Cinétiques de décarboxylation oxydative extra- et intracellulaire d' α -acétolactate par un *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*

Emmanuel Rondags^a, Pierre Germain^b, Ivan Marc^{a*}

^a Laboratoire des sciences du génie chimique, CNR, UPR 6811, 1, rue Grandville, B.P. 451, 54001 Nancy cedex, France,

^b Laboratoire de microbiologie industrielle, Ensaia, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Abstract — Kinetic studies on α -acetolactic acid extra and intracellular oxidative decarboxylation to diacetyl by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933. α -acetolactic acid (ALA) oxidative decarboxylation is thought to be the dominant mechanism for the dairy flavour diacetyl production by lactic acid bacteria of *Leuconostoc* and *Lactococcus* genera. However, kinetic data on that particular reaction are lacking due to the conjunction of the high reactivity of ALA in presence of oxygen and the diacetyl and ALA specific measurement difficulties. The use of a gas chromatographic technique coupled with a gas membrane sensor equipped bioreactor with a controlled atmosphere nonetheless allows the on-line acquisition of diacetyl production kinetics by lactococci cultures or directly from ALA. Thus, this paper provides kinetic data on both diacetyl microbiological production and extra- and intracellular ALA oxidative decarboxylation. The comparison of these kinetics shows that oxidative decarboxylation can account for diacetyl biological production and that this reaction is located at the intracellular level. Moreover, the evolution of the pattern of intracellular kinetics with and without heat treatment demonstrates the action of a thermolabile compound in oxidative decarboxylation. © Inra/Elsevier, Paris.

lactic acid bacteria / *Lactococcus* / dairy flavour / diacetyl / α -acetolactate

Résumé — La décarboxylation oxydative de l' α -acétolactate (ALA) est actuellement considérée comme le principal mécanisme de production du diacétyl, arôme laitier dominant du beurre, par les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Toutefois, les données cinétiques concernant cette réaction sont parcellaires, du fait de l'instabilité de l'ALA en présence d'oxygène et des difficultés de dosage spécifique de l'ALA et du diacétyl. Le recours à une technique chromatographique en phase gazeuse couplée à un système d'échantillonnage en ligne dans un bioréacteur maintenu en anaérobiose a permis l'acquisition de données cinétiques concernant cette réaction dans des cultures de lactocoques. Ainsi, cet article présente à la fois des cinétiques de production microbiologique de diacétyl et de décarboxylation oxydative en condi-

* Correspondance et tirés à part

tions intra- et extracellulaires. La comparaison des vitesses de décarboxylation oxydative avec les cinétiques de production microbiologique a permis de montrer que cette réaction peut être responsable de la production biologique du diacétyle et que sa localisation est intracellulaire. De plus, la nature des cinétiques intracellulaires a clairement mis en évidence l'intervention d'un réactant thermolabile dans cette réaction. © Inra/Elsevier, Paris.

bactérie lactique / *Lactococcus* / arôme laitier / diacétyle / α -acétolactate

1. INTRODUCTION

Le diacétyle est l'élément dominant de l'arôme de beurre mais est aussi présent dans bien d'autres produits laitiers tels que les laits et crèmes fermentés et divers fromages [5]. Sa synthèse biologique est le fruit du métabolisme de bactéries lactiques des genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Deux voies de production de ce composé à partir de l'acide pyruvique ont été identifiées (figure 1). La première, mise en évidence par Speckman et Collins [10, 11], fait intervenir une réaction entre un complexe acétaldéhyde-TPP et l'acétyl-CoA pour former directement le diacétyle, alors que la deuxième implique la condensation directe de l'acide pyruvique avec l'acétaldéhyde-TPP aboutissant à l' α -acétolactate, intermédiaire réactionnel pouvant subir une décarboxylation oxydative en diacétyle [2]. La participation cinétique respective de chacune de ces voies dans la production biologique du diacétyle n'a pas été déterminée, du

fait de leur probable coexistence, de la présence d'un mécanisme de réduction du diacétyle et surtout du manque de précision ou de sélectivité des techniques analytiques mises en œuvre pour les études physiologiques [7, 12]. Pourtant, la voie transitant par l'ALA est actuellement considérée comme cinétiquement prépondérante du fait, notamment, de la forte instabilité de l'ALA [4]. Néanmoins, l'observation d'une production biologique de diacétyle par la souche de référence utilisée au laboratoire, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933, dans des conditions peu propices à une décarboxylation oxydative de l'ALA (anaérobiose et faible potentiel redox) semble aller à l'encontre de cette théorie.

