux autres souches, la production de DMDS et de DMTS est diminuée par l'addition de cystéine. Ainsi, la production en DMDS décroît respectivement de 83% et 99% chez YL200 et GC77 suite à l'ajout de 1,0 gl^{-1} de cystéine. En outre, la production de SMTA par GC77 augmente pour les deux concentrations en cystéine, mais sans différence significative entre elles. La production de thiophènone par YL200 ne semble pas non plus être influencée par ces conditions de culture (tableau C-8).

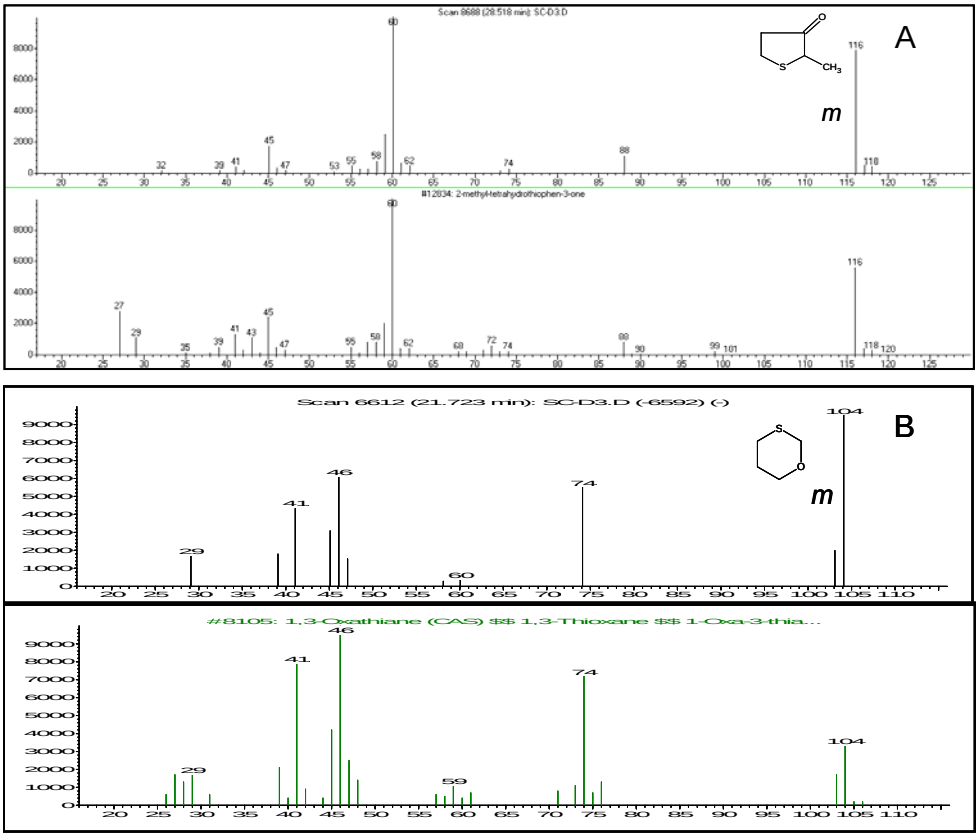


Figure C-11. (A) Spectre de masse du 2-méthyl-tétrahydrothiophèn-3-one et (B) 1,3-oxathiane.

X.2.1.4. Consommation de la méthionine et de la cystéine

La consommation de méthionine et de cystéine par les cinq levures étudiées, dans différentes conditions de supplémentation, est présentée dans la figure C-12.

Ajoutée seule aux milieux de culture (1,0 gl^{-1}), la méthionine est fortement consommée par toutes les levures, avec un minimum de 46% pour YL200.

Pour les souches GC77, KL640, SC45(3) et DH47(8), cette consommation est limitée par l'ajout de cystéine, même si l'ampleur de cet effet reste souche dépendant. Pour GC77, la consommation de méthionine n'est plus que de 21% sur le mélange méthionine-cystéine 1,0-1,0 (pour 75% sur méthionine seule). A l'opposé, YL200 augmente sensiblement sa consommation de méthionine lors de l'addition de cystéine : +29% et +13% de méthionine consommée pour l'addition de 0,2 et 1,0 gl^{-1} de cystéine respectivement.

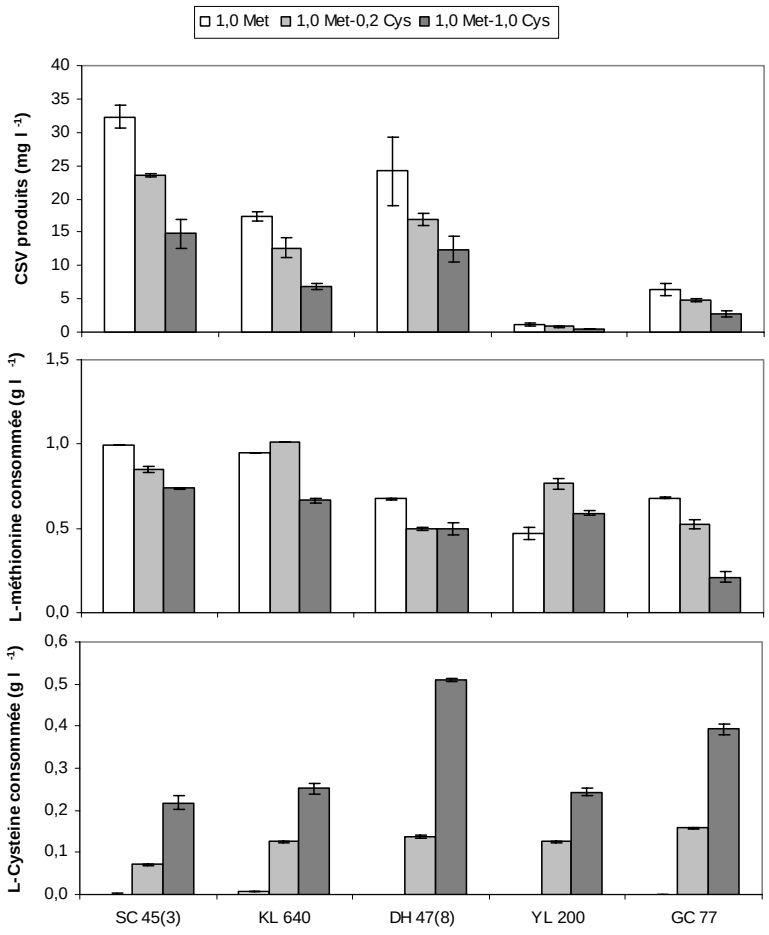


Figure C-12. CSV totaux, L-méthionine et L-cystéine consommées par les levures sélectionnées dans des milieux enrichis en L-méthionine ou sur les mélanges de L-méthionine et L-cystéine.

Par ailleurs, lorsque la cystéine est ajoutée à la concentration de 0,2 gl^{-1}, elle est fortement consommée par KL640, DH47(8), YL200, et GC77 (≥ 62%), tandis que SC45(3) en consomme seulement 35%. A une concentration plus élevée de cystéine (1,0 gl^{-1}), ces levures consomment des quantités de cystéine supérieures, allant de 0,2 à 0,5 gl^{-1}, même si les % consommés restent faibles, allant de 20% pour SC45(3) et YL200, à 50% maximum pour DH47(8).

X.2.1.5. Recherche des intermédiaires métaboliques de dégradation de la méthionine et la cystéine

Nous avons recherché le pyruvate et le mercaptopyruvate, comme principaux produits de dégradation de la cystéine. Le pyruvate n'est pas détecté dans le milieu PDB seul ou dans les cultures témoins (sans addition d'acides aminés soufrés).

En ajoutant la cystéine seule (1,0 gl^{-1}) ou en faible concentration (méthionine-cystéine 1,0-0,2 gl^{-1}), le pyruvate s'accumule dans le milieu, et ceci pour toutes les souches à exception de SC45(3). Cette souche n'accumule d'ailleurs jamais de pyruvate dans les conditions testées. La concentration en pyruvate varie de 15 mgl^{-1} chez GC77 à 64 mgl^{-1} chez KL640 (tableau C-9). Avec l'addition du mélange méthionine-cystéine (1,0-1,0), seulement YL200 (19,89 ± 0,47 mgl^{-1}) et GC77 (14,84 ± 0,31 mgl^{-1}) accumulent du pyruvate, tandis que seule YL200 (30,54 ± 0,87 mgl^{-1}) en accumule sur méthionine seule.

Nous avons essayé d'identifier la formation du mercaptopyruvate dans les cultures contenant de la cystéine avec une méthode de double dérivation et une séparation par chromatographie en phase gazeuse (voir matériels et méthodes, paragraphe VII.4.3.). Dans la culture de *S. cerevisiae* supplémentée en cystéine, nous avons identifié un pic chromatographique d'intensité faible, correspondant au mercaptopyruvate (annexe 6). Un pic d'α-cétoglutarate est également présent en grande quantité, ce qui va dans le sens d'une forte activité de transamination. Par ailleurs, un pic de pyruvate est identifié qui peut correspondre à la dégradation spontanée du mercaptopyruvate très instable. Tous ces composés sont absents (mercaptopyruvate) ou présents en moindre quantité (pyruvate et α-cétoglutarate) sur un milieu sans cystéine. Dans le cas de GC77, l'absence de mercaptopyruvate est à noter. Cependant, à cause de son instablité, nous ne pouvons pas exclure totalement sa formation.

Le KMBA, l'HMBA et l'α-KB étant des produits de dégradation de la méthionine, nous avons donc cherché à les quantifier dans les cultures supplémentées en méthionine. Il

faut noter qu'aucun de ces composés n'est présent dans le milieu de culture initial (PDB seul ou supplémenté en méthionine),

L'α-KB n'est identifié pour aucune des cinq levures étudiées, quellles que soient les conditions de culture testées. Par ailleurs, le KMBA est produit par toutes les levures dans les cultures contenant de la méthionine, GC77 en accumulant la plus forte concentration (301±4 mgl^{-1}) (tableau C-10). SC45(3), DH47(8) et YL200 produisent du KMBA dans les cultures témoin ou supplémentée en cystéine, mais seul DH47(8) en produit des quantités significativement différentes d'une culture à l'autre. A exception de DH47(8), l'accumulation de KMBA dans les cultures diminue avec l'addition de 1,0 gl^{-1} de cystéine (méthionine-cystéine 1,0-1,0), diminution de 61% et 92% respectivement pour YL200 et SC45(3) tandis que GC77 n'en accumule plus dans ces conditions. Ces diminutions correspondent à peu près à celles observées concernant la consommation de méthionine par ces levures. YL200 reste un cas à part puisque sa consommation de méthionine augmente avec l'addition de cystéine.

Il est généralement admis que l'HMBA est produit par réduction du KMBA, et que cette réaction serait catalysée par une déshydrogénase. L'HMBA présente en effet le même comportement que le KMBA : il est accumulé par KL640, DH47(8), YL200 et GC77, et non par SC45(3). L'accumulation d'HMBA est aussi limitée par l'addition de cystéine chez KL640, YL200 et GC77, et non chez DH47(8). La plus forte limitation est observée chez KL640 qui diminue de 67% son accumulation d'HMBA sur le mélange méthionine-cystéine 1,0-1,0.

Tableau C-9. Concentration (mgl^{-1}) en pyruvate accumulé dans les cultures des levures étudiées.

Souche	1,0 Cys	1,0 Met-0,2 Cys	1,0 Met-1,0 Cys	1,0 Met
KL640	63,71±1,82 ^{f}	48,84±3,11 ^{e}	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
SC45(3)	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
DH47(8)	23,38±0,98 ^{bc}	25,43±0,5 ^{bc}	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
YL200	27,9±1,69 ^{cd}	21,88±0,88 ^{bc}	19,89±0,47 ^{bc}	30,54±0,87 ^{de}
GC77	14,9±0,48 ^{bc}	15,78±0,84 ^{b}	14,84±0,31 ^{b}	0±0 ^{a}

Une même lettre indique que les résultats ne sont pas significativement différents au risque d'erreur α de 5% (test de Tukey, ANOVA – Statistica).

X.2.1.6. Effet de l'addition de cystéine sur des activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme des acides aminés soufrés

Nous avons déterminé les activités déméthiolase et CBGL présentes dans les extraits acellulaires des levures, en utilisant comme substrat respectivement la méthionine ou la cystathionine. La formation d'un thiol libre, le méthanethiol pour l'activité déméthiolase et la cystéine et/ou l'homocystéine pour la CBGL, est suivie avec la réaction au DTNB (voir matériels et méthodes, paragraphe VII.5).

Tableau C-10. Concentration (mgl^{-1}) en KMBA et en HMBA accumulés dans les cultures des levures étudiées.

Souche	Condition de culture	Intermédiaires	
		KMBA	HMBA
KL640	Sans addition	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
	1,0 Cys	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
	1,0 Met-0,2 Cys	24,72±0,78 ^{defg}	199,2±2,95 ^{f}
	1,0 Met-1,0 Cys	18,94±0,92 ^{bc}	91,75±1,56 ^{d}
	1,0 Met	29,06±0,48 ^{fg}	274,05±3,88 ^{g}
SC45(3)	Sans addition	27,28±0,48 ^{fg}	0±0 ^{a}
	1,0 Cys	24,03±0,67 ^{df}	0±0 ^{a}
	1,0 Met-0,2 Cys	25,06±0,74 ^{dfg}	0±0 ^{a}
	1,0 Met-1,0 Cys	2,47±0,31 ^{a}	0±0 ^{a}
	1,0 Met	29,35±1,54 ^{g}	0±0 ^{a}
DH47(8)	Sans addition	27,13±0,45 ^{fg}	22,5±4,24 ^{b}
	1,0 Cys	14,26±0,82 ^{b}	31,58±2,33 ^{c}
	1,0 Met-0,2 Cys	17,12±0,99 ^{bc}	29,03±1,06 ^{bc}
	1,0 Met-1,0 Cys	13,96±0,56 ^{b}	24,15±2,12 ^{b}
	1,0 Met	18,25±0,43 ^{bce}	20,55±3,39 ^{b}
YL200	Sans addition	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
	1,0 Cys	56,34±0,09 ^{h}	26±1,74 ^{bc}
	1,0 Met-0,2 Cys	20,87±0,82 ^{cde}	0±0 ^{a}
	1,0 Met-1,0 Cys	20,52±0,96 ^{cde}	34,05±1,48 ^{c}
	1,0 Met	53,28±1,54 ^{h}	45,5±0,92 ^{c}
GC77	Sans addition	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
	1,0 Cys	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
	1,0 Met-0,2 Cys	218,05±3,45 ^{i}	82,35±1,91 ^{d}
	1,0 Met-1,0 Cys	0±0 ^{a}	0±0 ^{a}
	1,0 Met	301,48±4,34 ^{j}	135,4±5,12 ^{e}

Une même lettre indique que les résultats ne sont pas significativement différents au risque d'erreur α de 5% (test de Tukey, ANOVA – Statistica).

Les résultats concernant l'activité déméthiolase sont présentés dans le tableau C-11. Cette activité n'est pas détectée chez DH47(8) quelques soient les conditions de culture testées. Pour KL640 et SC45(3), cette activité est présente sur méthionine seule, alors que GC77 et YL200 ne possèdent d'activité déméthiolase que dans les conditions méthionine-cystéine 1,0-1,0 et cystéine seule.

Par ailleurs l'activité CBGL n'a pu être déterminée avec précision à cause de fortes interférences avec les extraits acellulaires testés. Elles peuvent être dues à des réactions parasites avec le DTNB (présence de fonction SH libre, par exemple CoA-SH), et à la formation de précipités au moment du rajout des extraits acellulaires au milieu réactionnel. Nous avons essayé de remédier à ces problèmes en diluant les extraits avant de les utiliser mais sans succès.

Tableau C-11. Activité déméthiolase (DML) déterminées sur des extraits acellulaires des levures étudiées obtenus sur des milieux enrichis avec de la méthionine, de la cystéine ou leur mélange.

Souche	Condition de culture				
	Sans addition	1,0 Cys	1,0 Met - 0,2 Cys	1,0 Met - 1,0 Cys	1,0 Met
KL640	54,3±17,5	22,7±18,9	14,0±0.0	149,3±0.0	203,4±0.0
SC45(3)	n.d*	n.d	53,7±9,9	52,2±10,2	192,7±82,3
DH47(8)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
YL200	17,2±4,3	63,4±16,2	28,7±0.0	38,5±2,9	n.d
GC77	n.d	57,91±23,61	n.d	182,85±110,56	n.d

* n.d, non détectée

X.2.1.7. Effet de la cystéine sur l'évaluation sensorielle des cultures

Nous avons choisi d'évaluer l'effet de deux souches de levure, chacune appartenant à un groupe métabolique distinct : KL640 et YL200, sur l'odeur de cultures réalisées sur méthionine, cystéine ou en mélange. Des échantillons de cultures réalisées avec ces levures

sont aléatoirement évalués par quatre sujets qui en décrivent l'odeur avec leur propre vocabulaire.

Les cultures des levures supplémentées en cystéine sont décrites comme ayant une forte odeur d'œufs pourris, alors que les cultures supplémentées en méthionine sont perçues comme ayant une odeur fruitée, de pomme de terre et très légèrement soufrée (tableau C-12).

De plus, les juges qualifient les cultures de KL640 sur les mélanges cystéine-méthionine, avec des notes fruitées clairement perçues, d'ail ou de chou, et très piquantes, peu agréables, tandis que les cultures de YL200 sont qualifiées comme étant plus soufrées, avec des notes d'oignon, d'ail ou de chou. Pour cette souche, les échantillons provenant de la culture avec le mélange de cystéine-méthionine 0,2-1,0, sont perçus comme des fromages affinés de type Munster ou Epoisse.

Tableau C-12. Description de l'odeur des cultures de KL640 et YL200.

	Descripteur d'odeurs	
Condition de culture	KL640	YL200
1,0 Cys	Œuf pourri (H_2S)	Œuf pourri (H_2S)
1,0 Met	Pomme de terre cuite, milieu de culture, légèrement soufré	Milieu de culture, légèrement soufré
1,0 Met – 0,2 Cys	Fruité, chou, ail, poivre, acide	Moyennement soufré, oignon cuit, ail, chou, fromage affiné (type Munster, Epoisses)
1,0 Met – 1,0 Cys	Fruité, végétal cuit, ail, piquant, acide, poivré	Soufré très fort, chou, fromage affiné

X.2.2. Discussion et Conclusions

Toutes les levures étudiées produisent des CSV à partir de la méthionine et sur des mélanges méthionine-cystéine. Les concentrations et les profils de ces CSV sont souche dépendants. Nos résultats montrent par ailleurs que la méthionine est moins dégradée en présence de cystéine. Par conséquent, des plus faibles concentrations en CSV sont obtenues sur les mélanges méthionine-cystéine (tableau C-8 et figure C-12). Ainsi, une diminution de 30% après ajout de 0,2 gl^{-1} de cystéine et de presque 60% après ajout de 1,0 gl^{-1} de cystéine à 1,0 gl^{-1} de méthionine est obtenue en moyenne.

Si l'on considère les voies potentielles de dégradation de la méthionine et de la cystéine (figure C-13), on peut supposer que ces deux acides aminés soufrés sont catabolisés par des systèmes enzymatiques très semblables. Par exemple, des transaminases, des réductases, des décarboxylases, des déshydrogénases ou des estérases (identifiées par les chiffres 1, 3, 4, 5 et 7 sur la figure C-13) peuvent agir sur la méthionine, la cystéine ou leurs intermédiaires. Etant donné que la méthionine est la principale source des CSV, sa substitution dans un milieu de culture par la cystéine devrait donc provoquer la diminution de la production de ces composés, s'il existe effectivement une forme de compétition vis-à-vis des systèmes enzymatiques impliqués dans leur dégradation. Notre étude nous a donc apporté des résultats allant dans ce sens, et l'effet limitant de la cystéine sur la dégradation de la méthionine par des levures d'affinage n'avait pas été observé auparavant.

