

## Production de composés soufrés volatils par des *Micrococcaceae* et des bactéries corynéformes d'origine fromagère

S Bloes-Breton<sup>1</sup>, JL Bergère<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire SOREDAB, La Tremblaye, 78125 La Boissière École ;  
<sup>2</sup> Laboratoire de génie et microbiologie des produits alimentaires, Inra,  
78850 Thiverval-Grignon, France

(Reçu le 26 février 1997 ; accepté le 6 mai 1997)

**Summary — Volatile sulfur compounds produced by *Micrococcaceae* and coryneform bacteria isolated from cheeses.** Bacteria, containing both *Micrococcaceae* and coryneform bacteria, isolated from traditional cheeses, are classified with respect to flavor families from the smell of the cultures in a cheese model, 7 *Micrococcaceae*, 13 coryneform bacteria and 2 *Brevibacterium linens* for reference, representative of the aromatic families, are studied for their sulfur compound production. The sulfur compounds produced in the cheese model are analysed through gas chromatography and identified through mass spectrometry. The production of free sulfhydryls from methionine, hydrogen sulfur from cysteine and the use of these amino acids as carbon source are investigated using a synthetic medium. The bacteria display a very wide pattern of sulfur compound products. All the coryneform bacteria and most *Micrococcaceae* are able to produce methanethiol from methionine, several strains as much as *Brevibacterium linens*. All the strains produce hydrogen sulfide from cysteine. However, the main point is the large variety of the produced sulfur compounds: sulfides (methyl, dimethyl and trimethylsulfide), thiols (2-propanethiol, 2-methylpentanethiol), thioesters (methylthioacetate, methylthiobutanoate, methylthiopentanoate) and many not yet identified. All these compounds have a low threshold. Moreover, most of them have already been described in cheese volatile fractions. Altogether, the variety of such compounds and their proportion in bacteria cultures suggest that they might have an important role in cheese flavor diversity.

**sulfur volatile compound / methanethiol / coryneform bacteria / *Micrococcaceae***

**Résumé —** Une collection de souches de *Micrococcaceae* et de bactéries corynéformes autres que *Brevibacterium linens* et isolées de fromages traditionnels est classifiée en familles, à partir des arômes produits par les cultures sur un modèle fromager ; 7 *Micrococcaceae* et 13 bactéries corynéformes, choisies parmi des souches représentatives de ces différentes familles, sont étudiées plus précisément pour leur aptitude à produire des composés soufrés volatils. Deux souches de *B. linens* servent de base de comparaison. Les composés soufrés produits sur le modèle fromager sont analysés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un

spectromètre de masse. L'aptitude à produire des résidus sulhydryls libres et de l'H<sub>2</sub>S, respectivement à partir de méthionine et de cystéine, ainsi que l'utilisation de ces deux acides aminés comme unique source de carbone, sont examinées sur milieu synthétique. Les souches étudiées ont des capacités de production de composés soufrés variables. Ainsi, toutes les bactéries corynéformes et beaucoup de *Micrococcaceae* produisent du méthane-thiol, certaines d'ailleurs avec des efficacités équivalentes à celles de souches de *B. linens*. De même, toutes les souches analysées produisent de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine. Cependant, l'originalité des différentes souches caractérisées réside plus particulièrement dans la diversité des autres composés soufrés produits : sulfures (méthyl, diméthyl et triméthylsulfures), thiols (2-propanethiol, 2-méthyl-1-pentanethiol), thioesters (S-méthylthioacétate, S-méthylthiobutanoate, S-méthylthiopentanoate) et les nombreux composés non encore identifiés. Pour certains de ces composés, l'importance relative des voies chimiques et enzymatiques de production reste encore mal connue compte tenu de leurs très grandes instabilité et réactivité en solution. Enfin, beaucoup des composés soufrés ont déjà été identifiés dans des fractions volatils des fromages : ils interviennent donc très certainement dans les arômes de ces produits en raison de leur faible seuil de perception.