En conséquence, il est apparu nécessaire d'approfondir les connaissances sur la décarboxylation oxydative de l'ALA dans des conditions physico-chimiques correspondant à des cultures de bactéries lactiques productrices d'arômes. D'un point de vue pratique, cette réaction met-

Figure 1. Voies potentielles de production du diacétyle.

Figure 1. Diacetyl potential production pathways.

tant en jeu un composé instable en présence d'oxygène et de faibles concentrations de produits dans des milieux biologiques, cette étude a été réalisée en bioréacteur à atmosphère contrôlée avec un système d'analyse en ligne du diacétyle par capteur à molécules volatiles couplé à un chromatographe en phase gazeuse [8]. À l'aide de ce dispositif expérimental, les vitesses de décarboxylation oxydative de l'ALA dans des microfiltrats de culture (conditions extracellulaires) et des extraits cellulaires (conditions intracellulaires) ont été déterminées et comparées avec des cinétiques de production de diacétyle par la souche productrice de référence pour localiser cette réaction et en évaluer la part cinétique dans la production microbiologique du diacétyle.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Souche bactérienne et conditions de culture

– *Milieu* : D (+) lactose monohydraté 10 g/L, peptone de caséine 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, acétate de sodium 5 g/L, acide citrique monohydraté 1,5 g/L et $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L. Pour les cultures en présence d' α -acétolactate décarboxylase, l'enzyme (Maturex, Novo) est ajoutée de façon à atteindre au minimum 25 ADU/L.

– *Souche* : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 (Laboratoires Visby, Danemark).

– *Conservation* : stockage à -18°C dans du milieu de culture

– *Inoculum et inoculation du bioréacteur* : des inoculums de 200 mL et 2 L sont préparés en cultivant les cellules pendant 15 h à 30°C . Ces précultures sont ensuite utilisées pour ensemer des réacteurs de 2 L et 20 L contenant initialement 1,4 et 14 L de milieu.

– *Conditions de culture* : les cultures ont lieu en bioréacteur de 2 ou 20 L contenant 1,6 ou 16 L de milieu agités à 250 tr/min, thermostatés à 25°C , maintenus en anaérobiose par injection d'azote. Le pH est contrôlé par ajout de soude 4 mol/L.

2.2. Réactivité chimique

– *Surnageants cellulaires* : les surnageants sont obtenus par microfiltration sous azote du milieu de culture sur cartouche Sartobran (Sartorius) de seuil de coupure de 0,2 μm .

– *Préparation d'extraits cellulaires* : les cellules sont traitées avec 0,71 g de lysozyme (Fluka) par g de matière sèche pendant 2 heures à 25°C . Après sédimentation à 8°C , le surnageant est éliminé. Un choc osmotique est alors appliqué aux cellules (+ 2,5 g/L de NaCl) et la lyse totale est contrôlée par observation microscopique sur cellule de Thoma.

– *Traitement thermique* : les extraits cellulaires sont autoclavés pendant 20 min à 121°C .

– *Oxydation au permanganate* : le contenu du réacteur est oxydé par addition de 250 mg de permanganate de potassium.

– *Bioréacteur* : les évaluations de réactivité chimique ont lieu dans un réacteur de 2 L identique à celui utilisé pour les cultures contenant 1 L de milieu réactionnel (milieu de culture, surnageant ou extrait cellulaire) thermostaté à 25°C , en anaérobiose, agité à 250 tr/min avec contrôle du pH par addition de soude 4 mol/L ou d'acide sulfurique 2 mol/L.