Contrairement aux autres levures, *Y. lipolytica* YL200 augmente sa consommation de méthionine en présence de cystéine. D'après les études menés sur le génome des levures (Génolevures : Exploration de Genomic des levures de Hemiascomycete [http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php]), le genre Yarrowia est d'un point de vue phylogénique éloigné des genres *Saccharomyces*, *Debaryomyces* ou *Kluyveromyces*. Ceci va dans le sens des différences métaboliques rencontrées entre ce genre et les quatre autres levures étudiées, plus proches d'un point de vue génétique et métabolique.

Concernant les voies de dégradation de la cystéine, l'H_2S est le principal produit obtenu, même pour de faibles concentrations en cystéine ; qu'elle soit seule ou en présence de méthionine. Nous n'avons pas observé, comme dans le cas des bactéries, de production de polysulfures comme le DMTS, mise à part par GC77 mais en très faible concentration. Ces

résultats peuvent être expliqués par le pH acide des cultures (pH ≤ 4,0), où l'H_2S est principalement sous forme associée, très volatil, et donc moins disponible pour réagir dans le milieu liquide.

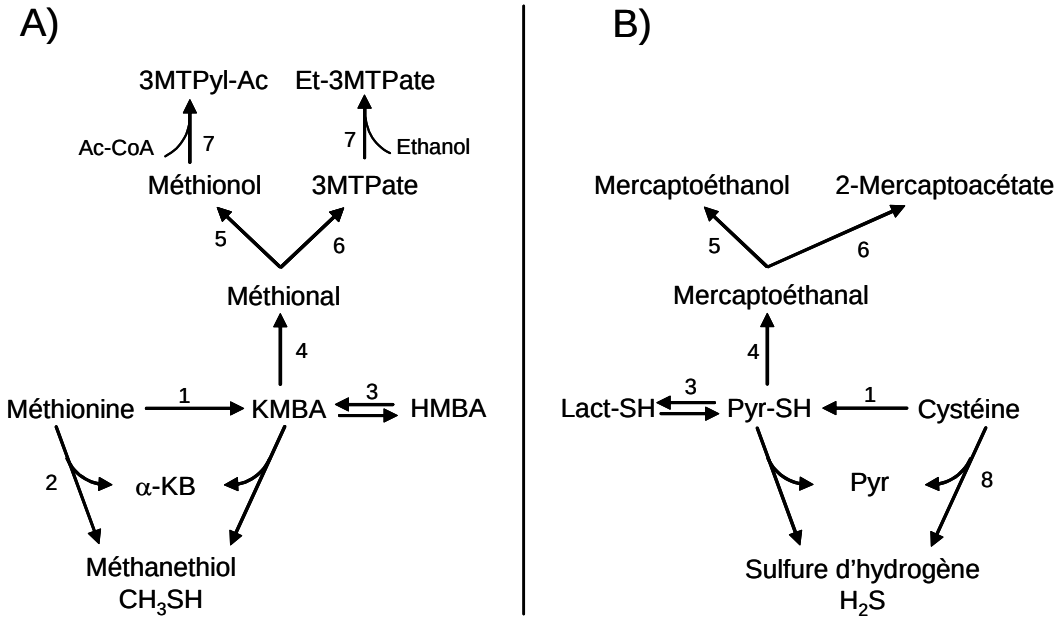


Figure C-13. Voie métabolique de formation de composés soufrés volatils. Le catabolisme de la L-cystéine (B) est décrit par comparaison à celui de la L-méthionine (A). Le mercaptoéthanal, mercaptoéthanol et le 2-mercaptoacétate, produits potentiels de dégradation de la L-cystéine, n'ont pas été identifiés dans nos cultures. α-KB : α- cétobutyrate ; KMBA : 3-méthylthiocétobutyrate ; HMBA : 3-méthylthiohydroxybutyrate ; 3MTPyl-AC : 3(méthylthio)-propyl-acétate ; Et-3MTPate : Ethyl-3(méthylthio)-propanoate ; PyrSH : Mercaptopyruvate ; Pyr : pyruvate ; Lact-SH : Mercaptolactate. Enzymes : 1) transaminase ; 2) déméthiolase ; 3) réductase ; 4) décarboxylase ; 5) alcool déshydrogénase ; 6) oxydase ; 7) estérase ; 8) désulfhydrase.

Les levures produisent généralement des esters à partir des hydrates de carbone (acyl-CoA) et des alcools supérieurs, produits de dégradation des acides aminés. De plus, dans le cas des thio-esters, un thiol peut réagir avec un acide activé, comme l'acétyl-CoA ou des acyl-CoA (Helinck et col., 2000). Ainsi, le 3(méthylthio)-propyl-acétate peut être le produit de la réaction entre le méthionol et l'acétyl-CoA, tandis que l'éthyl-3(méthylthio)-propanoate serait le produit de réaction entre l'éthanol et l'acide 3-méthylthiopropanoique, forme oxydée du

méthional. L'acide 3-méthylthiopropanoique, ou ses esters, n'ont pas été fréquemment retrouvés dans des cultures de levures. Leur formation semble être influencée par les conditions d'aération chez *S. cerevisiae* (Perpète et col., 2006). Récemment Kagli et col., (2006) ont décrit la production de ces esters par des souches de *K. lactis,* mais pas par les souches de *S. cerevisiae* étudiées dans ce travail.

La modification des concentrations des CSV produits a un fort impact sur la perception aromatique des cultures, comme le montrent nos résultats (flairage de cultures de KL640 et YL200). Tandis que les cultures de KL640, qui produisent principalement du méthional et du méthionol, ont été perçues comme fruitée, avec des notes de pomme de terre cuite, les cultures de YL200, qui contiennent du DMDS, ont été perçues plus soufrées et proches de l'odeur de fromage affiné. On peut donc supposer que le développement de *Yarrowia* dans le caillé contribuerait plus aux caractéristiques d'arôme de fromage affiné que *Kluyveromyces*. Des études en milieu caillé seront bien sûr nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Finalement, deux composés originaux, la 2-méthyl-tétrahydrothiophèn-3-one et le 1,3-oxathiane, ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec les spectres existants dans des banques de référence. Des composés de type thiophène sont produits dans le vin (Karagiannis et Lanaridis, 2000), pendant la cuisson de la viande et dans des systèmes modèle par des réactions de type Maillard entre des hydrates de carbone (ou leurs produits de dégradation) et la cystéine (Zheng et col., 1997 ; van Boekel, 2006). Récemment Buzinni et col., (2005) ont montré la production d'un tétrahydrothiophèn-3-one (4,5-dihydro-3(2H)-thiophènone) par des levures associées à la truffe, mais sans proposer de voies potentielles de formation. Les notes aromatiques des composés de type thiophène varient, selon leur structure chimique, de fruité, à des odeurs soufrées et de viande (Vermeulen et col., 2005). Pour ce qui concerne le 1,3-oxathiane, il est bien établi que les dérivés substitués d'oxathiane soient des composés clé de fruits tropicaux, particulièrement dans le fruit de la passion (Singer et col., 1986). Une recherche plus approfondie est cependant nécessaire pour identifier l'origine de l'atome de soufre dans la thiophènone et l'oxathiane identifiée dans nos essais, ainsi que leur potentielle implication dans l'arôme du fromage.

En conclusion, nous avons démontré dans cette étude que la cystéine, même à de faibles concentrations, peut modifier les concentrations en CSV produits par des levures à partir de la méthionine. Cet effet semble être la conséquence de la limitation par la cystéine du catabolisme de la méthionine. D'autre part, et dans le contexte fromager, nous pouvons raisonnablement supposer que l'H_2S produit par le catabolisme de la cystéine ne participerait pas à la modification du profil de CSV en début d'affinage, à cause du caractère acide du caillé pendant cette période. Dans ces conditions, l'H_2S est sous forme associée, très volatil et donc peu disponible pour des réactions dans le caillé. L'augmentation du pH, suite au développement des levures désacidifiantes, peut augmenter la réactivité de l'H_2S, par l'apparition des formes HS^- et S^{2-}. La production simultanée du méthanethiol, produit du catabolisme de la méthionine par les bactéries d'affinage, pourrait ainsi favoriser la production de polysulfures tels que DMTS et DMQS. Ainsi, la co-production de ces molécules soufrées par les levures et les bactéries d'affinage pourrait favoriser le développement des arômes de type fromage affiné.

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-007-0971-3

Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine–cysteine mixtures

M. López del Castillo-Lozano · A. Delile · H. E. Spinnler · P. Bonnarme · S. Landaud

Received: 18 January 2007 / Revised: 23 March 2007 / Accepted: 24 March 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Production of volatile sulphur compounds (VSC) was assessed in culture media supplemented with L-methionine or L-methionine/L-cysteine mixtures, using five cheese-ripening yeasts: *Debaryomyces hansenii* DH47 (8), *Kluyveromyces lactis* KL640, *Geotrichum candidum* GC77, *Yarrowia lipolytica* YL200 and *Saccharomyces cerevisiae* SC45(3). All five yeasts produced VSC with L-methionine or L-methionine/L-cysteine, but different VSC profiles were found. GC77 and YL200 produced dimethyldisulphide and trace levels of dimethyltrisulphide while DH47(8), KL640 and SC45(3) produced mainly methionol and low levels of methional. *S*-methylthioacetate was produced by all the yeasts but at different concentrations. DH47(8), KL640 and SC45(3) also produced other minor VSC including 3-methylthiopropyl acetate, ethyl-3-methylthiopropanoate, a thiophenone, and an oxathiane. However, VSC production diminished in a strain-dependent behaviour when L-cysteine was supplemented, even at a low concentration (0.2 g l^{-1}). This effect was due mainly to a significant decrease in L-methionine consumption in all the yeasts except YL200. Hydrogen sulphide produced by L-cysteine catabolism did not seem to contribute to VSC generation at the acid pH of yeast cultures. The significance of such results in the cheese-ripening context is discussed.

M. López del Castillo-Lozano · A. Delile · H. E. Spinnler · P. Bonnarme · S. Landaud (✉)
UMR782 GMPA, AgroParisTech INRA,
INRA Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles,
78850 Thiverval Grignon, France
e-mail: landaud@grignon.inra.fr

Introduction

Volatile sulphur compounds (VSC) such as methanethiol (MTL), dimethyldisulphide (DMDS), dimethyltrisulphide (DMTS), *S*-methylthioacetate (SMTA) and *S*-methylthiobutyrate (SMTB) (Lamberet et al. 1997a, b; Sablé and Cottenceau 1999) have been identified in many ripened cheeses, including cheddar, limburger, camembert, blue, and other mold-ripened varieties (Engels and Visser 1994; Molimard and Spinnler 1996). These compounds are produced by oxidation of MTL (DMDS and DMTS; Chin and Lindsay 1994) or by reaction with acetylCoA compounds (SMTA and SMTB; Helinck et al. 2000). VSC contribute significantly to the distinctive cheesy flavour (Molimard and Spinnler 1996; Sablé and Cottenceau 1999) even at very low concentrations, given their low odour thresholds (Kubickova and Grosch 1998; Martin et al. 2004). Although VSC production was believed to be exclusively achieved in cheese by bacterial cultures (Ferchichi et al. 1986), recent evidence of the yeast contribution to VSC generation has been reported (Corsetti et al. 2001; Spinnler et al. 2001; Arfi et al. 2002).

As methionine is the main sulphur amino acid in cheese curd, it is believed to be the origin of VSC in cheese, and its catabolism has been extensively studied. Methionine catabolism goes through either a one-step demethylation pathway or a two-step transamination–demethylation pathway (Fig. 1a). The first is present in bacteria such as *Brevibacterium linens* (Ferchichi et al. 1986) and *Arthrobacter* spp. (Bonnarme et al. 2000) and directly generates MTL (Amarita et al. 2004; Dias and Weimer 1998). The second pathway has been identified in several microorganisms including yeasts (Bonnarme et al. 2001a; Bondar et al. 2005; Kagkli et al. 2006), lactic acid bacteria (Gao et al. 1998) and cheese surface bacteria (Bonnarme et al.

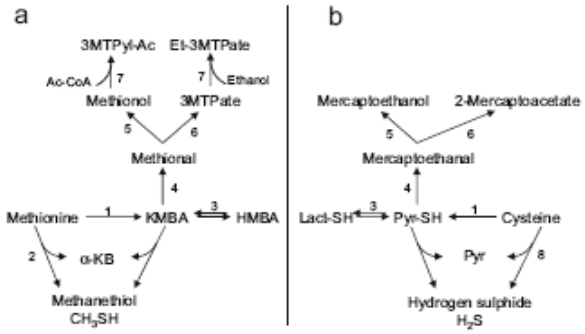


Fig. 1 Catabolic pathways for sulphur compound production. **a** Known L-methionine catabolic pathways; **b** prospective L-cysteine catabolism pathway. *α-KB* α-ketobutyrate; *KMBA* 3-methylthioketobutyrate; *HMBA* 3-methylthiohydroxybutyrate; *3MTPyl-AC* 3-methylpropyl-acetate; *Et-3MTPate* ethyl-3-methylthio-propanoate; *PyrSH* mercaptopyruvate; *Pyr* pyruvate; *Lact-SH* mercaptolactate. Enzymes: *1* transaminase; *2* demethiolase; *3* reductase; *4* decarboxylase; *5* alcohol dehydrogenase; *6* oxydase; *7* esterase; *8* desulfhydrase

2001b). The first step is the L-methionine transamination, which gives rise to the intermediate 4-methylthio-2-oxobutyric acid (KMBA; Bonnarme et al. 2000). In the second step, KMBA is converted into MTL or *S*-methyl thiopropanal (methional). The production of MTL from KMBA is thought to be mainly an enzymatic reaction, but the involved demethiolase has not yet been identified. KMBA can alternatively be decarboxylated through the Ehrlich pathway, like in lactic acid bacteria (Amarita et al. 2001) and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Perpète et al. 2006), producing methional. This compound has also been detected in cheeses, including cheddar and camembert (Dunn and Lindsay 1985; Kubickova and Grosch 1998), and it is generally associated with a defective baked-potato-like odour.

Research on the origin of VSC has been focussed on methionine catabolism without attention being paid to the possible participation of L-cysteine, perhaps due to its low levels in cheese, a 1:5 cysteine/methionine proportion (Fox et al. 2000). Nevertheless, the role of L-cysteine as a potent VSC precursor is well established in some fermented beverages (Duan et al. 2004; Marchand et al. 2002). It is, however, likely that cysteine can follow a similar catabolism pathway (Fig. 1b). Hydrogen sulphide (H_2S) and mercaptopyruvate (α-ketothiopropionate) are thus produced by direct desulphuration (one-step reaction) or by transamination (two-step reaction), respectively; the Ehrlich pathway could also occur. Due to their free thiol group, these compounds are highly reactive and perhaps participate in the generation of other sulphur compounds. Indeed, cheese-ripening bacteria produce higher concentrations of DMTS and dimethyltetrasulfide (DMQS) with the addition of low cysteine concentrations (López del Castillo-Lozano et al. 2007). However, only trace levels of SMTA and DMDS, the main end products of methionine catabolism, have been found in cheese-ripening yeast cultures supplemented with cysteine (López del Castillo-Lozano et al. 2007). We therefore decided to investigate how VSC production by five yeasts could be affected through the supplementation of methionine–cysteine mixtures in comparison with methionine alone. These yeasts were selected from amongst 20 cheese-ripening yeast strains for their high capacity to produce H_2S from L-cysteine.

Materials and methods

Micro-organisms and culture conditions

Kluyveromyces lactis 640 (KL640), *Debaryomyces hansenii* 47(8) [DH47(8)], *Geotrichum candidum* 77 (GC77), *Yarrowia lipolytica* 200 (YL200) and *S. cerevisiae* 45(3) [SC45 (3)] cheese-ripening yeasts were grown in 500-ml flasks containing 100 ml of potato dextrose broth (PDB) supplemented with cysteine (1.0 g l^{-1}), methionine (1.0 g l^{-1}) or methionine-cysteine (1.0–0.2 and 1.0–1.0 g l^{-1}). Yeast culturing was carried out for 48 h at 25°C and 150 rpm. After that, samples were taken for dry weight quantification and VSC analysis. For the latter, 5 ml of each culture were transferred into solid phase micro-extraction (SPME) vials at 4°C and stored at −80°C until analysis. For dry weight, 10 ml of culture was filtered through a glass micro-fibre filter (GF/A filters, pore size 0.2 μm, diameter 4.7 cm; Whatman). Filters were rinsed twice with distilled water and dried at 105°C until their weight was constant.

H_2S production and quantification

PDB medium (5 ml) supplemented as described above was introduced into trap flasks (tissue culture flasks, Greiner Bio-one, Elancourt, France) and inoculated (1%) with each strain. The cultures were allowed to develop for 48 h at 25°C and 90 rpm. The H_2S produced was quantified by a modified methylene blue reaction as previously described (López del Castillo-Lozano et al. 2007).

Cysteine and methionine quantification

Cysteine and methionine were quantified in filtrates. As reported by Gaitonde (1967), initial and residual L-cysteine was specifically quantified by the ninhydrine acid method without interaction with methionine. Cysteine being spontaneously oxidised in solution to cystine, we quantified the total residual cysteine (cysteine + cystine) using dithiotrietol (DTT) to promote the reduction of cystine to cysteine before quantification by the ninhydrine acid method: 500 μl of the

sample were mixed with 500 µl of DTT (10 mM prepared in NaOH, 1N) and left in the dark for 30 min.

Methionine was specifically quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (Bonnarme et al. 2001a), while cysteine could not be detected using these analytical conditions.

VSC extraction and analysis

VSC extraction and analysis were carried out using an automatic SPME method coupled to a gas chromatograph (HP 6890) and a mass spectrometry detector (HP 6890A quadrupole mass spectrometer) as previously described (López del Castillo-Lozano et al. 2007). Volatile compounds were identified by comparing their mass spectra with a reference library (Wiley275821 Library, Agilent Technologies). The concentration of sulphur compounds was determined using a calibration curve made with the standards of DMDS and *S*-methyl thioacetate (MTA). Known amounts of reference compounds were added at various final concentrations (0–100 ppb), and triplicate samples were analysed for each concentration. Linear regression was then performed to accurately determine the DMDS or MTA concentration in each culture. The concentrations of thioesters were extrapolated using MTA calibration, while all the other sulphur compounds, such as DMTS and DMQS, were extrapolated using DMDS calibration.

Data analysis

All analyses were performed in triplicate. Data were expressed as means±standard deviations and analysed using Statistica 6.0 for Windows software. One-way analysis of variance was performed.

Results

Yeast growth

Yeast growth was identical in the presence or absence of L-cysteine, regardless of the strain used. Final concentrations (dry weight) were in the range of 2.5 to 3.2 gl^{-1} with a mean pH of 4.12±0.49. In the following sections, the microbial production of H_2S and VSC will therefore be expressed in concentrations (mg l^{-1}).

VSC production from L-methionine

The production of VSC from L-methionine by the five tested yeast strains is shown in Table 1.

Concerning the VSC production from methionine, we suspected the two pathways for methionine catabolism and consequently separated the yeasts into two groups.