**composé soufré volatil / méthane-thiol / bactérie corynéforme / *Micrococcaceae***

## INTRODUCTION

Un assez grand nombre de fromages, en particulier les fromages à croûte lavée, sont caractérisés par la présence d'une flore microbienne de surface, qui se développe massivement au cours de l'affinage. Elle résulte, dans les fromages traditionnels, d'un ensemencement naturel à partir du lait, de l'environnement ou d'un transfert entre fromages.

Dans le cas des fromages à croûte lavée ou morgée, la flore de surface est essentiellement bactérienne après une phase de développement des levures. Elle comprend principalement des *Micrococcaceae* et des bactéries corynéformes (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995 ; Grand et al, 1992 ; Piton, 1988 ; Piton et Fontanier, 1990). Certaines de ces bactéries se rencontrent également à la surface de fromages à croûte fleurie, lors des derniers stades de l'affinage (Lenoir, 1984 ; Richard et Zadi, 1983). Ainsi, les *Micrococcaceae* représentent jusqu'à 50 % de la flore superficielle après 20 jours d'affinage. Très souvent, cette flore représente une biomasse égale ou supérieure à celle qui se trouve à l'intérieur de la pâte.

Elle constitue, en outre, un élément majeur de la personnalité du fromage puisqu'elle contribue, de façon déterminante, au développement des qualités rhéologiques et organoleptiques du produit.

Pour le moment, seules quelques souches parmi les *Micrococcaceae* et les bactéries corynéformes sont utilisées comme levains pour ensemercer les fromages industriels. Leur choix repose sur des données très empiriques puisque leur nature exacte est souvent mal connue et que leur taxonomie, en particulier pour les bactéries corynéformes, demeure encore incertaine. En outre, il existe peu de données concernant leurs activités métaboliques en relation avec leur aptitude à produire des composés d'arôme, sauf pour une espèce de bactérie corynéforme : *Brevibacterium linens*, qui est aujourd'hui relativement bien caractérisée pour l'ensemble de ses activités métaboliques (Boyaval et Desmazeaud, 1983 ; Clancy et O'Sullivan, 1993 ; Frings et al, 1993 ; Holtz et Kunz, 1994). Les *Micrococcaceae*, tout comme les bactéries corynéformes autres que *B. linens*, présentent également des activités biochimiques très variées et parfois intenses : activités protéasiques (Bhowmik

et Marth, 1988 ; Garcia de Fernando et Fox, 1991 ; Ortiz de Apodaca et al, 1993), aminopeptidasiques endo- ou exocellulaires (Bhowmik et Marth, 1988 ; Si-Kyung et Hyun-Kyu, 1993), lipasiques ou estérasiques (Bhowmik et Marth, 1990a ; Delarras, 1982 ; El Shafei et al, 1989 ; Ezzat et al, 1993 ; Ortiz de Apodaca et al, 1993) ou de dégradation des acides aminés (Cuer et al, 1979a, 1979b ; Hemme et Richard, 1986 ; Hemme et al, 1982 ; Sharpe et al, 1977). Ces activités, associées à l'abondance de ces germes peuvent expliquer leur grand pouvoir d'aromatization des pâtes fromagères. Ainsi, l'addition au lait de fromagerie de quelques souches de *Micrococcaceae* affecte, de façon positive les qualités organoleptiques de divers fromages, en particulier le cheddar (Bhowmik et Marth, 1990b ; Kinik et Akbulut, 1994 ; Law et al, 1976).

L'arôme des fromages est produit par un ensemble de réactions, chimiques et enzymatiques, qui transforment les divers constituants du caillé en molécules sapides et/ou odorantes. La proportion de ces molécules dépend non seulement du produit, mais également du procédé technologique.

La fraction volatile de l'arôme des fromages est constituée d'un ensemble complexe de composés, qui appartiennent à de nombreuses familles chimiques : acides, alcools, esters, composés carbonylés ou soufrés, amines, hydrocarbures... De précédents travaux ont souligné l'importance des composés soufrés dans de très nombreux produits alimentaires. Dans les fromages, beaucoup de composés soufrés volatils ont été isolés et leur impact aromatique déterminé ; c'est le cas du 2,4-dithiapentane dans le Gouda (Sloot et Harkes, 1975), du 2,3,4-trithiapentane ou DMTS (Mc Guban, 1975) ou du méthane-thiol dans le cheddar (Manning et Price, 1977 ; Manning et al, 1976). Les composés responsables de la note aillée, caractéristique du camembert affiné, ont été identifiés : il s'agit du bis(méthylthio)-méthane, du diéthylsulfure, du 2,3,5-tri-