– *Synthèse d'ALA* : 500 mg d'éthyl 2-acétoxy-2-méthylacétoacétate (Aldrich) sont hydrolysés en ALA, éthanol et acétate par addition de 2 mL de soude 4 mol/L dans une seringue maintenue sous azote. Après 30 minutes de réaction, le mélange est injecté dans le bioréacteur où le rendement est évalué par mesure de la concentration en éthanol.

– *Décarboxylation oxydative de l'ALA* : cette réaction est suivie en ligne par mesure de la concentration en diacétyle. L'éventuelle formation de produits de réduction du diacétyle et de décarboxylation non oxydative de l'ALA (acétoïne et 2,3-butanediol) est évaluée par chromatographie en phase gazeuse hors ligne.

2.3. Techniques analytiques

Les méthodes de mesure des concentrations en biomasse, diacétyle, éthanol, acétaldéhyde, acétoïne, 2,3-butanediol, lactose, acides citrique, lactique, acétique et pyruvique ont été décrites précédemment par Rondags et al [9].

3. RÉSULTATS

3.1. Production biologique de diacétyle

Une culture de référence de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 est réalisée en anaérobiose stricte à pH 5,5. Au cours de cette fermentation, le lactose et le citrate sont totalement consommés, conduisant à la formation de 1 g/L de biomasse, 9,2 g/L de lactate, 0,7 g/L d'acétate, 98 mg/L de pyruvate, 198 mg/L d'éthanol et à l'accumulation transitoire de 9,3 mg/L d'acétaldéhyde. En ce qui concerne la production de diacétyle, la concentration maximale atteinte est de 8,0 mg/L (figure 2), avec production de 302 mg/L d'acétoïne partiellement transformée en 226 mg/L de 2,3-butanediol. La cinétique de production de diacétyle (figures 2 et 3) montre une productivité initiale élevée, avec une vitesse de production maximale proche de $2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, suivie d'une diminution de la concentration en diacétyle par réduction en acétoïne et 2,3-butanediol par l'acétoïne/butanediol réductase avec une vitesse pouvant atteindre $1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Au vu de cette cinétique, la valeur de $2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de diacétyle est retenue comme valeur de référence pour les comparaisons avec les

vitesse de décarboxylation oxydative de l'ALA aux niveaux extra- et intracellulaires.

3.2. Production de diacétyle par décarboxylation oxydative extracellulaire d'ALA

3.2.1. Cinétiques de décarboxylation oxydative extracellulaire

Cette réaction a été suivie en anaérobiose à pH 5,5 dans de l'eau en guise de témoin, dans du milieu de culture non fermenté et dans du microfiltrat de culture, l'ALA étant présente en excès. Ces deux derniers milieux représentent les conditions extracellulaires de début et de fin de culture. Quel que soit le milieu, les cinétiques de production sont toujours linéaires, et ce, pendant au moins 12 heures. Ces résultats montrent que la réactivité de l'ALA peut être assez élevée dans l'eau, avec $2,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, mais que, dans des milieux correspondant aux conditions extracellulaires de culture, celle-ci est faible par rapport à la vitesse maximale de production biologique de $2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ avec respectivement 0,0 et $0,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans du milieu non fermenté et dans du microfiltrat de milieu de culture fermenté.

Figure 2. Évolution de la concentration en diacétyle lors d'une culture de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 en anaérobiose à pH 5,5.

Figure 2. Diacetyl concentration evolution during a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 culture at pH 5.5 under anaerobiosis.

Figure 3. Variation de la vitesse d'évolution biologique de diacétyle lors d'une culture de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 en anaérobiose à pH 5,5.

Figure 3. Variation of the diacetyl evolution rate during a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 culture at pH 5.5 under anaerobiosis.

3.2.2. Recherche d'une accumulation extracellulaire de l'ALA

Pour obtenir des données complémentaires aux cinétiques de réaction de décarboxylation oxydative extracellulaire de l'ALA, le réactif initial, l'ALA, a été recherché dans le milieu lors de cultures de lactocoques. Pour ce faire, deux méthodes ont été mises en œuvre, l'une enzymatique et l'autre chimique, permettant de traduire la présence d'ALA dans le milieu en une différence de concentration en diacétyle, mesurable de façon précise et spécifique à l'aide du capteur à molécules volatiles couplé à un chromatographe en phase gazeuse.