A first group was formed with the yeasts SC45(3), KL640 and DH47(8), which produced mainly methionol in a range of 13.51 to 25.70 mg l^{-1}. SC45(3) and DH47(8) also produced SMTA at high concentrations (4.93±0.27 and 10.03±1.03 mg l^{-1}, respectively) and traces levels of DMDS (≤10 µg l^{-1}). KL640 produced SMTA at low concentrations (0.77±0.07) and did not produce DMDS. These three strains also produced traces amounts of other VSC (Table 1) such as methional and the 3-methylthiopropyl acetate (acetic ester of methionol) and ethyl-3-methylthiopropanoate (ethyl ester of 3-methylpropanoic acid) esters. In addition, 2-methyl-tetrahydrothiophen-3-one (a thiophenone) and 1,3-oxathiane were also detected (Fig. 2). The thiophenone and the oxathiane were well identified (95 and 80% match quality, respectively) by comparison of their mass spectra with the reference library. These two VSC were detected only in cultures supplemented with L-methionine or L-methionine/L-cysteine.

A second group was formed with the yeasts YL200 and GC77, which produced mainly DMDS from methionine but at different levels (1.01±0.16 and 5.70±0.70 mg l^{-1}, respectively). As DMDS is the oxidation product of MTL (Chin and Lindsay 1994), the primary production of this compound was assumed to take place in these strains. GC77 also produced DMTS (0.03 mg l^{-1}) and SMTA (0.92±0.12 mg l^{-1}), while YL200 produced 2-methyl-tetrahydrothiophen-3-one (0.13±0.02 mg l^{-1}). No other VSC were detected in the media where these yeasts were cultivated.

H_2S and VSC production from L-methionine/L-cysteine mixtures

A good correlation was observed between the concentration of supplemented L-cysteine and H_2S production. As expected, low concentrations of H_2S were quantified in cultures with low cysteine concentrations (0.2 g l^{-1}). KL640 (45.8±1.87 mg l^{-1}), SC45(3) (41.9±1.72 mg l^{-1}) and DH47(8) (46.9±1.91 mg l^{-1}) were the highest producers of H_2S at 1.0 g l^{-1} of cysteine (Table 1). These yeasts also produced H_2S in cultures with L-methionine at 1.0 g l^{-1}. In this condition, KL640 produced as much H_2S (14.5±0.66 mg l^{-1}) as in cultures with low cysteine (17.6±0.74 mg l^{-1}).

On the other hand, although neither new nor distinct VSC were identified in cultures supplemented with L-cysteine/L-methionine, differences in VSC concentrations were observed under these conditions in comparison to the L-methionine condition (Table 1). For KL640, SC45(3) and DH47(8) lower methionol and methional concentrations were observed with increased L-cysteine concentrations.

Table 1 Production of sulphur compounds by five yeast strains in liquid medium supplemented with L-methionine (1.0 g l^{-1}) or L-methionine/L-cysteine (1.0–0.2 or 1.0–1.0 g l^{-1})[a]

Yeast strain	Culture condition	Sulphur compound concentration (mgl^{-1})									
		H_2S	DMDS	DMTS	SMTA	Methionol	Methional	Et-3MTP	3MTPyl-Ac	2M-Thiophenone	1,3-oxathiane
KL640	PDB+1.0Met	14.5±0.66	nd[b]	nd	0.77±0.07	14.51±0.35	1.07±0.17	0.06±0.00	0.13±0.03	0.62±0.02	0.18±0.03
KL640	PDB+1.0Met-0.2Cys	17.6±0.74	nd	nd	0.30±0.05	9.83±1.18	0.90±0.13	nd	0.41±0.07	0.98±0.14	0.21±0.04
KL640	PDB+1.0Met-1.0Cys	45.8±1.87	nd	nd	0.82±0.10	4.57±0.20	nd	nd	0.14±0.03	1.12±0.14	0.13±0.02
SC45(3)	PDB+1.0Met	8.41±0.42	tr[c]	nd	4.93±0.27	25.70±2.02	0.57±0.08	0.09±0.01	0.13±0.01	0.55±0.09	0.23±0.01
SC45(3)	PDB+1.0Met-0.2Cys	17.3±0.76	nd	nd	4.06±0.05	17.05±0.40	0.17±0.00	nd	nd	2.16±0.12	0.17±0.03
SC45(3)	PDB+1.0Met-1.0Cys	41.9±1.72	tr	nd	2.08±0.33	11.36±2.56	nd	nd	nd	1.17±0.13	0.14±0.02
DH47(8)	PDB+1.0Met	1.99±0.17	tr	nd	10.03±1.03	13.51±4.57	0.23±0.05	0.04±0.01	0.12±0.02	0.41±0.01	0.16±0.01
DH47(8)	PDB+1.0Met-0.2Cys	11.5±0.54	tr	nd	13.52±1.33	nd	0.65±0.07	nd	nd	1.69±0.30	0.13±0.02
DH47(8)	PDB+1.0Met-1.0Cys	46.9±1.91	tr	nd	10.21±1.59	nd	nd	nd	nd	1.78±0.41	0.15±0.03
YL200	PDB+1.0Met	0.26±0.04	1.01±0.16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.13±0.02	nd
YL200	PDB+1.0Met-0.2Cys	15.5±0.70	0.57±0.03	nd	0.12±0.04	nd	nd	nd	nd	0.11±0.02	nd
YL200	PDB+1.0Met-1.0Cys	22.5±0.97	0.17±0.04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.12±0.01	nd
GC77	PDB+1.0Met	0.66±0.11	5.70±0.70	0.03±0.00	0.92±0.12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GC77	PDB+1.0Met-0.2Cys	5.64±0.31	2.20±0.12	0.02±0.01	2.57±0.32	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GC77	PDB+1.0Met-1.0Cys	19.2±0.84	0.06±0.01	Tr	2.67±0.47	nd	nd	nd	nd	nd	nd

[a] Cultures were harvested after 48 h cultivation in PDB medium. *DMDS* Dimethyldisulphide; *DMTS* dimethyltrisulphide; *SMTA* *S*-methylthioacetate; *Et-3MP* ethyl-3(methylthio)-propanoate; *3MP-Ac* 3(methylthio)-propyl-acetate; *2MThiophenone* 2-methyl-tetrahydrothiophen-3-one. All experiments were triplicated, and sulphur compound concentrations were reported as mean± standard deviation.

[b] *nd* Not detected

[c] *tr* Traces (≤10.0 ppb)

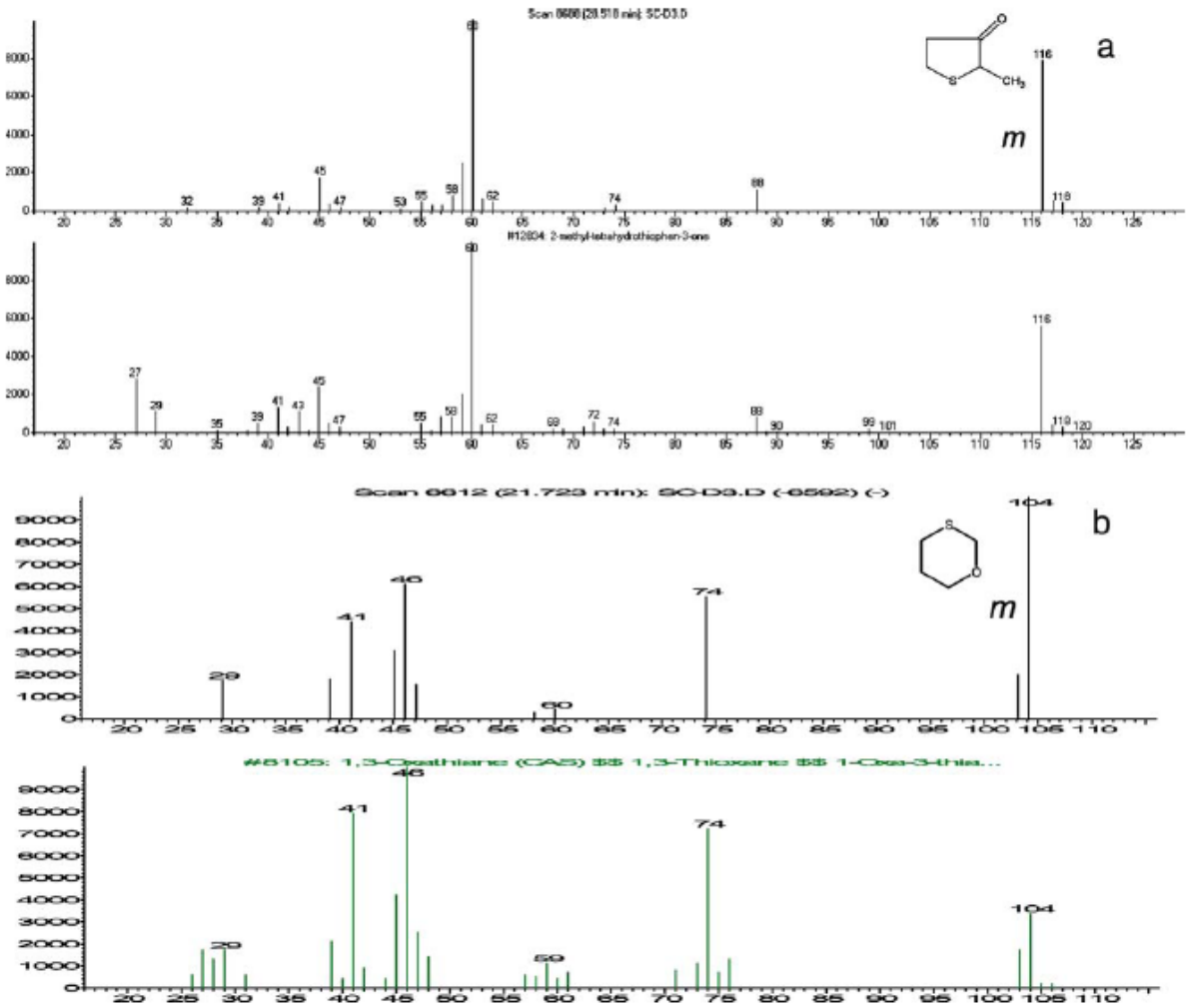


Fig. 2 Mass spectra of a 2-methyl-tetrahydrothiophen-3-one and b 1,3-oxathiane

When L-cysteine was added at 1.0 g l^{-1} to L-methionine, methionol was decreased in KL640 (68%) and SC45(3) (55%) and was no longer detected in DH47(8) cultures. However, the behaviour of other VSC produced by this group of yeast was strain dependent. For instance, at low L-cysteine concentrations (0.2 g l^{-1}), SMTA decreased in KL640 and SC45(3) but increased in DH47(8). When L-cysteine was added at 1.0 g l^{-1}, SMTA remained stable in KL640 and DH47(8) but decreased in SC45(3). Only the thiophenone concentration increased for both L-cysteine concentrations for these three yeast strains, while the oxathiane concentrations did not change significantly (Table 1). Furthermore, DMDS and DMTS production by YL200 and GC77 was also lowered by the addition of either cysteine concentrations, while SMTA production by GC77 increased at both L-cysteine concentrations with no significant difference between them. Thiophenone production by YL200 showed no significant difference between conditions (Table 1).

Methionine–cysteine consumption

When added alone (1.0 g l^{-1}), L-methionine was highly consumed by the yeasts, with a minimum of 46% consumed by YL200 (Fig. 3). The L-methionine consumption was, however, diminished by the addition of L-cysteine (1.0 g l^{-1}) to culture medium, with a strain-dependent behaviour. Indeed, GC77 did not consume more than 21% of L-methionine in L-methionine/L-cysteine 1.0:1.0 condition, whereas YL200 consumption was increased by 29 and 13% with the addition of 0.2 and 1.0 g l^{-1} of L-cysteine, respectively.

On the other hand, the L-cysteine was highly consumed (25–50%) at both concentrations (0.2 and 1.0 g l^{-1}) by all the yeasts.

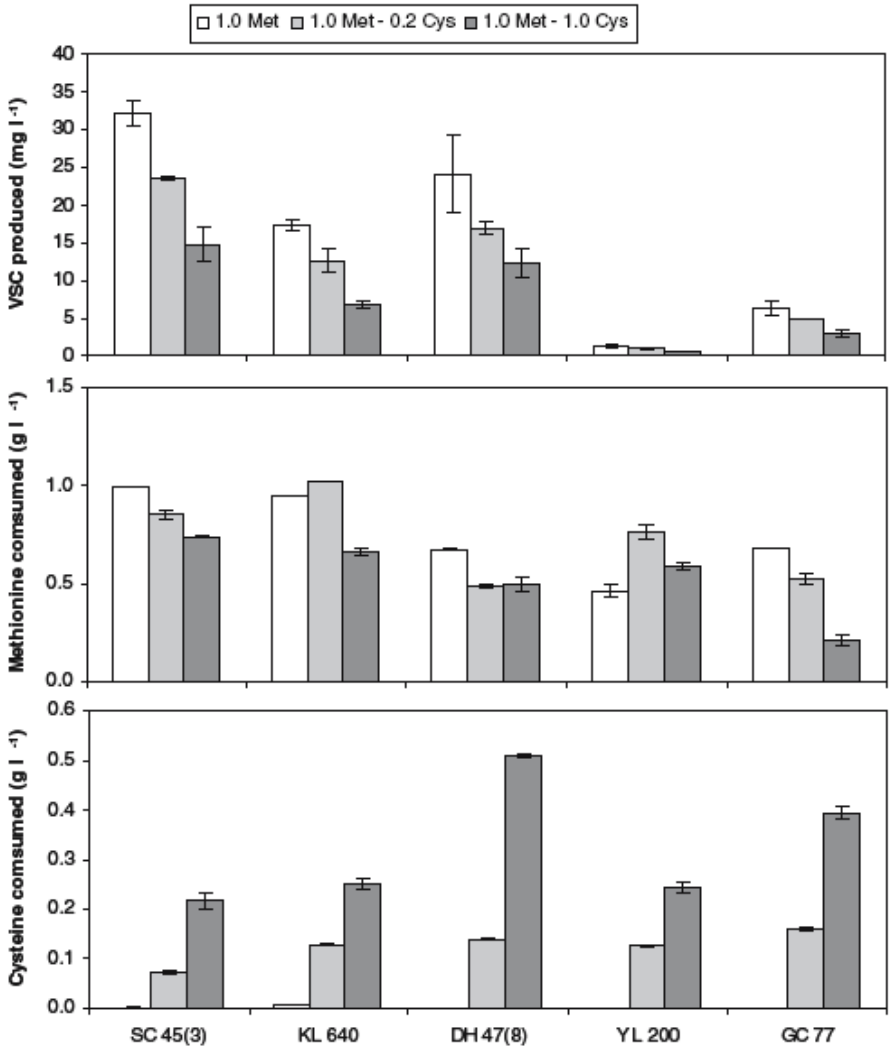


Fig. 3 VSC production and L-methionine and L-cysteine consumption by selected yeast strains in medium supplemented with L-methionine, L-cysteine or L-methionine/L-cysteine

Discussion

All the yeasts tested in this study produced VSC from L-methionine and the L-methionine/L-cysteine mixture but not from L-cysteine alone. We, thus, confirm our previous hypothesis that L-methionine must be present in culture medium for the production of VSC by the yeast. Although the VSC concentrations and compositions were strain-dependent, our results show that L-methionine is catabolised to a lower extent when L-cysteine is also added in the cultures. As a consequence, lower concentrations of VSC are produced in the L-methionine/L-cysteine conditions: 30% reduction by adding 0.2 g l^{-1} of L-cysteine to L-methionine (1.0 g l^{-1}) and almost 60% reduction when L-cysteine was added at 1.0 g l^{-1}.

From these results, it is clear that when L-cysteine and L-methionine are present at the same concentration in the culture medium, L-cysteine is preferably consumed whatever the species are. If the potential pathways for the L-methionine and L-cysteine catabolism are considered (Fig. 1), it appears possible that these two sulphur amino acids can be catabolised by a similar enzymatic system. For instance, transaminase, reductase, decarboxylase, deshydrogenase or esterase enzymes (indicated with 1, 3, 4, 5 and 7 in Fig. 1) could use L-methionine, L-cysteine or their intermediates as substrates. Furthermore, it has been demonstrated that cystathionine β-lyase (CBL) and cystathionine γ-lyase (CGL), in addition to their anabolic activity, are able to produce MTL from methionine and, in the case of CGL, H_2S from cysteine (Yamagata et al. 1993a, b). The substitution of L-methionine by L-cysteine in such as enzymatic system could then account for the lower generation of VSC. It would appear that such was the situation in our cultures when L-cysteine was supplied

along with L-methionine (Fig. 2). Such effect of L-cysteine on L-methionine degradation by cheese-ripening yeasts has never before been observed.

In contrast to the other yeasts, *Y. lipolytica* YL200 showed an increased consumption of L-methionine when L-cysteine was added even at low concentrations. This different metabolic behaviour might be due to the low phylogenic relationship between *Yarrowia* vs *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Kluyveromyces* genera [Génolevures: Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts (http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php)].

On the other hand, H_2S was produced from L-cysteine even at low concentrations in the presence of L-methionine. However, we did not observe the production of polysulphides, as DMTS, apart from the low concentration produced by GC77. These results can be explained partially by the fact that H_2S is more volatile in acidic conditions such as in our yeast cultures (pH≤4.0) than MTL. Hence, even if MTL is produced by L-methionine catabolism, the H_2S is less available to react in solution, and thus, fewer or no polysulphides should be formed. On the contrary, a basic condition can enhance the formation of polysulphide compounds, and such a situation has previously been observed in cheese-ripening bacteria cultures supplemented with L-cysteine (López del Castillo-Lozano et al. 2007).

Yeasts usually produce esters, to a higher or lower extent, from carbohydrates (acyl-CoA) and amino acid intermediates. In their formation, an alcohol or a thiol reacts with an activated acid (acyl-CoA; Helinck et al. 2000). This result could be the case for 3-methylthiopropyl acetate, a product of the reaction between methionol and acetyl-CoA. Recently, esters 3-(methylthio)-propyl acetate and ethyl-3-(methylthio)-propionate have been reported to be produced by *K. lactis* but not by *S. cerevisiae* strains (Kagkli et al. 2006). The oxidised form of methional, the 3-methylthiopropionic acid or its esters have not often been reported in yeast cultures. Their formation by *S. cerevisiae* seems to be influenced by the aeration conditions (Perpète et al. 2006).

Finally, two original compounds, 2-methyl-tetrahydrothiophen-3-one and 1,3-oxathiane, were identified by comparing their mass spectra with a reference library (Fig. 2). Recently, a 4,5-dihydro-3(2H)-thiophenone was identified by Buzzini et al. (2005) to be produced by basidiomycetous yeasts associated to truffles. However, to the authors' knowledge, the production of thiophene compounds by ascomycetous yeast like *K. lactis*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii* and *Y. lipolytica* have not been reported until now. Thiophene compounds have been demonstrated to be produced in heated meat in model system of the Maillard reaction between carbohydrates or carbohydrate-degradation products with cysteine (Zheng et al. 1997; van Boekel 2006) and in some wines (Karagiannis and Lanaridis 2000). The thiophene odour notes vary according to their chemical structure from fruity to sulphurous and meaty odours (Vermeulen et al. 2005).

Concerning 1,3-oxathiane, it is well established that substituted oxathiane derivatives are key compounds in tropical fruits, especially passion fruit (Singer et al. 1986). A more in-depth investigation is, however, needed to clarify the origin of the sulphur atom in the thiophene and the oxathiane, such as their potential implication in cheese aromatisation.