thiahexane, du 3(méthylthio)2,4-dithiapentane et enfin du méthane-thiol (Adda, 1986, Dumont et al, 1976a ; Law, 1981). Certains fromages à croûte lavée ont également fait l'objet d'études (Dumont et al, 1974, 1976b ; Parliment et al, 1982) qui ont toutes souligné l'importance des composés soufrés dans l'arôme de ces fromages : hydrogène sulfuré, méthane-thiol, sulfures et thioesters.

Cependant, en dehors du méthane-thiol, les voies de production ainsi que les conditions de synthèse des composés soufrés, lors de l'affinage, sont loin d'être maîtrisées, voire même connues. La part purement microbienne n'est que très peu identifiée et il est vraisemblable que les réactions chimiques et enzymatiques se déroulent conjointement.

Nous nous sommes intéressés à la production de composés soufrés volatils par une sélection représentative d'une collection de souches de *Micrococcaceae* et de bactéries corynéformes autres que *B linens*, provenant essentiellement de fromages traditionnels français.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Souches bactériennes et sélection

À partir d'une collection de bactéries corynéformes (132 souches) et de *Micrococcaceae* (143 souches), isolées pour la plupart de fromages traditionnels, 32 *Micrococcaceae* et 30 bactéries corynéformes autres que *B linens* sont sélectionnées pour une étude approfondie de la production des composés aromatiques volatils. Ce choix est effectué principalement en fonction de la nature de l'arôme produit par les cultures sur un modèle fromager, mais également en fonction de l'espèce lorsqu'elle est connue et du fromage d'origine. Parmi les souches sélectionnées, celles qui produisent des composés soufrés volatils (Bloes-Breton et Bergère, 1994) ou qui donnent, en culture, des odeurs « sulfurées » sont retenues pour la présente étude.

La sélection des souches est réalisée par flamage de l'odeur produite par la culture dans un

modèle fromager liquide composé de rétentat d'ultrafiltration (de facteur de concentration volumique 3) obtenu à partir d'un lait UHT demi-écrémé, diafiltré (teneur résiduelle en lactose comprise entre 5 et 6 g/L) et complétement en NaCl (Prolabo) (10 g/L), lactate de sodium (Prolabo) (20 g/L), casaminoacides (Difco) (7,5 g/L), L-méthionine (Sigma) (7,5 mg/L), L-cystéine (Sigma) (15 mg/L), L-tryptophane (Sigma) (67,5 mg/L) et extrait de levure (Difco) (0,25 mg/L), pH 6,4 - 6,5. Ce milieu est incubé à 25 °C sur table d'agitation rotative après ensemencement à 2 % à partir d'une préculture de 2 à 3 jours effectuée dans un milieu riche (tryptone 10 g, glucose 5 g, NaCl 5 g, lactate de sodium 20 g, extrait de levure 1 g et tampon phosphate 0,05 M, 11, pH 7). Le rétentat, réparti à raison de 50 mL par erlenmeyer de 250 mL est stérilisé par autoclavage (15 min, 115 °C). Les autres composés préparés sous forme de solutions concentrées stérilisées par filtration sont ensuite ajoutés.

Après 3 et 4 jours, 10 mL de culture sont alors prélevés et placés dans des verres ballon à dégustation, d'une contenance de 410 mL, recouverts d'une boîte de Pétri. Le contenu est alors soumis aux dégustateurs après équilibre à température ambiante.

### **Utilisation de la L-méthionine et de la L-cystéine comme uniques sources de carbone**

L'aptitude à utiliser la méthionine et la cystéine comme sources de carbone est déterminée dans le milieu chimiquement défini utilisé par Seiler pour le classement des bactéries corynéformes (1983). Ce milieu est réparti en boîtes de Pétri carrées compartimentées et inoculé, en surface, à l'aide d'un appareil Multipoint. L'inoculum est constitué d'une suspension cellulaire dans de l'eau physiologique tamponnée (opacité 4 sur l'échelle de Mac Farland) préparée à partir d'une culture de 4 jours à 25 °C sur le milieu de préculture gélosé défini dans le paragraphe précédent.