3.2.2.1. Recherche par méthode enzymatique

Cette technique est basée sur une modification cinétique de la production biologique du diacétyle à partir de l'ALA dans le milieu de culture par ajout d'une enzyme catalysant la production d'acétone au détriment du diacétyle, l'ALA décarboxylase ou ADC (figure 4). Ainsi, La présence éventuelle d'ALA est révélée par une diminution de la production de diacétyle dans une culture avec ADC par rapport à une culture témoin sans l'enzyme. Les résultats obtenus à pH 5,5 (tableau I) montrent que l'ADC n'a pas d'effet sur les voies métaboliques principales de la souche employée. La produc-

Figure 4. Réactions de décarboxylation de l'ALA.

Figure 4. ALA decarboxylation reactions.

Tableau I. Effet de l'addition d'ADC sur la production de diacétyle, acétoïne et 2,3-butanediol par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 en culture anaérobie discontinue à pH 5,5.

Table I. Effect of ADC addition in the culture medium on the productions of diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol by an anaerobic culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 at pH 5.5.

ADC	—	+
Diacétyle produit (mg/L) *	7,3	7,8
Acétoïne produite (mg/L) *	214	264
2,3-butanediol produit (mg/L) *	226	241

* Concentration maximale atteinte.

* Highest concentration reached during the culture.

tion de diacétyle est équivalente avec et sans enzyme, et ce, avec des cinétiques comparables. Ceci tend à montrer que l'ALA ne s'accumule pas dans le milieu extracellulaire mais la faible action stimulante de l'extrait enzymatique sur la synthèse d'acétoïne et du 2,3-butanediol ne permet pas de conclure de façon définitive dans ce sens.

3.2.2.2. Recherche par méthode chimique

Cette méthode est employée pour confirmer les résultats obtenus avec la méthode enzymatique. Son principe est le suivant : du milieu extracellulaire est prélevé en anaérobiose stricte par microfiltration et la concentration en diacétyle est alors mesurée. L'échantillon subit ensuite une oxydation au KMnO_4 qui permet la rapide transformation de l'ALA en diacé-

tyle. La concentration en diacétyle est à nouveau mesurée. La différence de concentrations en diacétyle est révélatrice de la présence extracellulaire d'ALA dans le milieu de culture. Cette technique analytique, appliquée à une culture discontinue anaérobie à pH 5,5 n'a révélé aucune accumulation d'ALA dans le milieu extracellulaire (pas d'augmentation de la concentration en diacétyle après oxydation du surnageant) à différents moments de la fermentation (tableau II). Ainsi, que ce soit par méthode enzymatique ou chimique, aucune accumulation extracellulaire d'ALA n'a pu être détectée. La réactivité extracellulaire de ce composé étant, qui plus est, réduite, la production biologique de diacétyle par décarboxylation oxydative extracellulaire de l'ALA peut être écartée comme mécanisme dominant.

Tableau II. Effet de l'oxydation sur le contenu en diacétyle, acétoïne et 2,3-butanediol de filtrats de culture de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 en culture anaérobie discontinue à pH 5,5.

Table II. Effect of oxidation on the diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol contents of microfiltrates of an anaerobic batch culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 at pH 5.5.

Durée de culture (h)	3		6		9	
Oxydation	—	+	—	+	—	+
Diacétyle (mg/L)	6,2	6,2	7,2	7,2	7,1	7,1
Acétoïne (mg/L)	131	129	165	170	265	268
2,3-butanediol (mg/L)	28	27	27	29	25	27