In conclusion, we have demonstrated in this study that even at low concentrations, L-cysteine can change the levels of VSC produced by yeasts from L-methionine. This effect seems to be the consequence of diminished catabolism of L-methionine. In addition, and in a cheese context, we can consider that the H_2S produced by L-cysteine catabolism could not account for the improvement of the VSC profile at the beginning of ripening due to the acidic characteristics of cheese curd at this period. In these conditions, the H_2S is more volatile and thus less available for reactions. The subsequent increase of pH by deacidifying yeasts could result in increased reactivity of H_2S in slightly acid-basic conditions. The simultaneous production of MTL by L-methionine catabolism of yeast and bacteria could enhance the production of polysulphides, such as DMTS and DMQS. Thus, the synergetic interaction between yeasts and bacteria must account for the development of cheese-ripening odours. Further investigations are needed to clarify the importance of L-cysteine in a real cheese context.

Acknowledgement M. Lopez del Castillo is grateful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (National Council of Science and Technology, Mexico) for a Ph.D. scholarship. We would like to thank D. White for valuable editorial advice and R. Tâche and S. Mansour for excellent technical assistance.

References

Amarita F, Fernandez-Espla D, Requena T, Pelaez C (2001) Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Lett 204:189–195

Amarita F, Yvon M, Nardi M, Chambellon E, Delettre J, Bonnarme P (2004) Identification and functional analysis of the gene encoding methionine gamma-lyase in *Brevibacterium linens*. Appl Environ Microbiol 70(12):7348–7354

Arfi K, Spinnler HE, Tâche R, Bonnarme P (2002) Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for *S*-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. Appl Microbiol Biotechnol 58:503–510

Bondar DC, Beckerich JM, Bonnarme P (2005) Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulphur compounds in *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol 71(8):4585–4591

Bonnarme P, Psoni L, Spinnler HE (2000) Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. Appl Environ Microbiol 66(12):5514–5517

Bonnarme P, Arfi K, Dury C, Helinck S, Yvon M, Spinnler HE (2001a) Sulfur compound production by *Geotrichum candidum* from L-methionine: importance of the transamination step. FEMS Microbiol Lett 205:247–252

Bonnarme P, Lapadatescu C, Yvon M, Spinnler HE (2001b) L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening micro-organisms. J Dairy Res 68:663–674

Buzzini P, Romano S, Turchetti B, Vaughan A, Pagnoni UM, Davoli P (2005) Production of volatile organic sulphur compounds (VOSCs) by basidiomycetous yeasts. FEMS Yeast Res 5:379–385

Chin HW, Lindsay RC (1994) Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfure and dimethyl trisulfure. Food Chem 49:387–392

Corsetti A, Rossi J, Gobbetti M (2001) Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. Int J Food Microb 69:1–10

Dias B, Weimer B (1998) Purification and characterization of L-methionine gamma-lyase from *Brevibacterium linens* BL2. Appl Environ Microbiol 64(9):3327–3331

Duan W, Roddick FA, Higgins VJ, Rogers PJ (2004) A parallel analysis of H_2S and SO_2 formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. J Am Soc Brew Chem 62(1):35–41

Dunn HC, Lindsay RC (1985) Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of cheddar cheese. J Dairy Sci 68:2859–2874

Engels WJM, Visser J (1994) Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different types of cheese. Neth Milk Dairy J 48:127–140

Ferchichi M, Hemme D, Nardy M (1986) Induction of methanethiol production by *Brevibacterium linens* CNRZ918. J Gen Microbiol 132:3075–3082

Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH (2000) Chemistry of milk constituents. In: Fox PF, Cogan TM, McSweeney, PLH (eds) Fundamentals of cheese science. Aspen, Maryland, USA, pp 19–43

Gaitonde MK (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Anal Chem J 104:627–633

Gao S, Mooberry SE, Steele JL (1998) Use of 13C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by lactococci. Appl Environ Microbiol 64:4670–4675

Helinck S, Spinnler HE, Parayre S, Dame-Cahagne M, Bonnarme P (2000) Enzymatic versus spontaneous S-methyl thioester synthesis in *Geotrichum candidum*. FEMS Microbiol Lett 193:237–241

Kagkli D-M, Tâche R, Cogan TM, Hill C, Casaregola S, Bonnarme P (2006) *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and volatile-sulphur-aroma-producing micro-organisms of the cheese ecosystem. Appl Microbiol Biotechnol 73:434–442

Karagiannis S, Lanaridis P (2000) The effect of various vinification parameters on the development of several volatile sulphur compounds in Greek white wines of the cultivars Batiki and Muscat of Hamburg. Am J Enol Vitic 50(3):334–342

Kubickova J, Grosch W (1998) Quantification of potent odorants in Camembert cheese and calculation of their odour activity values. Int Dairy J 8:11–16

Lamberet G, Auberger B, Bergére JL (1997a) Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis. I. Effect of substrate and pH on their formation by *Brevibacterium linens* GC171. Appl Microbiol Biotechn 47:279–283

Lamberet G, Auberger B, Bergére JL (1997b) Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis. II. Comparaison of coryneform bacteria, Micrococcaceae and some lactic acid bacteria starters. Appl Microbiol Biotechnol 48:393–397

López del Castillo-Lozano M, Tâche R, Bonnarme P, Landaud S (2007) Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: the first step towards L-cysteine catabolism. J Microbiol Methods 69:70–77

Marchand S, de Revel G, Vercauteren J, Bertrand A (2002) Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine. J Agric Food Chem 50:6160–6164

Martin N, Neelz V, Spinnler HE (2004) Suprathreshold intensity and odour quality of sulphides and thioesters. Food Qual Prefer 15:247–257

Molimard P, Spinnler HE (1996) Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. J Dairy Sci 79:169–184

Perpète P, Duthoit O, De Maeyer S, Imray L, Lawton AI, Stavropoulos KE, Gitonga VW, Hewlins MJE, Dickinson JR (2006) Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 6:48–56

Sablé S, Cottenceau G (1999) Current knowledge of soft cheeses flavor and related compounds. J Agric Food Chem 47:4825–4836

Singer G, Heusinger G, Frohlich O, Schreier P, Mosandl A (1986) Chirality evaluation of 2-methyl-4-propyl-l,3-oxathiane from the yellow passion fruit. J Agric Food Chem 34(6):1029–1033

Spinnler HE, Berger C, Lapadatescu C, Bonnarme P (2001) Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. Int Dairy J 11:245–252

van Boekel MAJS (2006) Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. Biotechnol Adv 24:230–233

Vermeulen C, Laurence G, Collins S (2005) Sensorial contribution and formation pathways of thiols in foods: a review. Food Rev Int 21:69–138

Yamagata S, D'Andrea RJ, Fujisaki S, Isaji M, Nakamura K (1993a) Cloning and bacterial expression of the CYS3 gene encoding cystathionine γ-lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. J Bacteriol 175:4800–4808

Yamagata S, Yasugahira T, Okuda Y, Iwama T (2003b) Conversion of the aminocrotonate intermediate limits the rate of γ-elimination reaction catalyzed by L-cystathionine γ-lyase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biochem 134:607–613

Zheng Y, Brown S, Leding WO, Mussinan C, Ho CT (1997) Formation of sulphur-containing flavour compounds from reactions of furaneol and cysteine, glutathione, hydrogen sulphide, and alanine/hydrogen sulphide. J Agric Food Chem 45(3):894–897

D. Conclusions et Perspectives

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle potentiel de la cystéine et de son catabolisme dans la production de composés soufrés volatils (CSV) par des levures et des bactéries de la flore d'affinage.

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis au point une méthode pour quantifier l'H_2S, produit principal de dégradation de la cystéine, par la réaction de synthèse du bleu de méthylène. Bien que cette réaction soit connue et utilisée depuis longtemps (Fogo et Popowski, 1949), l'approche en système fermé, que nous avons mise en place, nous a permis de piéger sans perte et de quantifier *in situ* l'H_2S produit par les micro-organismes sans affecter de manière mesurable leurs croissances.

En utilisant cette méthode pour cribler plusieurs souches d'affinage et retenir celles qui dégradent efficacement la cystéine, nous avons constaté que : (a) la production d'H_2S est très dépendante de la souche étudiée, même parmi les souches d'une même espèce de levure ou de bactérie, (b) que, dans nos conditions de culture, les levures produisent plus d'H_2S pour une même quantité de cystéine dégradée que les bactéries, et (c) que la moitié des levures étudiées consommait la cystéine en produisant de très faibles quantités d'H_2S.

En faisant un parallèle avec les voies connues de dégradation de la méthionine, il est possible que, pour les bactéries, même si la dégradation de la cystéine se fait en une étape (β-élimination) ou en deux étapes (transamination puis désulfhydration), le produit final de dégradation soit dans tous les cas de l'H_2S. Pour les levures, les voies potentielles de dégradation sont plus complexes : à partir du produit de transamination (le mercapto-pyruvate), en plus de la désulfhydration possible, des étapes de décarboxylation et de réduction sont tout à fait envisageables donnant lieu non plus à de l'H_2S mais à du mercaptoéthanal/mercaptoéthanol et à leurs produits de dégradation. Ceci peut expliquer les différences observées en termes de relation cystéine consommé/H_2S produit.

En outre, les valeurs de pH des cultures pourraient expliquer les plus grandes quantités d'H_2S quantifiées dans les cultures de levures par rapport aux cultures de bactéries. En effet, selon le pH de la solution, l'H_2S peut être présent sous trois formes : non ionisée (H_2S), partiellement ionisée (HS^-) ou totalement ionisée (S^{2-}). La forme la plus volatile, non ionisée, est la forme majoritaire à des pH acides (pH$\leq$ 6). Il est donc possible que, au pH acide des cultures de levures (en moyenne 4,42 ± 0,35), l'H_2S produit soit en grande partie volatilisé et que les quantités mesurées soient plus importantes que dans les cultures des bactéries (pH moyen de 7,37 ± 0,10) où une partie de l'H_2S produit se dissout dans le milieu.

Concernant la capacité des levures à produire plus d'H_2S, et donc à consommer plus de cystéine, il est également possible que cette consommation plus élevée soit liée à l'utilisation de la cystéine pour des fonctions cellulaires propres aux cellules eucaryotes, comme par exemple l'accumulation de glutathion. Ce dernier étant déjà décrit comme une forme de stockage du soufre et de l'ammonium chez les levures (Penninckx, 2002), il serait intéressant d'étudier dans le contexte de l'écosystème fromager, si une accumulation préalable de cystéine par les levures, sous forme de glutathion, favoriserait la croissance et la formation de CSV par d'autres levures ou bactéries se développant ultérieurement.

Sur la base des résultats du criblage, nous avons étudié la production de CSV par cinq souches de levures (*S. cerevisiae* SC45(3), *D. hansenii* DH47(8), *K. lactis* KL640, *Y. lypolytica* YL200 et *G. candidum* GC77) et quatre souches de bactéries (*Arthrobacter spp* AR7(2), *B. linens* BL918 et BL9175 et *C. glutamicum* COD13) sélectionnées comme étant les meilleures productrices d'H_2S et donc les plus efficaces en termes de consommation de cystéine. Les premiers résultats ont montré que l'addition de cystéine dans les cultures ne permettait que la production d'H_2S dans le cas des levures, tandis que pour les bactéries, seuls des CSV provenant habituellement de la dégradation de la méthionine étaient générés ; ces CSV sont probablement produits à partir de la méthionine naturellement contenue dans le milieu de culture utilisé. Toutefois, les quantités de CSV produites par les bactéries étaient réduites par l'ajout de cystéine dans le milieu. Ainsi, dans nos conditions de culture, l'addition de cystéine n'a pas généré de composés soufrés volatils originaux ; par contre, elle a limité la production de CSV à partir de la méthionine. Nous nous sommes donc demandé si une telle diminution en CSV pourrait aussi survenir avec des concentrations en cystéine-méthionine similaires à celles potentiellement présentes dans un caillé. Nous avons donc décidé de clarifier cet effet dans des cultures enrichies en cystéine et en méthionine, ce qui a fait l'objet de la deuxième partie de cette thèse.

Nous avons donc réalisé des cultures avec des ajouts de cystéine seule, de méthionine seule, et des mélanges de ces deux acides aminés soufrés. L'objectif était de déterminer si la concentration en cystéine modifiait la quantité et la nature des CSV produits à partir de la méthionine.

Nous avons mis en évidence la production de méthanethiol, DMDS, DMTS et DMQS par les quatre bactéries étudiées et de thioesters par AR7(2) et BL918 ; ces deux souches ont d'ailleurs produit des quantités très élevées de CSV (≥ 20 ppm), tandis que COD13 a produit des concentrations notablement plus basses (≤ 0,3 ppm). Même si certains comportements restent très souche dépendants, des tendances intéressantes ont été observées. Avec un enrichissement en cystéine, les polysulfures DMTS et DMQS ont été surproduits même avec une faible addition de cystéine (0,2 gl^{-1}) : la concentration en DMTS est doublée, triplée et quadruplée respectivement pour BL918, AR7(2) et BL9175. Une présence importante d'H_2S, produit à partir de la cystéine ajoutée, est probablement responsable de cette augmentation en polysulfures complexes (Chin et Lindsay, 1994a). Néanmoins ceci est paradoxal puisque H_2S est très réducteur, or il est supposé que la formation des polysulfures passe par une oxydation du méthanethiol, celle-ci devrait donc être réduite plutôt qu'augmentée. Ce résultat surprenant mériterait d'être approfondi car il pourrait faire appel à un mécanisme de régulation évitant l'accumulation d'entités chimiques très réductrices.

Par ailleurs, cette augmentation des polysulfures a entraîné la diminution de la concentration en thioesters chez AR7(2) et BL918. Etant donné que les polysulfures DMTS et DMQS sont formés à partir du méthanethiol et que, d'un autre côté, le méthanethiol réagit avec les acyl-CoA pour former des thioesters, on peut émettre l'hypothèse que la diminution des thioesters serait due à une diminution de la disponibilité en méthanethiol. Le caractère limitant du méthanethiol pour la production de thioesters a d'ailleurs été démontré chez la levure *K. lactis* 44_8 (Arfi et col., 2002). De manière analogue la limitation en alcool pour la génération d'esters avait été décrite auparavant dans d'autres produits fermentés, comme par exemple la bière (Calderbank et Hammond, 1994). Des réactions de compétition entre les différents composés soufrés (par exemple, entre l'H_2S et le méthanethiol) pour les acyl-CoA pourraient aussi expliquer la diminution des thioesters en présence de cystéine (H.E. Spinnler, communication personnelle). La formation des composés potentiels correspondant (acyl-mercaptans) n'a pas été directement détectée dans nos cultures.

D'autre part, pour les levures sélectionnées, deux voies de dégradation de la méthionine ont été identifiées : une avec production de méthional et de méthionol, l'autre avec production de méthanethiol et DMDS. Toutes les souches testées sont par contre capables de produire du S-méthyl-thioacétate, mais à des concentrations différentes suivant la souche et

les conditions de culture utilisées. En général, l'addition de cystéine a diminué la consommation de méthionine et donc la concentration des CSV produits. Cette diminution serait peut-être liée à une compétition entre la cystéine et la méthionine vis-à-vis des systèmes enzymatiques responsables de leur catabolisme. Toutefois, des études plus poussées sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Les différentes techniques analytiques, et notamment les tests enzymatiques, utilisées auparavant dans l'étude du métabolisme de la méthionine, se sont avérées peu répétables dans notre cas, en présence de cystéine. Ceci est peut être dû à la plus forte réactivité de la cystéine (fonction SH libre) par rapport à la méthionine. Il est donc indispensable de trouver d'autres méthodes analytiques pour suivre précisément les voies de dégradation de la cystéine et les enzymes impliquées.

Comme dans le cas des bactéries, le profil des CSV produits par les levures a été affecté par l'addition de la cystéine. Toutefois, la formation des polysulfures DMTS et DMQS est restée très limitée chez les levures. Nous considérons que le pH plus acide du milieu de culture est la cause principale de cette absence d'effet sur la production de polysulfures. En effet, dans de telles conditions de pH, l'H_2S est plus volatil et donc moins réactif en solution. Il est possible que le pH plus acide du caillé en début d'affinage puisse limiter la participation de l'H_2S dans l'arôme de fromage. Par contre, l'augmentation du pH pendant l'affinage, et la production de méthanethiol par des bactéries, pourraient améliorer cette situation. Des études en milieu caillé contenant de la cystéine et en cultures mixtes (levures – bactéries) seront d'utilité afin de confirmer cette hypothèse.

Etant donné la faible concentration en cystéine dans le caillé et l'hydrolyse restreinte des α_{S2} et κ-caséines, qui sont les principaux « réservoirs » de cystéine, la voie de trans-sulfuration nous semble la voie la plus probable assurant la formation de cystéine à partir de la méthionine dans le caillé. Cette voie n'est néanmoins pas exprimée chez tous les micro-organismes et, à ce niveau d'avancement de notre travail, nous n'avons pas réussi à la démontrer clairement chez les levures ou les bactéries étudiées. Toutefois, bien que la voie de trans-sulfuration puisse diminuer la disponibilité en méthionine et donc la production d'arômes soufrés, elle pourrait cependant y participer indirectement via la production d'H_2S (à partir de la L-cystéine ou de l'homocystéine intermédiaire dans cette voie de biosynthèse). Ainsi, elle pourrait participer à une production accrue de polysulfures DMTS et DMDS.

Dans nos essais de flairage, les profils de CSV obtenus sur le mélange méthionine/cystéine de 1,0-0,2 gl^{-1} (une proportion très proche de celle potentiellement présente dans un caillé) donnent un arôme très semblable à un fromage bien affiné. Il serait intéressant d'étudier la complémentarité entre les flores d'affinage (levures-bactéries) par rapport à cette voie métabolique.

Afin de poursuivre cette étude, l'utilisation d'outils de génomique s'avère incontournable dans un premier temps. Il est clair que les aptitudes des bactéries et des levures à produire des CSV sont déterminées non seulement par des gènes liés au métabolisme du soufre, mais aussi très probablement par des gènes liés au métabolisme du carbone et de l'azote. On peut citer par exemple les gènes liés à la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée, voie qui peut utiliser la chaîne carbonée de la méthionine, (Arfi et col., 2006) ou à l'utilisation de la méthionine et de la cystéine dans des fonctions cellulaires majeures (méthylation, synthèse protéique, réponse au stress oxydatif..). Ainsi, la connaissance des différences génomiques et des différences d'expression des gènes (analyse transcriptomique globale) de micro-organismes cible de la flore d'affinage sera primordiale pour mieux comprendre les rôles et l'adaptation des levures et des bactéries dans les écosystèmes fromagers. Cette première étape devrait permettre ensuite de mieux appréhender les rôles de ces micro-organismes dans la génération des diverses fonctions de la flore d'affinage.

Nous espérons que les deux projets qui débutent au LGMPA en 2007 [projet Ecomet : "Ecosystème fromager : étude fonctionnelle du métabolisme du soufre", Pascal Bonnarme (projet ANR-06-PNRA-014-01) ; et projet de séquençage du génôme d'*Arthrobacter arilaitensis,* T. Vallaeys (projet GENOSCOPE AP06/AP07-Projet #66)] permettront de générer les connaissances nécessaires à une connaissance et une maîtrise accrues de l'écosystème fromager.

E. Références Bibliographiques

A

Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolak, D., Leung, T., (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. International Journal of Food Microbiology, 69: 25-36.

Aldarf, M., Amrane, A., Prigent, Y., (2002). Carbon and nitrogen substrates consumption, ammonia release and proton transfer in relation with growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* on a solid medium. Journal of Biotechnology, 95: 99-108.

Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopez, A., Ramos, J., Loureiro-Dias, M.C., (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. International Journal of Food Microbiology, 56: 191-197.

Alting, A.C., Engels, W.J.M., van S, S., Exterkate, F.A., (1995). Purification and characterization of cystathionine β-lyase from *Lactococcus lactis* subs *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. Applied and Environmental Microbiology 61(11): 4037-4042.