La souche est apte à utiliser le composé testé lorsque sa croissance est nettement visible après une semaine d'incubation à 25 °C. L'aspect de la culture sur le milieu sans source de carbone ajoutée sert de témoin négatif.

### **Production de méthanethiol à partir de la L-méthionine**

#### *Préparation des suspensions bactériennes*

Chaque souche, conservée sur gélose inclinée BHI (Brain Heart Infusion, Difco) à 4 °C, est revivifiée par une préculture de 50 mL identique à celle utilisée pour la sélection des souches. Après 48 heures d'incubation, 50 mL de milieu d'expression (tryptone 10 g, NaCl 10 g, extrait de levure 1 g, Yeast Nitrogen Base (Difco), L-méthionine à 0,1 % final et tampon phosphate 0,05 M, pH 7, 11) sont inoculés à 1 % et incubés à 25 °C avec agitation mécanique jusqu'à obtention de pH 8, valeur optimale pour la production de méthanethiol chez les microcoques (Laasko et Nurmikko, 1976). Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation (12 000 g, 4 °C, 10 minutes), lavées et mises en suspension dans du tampon Tris HCl, pH 8 de façon à obtenir une teneur en poids sec de 0,02 g par mL. Cette suspension sert dans la détermination du potentiel de production de méthanethiol.

#### *Mise en évidence de la production de méthanethiol à partir de la méthionine*

La capacité de production du méthanethiol est évaluée par la méthode décrite par Laakso et Nurmikko (1976) et adaptée par Ferchichi et al, 1985.

### **Production d'hydrogène sulfuré à partir de la L-cystéine**

#### *Préparation des suspensions bactériennes*

Les cultures sont préparées à partir du même milieu que celui utilisé pour la production de méthanethiol. Seule, la méthionine est remplacée par la L-cystéine, à raison de 0,1 %.

En fin de croissance exponentielle, les cellules sont lavées et mises en suspension dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,3, de façon à obtenir une concentration de 0,02 g de poids sec par mL de suspension. Cette suspension sert à la détermination de l'hydrogène sulfuré.

### **Mise en évidence de la production d' $H_2S$**

La production d' $H_2S$  est détectée par la méthode décrite par Thomas et al (1974). Elle est exprimée en variation d'absorbance à  $609 \text{ nm}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de poids sec, ce qui permet une comparaison des différentes souches.

### **Aptitude à la désamination et à la décarboxylation de la L-méthionine**

#### **Préparation des suspensions bactériennes**

Une suspension dense ( $DO_{650 \text{ nm}}$  de 25) de cellules bactériennes (1 mL) réalisée dans de l'eau physiologique stérile est étalée sur une boîte de Pétri contenant un milieu tryptone-caséine (Biotrypcase de Biomérieux) gélosé à pH 5,5. Après 48 heures d'incubation à  $25^\circ\text{C}$ , les cellules sont récoltées dans 8 mL d'eau physiologique stérile. Cette suspension est utilisée pour l'étude des capacités de désamination et de décarboxylation de la méthionine.

#### **Mise en évidence de la désamination de la méthionine**

La mise en évidence de cette activité enzymatique repose sur la détection, de manière qualitative, de l'ammoniac libéré à l'aide du réactif de Nessler. À 0,5 mL de tampon mixte phosphate/citrate (0,15 M, pH 6,5), sont ajoutés 0,5 mL de suspension bactérienne et 0,05 mL d'acide aminé à 0,1 %. Parallèlement, un témoin sans acide aminé est réalisé. Après 2 heures d'incubation à  $40^\circ\text{C}$ , l'ammoniac formé est mis en évidence par l'apparition d'une coloration et d'un précipité rouge-orangé en présence du réactif de Nessler. L'intensité de la réaction est estimée qualitativement par l'importance du culot formé et par l'intensité de la coloration.