3.3. Production de diacétyle par décarboxylation oxydative intracellulaire d'ALA

La réactivité intracellulaire de l'ALA a été évaluée en anaérobiose au sein d'extraits cellulaires obtenus par traitement des bactéries avec du lysozyme et choc osmotique au NaCl de façon à en préserver le contenu enzymatique et coenzymatique. La réactivité a été déterminée à trois pH (6,25, 6,75 et 7,25) correspondant aux valeurs du pH intracellulaire mesurées lors de cultures conduites à un pH extracellulaire de 5,5 [1, 6]. Pour chaque pH, les courbes de production de diacétyle à partir d'ALA sont diphasiques : une première phase de production rapide à vitesse constante (v_1) est suivie d'une seconde plus lente (v_2), elle aussi à vitesse constante (figure 5). Alors que la vitesse v_2 est constante dans l'intervalle de pH considéré, la vitesse v_1 diminue lorsque le pH augmente (tableau III). De même, la durée de la première phase diminue avec l'augmentation du pH. Les résultats repor-

tés dans le tableau IV montrent aussi que le stockage de l'extrait cellulaire influe fortement sur la durée de la phase rapide, sans toutefois en modifier la vitesse. Le stockage reste, par contre, sans effet sur la cinétique de la phase lente. Quoi qu'il en soit, les vitesses de production observées lors de la première phase sont, ou supérieures à la vitesse seuil de production biologique de diacétyle, ou du même ordre de grandeur. De façon à recueillir des informations complémentaires sur la décarboxylation oxydative intracellulaire, des expériences du même type ont été réalisées avec des extraits traités thermiquement (figure 5). Le profil des courbes de production est radicalement modifié par le traitement thermique des extraits. Les cinétiques obtenues sont uniquement monophasiques avec une vitesse de production (v_3) constante pour chaque pH. v_3 est sensible au pH comme la vitesse de la première phase v_1 : elle diminue avec une augmentation du pH, mais tend vers une valeur seuil proche de v_2 lorsque le pH augmente.

Tableau III. Données cinétiques de production de diacétyle à partir d'ALA dans des extraits cellulaires à pH 6,25 ; 6,75 ; 7,25.

Table III. Kinetic data on the diacetyl production from ALA in cellular extracts at pH 6.25, 6.75 and 7.25.

pH	v_1 (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Durée de la phase 1	v_2 (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
6,25	3,3	1 h 45	0,1
6,75	2,7	1 h 45	0,1
7,25	1,8	1 h	0,1

Tableau IV. Données cinétiques de décarboxylation oxydative d'ALA à pH 6,25 dans des extraits cellulaires frais ou stockés à 4 °C pendant 15 jours.

Table IV. Kinetic data on the diacetyl production from ALA at pH 6.25 in freshly prepared cellular extracts and cellular extracts stored during 15 days at 4 °C.

	v_1 (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Durée de la phase 1	v_2 (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Extrait frais	3,3	1 h 45	0,1
Extrait stocké	3,2	1 h	0,1

Figure 5. Production de diacétyle à partir d'ALA à pH 6,25 dans un extrait cellulaire traité ou non thermiquement.

Figure 5. Diacetyl production from ALA at pH 6.25 in crude and heat treated cellular extracts.

4. DISCUSSION

Le suivi cinétique d'une culture anaérobie de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 a permis de constater qu'une production de diacétyle peut être obtenue dans des conditions physico-chimiques apparemment défavorables à la décarboxylation oxydative de l'ALA. La vitesse maximale de production du diacétyle au cours de cette culture a été choisie comme valeur seuil pour la comparaison de la production biologique de diacétyle avec les cinétiques de décarboxylation oxydative de l'ALA.

Dans des conditions physico-chimiques extracellulaires (milieu de culture non fermenté et microfiltrat de culture), ces études montrent que les vitesses de décarboxylation oxydative de l'ALA en diacétyle sont largement inférieures à la valeur seuil retenue. De plus, l'utilisation de deux méthodes de détection de l'ALA au niveau extracellulaire a révélé que ce composé ne s'accumule pas dans le milieu de culture. Il apparaît donc que la décarboxylation oxydative extracellulaire de l'ALA en diacétyle ne peut être considérée comme le mécanisme dominant de pro-

duction du diacétyle par la souche considérée.