Amarita, F., Requena, T., Taborda, G., Amigo, L., Pelaez, C., (2001). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. Journal of Applied Microbiology, 90, 971-978

Amarita, F., Fernandez-Espla, D., Requena, T., Pelaez, C., (2001). Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiology Letter, 204: 189-195.

Amarita, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J., Bonnarme, P., (2004). Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-γ-lyase in *Brevibacterium linens*. Applied and Environmental Microbiology, 70(12): 7348-7354.

André, B., (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 11: 1575-1611.

Anocibar-Beloqui, A., Guedes de Pinho, E., Bertrand, A., (1995). Importance de la N-3-(methylthiopropyl)-acetamide et de l'acid 3-méthylthiopropionique dans les vins. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 29: 17-26.

Anwar M.M., Meki A.R., (2003). Oxidative stress in streptozocin-induced diabetic rats: effect of garlic oil and melatonin. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 135: 539-547.

Arfi, K., Spinnler, H.E., Tache, R., Bonnarme, P., (2002). Production of volatile compounds by cheese-ripenning yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kleuyveromyces lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 58: 503-510.

Arfi, K., Amárita, F., Spinnler, H.E., Bonnarme, P., (2003). Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. Journal of Biotechnology, 105: 245-253.

Arfi, K., (2005). Biogenèse, par la flore d'affinage, de composes soufrés volatils intervenant dans l'aromatisation du fromage. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Aston, B.W., Dulley, J.R., (1982). Cheddar cheese flavour. Australian Journal of Dairy Technology, 59-64.

Aubel, D., Germond, J.A., Gilbert, C., Atlan, D., (2002). Isolation of the patC gene encoding the cystathionine β-lyase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and molecular analysis of inter-strain variability in enzyme biosynthesis. Microbiology, 148: 2029-2036.

Auger, S., Yuen, W.H., Danchin, A., Martin-Verstraete, I., (2005a). The metIC operon involved in methionine biosynthesis in *Bacillus subtilis* is controlled by transcription antitermination. Microbiology, 148: 507-518.

Auger, S., Gomez, M.P., Danchin, A., Martin-Verstraete, I., (2005b). The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase. Biochimie 87: 231-238.

Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., Takagi, H., (2005). Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. Applied and Environmental Microbiology, 71(7): 4149-4152.

B

Baptist, E.W., Kredich, N.M., (1977). Regulation of L-cystine transport in *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology, 131: 111-118.

Bang J.H., Han, E.S., Lim, I., Lee, C.S., (2004). Differential response of MG132 cytotoxicity against small cell lung cancer to changes in cellular GSH contents. Biochemical Pharmacology, 68(4): 659-666.

Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarow, D., (1983). Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.

Barth, G., Gaillardin, C., (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews, 19: 219-237.

Bartschi, C., Berthier, J., Valla, G., (1994). Inventaire et évolution des flores fongiques de surface du Reblochon de Savoie. Le Lait, 74 : 105-114.

Belitz, H.D., Grosch, W., (1999). Amino acids, peptides, proteins. Dans : Food chemistry. Ed. Springer, pag. 8-90.

Berger, E.A., Heppel, L.A., (1972). A binding protein involved in the transport of cysteine and diaminopimelic acid in Escherichia coli. Journal of Biology Chemistry, 247: 7684-7694.

Berger, C., Khan, J.A., Molimard, P., Martin, N., Spinnler, H.E., (1999a). Production of sulphur flavours by ten strains of *Geotrichum candidum*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5510-5514.

Berger, C., Martin, N., Collin, S., Gijs,L., Khan, J.A., Pirarez, G., Spinnler, H.E., Vulfson, E.N., (1999b). Combinatorial approach to flavor analysis. 2. Olfactory investigation of a library of S-ethyl thioesters and sensory evaluation of selected components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3274-3279.²

Bergère, J.L., Tourneur, C., (1992). Les bactéries de surface des fromages. Dans : Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Coordinateurs : J. Hermier, J. Lenoir, F. Weber. Ed. Cepil, Paris, pag. 127-163.

Bloes-Brenton, S., Bergère, J.L., (1997). Production de composés soufrés volatils par des Micrococcaceae et des bactéries coryneformes d'origine fromagère. Le Lait, 77: 543-559.

Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow´s and goat´s milk. International Dairy Journal, 0:1-8.

Bolotin-Fukuhara, M., Toffano-Nioche, C., Artiguenave, F., Duchateau-Nguyen, G., Lemaire, M., Marmeisse, R., Montrocher, R., Robert, C., Termier, M., Wincker, P., Wésolwski-Louvel, M., (2000). Genomic exploration of hemiascomycetous yeast: 11. *Kluyveromyces lactis*. FEBS Letters, 487: 66-70.

Bonaïti, C., Parayre, S., Irlinger, F., (2006). Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. International Journal of Food Microbiology, 107: 171-179.

Bondar, D.C., Beckerich, J.M., Bonnarme, P., (2005). Involvement of a branched-chain aminotrasferase in production of volatile sulphur compounds in *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology, 71(8): 4585-4591.

Bonnarme, P., Psoni, L., Spinneler, H.E., (2000). Diversity of L-methionine catabolism by cheese ripening bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66(12): 5514-5517.

Bonnarme, P., Arfi, K., Dury, C., Helinck, S., Yvon, M., Spinnler, H.E., (2001a). Sulfur compound production by *Geotrichum candidum* from L-methionine: importance of the transamination step. FEMS Microbiology Letters, 205: 247-252.

Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M., Spinnler, H.E., (2001b). L-Methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. Journal of Dairy Research, 68, 663–674.

Bonnarme, P., Amarita, F., Chambellon, E., Semon, E., Spinnler, H.E., Yvon, M., (2004). Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiology Letters, 236: 85-90.

Boyaval, P., Desmazeaud, M.J., (1983). Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. Le Lait, 63 : 187-216.

Bowles, K.C., Ernste, M.J., Kramer, J.R., (2003). Trace sulfide determination in oxic freshwaters. Analytica Chimica Acta, 477: 113-124.

Bracq, E., Levieux, A., Levieux, D., (1997). Purification and immunochemical quantitation of *Penicillium roqueforti* acid aspartyl proteinase. Journal of Dairy Research, 64: 105–113.

Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Bray, R.C., Adams, B., Smith, A.T., Richards, R.L., Lowe, D.J., Bailey, S., (2001). Reactions of dimethylsulfoxide reductase in the presence of dimethyl sulfide and the structure of the dimethyl sulfide modified enzyme. Biochemistry, 40: 9810-9820.

Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P.F., Goodfellow, M., Cogan, T.M., (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. Applied and Environmental Microbiology 68, 820-830.

Breuning, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J.J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H.Y., Wesolowski-Louvel, M., Zeeman, A.M., (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. Enzyme and Microbial Technology, 26: 771-780.

Bruinenberg, P.G., Roo, G.D., Limsowtin, G.K.V., (1997). Purification and characterization of cystathionine γ-lyase from *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* SK11: Possible role in flavour compound formation during cheese maturation. Applied and Environmental Microbiology, 63: 561-566.

Bunik, V.I., (2003). 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation: Role of the lipoate residues and thioredoxin. European Journal of Biochemistry, 270:1036-1042.

Buzzini, P., Romano, S., Turchetti, B., Vaughan, A., Pagnoni, U.M., Davoli, P., (2005). Production of volatile organic sulphur compounds (VOSCs) by basidiomycetous yeasts. FEMS Yeast Research 5:379-385.

C

Calderbank, J., Hammond, J.R.M., (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. Journal of the American Society of Brewing Chemists 52 (2) : 84-90.

Carlsson, J., Granberg, G.P.D., Nyberg, G.K., Edlund, M.B.K., (1979). Bactericidal effect of cysteine exposed to atmospheric oxygen. Applied and Environmental Microbiology, 37(3): 383-390.

Caussette, M., Marty, A., Combes, D., (1997). Enzymatic synthesis of thioesters in non-conventional solvents. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 68: 257–262.

Cavaille-Lefebvre, D., Combes, D., (1997). Lipase synthesis of short chain flavour thioesters in solvent-free medium. Biocatalysis and Biotransformation, 15, 265–279.

Celland, W.W., (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH group. Biochemistry, 3: 480-482.

Charlot, G., (1966). Le soufre. Dans : Chimique analityque. G. Charlot. Masson & Cie.

Chin, H.W., Lindsay, R.C., (1994a). Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulphide. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 387-392.

Chin, H.W., Lindsay, R.C., (1994b). Mechanisms of formation of volatile sulphur compounds following the action of cysteine sulfoxide lyase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 1529-1536.

Choi, M.F., Hawkins, P., (1997). Development of sulphide-selective electrode membranes based on fluorescence quenching. Analytical Chemistry Acta, 344: 105-110.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J., (1997a). La Biochimie de l'affinage. Dans : Le Fromage. Coordinateurs : A. Eck, J-C. Gillis. 3ème édition, Ed. Lavoisier Tec & Doc, pag. 86-161.

Choisy, C. Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J.L., Tourneur, C., (1997b). Les phénomènes microbiens. En : Le fromage. Coordinateurs : A. Eck, J-C. Gillis. 3ème édition, Ed. Lavoisier Tec & Doc, pag. 377-446.

Collins, J.A., Monty, K.J., (1973). The cysteine desulfhydrase of *Salmonella typhimurium*: Kinetic and catalytic properties. The Journal of Biological Chemistry, 248(17): 5943-5949.

Collins, M.D., (1981). The genus *Brevibacterium*. En : "The Prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria". Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (Ed). Springer-Verlag, Berlin. Vol 2, pag. 1351-1354.

Collin, J.C., Law, B.A., (1989). Isolation and characterization of L-methionine-γ-demethiolase from *Brevibacterium linens* NCDO 739. Sciences des Aliments, 9: 805–812.

Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G., (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. International Dairy Journal, 13: 841–866.

Cooper, A.J., Haber, M.T., Meister, A., (1982). On the chemistry and biochemistry of 3-mercaptopyruvic acid, the α-keto acid analog of cysteine. The Journal of Biological Chemistry, 57(2): 816-826.

Cooper, A.J., (1983). Biochemistry of sulfur containing amino acids. Annual Review of Biochemistry, 52: 187-222.

Corsetti, A., Rossi, J., Gobbetti, M., (2001). Interactions between yeast and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. International Journal of Food Microbiology, 69: 1-10.

Crowell, E.A., Guymon, J.F., Ingraham, J.L., (1961). Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeasts. American Journal of Enology and Viticulture 12:3:111-116.

Cuer, A., Dauphin, G., Kergomard, A., Dumont, J.P., Adda, J., (1979a). Production of S-methylthioacetate by *Brevibacterium linens*. Applied and Environmental Microbiology, 38: 332-334.

Cuer, A., Dauphin, G., Kergomard, A., Dumont, J. P., Adda, J., (1979b). Production of S-methylthioacetate by *Micrococcus* cheese strains. Agricultural and Biological Chemistry, 43: 1783–1784.

Cuer, A., Dauphin, G., Kergomard, A., Roger, S., Dumont, J. P., Adda, J. (1979c). Flavour properties of some sulphur compounds isolated from cheeses. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 12: 258–261.

Cuer, A., (1982). Les arômes de fromage. Parfums-Cosmétiques-Arômes, 44: 88-92.

Curioni, P.M.G., Bosset, J.O., (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfatometry. International Dairy Journal, 12: 959-984.

D

Dales, R.E., Spitzer, W.O.; Suissa, S., Schechter, M.T. Tousignant, P., Steinmetz, N., (1989). Respiratory health of a population living downwing from natural gas refineries. American Review Respiratoire Diseas, 139: 595-600.

De Mora, S.J., Eschenbruch, R., Knowles, S.J., Speding, D.J., (1986). The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. Food Microbiology, 3(1): 27-32.

Demarigny, Y., Beuvier, E., Buchin, S., Pochet, S., Grappin, R., (1997). Influence of raw milk microflora on the characteristics of swiss-type cheeses: II. Biochemical and sensory characteristiques. Le Lait, 77: 151-176.

Demarigny, Y., Berger, C., Desmasures, N., Guegen, M., Spinnler, H.E., (2000). Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by Geotrichum candidum. Journal of Dairy Research, 67: 371-380.

Desmazeaud, M., Adda, J., (1989). La maîtrise des flaveurs. En : Microbiologie Alimentaire. Tome 2 : Les fermentations alimentaires. Coordinateurs : C.M. Bourgeois et J.P. Larpent. Ed. Lavoisier Tec & Doc, pag. 265-281.

Desmazeaud, M., (1997). Aptitude du lait au développement de la flore lactique. Dans : Le fromage. Coordinateurs : A.Eck et J-C. Gillis coord. 3ème édition, Ed. Lavoisier Tec & Doc, pag. 212-228.

Dias, B., Weimer, B., (1998a). Convertion of methionine to thiols by *Lactococci*, *Lactobacilli*, and *Brevibacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 64(9): 3320-3326.

Dias, B., Weimer, B., (1998b). Purification and characterization of L-methionine γ-lyase from *Brevibacterium linens* BL2. Applied and Environmental Microbiology, 64(9): 3327-3331.

Dias, B., Weimer, B. (1999). Production of volatil sulphur compounds in Cheddar cheese slurries. International Dairy Journal, 9: 605-611.

Dickinson, J.R., Lanterman, M.M., Danner, D.J., Pearsoni, B.M., Sanz, P., Harrison, S.J., Hewlins, M.J.E., (1997). A 13C Nuclear Magnetic Resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 272(43): 26871–26878.

Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Hewlins, M.J.E., (1998). An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 273(40): 25751-25756.

Drotar, A., Burton, G.A., Tavernier, J.E., Fall, R., (1987a). Widespread occurrence of bacterial thiol methyltransferases and the biogenic emission of methylated sulphur gases. Applied and Environmental Microbiology, 53: 1626-1631.

Drotar, A., Fall, L.R., Mishalanie, E.A., Tavernier, J.E., Fall, R., (1987b). Enzymatic methylation of sulfide, selenide, and organic thiols by *Tetrahymena thermophila*. Applied and Environmental Microbiology, 53: 2111-2118.

Duan, W., Roddick, F.A., Higgins, V.J., Rogers, P.J., (2004). A parallel analysis of H_2S and SO_2 formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. Journal of American Society of Brewing Chemists, 62(1): 35-41.

Dumont, J.P., Roger, S., Adda, J., (1976). L'arôme du camembert : autres composés mineurs mis en évidence. Le Lait, 56: 595-599.

Dunn, H.C., Lindsay, R.C., (1985). Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 68: 2859-2874.

E

Eden, A., Van Nedervelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N., Debourg, A., (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. Applied Microbiology and Biotechnology, 55: 296–300.

Eliskases-Lechner, F., Ginzinger, W., (1995a). The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneform. Le Lait, 75: 571-584.

Eliskases-Lechner, F., Ginzinger, W., (1995b). The yeast flora of surface-ripened cheeses. Milchwissenschaft, 50: 458-462.

EPA (1993). Health assessment document for hydrogen sulfide. Doccument : EPA/600/8-86/026F/January 1993. Environmental Protection Agency (EPA), USA.

Esaki, N., Soda, K., (1987). L-methionine γ-lyase from *Pseudomonas putida* and *Aeromonas*. Methods in Enzymology, 143: 459-465.

Escudero, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V., (2000). Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48: 4268-4272.

F

Faleev, N.G., Troitskaya, M.V., Paskonova, E.A., Saporoyskaya, M.B., Belikov, V.M., (1996). L-methionine-γ-lyase in *Citrobacter intermedius* cells: stereochemical requirements with respect to the thiol structure. Enzyme and Microbiology Technology, 19: 590-593.

Famelart, M.H., Bouillanne, C., Kobilinsky, A., Desmazeaud, M.J., (1987). Studies on *Brevibacterium linens* in fermentor. Applied Microbiology and Biotechnology, 26: 378-382.

Fauconnier, M.L., Mpambara, A., Delcarte, J., Jacques, P., Thonart, P., Marlier, M., (1999). Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase. Biotechnology Letters, 21 (7): 629-633.

Ferchichi, M., Hemme, D., Naedi, M., Pamboukdjian, N., (1985). Production of methanethiol from methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ918. Journal of General Microbiology, 131: 715-723.

Ferchichi, M., Hemme, D., Nardy, M., (1986). Induction of methanethiol production by *Brevibacterium linens* CNRZ918. Journal of General Microbiology, 132: 3075-3082.

Fernandez, M., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., Siezen, R.J., van kranenburg, R., (2002). Regulation of the metc-cysk operon, involved in sulphur metabolism in *Lactoccocus lactis*. Journal of Bacteriology, 184(1): 82-90.

Ferreira, A.D., Viljoen, B.C., (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. International Journal of Food Microbiology, 86: 131-140.

Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H.E., Glaser, P., Vallaeys, T., (2004). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. Journal of Applied Microbiology 97, 546–556.

Fiedler, F., Schäffler, M., Stakebrandt, E., (1981). Biochemical and nucleic acid hybridisation studies on *Brevibacterium linens* and related strains. Archives of Microbiology, 129: 85-93.

Fleet, G.H., (1990). Yeasts in dairy products- a review. Journal of Applied Bacteriology, 68: 199-211.

Fleet, G.H., (2003). Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86: 11-22.

Fogo, J.K., Popowsky, M., (1949). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide: Methylene blue method. Analytical Chemistry, 21(6): 732-734.

Font, J., Gutierrez, J., Lalueza, J., Perez, X., (1996). Determination of sulfide in the leather industry by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography. A, 740: 125-132.

Fox, P.F, Wallace, J.M., (1997). Formation of flavour compounds in cheese. Advances in Applied Microbiology, 45: 17-85.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2000a). Chemistry of milk constituents. Dans : Fundamentals of cheese science. Ed. Aspen Publishers, pag. 19-43.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2000b). Starter Cultures. Dans : Fundamentals of cheese science. Ed. Aspen Publishers, pag. 54-96.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2000c). Cheese flavor. Dans : Fundamentals of cheese science. Ed. Aspen Publishers, pag. 282-304.

Fox, P.F., (2001). Milk proteins as food ingredients. International Journal of Dairy Technology, 54(2): 41-55.

Fukamachi, H., Nakano, Y., Yoshimura, M., Koga, T., (2002). Cloning and characterization of the L-cysteine desulfhydrase gene of *Fusobacterium nucleatum*. FEMS Microbiology Letters, 215: 75-80.

G

Gaitonde, M.K. (1967). A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Analytical Chemistry Journal, 104: 627-633.

Garcia, A.H., Vazquez, E.P., Campos, J. M., (2003). Minibioreactor-gas collector for determining bacteria-produced hydrogen sulphide. Electronical Journal of Biotechnology 6, 223-232.

Gao, S., Oh, D.H., Broadbent, J.R., Johnson, M.E., Weimer, B.C., Steele, J.L., (1997). Aromatic amino acid catabolism by lactococci. Le Lait, 77: 371–381.

Gao, S., Steele, J.L., (1998). Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. Journal of Food Biochemistry, 22: 197–211.

Gao, S., Mooberry, E.S., Steele, J.L., (1998). Use of ^{13}C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by *Lactococci*. Applied and Environmental Microbiology, 64(12): 4670–4675.

Gijs, L., Perpete, P., Timmermans, A., Collins, S., (2000). 3-methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulphide in aged beers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 6196-6199.

Gijs, L., Vermeulen, C., Collin, S., (2003). Review: Occurrence et voies de formation des arômes soufrés dans la bière. 1. Les sulfures et les polysulfures. Cerevisia, 37-46.

Gijs, L., (2003). Vers un contrôle des composés soufrés mineurs de la bière. Thèse de doctorat. Université Catholique de Louvain.