Au niveau des extraits cellulaires, des cinétiques biphasiques de production de diacétyle à partir d'ALA sont obtenues : à une première phase rapide succède une deuxième phase plus lente. L'observation de ces deux phases, dont l'une présente une vitesse variant en fonction du pH (phase rapide) et l'autre non (phase lente) suggère la coexistence de deux mécanismes de décarboxylation oxydative de l'ALA en diacétyle : la phase lente correspondrait à une réactivité chimique de base de l'ALA alors que la phase rapide ferait intervenir un ou des bioréactifs spécifiques. En effet, l'aspect des cinétiques pourrait être expliqué par l'intervention lors de la première phase d'un réactif présent en quantité limitée dans ces extraits et épuisé en présence d'un excès d'ALA. La variation de la vitesse de la phase rapide en fonction du pH et de sa durée en fonction du temps de stockage de l'extrait cellulaire impliquent que ce réactif serait très sensible aux conditions environnementales et physico-chimiques du milieu. De telles cinétiques intracellulaires peuvent être dues à une réaction faisant intervenir un ou des coenzymes d'oxydo-réduction,

composés sensibles aux conditions du milieu, normalement régénérés dans les cellules fonctionnelles mais rapidement épuisés dans les extraits cellulaires soumis aux conditions expérimentales. Ainsi, en se basant sur les vitesses observées lors de la phase rapide, qui correspondraient aux vitesses de décarboxylation oxydative à l'intérieur de cellules fonctionnelles avec régénération du ou des réactifs mis en évidence, il apparaît que la production de diacétyle par la souche considérée peut cinétiquement provenir d'une décarboxylation oxydative catalysée et intracellulaire de l'ALA.

Ces travaux ont permis de progresser dans la connaissance du mode de production de diacétyle *in vivo* par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* SD 933 en apportant des données cinétiques extra et intracellulaires concernant l'une de ses voies de production. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la synthèse biologique du diacétyle aurait lieu par décarboxylation oxydative de l'ALA [4]. Ils permettent, de plus, de localiser cette réaction au niveau intracellulaire. Enfin, les profils cinétiques observés avec les extraits cellulaires traités thermiquement ou non peuvent tout à fait correspondre à une décarboxylation oxydative de l'ALA par action de coenzymes d'oxydo-réduction conformément aux résultats de Ho Park et al [3].

RÉFÉRENCES

- [1] Cook G.M., Russel J.B., The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*, Curr. Microbiol. 28, 165-168.
- [2] Hugenholtz J., Citrate metabolism in lactic acid bacteria, FEMS Microbiol. Rev. 12 (1993) 165-178.
- [3] Ho Park S., Xing R.Y., Whitman W.B., Nonenzymatic acetolactate oxidation to diacetyl by flavin, nicotinamide and quinone coenzymes, Biochim. Biophys. Acta 1245 (1995) 366-370.
- [4] Monnet C., Schmitt P., Diviès C., Diacetyl production in milk by an α -acetolactic acid accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, J. Dairy Sci. 77 (1994) 2916-2924.
- [5] Paquot M., Eustache J.M., Roblain D., Thonart P., Crèmes et beurres acides. In: (de Roisart H., Luquet F.M. (Eds), Bactéries lactiques, Loriga, Uriage, 1994
- [6] Poolman B., Driessen A.J.M., Konings W.N., Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values, Microbiol. Rev. 51 (1987) 498-508.
- [7] Ramos A., Jordan K.N., Cogan T.M., Santos H., ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis*, Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994) 1739-1748.
- [8] Rondags E., Stien G., Germain P., Marc I., Kinetic study of the chemical reactivity of α -acetolactate as a function of pH in water, and in fresh and fermented culture media used for *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* cultivation, Biotechnol. Lett. 18 (1996) 747-752.
- [9] Rondags E., Halliday E., Marc I., Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis*: study of α -acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis, Appl. Biochem. Biotechnol. (sous presse)
- [10] Speckman R.A., Collins E.B., Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*, J. Bacteriol. 95 (1968) 174-180.
- [11] Speckman R.A., Collins E.B., Incorporation of radioactive acetate into diacetyl by *Streptococcus diacetylactis*, Appl. Microbiol. 26 (1973) 744-746.
- [12] Veringa H.A., Verburg E.H., Stadhouders J., Determination of diacetyl in dairy products containing α -acetolactic acid, Neth. Milk Dairy J. 38 (1984) 251-263.