Giovanelli, J., (1987). Sulphur amino acids of plants : an overwiew. Methods in enzymology, 143: 419-426.

Gonzalez de Llano, D., Polo, C.M., Ramos, M., (1995). Study of proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. Journal of Dairy Science, 78: 1018–1024.

Gonzales-Sizo, M.I., Freire-Picos, M.A., Ramil, E., Gonzales-Dominguez, M., Torres, A.R., Cerdan, M.E., (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. Enzyme and Microbial Technology, 26: 699-705.

Griffith, O.W., (1987). Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview. Methods in Enzymology, 143: 366-376.

Griffith, R., Hammond, E.G., (1989). Generation of swiss cheese flavor components by the reaction of amino acids with carbonyl compounds. Journal of Dairy Science, 72: 604-613.

Gueguen, M., Schmidt, M., (1992). Les levures et *Geotrichum candidum*. Dans : « Les groupes microbienes d'intérêt laitier ». Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F. (Ed). CEPIL, Paris. pag 165-219.

Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Vannini, L., Galgano, F., Favati, F., Gardini, F., Suzzi, G., (2001). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. International Journal of Food Microbiology, 69: 79-89.

H

Hansen, J., Kielland-Brandt, M.C., (1996). Modification of biochemical pathways in industrial yeast. Journal of Biotechnology, 49: 1-12.

Hansen, J., (1999). Inactivation of MXR1 abolishes formation of dimethyl sulfide from dimethyl sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 3915-3919.

Hansen, T.K., Jakobsen, M., (2001). Taxonomical and technological characteristics of *Saccharomyces* spp associated with blue veined cheese. International Journal of Food Microbiology, 69: 59-68.

Hansen, T.K., van den Tempel, T., Cantor, M.D., Jakobsen, M., (2001). *Saccharomyces cerevisiae* as a starter culture in Mycella. International Journal of Food Microbiology, 69: 101-111.

Helinck, S., Spinnler, H.E., Parayre, S., Dame-Cahaghe, M., Bonnarme, P., (2000). Enzymatic versus spontaneous S-methyl thioester synthesis in *Geotrichum candidum*. FEMS Microbiology Letters, 193: 237-241.

Hesse, H., Nikiforova, V., Gakière, B., Hoefgen, R., (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. Journal of Experimental Botany, 55(401): 1283-1292.

Horinouchi, M., Yoshida, T., Nojiri, H., Yamane, H., Omori, T., (1999). Oxidation of dimethyl sulfide by various aromatic compound oxygenases from bacteria. Biotechnology Letters, 21: 929-933.

Hwang, C.F., Riha, W.E., Jin, B., Karwe, M.V., Hartman, T.G., Daun, H., Ho, C.T., (1997). Effect of cysteine addition on the volatile compounds released at the die during twin-screw extrusion of wheat flour. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 30, 411–416.

Hwang, B-J, Yeom, H-J., Kim, Y., Lee, H-S., (2002). *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. Journal of Bacteriology, 184(5): 1277–1286.

Helinck, S., Spinnler, H.E., Parayre, S., Dame-Cahagne, M., Bonnarme, P., (2000). Enzymatic versus spontaneous S-methyl thioester synthesis in *Geotrichum candidum*. FEMS Microbiology Letters 193: 237-241.

Hewedi, M.M., Fox, P.F., (1984). Ripening of blue cheese: characterization of proteolysis. Milchwissenschaft 39: 198–201.

Hohmann, S., Meacock, P., (1998). Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. Biochimica et Biophysica Acta 1385, 201-219.

Hoppe-Seyler, T.S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W.H., Geis, A., Heller, K.J., (2004). Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. Systematic and Applied Microbiology, 27: 211-218.

I

Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefèvre, M., Grimont, P.A.D., (2005). *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated

from the surfaces of cheeses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 457-462.

Irlinger, F., Morvan, A., Elsolh, N., Bergere, J. L. (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. Systematic and Applied Microbiology. 20, 319–328 (1997).

J

Jakobsen, M., Narvhus, J., (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. International Dairy Journal, 6: 755-768.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A., (1995). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. Applied and Environmental Microbiology, 61(2): 461-467.

Jocelyn, P.C., (1983). Spectrophotometric assay of thiols. Methods in Enzymology, 143: 44-67.

Jones, D., Keddie, R.M., (1986). The genus *Arthrobacter*. Dans: "The Prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria". Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (Ed). Springer-Verlag, Berlin. Vol 2, pag. 1283-1299.

Jones, D., Collins, M.D., (1986). Irregular, nonsporing Gram-positive rods. Dans : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore. Vol 2, pag. 1261-1434.

Jones, E.W., (1991). Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 266 (3): 7963-7966.

K

Kagkli, D.M., Bonnarme, P., Neuvéglise, C., Cogan, T.M., Casaregola, S., (2006). L-methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: Identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. Applied and Environmental Microbiology, 72(5): 330-3335.

Kaminarides, S.E., Laskos, N.S., (1992). Yeasts in factory brine of feta cheese. Australian Journal of Dairy Technology, 47, 68-71.

Kamoun, P., (2004). Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. Amino Acids, 26: 243-254.

Karagiannis, S., Lanaridis, P., (2000). The effect of various vinification parameters on the development of several volatile sulphur compounds in Greek white wines of the cultivars Batiki and Muscat of Hamburg. American Journal of Enolic and Viticulture 50(3):334-342

Katrusiak, A.E., Paterson, P.G., Kamencic, H., Shoker, A., Lyon, A.W., (2001). Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl–glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. Journal of Chromatography B, 758 (2001) 207–212.

Kertesz, M.A., (1999). Riding the sulfur cycle: Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 24: 135-175.

Kertesz, M.A., (2001). Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. Research in Microbiology, 152: 279-290.

Khan, J. A., Gijs, L., Berger, C., Martin, N., Piraprez, G., Spinnler, H.E., Vulfson, E. N., Collin, S., (1999). Combinatorial approach to flavor analysis. 1. Preparation and characterization of a S-methyl thioester library. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3269–3273.

Kim, Y.H., (1992). Biochemistry of disulfides. Dans : Organic sulfur chemistry: Biochemical aspects. S. Oae and T. Okuyama (Ed). CRS-Press, page 137-194.

Koga, J., Adachi, T., Hidaka, H., (1992). Purification and characterization of indolpyruvate decarboxylase. The Journal of Biological Chemistry, 267(22): 15823-15828.

Kok, J., (1993). Genetics of proteolytic enzymes of lactococci and their role in cheese flavor development. Journal of Dairy Science, 76(7): 2056-2064.

Kreger-van Rij, N.J.W., (1984). The yeast, a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam.

Kristoffersen, T., Gould, I.A., Purvis, G.A., (1964). Cheddar cheese flavor. III. Active sulfhydryl group production during ripening. Journal of Dairy Science, 47: 5099-603.

Kuban, V., Dasgupta, P.K., Marx, J.N., (1992). Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater. Analytical Chemistry, 64: 36-43.

Kubickova, J., Grosch, W., (1997). Evaluation of potent odorants of camembert cheese by dilution and concentration techniques. International Dairy Journal, 7: 65-70.

Kubickova, J., Grosch, W., (1998a). Evaluation of flavour compounds of camembert cheese. International Dairy Journal, 8: 11-16.

Kubickova, J., Grosch, W., (1998b). Quantification of potent odorants in camembert cheese and calculation of their odour activity values. International Dairy Journal, 8: 17-23.

L

Lamberet, G., Auberger, B., Bergère, J.L., (1997a). Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis. II. Compararison of coryneform bacteria, *Micrococcacea* and some lactic acid bacteria starters. Applied Microbiology and Biotechnology, 48: 393-397.

Lamberet, G., Auberger, B., Bergère, J.L., (1997b). Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis. I. Effect of substrates and pH on their formation by *Brevibacterium linens* GC171. Applied Microbiology and Biotechnology, 47: 279-283.

Larsen, M. D., Kristiansen, K. R., Hansen T. K., (1998). Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. International Journal of Food Microbiology, 43: 215-221.

Law, B.A., (1984). Flavour development in cheeses. Dans : "Advances in microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Davies, F.L., Law, B.L. (Ed). Elsevier Applied Science Publishers, London, pag. 187-208.

Lawrence, W.C., Cole, E.R., (1968). Yeast sulphur metabolism and the formation of hydrogen sulphide in brewery fermentations. Wallerstein Commun. 21, 95-113.

Lawrence, N.S., Davis, J., Compton, R.G., (2000). Analytical strategies for the detection of sulfide: a review. Talanta 52: 771-784.

Lecanu, L., Ducruet, V., Jouquand, C., Gratadoux, J.J., Feigenbaum, A., (2002). Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3810–3817.

Leclercq-Perlat, M.-N., Corrieu, G., Spinnler, H.E., (2004). The color of *Brevibacterium linens* depends on the yeast used for cheese deacidification. Journal of Dairy Science 87, 1536-1544.

Lee, C.W., Desmazeaud, M.J., (1985a). Partial purification and some properties of an aromatic amino acid and an aspartate aminotransferase in *Brevibacterium linens* 47. Journal of General Microbiology, 131: 459-467.

Lee, C.W., Desmazeaud, M.J., (1985b). Utilization of aromatic amino acids as nitrogen sources in *Brevibacterium linens*: An inducible aromatic amino acid aminotransferase. Archives of Microbiology, 140, 331-337.

Leinweber, F.J., Monty, K.J., (1987). Cysteinesulfinic acid: Fuchsin method. Methods in Enzymology, 143: 160-163.

Lenoir, J., 1984. The surface flora and its role in the ripening of cheese. International Dairy Federation Bulletin, 171, 3-20.

Lenoir, J., Gripon, J.C., Lambert, G., Cerning, J., (1992). Les *Penicillium*. Dans : Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Corrdinateurs : J. Hermier, J. Lenoir, F. Weber. Ed. Cepil, Paris, pag. 221-257.

Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J.L., Tourneur, C., (1985). La maitrise du bioreacteur fromage. Biofutur, 12: 23-50.

Lepingle, A., Casaregola, S., Neuveglise, C., Bon, E., Nguyen, H.V., Artiguenave, F., Wincker, P., Gaillardin, C., (2000). Genomic exploration of the *Hemiascomyceteous* yeast: 14. *Debaryomyces hansenii* var *hansenii*. FEBS Letters, 487: 82-86.

Leustek, T., Martin, M.N., Bick, J.A., Davies, J.P., (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revelated through molecular and genetic studies. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 141-165.

Lieu, C., Martin, E., Leyh, T.S., (1994). The energetic linkage of GTP hydrolysis and the synthesis of activated sulfate. Biochemistry, 33: 7309-7314.

Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V.L., (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. International Dairy Journal, 14: 923–945.

Lockwood, B.C., Coombs, G.H., (1991). Purification and characterization of methionine γ-lyase from *Trichomonas vaginalis*. Biochemical Journal, 279: 675-682.

Lowe, P.N., Hodgson, J.A., Perham, R.N., (1983). Dual role of a single multienzyme complex in the oxidative decarboxylation of pyruvate and branched-chain 2-oxo acids in *Bacillus subtilis*. Biochemistry Journal, 215: 133–140.

M

Ma, Y.L., Galal, A., Zimmer, H., Mark, H.B., Huang, Z.F., Bishop, P.L., (1994). Potentiometer selective determination of hydrogen sulfide by an electropolymerized membrane electrode based on binaphthyl-20-crown-6. Analytical Chimical Acta, 289: 21-26.

MacCoy, J.H., (1962). The isolation of Salmonellae. Journal of Applied Bacteriology, 25: 213-224.

Manning, D.J. (1979). Chemical production of essential Cheddar flavour compounds. Journal of Dairy Research, 46: 531-537.

Marchand, S., de Revel, G., Vercauteren, J., Bertrand, A., (2002). Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6160-6164.

Marzluf, G.A., (1997). Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. Annual Review Microbiology, 51:73-96.

Martelli, A. (1989). Volatiles in the flavour of Gorgonzola cheese. Rivista Societe Italiana Scienze Alimentaire, 18: 251–262.

Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., (1985). Précis de biochimie. Edit: Les Presses de l'Université Laval, Paris.

Martin, N., Neelz, V., Spinnler, H.E., (2004). Suprathreshold intensity and odour quality of sulphides and thioesters. Food Quality and Preference, 15: 247–257.

Mason, A.B., Dufour, J.P., (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. Yeast, 16: 1287-1298.

McSweeney, P.L.H., Sousa, M. J., (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: a review. Le Lait, 80: 293–324.

McSweeney, P.L.H., (2004). Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology, 57(2/3): 127-144.

Meister, A., Anderson, M.E., (1983). Glutathione. Annual Review in Biochemistry, 52: 711-760.

Meussdoerffer, F., Tortora, P., Holzer, H., (1980). Purification and properties of proteinase A from yeast. Journal of Biological Chemistry 255 (24): 12087-12093.

Miura, Y., Fukasawa, K., Koh, T., (1998). Determination of sulfur anions at the ppb level by ion chromatography utilizing their catalytic effects on the postcolumn reaction of iodine with azide. Journal of Chromatography A, 804: 143-150.

Molimard, P., Spinnler, H.E., (1996). Review: Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. Journal of Dairy Science, 79:169-184.

Moreau, A., Fillon, M., Truong-Meyer, X.M., Pingaud, H., Strehalaiano, P., (1998). Etude du catabolisme de l'acide lactique et des acides aminés chez *Brevibacterium linens*. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 16: 251-258.

Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F., Cogan, T., (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. Applied and Environmental Microbiology, 71(11): 6489-6500.

Munch, J.W., Munch, D.J., Winslow, S.D., Wendelken, S.C., Pepich, B.V., (1998). Determination of carbonyl compounds in drinking water by pentafluorobenzylhydroxylamine derivation and capillary gas chromatography with electron capture detection. Method No. 556. U.S. Environment Protection Agency, Cincinnati, Ohio, pag. 1-37.

N

Nagasawa, T., Kanzaki, H., Yamada, H., (1984). Cystathionine γ-lyase of *Streptomyces phaeochromogenes*. Journal Biological Chemistry, 259: 10393-10403.

Naud, A.I., Legault-Demare, J., Cretin-Maitenaz, P., (1992). Les bactéries propioniques. Dans : Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Coordinateurs : J. Hermier, J. Lenoir, F. Weber. Ed. Cepil, Paris, pag. 85-125.

Nedjma, M., Hoffmann, N., (1996). Hydrogen sulfide reactivity with thiols en presence of cooper (II) in hydroalcoholic solutions cognac brandies: Formation of symetrical and unsymetrical dialkyltrisulfides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(12): 3935-3938.

Neviani, E., Gatti, M., Vannini, L., Gardini, F., Suzzi, G., (2001). Contribution of Gallactic acid bacteria to *Saccharomyces cerevisiae* metabolic activity in milk. International Journal of Food Microbiology, 69: 91-99.

O

Oae, S., (1992). Oxygenation and oxydation of sulfur compounds. Dans : Organic sulfur chemistry: Biochemical aspects. S. Oae and T. Okuyama (Ed). CRS-Press, page 195-222.

Ogrydziak, D.M., (1993). Yeast extracellular proteases. Critical Reviews in Biotechnology, 3: 1-55.

Ono, B., Naito, K., (1991). The cysteine transport system of *Saccharomyces cerevisiae*.Yeast, 7: 849-855.

Ono, B., Naito, K., Shirahige, Y., Yamamoto, M., (1991). Regulation of cystathionine γ-lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 7: 843-848.

Ono, B.I., Hazu, T., Yoshida, S., Kawato, T., Shinoda, S., Brzvwczy, J., Paszewski, A., (1999). Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. Yeast, 15: 1365-1375.

Ozaki, H., Shiio, I., (1982). Methionine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*: properties and essential role of *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase. Journal of Biochemistry, **91:**1163–1171.

P

Park, S.K., Kim, J.Y., (2004). New development for measuring hydrogen sulfide during brewing –preliminary data. Technical Quaterly Master Brewers Association of the Americas, 41, 310-316.

Pawlak, Z., Pawlak, A.S., (1999). Modification of iodometric determination of total and reactive sulfide in environmental samples. Talanta 48(2): 347-353.

Penninckx, M., (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeast. FEMS Yeast Research, 2: 295-305.

Perpète, P., Duthoit, O., De Maeyer, S., Imray, L., Lawton, A.I., Stavropoulos, K.E., Gitonga, V.W;, Hewlins, M.J.E., Dickinson, J.R., (2006). Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 6: 48-56.

Praphailong, W., Fleet, G.H., (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeast. Food Microbiology, 14: 459-468.

Prentice, R.D.M., McKernan, G., Bryce, J.H., (1998). A source of dimethyl disulfide and dimethyl trisulphide in grain spirit produced with a coffey still. The American Society of Brewing Chemists, 99-103.

R

Radford-Knoery, J., Cutter, G.A., (1993). Determination of carbonyl sulfide and hydrogen sulfide species in natural waters using specialized collection procedures and gas chromatography with flame photometric detection. Analytical Chemistry, 65: 976-982.

Ramet, J.P., (1997). Technologie comparée des différents types de caillé. Dans : Le Fromage. Coordinateurs : A. Eck, J-C. Gillis. 3ème édition, Ed. Lavoisier Tec & Doc., pag. 334-364.

Rattray, F.P, Fox, P. F., (1999). Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: A Review. Journal of Dairy Science, 82: 891-909.

Reps, A., (1987). Bacterial surface-ripened cheese. Dans : Cheese: chemistry, physics and microbiology, Vol. 2, Major cheese groups, Editor: P.F. Fox. Elsevier Applied Science, London, pag. 151-184.

Riendeau, D., Rodriguez, A., Meighem, E., (1982). Resolution of the fatty acid reductase from *Photobacterium phosphoreum* into acyl protein synthetase and acyl-CoA reductase activities. Evidence for enzyme complex. Journal of Biological Chemistry, 257: 6908-6915.

Rijnen, L., Bonneau, S., Yvon, M. (1999a). Genetic characterization of the major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. Applied and Environmental Microbiology, 65(11): 4873-4880.

Rijnen, L., Delacroix-Buchet, A., Demaizières, D., Quéré, J.L., Gripon, J.C., Yvon, M. (1999b). Inactivation of lactococcal aromatic aminotransferase prevents the formation of floral aroma compounds from aromatic amino acids in semi-hard cheese. International Dairy Journal, 9: 877-885.

Roger, S., Degas, C., Gripon, J.C., (1988). Production of phenyl ethyl alcohol and its esters during ripening of traditional Camembert. Food Chemistry, 28: 1-12.

Rohm, H. Eliskases-Lechner, F., Brauer, M., (1992). Diversity of yeast in selected dairy products. Journal of Applied Bacteriology, 72: 370-376.

Romano, P., Grazia, L., Suzzi, G., Giudici, P., (1989). The yeasts in cheese-making. Yeast, 5: S151-S155.

Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Suzzi, G., (2001). Yeasts from water-buffalo mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. International Journal of Food Microbiology, 69: 45-51.

Roostita, R., Fleet, G.H., (1996a). The occurrence and growth of yeasts in camembert and blue-veined cheeses. International Journal of Food Microbiology, 28: 393-404.

Roostita, R., Fleet, G.H., (1996b). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. International Journal of Food Micriobiology, 31: 205-219.

Rosi, I., Costamagna, L., (1987). Screening for extracellular acid proteases produced by wine yeasts. Journal of Instant Brewing 93, 322–331.

Rudy, J.L., (1989). Determination of the lower limit of detection. Clinical Chemistry, 35, 2152-2153.

Russell, J., McKeown, J.A., Hensman, C., Smith, W.E., Reglinski, J., (1997). HPLC determination of biologically active thiols using pre-column derivatisation with 5,5'-dithio-(bis-2-nitrobenzoic acid). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15: 1757-1763.

Ruiz-Herrera, J., Starkey, R.L. (1969). Dissimilation of methionine by fungi. Journal of Bacteriology, 99: 544-551.

S

Sablé, S., Cottenceau, G., (1999). Current knowledge of soft cheeses flavour and related compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(12): 4825-4836.

Safavi, A., Ramezani, Z., (1997). Kinetic spectrophotometric determination of traces of sulfide. Talanta 44 (7): 1225-1230.

Saloman, D.R., Romano, J., (1992). Applications of capillary ion electrophoresis in the pulp and paper industry. Journal of Chromatography A., 602: 219-225.

Schaffrath, R., Breunig, K.D., (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis.* Fungal Genetics and Biology, 30: 173-190.

Schieberle, P., Engel, W., (2002). Characterization of novel, sulfur-containing Maillard flavor compounds. International Congress Series, 1245: 229-233.

Schutte, L., Koenders, E.B., (1972). Components Contributing to Beef Flavor. Natural Precursors of 1-Methylthio-ethanethiol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 20(2): 181-185.

Scislowski, P.W.D., Pickard, K., (1993). Methionine transamination-metabolic function and subcellular compartimentation. Molecular and Cellular Biochemistry, 129: 39-45.

Segal, W., Starkey, R.L., (1969). Microbial decomposition of methionine and identity of the resulting sulphur products. Journal of Bacteriology, 98: 908-913.

Seiler, H., (1986). Identification of cheese-smear coryneform bacteria. Journal of Dairy Research, 53: 439-449.

Sekowska, A., Kung, H.F., Danchin, A., (2000). Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2(2): 145-177.

Shanthi, K., Balasubramanian, N., (1996). Method for sampling and analysis of hydrogen sulfide. Analyst 121: 647-650.

Sharpe, M.E., Law, B.A., Philips, B.A., Picher, D.G., (1977). Methanethiol production by coryneform bacteria: strains from dairy and human skin sources and *Brevibacterium linens*. Journal of General Microbiology, 101: 345-349.

Shelef, L.A., Tan, W., 1998. Automated detection of hydrogen sulfide release from thiosulfate by *Salmonella spp*. Journal of Food Protection, 61: 620-622.

Shiff, J.A., Saidha, T., (1987). Overwiew: Inorganic sulphur and sulfate activation. Methods in Enzymology, 143: 329-334.

Sinclair, D.A., Dawes, I.W., Dickinson, J.R., (1993). Purification and characterization of the branched chain α-ketoacid dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Molecular Biology International, 31: 911-922.

Singer, G., Heusinger, G., Frohlich, O., Schreier, P., Mosandl, A., (1986). Chirality evaluation of 2-methyl-4-propyl-l,3-oxathiane from the yellow passion fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34(6):1029–1033.

Singh, R., Lamoureux, G.V., Lees, W.J., Whitesides, G.M., (1995). Reagents for rapid reduction of disulfide bonds. Methods in Enzymology, 251: 167-173.

Singh, T., Fox, P.F., Healy, A., (1997). Isolation and identification of further peptides in the diafilltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, 64: 433-443.

Slaughter, J.C., Nomura, T., (1992). Autocatalytic degradation of proteins in extracts of a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The role of endoproteinases and exopeptidases. Applied Microbiology and Biotechnology, 37: 638-642.

Smacchi, E., Gobetti, M., (1998). Purification and characterization of cystathionine γ-lyase from *Lactobacillus fermentum* DT41. FEMS Microbiology Letters, 166: 197-202.

Smacchi, E., Fox, P.F., Gobbetti, M., (1999). Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. FEMS Microbiology Letters, 170(2): 327-333.

Smit, G., Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E., Siezen, R., Engels, W., (2000). Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. Food Research International 33: 153-160.

Smit, B.A., Engels, W.J.M., Alewijn, M., Lommerse, G.T.C.A., Kippersluijs, E.A.H., Wouters, J.T.M., Smit, G., (2004a). Chemical conversion of α-keto acids in relation to

flavour formation in fermented foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1263-1268.

Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M., (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiology Review, 29: 591-610.

Soda, K., Tanaka, H., Esaki, N., (1983). Multifuntional biocatalysis: methionine γ-lyase. Trends in Biochemical Sciences, 8: 214-217.

Soda, K. (1987). Microbial sulphur amino acids: an overview. Methods in Enzymology, 143: 453-459.

Soltoft, M., (1988). Flavour active sulphur compounds. Brygmesteren, 2: 18-24.

Soulignac, L., (1995). Propriétés des levures fromagères : Influence des sources de carbones utilisées sur leur aptitudes a désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris.

Sourabié, A., (2005). Production d'hétérocycles soufrés par les réactions de Maillard à partir de précurseurs formés par voie microbiologique. Mémoire de DEA, INAPG.

Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal, 11, 327-345.

Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D.S., Renault, P., Guédon, E., (2005). Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. Journal of Bacteriology, 187(11): 3762-3778.

Spinnler, H.E. Berger, C., Lapadatescu, C., Bonnarme, P., (2001). Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. International Dairy Journal, 11: 245-252.

Spiropoulos, A., Bisson, L., (2000). MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 66(10): 4421-4426.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 47(2): 479-491.

Sutherland, C.M., Henschke, P.A., Langridge, P., Barros-Lopes, M., (2003). Subunit and cofactor binding of *Saccharomyces cerevisiae* sulfite reductase – towards developing wine yeast with lowered ability to produce hydrogen sulfide. Australian Journal of Grape and Wine Research, 9, 186-193.

Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M.T., Caruso, M., Andrighetto, C., Gardini, F., (2000). Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo mozzerella cheese. Journal of Applied Microbiology 88: 117-123.

Suzzi, G., Lanorte, M.T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E., (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. International Journal of Food Microbiology, 69: 69-77.

T

Tanaka, H., Esaki, N., Soda, K., (1985). A versatile bacterial enzyme: L-methionine γ-lyase. Enzyme and Microbiology Technology, 7: 530-537.

Thierry, A., Maillard, M.B., (2002a). Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. Le Lait, 82: 17-32.

Thierry, A., Maillard, M.B., Yvon, M., (2002b). Conversion of L-leucine to isovaleric acid by *Propionibacterium freudenreichii* TL34 and ITGP23. Applied and Environmental Microbiology, 68: 608-615.

Thierry, A., Richoux R., Kerjean, J.R., (2004). Isovaleric acid is mainly produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheese. International Dairy Journal, 14: 801–807.

Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y., (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61(4): 503-532.

Trieu-Cuot, P., Gripon, J.-C., (1983). Etude électrophorétique de la protéolyse au cours de l'affinage des fromages à pâte persillée du type bleu d'Auvergne. Le Lait, 63: 116–128.

Trieu-Cuot, P., Archieri-Haze, M.-J., Gripon, J.-C., (1982). Effect of aspartyl proteinases of *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* on caseins. Journal of Dairy Research, 49: 487–500.

Tse, Y.H., Janda, P., Lever, A.B.P., (1994). Electrode with electrochemically deposited N,N',N'',N'''-tetramethyltetra-3,4-pyridinoporphyrazinocobalt(I) for detection of sulfide ion. Analytical Chemistry. 66: 384-390.

U

Urbach, G., (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. International Dairy Journal, 5: 877-903.

Urbach, G. (1997). The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: Contribution of volatile compounds. International Journal of Dairy Technology, 5, 879–903.

Uren, J.R., (1987). Cystathionine β-lyase from *Escherichia coli*. Methods in Enzymology, 143: 483–485.

V

van Boekel, M.A.J.S., (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. Biotechnology Advances, 24: 230-233.

van den Tempel, T., Jakobsen, M., (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. International Dairy Journal, 10: 263-270.

van Staden, J.F., Kluever, J.G., (1998). Determination of sulphide in effluent streams using a solid-phase lead(II) chromate reactor incorporated into a flow-injection system. Analytical Chemistry Acta 369: 157-161.

Vermeij, P., Kertesz, M.A., (1999). Pathways of assimilative sulfur metabolism in *Pseudomonas putida*. Journal of Bacteriology, 181(18): 5833-5837.

Vermeulen, C., Gijs, L., Collins, S., (2005). Sensorial contribution and formation pathways of thiols in foods: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 21: 69-138.

Viljoen, B.C., Greyling, T., (1995). Yeast associated with Cheddar and Gouda making. International Journal of Food Microbiology, 28: 79-88.

Viljoen, B.C., (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments, International Journal of Food Microbiology, 69: 37-44.

Volkan, M., Eroglu, T., Eroglu, A.E., Ataman, O.Y., Mark, H.B., (1998). A novel sorbent tube for ambient hydrogen sulfide determination. Talanta, 47: 585-593.

W

Waché, Y., Aguedo, M., Nicaud, J.M., Belin, J.M., (2003). Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology, 61:393-404.

Wada, M., Awano, N., Haisa, K., Takagi, H., Nakamori, S., (2002). Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. FEMS Microbiology Letters 217: 103-107.

Wainwright, T., McMahon, J.F., McDowell, J., (1972). Formation of methional and methanethiol from methionine. Journal of Science Food and Agriculture, 23: 911-914.

Walker, M.D., Simpson, W.J., (1993). Production of volatile sulphur compounds by ale and lager brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Letters in Applied Microbiology, 16: 40-43.

Wang, X., Kolattukudy, P.E., (1995). Solubilization and purification of aldehyde-generating fatty acyl-CoA reductase from green alga *Botryococcus braunii*. FEBS Letters, 370: 15–18.

Weimer, B, Dias, B., Ummadi, M., Broadbent, J., Brennand, C., Jaegi, J., Jonhson, M., Milani, F., Steele, J., Sisson, D.V., (1997). Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence cheddar cheese ripening. Le Lait, 77: 383-398.

Weimer, B., Seefeldt, K., Dias, B., (1999). Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. Antonie van Leeuwenhoek, 76: 383-398.

WHO (1981). Evrironmental Health Criteria 19: Hydrogen sulfide. World Health Organization Report. http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc019.htm. Dernier acces : 31-10-05.

Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N., (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. International Dairy Journal, 15: 817–830.

Wood, A.F., Aston, J.W., Douglas, G.K., (1985). The determination of free amino acids in cheese by capillary column gas-liquid chromatography. Australian Journal of Dairy Technology, 40: 166-169.

Wyder, M.T., Puhan, Z., 1999. Investigation of the yeast flora in smear ripened cheeses. Milchwissenschaftliche, 54(6): 330-333.

X

Xie, Y., Springborg, D.C., Reckhow, D.A., (1993). Analysis of haloacetic acids and ketoacids without diazomethane. Water quality technology conference. American Water Works Association, Colorado, pag. 1-5.

Y

Yoo, S.S., Min, S.S., Kim, J.H., (1998). The study on the formation of sulfur-containing compounds responsibles for meat flavor generated by the Maillard reaction. Food Science and Biotechnology, 7(2): 122-126.

Yoshida, Y., Nakano, Y., Amano, A., Yoshimura, M., Fukamachi, H., Oho, T., Koga, T., (2002). lcd from *Streptococcus anginosus* encodes a C–S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades L-cysteine. Microbiology, 148: 3961–3970.

Yu, J., Jeffries, H.E., Lelacheur, R.M., (1995). Identifying airborne carbonyl compounds in isoprene atmospheric photooxidation products by their PFBHA oximes using gas chromatography/ion trap mass spectrometry. Environmental Science and Technology, 29: 1923-1932.

Yu, J., Flagan, R.C., Seinfeld, J.H., (1998). Identification of products containing –COOH, -OH and –C=O in atmospheric oxidation of hydrocarbons. Environmental Science and Technology, 32: 2357-2370.

Yuan, Y.Y., Kuriyama, H., (2000). Determination of hydrogen sulfide in a yeast culture solution by flow analysis utilising methylene blue spectrophotometric detection. Biotechnology Letters, 22: 795-799.

Yuki, Ogasawara, Y., Ishii, K., Togawa, T., Tanabe, S. (1991). Determination of trace amounts of sulphide in human red blood cells by high-performance liquid chromatography

with fluorimetric detection after derivatization with *p*-phenylenediamine and iron (III). Analyst, 116: 1359-1363.

Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C., (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. Applied and Environmental Microbiology, 63: 414–419.

Yvon, M., Berthelot, S., Gripon, J.C., (1998). Adding α-ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. International Dairy Journal, 8: 889–898.

Yvon, M., Chambellon, E., Sorokine, A., Roudot-Algaron, F., (2000). Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. Applied and Environmental Microbiology, 66(2): 571–577.

Yvon, M., Rijnen, L., (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal, 11: 185–201.

Z

Zheng, Y., Brown, S., Leding, W.O., Mussinan, C., Ho, C.T., (1997). Formation of sulphur-containing flavour compounds from reactions of furaneol and cysteine, glutathione, hydrogen sulphide, and alanine/hydrogen sulphide. Journal of Agricultural Food Chemistry 45(3): 894-897.

F. Annexes

ANNEXE 1. DISTRIBUTION DES DIFFERENTES FORMES DE L'H_2S EN SOLUTION AQUEUSE EN FONCTION DU pH

En solution, la distribution entre les diverses espèces chimiques de l'H_2S (H_2S, HS^- et S^{2-}) est régie en fonction du pH pour les équilibres suivants (à 25°C) :

$$S^{2-} + H^+ \leftrightarrow HS^- \quad avec \quad \frac{|S^{2-}||H^+|}{|HS^-|} = K_1 = 10^{-13}$$

$$HS^- + H^+ \leftrightarrow H_2S \quad avec \quad \frac{|HS^-||H^+|}{|H_2S|} = K_2 = 10^{-7}$$

Au-dessus de $pH=pK_1=13,0$, c'est la forme S^{2-} qui prédomine. De $pH=pK_1=13,0$ à $pH=pK_2=7,0$, c'est HS^- qui prédomine. A pH < 7,0, prédomine la forme H_2S. La distribution de ces formes en fonction du pH est représentée sur la figure F-1 (Charlot, 1966).

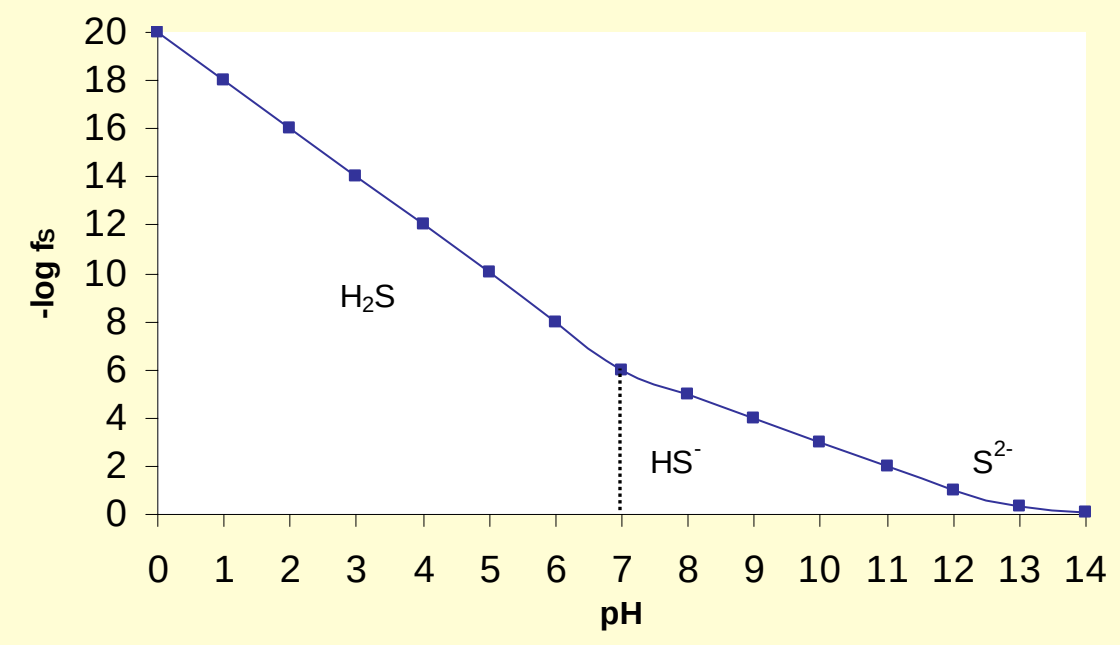


Figure F-1. Distribution de différentes formes d'H_2S en fonction du pH (Charlot, 1966).

Avec $-\log f_S = \frac{C_S}{|S^{2-}|}$; C_S = concentration totale en soufre.

ANNEXE 2. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES

Bouillon de dextrose et pomme de terre (PDB : Potatoe dextrose broth)

Ce milieu sert de base pour la culture des levures et des moisissures.

Composition approximative par litre

Fécule de pomme de terre	Potato starch	4,0 g
Glucose	Dextrose	20,0 g

pH final 5,1 ± 0,2

Préparation :

Mettre 24 g de poudre en suspension dans 1 l d'eau purifiée. Chauffer sous agitation fréquentment et laisser bouillir pendant 1 minute de manière à dissoudre parfaitement la poudre. Autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Bouillon cœur cervelle (Brain Heart Broth, BHI).

Composition (g/l)

Extrait cœur – cervelle	Brain heart infusion	17,5 g
Peptone pancréatique de gélatine	Pancreatic digest of gelatin	10,0 g
Chlorure de sodium	Sodium chloride	5,0 g
Phosphate disodique	Disodium phosphate	2,5 g
Glucose	Glucose	2,0 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2

Préparation.

Mettre en solution 37 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète. Repartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

ANNEXE 3. PREPARATION DES TAMPON PHOSPHATES UTILISES

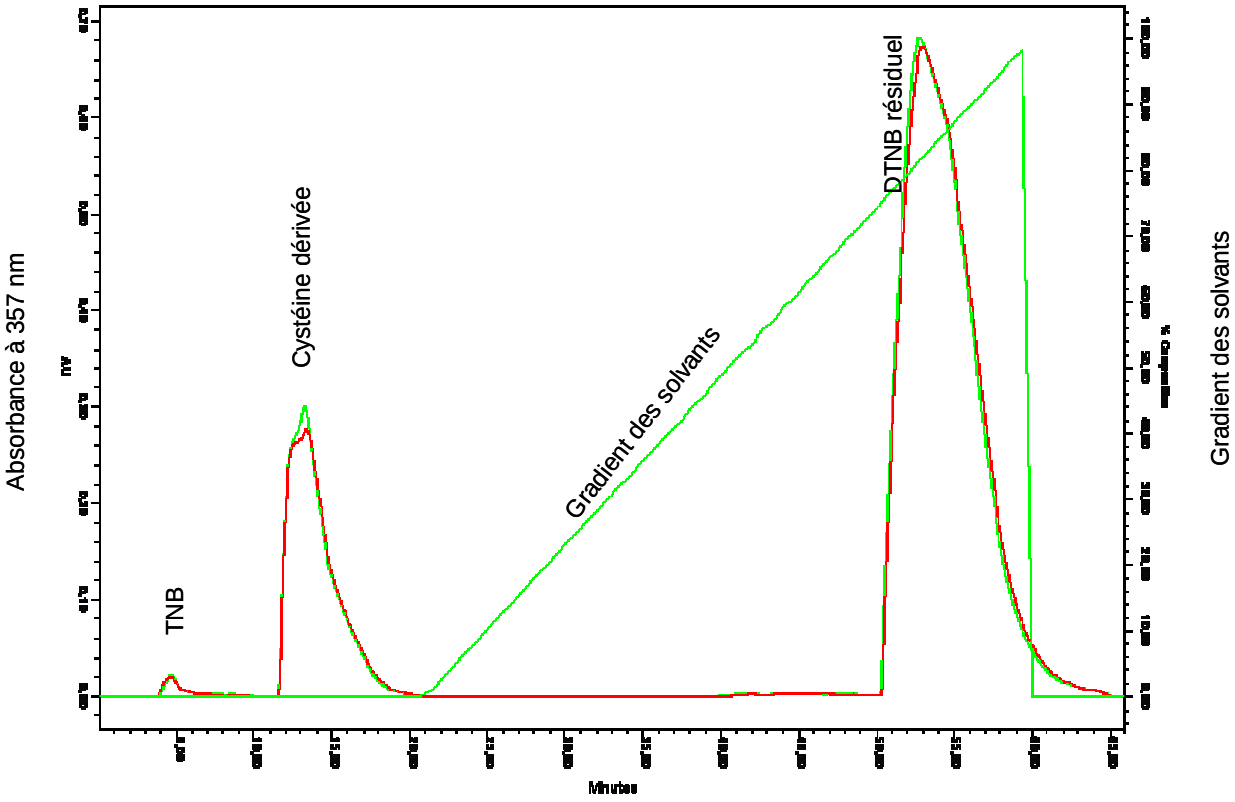
Des solutions tampon phosphate à différentes valeurs de pH peuvent être préparées à partir des solutions stocks suivantes :

- Solution A : 0.2 M NaH_2PO_4. Dissoudre 27,6 g de NaH_2PO_4 dans un litre d'eau mQ.
- Solution B : 0,2 Na_2HPO_4. Dissoudre 28,4 g de Na_2HPO_4 dans un litre d'eau mQ.

Pour avoir le tampon phosphate au pH souhaité il faut mélanger les volumes de la solution A et de la solution B selon le tableau ci-dessous

Pour 100 ml de solution tampon de phosphates à :		
pH	**Solution A (ml)**	**Solution B (ml)**
5,8	92,0	8,0
5,9	90,0	10,0
6,0	87,7	12,3
6,1	85,0	15,0
6,2	81,5	19,5
6,3	77,5	22,5
6,4	73,5	26,5
6,5	68,5	31,5
6,6	62,5	37,5
6,7	56,5	43,5
6,8	51,0	49,0
6,9	45,0	55,0
7,0	39,0	61,0
7,1	33,0	67,0
7,2	28,0	72,0
7,3	23,0	77,0
7,4	19,0	81,0
7,5	16,0	84,0
7,6	13,0	87,0
7,7	10,5	89,5
7,8	8,5	91,5

ANNEXE 4. CHROMATOGRAMME DE LA L-CYSTEINE DERIVEE AU DTNB ET SEPAREE PAR CLHP

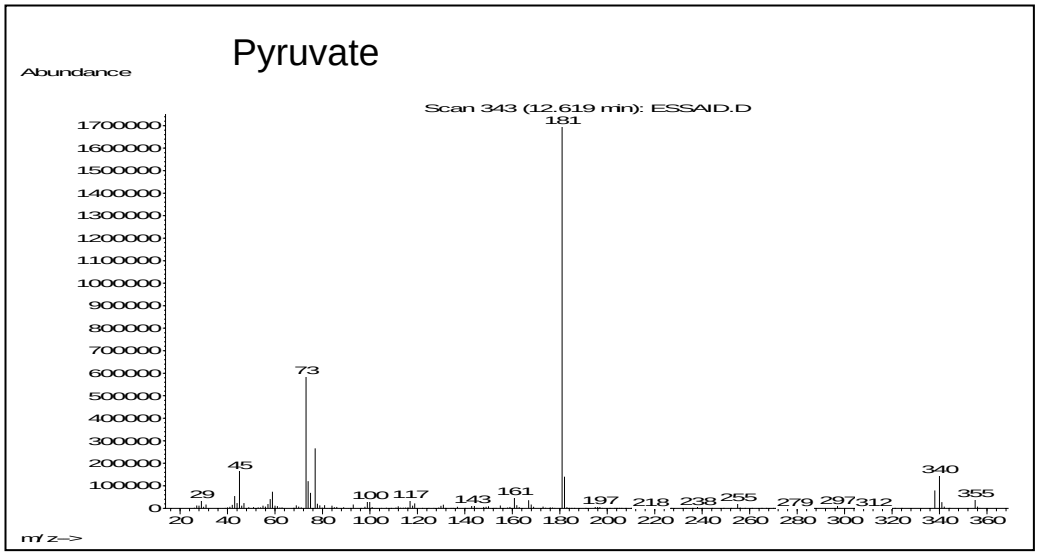


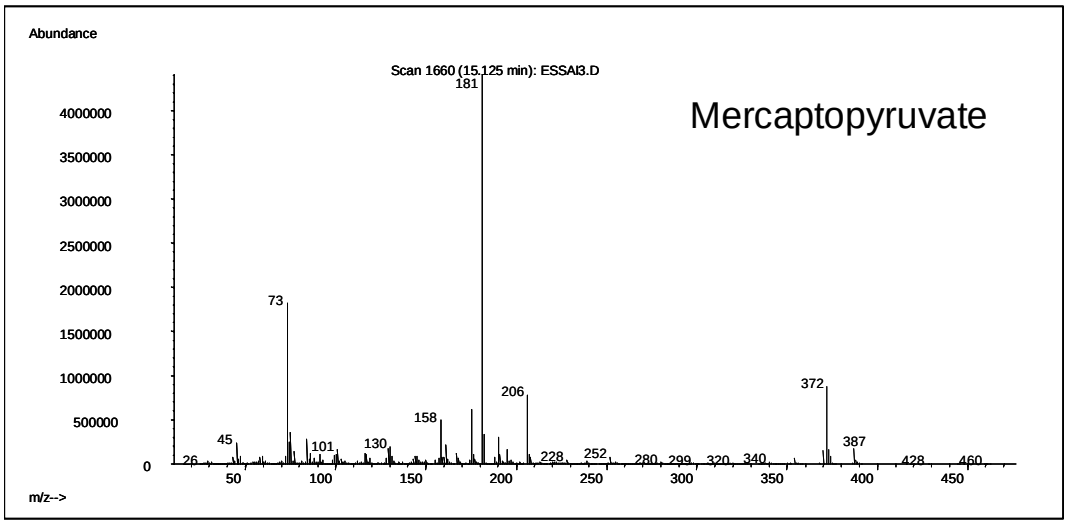
La L-cystéine a été dérivée avec le DTNB dans un tampon phosphate à pH 7,5. Les produits de réaction ont été séparés par CLPH en phase inverse en utilisant un mélange de tampon phosphate-méthanol (voir matériels et méthodes). En solution étalon, les pics correspondant à chaque produit sont facilement séparables et identifiables.

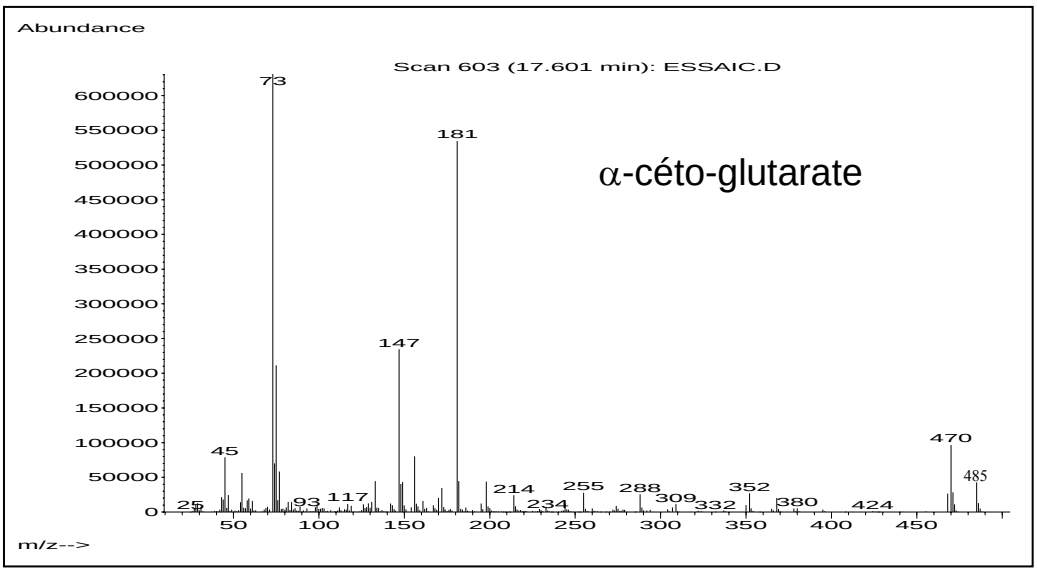
ANNEXE 5. SPECTRE DE MASSE DES COMPOSES PURS DERIVES

	Composé		
m/Z	Pyruvate	Mercaptopyruvate	α-cétoglutarate
Ion moléculaire du dérivé (M)	355	387	485
M-15	340	372	470
Fragment oxime	181	181	181
Fragment sylilation	73	73	73

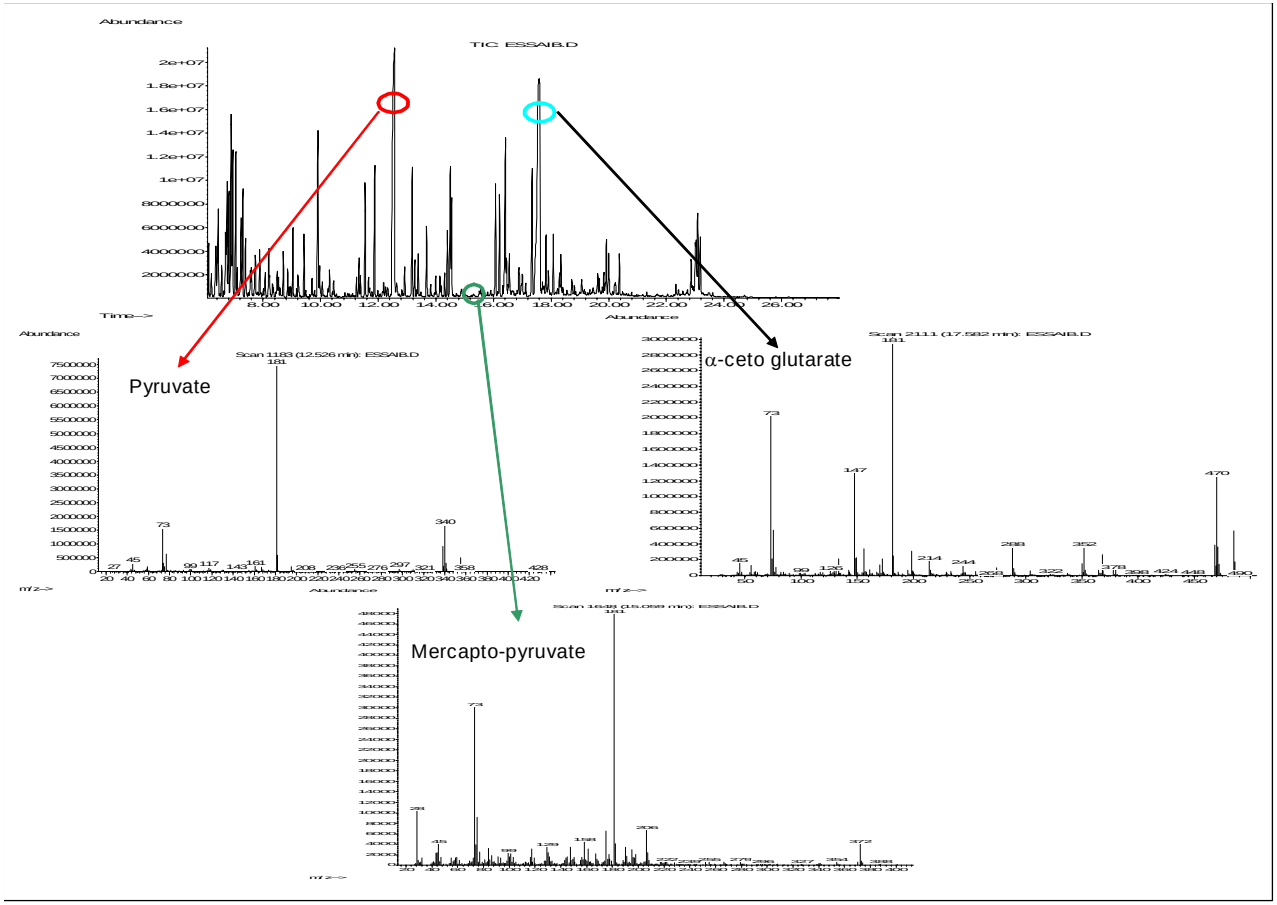
(Yu et col., 1998)




Abundance
Scan 1660 (15.125 min): ESSAI3.D
Mercaptopyruvate
m/z-->


Abundance
Scan 603 (17.601 min): ESSAIC.D
α-céto-glutarate
m/z-->

ANNEXE 6. CHROMATOGRAMME ET SPECTRE DE MASSE DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES CHEZ *S. cerevisiae* 45(3)



TITLE

Volatiles sulphur compounds production by cheese-ripening micro flora: Catabolism of L-cysteine

ABSTRACT

Due to their low odour threshold values volatile sulphur compounds (VSC) significantly contribute to the cheese flavour, even at low concentrations. Until now, the studies related to the production of VSC by cheese ripening microorganisms have been focused on the methionine catabolism, without paying attention to the possible contribution of cysteine in their production. This work aimed thus to establish the contribution of cysteine in the production of VSC by cheese-ripening yeasts and bacteria.

In the first part of this work, five yeasts and four bacteria were selected among 37 strains, based on their capacity to produce H_2S, the main degradation product of cysteine. This selection was achieved by using a practical adaptation of the methylene blue reaction, which enabled the simultaneous growth of microorganims, the collection and accurate quantification of H_2S.

In the second part of this work, the production of VSC by the selected strains was then assessed with the addition of cysteine, methionine or methionine-cysteine mixtures to the microbial cultures.

By adding cysteine, no new VSC was produced by yeasts and only low concentrations of VSC were quantified in the bacterial cultures. With the methionine addition, the yeast strains followed two degradation pathways of methionine, and produced methional/methionol or DMDS/DMTS. Two new volatile sulphur compounds were also characterized: one of them is a thiophenone, 2-methyl-tetrahydrothiophene-3-one, and the other one is a 1,3-oxathiane. In addition, the bacteria produced VSC (DMDS, DMTS, DMQS and some thioesters) which have been already identified as the main products of methionine catabolism. With mixtures of methionine-cysteine, the production of VSC was more or less decreased depending on the concentration of the added cysteine. This effect seems to be a consequence of the limitation of the methionine catabolism by the added cysteine.

Although this effect remains strain dependant, changes in the VSC profiles were observed in all the cases. Hence, in the bacteria, we observed a major production of the polysulphides DMTS and DMQS, with a parallel decrease in the concentrations of thioesters, when they were produced. In yeasts, a similar decrease was observed in the concentration of methional/methionol and in the concentrations of thioesters, but without any increase in the production of polysulphides. The low concentration of the solubilized form of H_2S (HS^- and S^{2-}) in the acid medium used for yeasts may explain this result.

Preliminary sniffing tests showed that the addition of low cysteine concentrations, with the simultaneous addition of methionine, produced flavour notes very close to ripened cheeses. Thus, and in a cheese-making context, we can reasonably suppose that H_2S produced by cysteine catabolism would not take part in the modification of VSC profile at the beginning of ripening, because of the acid character of curd during this period. However, the following increase in the pH, as a consequence of the deacidification promoted by yeasts development, can increase the reactivity of H_2S and thus, with a simultaneous production of methanethiol by the bacterial catabolism of methionine, could provide a better balance between polysulphides and thioesters. Thus, the co-production of these sulphur molecules by ripening yeasts and bacteria could improve the development of cheese ripened flavours.

KEYWORDS :

Cysteine, H_2S, volatile sulfur compounds, cheese ripening yeast, cheese ripening bacteria, methionine.

RESUME

Les composés soufrés volatils (CSV) sont des composés majeurs de l'arôme des fromages. Même présents à de très faibles concentrations, ils contribuent de manière significative à leur qualité aromatique et à leur typicité, du fait notamment de leur faible seuil de détection et de leur forte réactivité. Jusqu'à présent, les études portant sur la production de CSV étaient axées essentiellement sur le catabolisme de la méthionine, sans inclure l'implication potentielle de la cystéine dans leur production.

Cette étude a donc eu pour principal objectif d'étudier dans quelle mesure la cystéine pourrait contribuer à la production de CSV par les levures et les bactéries de la flore d'affinage.

La mise au point d'une technique de piégeage dans un système fermé, et de capture *in situ* de l'H_2S produit par le catabolisme de la cystéine, nous a permis d'effectuer une sélection de souches les plus aptes à dégrader la cystéine. Cette technique a donc été utilisée pour quantifier la production d'H_2S de vingt souches de levures et dix-sept souches de bactéries. Cinq souches de levures et quatre souches de bactéries ont été ainsi sélectionnées, et nous avons donc étudié leur capacité à produire des CSV à partir i) de la cystéine, ii) de la méthionine ou iii) de mélanges méthionine-cystéine.

En ajoutant de la cystéine, aucun nouveau CSV n'a été produit par les levures, et seulement des traces de CSV ont été quantifiées chez les bactéries. Avec l'ajout de méthionine, deux voies de dégradation de la methionine ont été mises en évidence chez les souches de levures : une produisant du méthional/méthionol, l'autre du DMDS/DMTS. Deux nouveaux composés soufrés volatils ont également été détectés : la 2-méthyl-tétrahydrothiophène-3-one et le 1,3-oxothiane. Concernant les bactéries, elles produisent sur cystéine seule ou méthionine seule les CSV majeurs du catabolisme de la méthionine (DMDS, DMTS, DMQS et des thioesters).

En ce qui concerne les mélanges de méthionine-cystéine, la production de CSV est plus ou moins réduite selon la concentration de cystéine ajoutée. Cet effet correspond certainement à une dégradation réduite de la méthionine consécutive à l'ajout de cystéine. Bien que cet effet demeure souche dépendant, des modifications du profil des CSV produits ont été observées dans tous les cas. Chez les bactéries, nous avons obtenu une production accrue des polysulfures DMTS et DMQS, parallèlement à la diminution de la production de thioesters. Chez les levures, on observe une diminution de la concentration de méthional/méthionol et de thioesters, mais sans augmentation de la production des polysulfures. Une faible concentration des formes solubles et réactives de l'H_2S (HS^- et S^{2-}) dans le milieu de culture acide utilisé pour les levures pourrait expliquer ce résultat.

Des essais de flairage ont montré que l'addition de faibles concentrations de cystéine, en présence de méthionine, assure la production de notes aromatiques globalement équilibrées et proches de celles d'un fromage à pâte molle croûte lavée bien affiné.

Ainsi, dans un contexte fromager, nous pouvons raisonnablement supposer que l'H_2S produit par le catabolisme de la cystéine ne participerait pas à la modification du profil de CSV en début d'affinage, à cause du caractère acide du caillé pendant cette période. Toutefois, l'augmentation du pH, résultat du développement des levures déacidifiantes, peut augmenter la réactivité de l'H_2S qui, avec la production simultanée de méthanethiol par le catabolisme de la méthionine des bactéries d'affinage, pourrait ainsi favoriser un meilleur équilibre entre les polysulfures et les thioesters. Ainsi, la co-production de ces molécules soufrées par les levures et les bactéries d'affinage pourrait favoriser le développement d'un arôme équilibré de type fromage affiné.

MOTS-CLES :
Cystéine, H_2S, composés soufrés volatils, flore d'affinage, levures d'affinage, bactéries d'affinage, méthionine.