#### **Mise en évidence de la décarboxylation de la méthionine**

L'aptitude à la décarboxylation de la méthionine est appréciée par la modification du pH qui se produit dans le milieu réactionnel lors de la transformation de l'acide aminé en amine. Nous avons retenu le protocole de Falkow modifié par Brisou (1971).

### **Production d'autres composés soufrés volatils à partir d'un milieu dont la composition se rapproche de celle d'un fromage**

#### **Milieu et conditions de production des composés soufrés**

La production de composés soufrés est étudiée après croissance dans le modèle fromager.

#### **Extraction des composés soufrés produits**

L'extraction des composés soufrés volatils produits dans le milieu d'expression aromatique est réalisée selon le principe de l'espace de tête dynamique, à partir de 50 mL de culture additionnés de 20 mL d'eau distillée et 50 g de sulfate de sodium anhydre (Prolabo). Les composés sont entraînés par un courant d'azote (20 mL/min) durant 5 heures, à  $54^\circ\text{C}$  puis piégés dans une microcolonne d'adsorbant (Porapak Q, 80 mesh, Supelco) conditionnée par un chauffage à  $110^\circ\text{C}$  pendant 12 heures, sous un courant d'azote (10 mL/min). La colonne est ensuite rincée avec 120  $\mu\text{L}$  de dichlorométhane redistillé. Un témoin (milieu non ensemencé) est traité selon le même protocole.

#### **Analyse et identification des composés soufrés**

Les composés soufrés sont séparés par chromatographe en phase gazeuse (Girdel série 300) équipé d'une colonne capillaire JW (DB 1701) de 0,32 mm de diamètre intérieur, 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film et 30 m de longueur, et détectés spécifiquement par un photomètre de flamme (Delsi). Le gaz vecteur est de l'hydrogène (0,45 bar, 2,6 mL/min); 0,8  $\mu\text{L}$  d'extrait aromatique est injecté, la fuite d'entrée étant ouverte 30 secondes après l'injection à un débit de 30 mL/min. La programmation de température commence après une isotherme initiale de 5 minutes à  $30^\circ\text{C}$ . Le taux de montée est fixé à  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  jusqu'à  $170^\circ\text{C}$ , température finale maintenue durant 20 minutes. Une dérivation en sortie de colonne permet, de plus, de flairer des composés élués. L'identification des composés élués est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse quadripolaire Nermag 10-10 (Delsi) couplé à un chromatographe (Varian 3400) équipé de la même colonne que précédemment (JW DB 1701) d'une

longueur de 60 m. La programmation de température est identique à celle utilisée pour la détection par photométrie de flamme. La pression du gaz vecteur (He) est fixée à 1 bar. Les spectres d'ionisation sont obtenus par impact électronique à 70 eV, avec une température de la source de 180 °C. La gamme de masse balayée s'étend de 50 à 300 en 0,8 s.

## RÉSULTATS

### Sélection des souches

Une bonne partie des souches flairées produisent, sur le milieu à base de rétentat, des arômes de produits laitiers ou de fromages plus ou moins affinés avec des notes « sulfuré », « alliacé » (moutarde et choux fleur), « chocolaté », « fruité », « beurré », « rance » et « ammoniac » (tableau I).

Les propriétés des souches retenues pour l'étude de la production de composés soufrés volatils sont décrites dans le tableau II. Deux souches de *B. linens*, dont l'une est connue pour produire du méthaneéthiol (CNRZ 918)

(Ferchichi et al, 1985, 1986), servent de comparaison.

### Activités de dégradation des acides aminés soufrés (L-méthionine et L-cystéine)

Alors que presque toutes les souches étudiées, à l'exception de *M. luteus* (G13) et d'un des deux *B. linens* (C171), désaminent la méthionine, la décarboxylation de cet acide aminé semble être une aptitude beaucoup plus exceptionnelle. En effet, seuls deux staphylocoques : *S. xylosus* (G16) et *S. lentus* (G126) augmentent le pH, ce qui pourrait correspondre à la production de méthylthiopropylamine (tableau III).

De plus, parmi l'ensemble des souches analysées, à l'exception de *B. linens*, seule une bactérie corynéforme (C70) est capable, dans le milieu choisi, d'utiliser la méthionine comme unique source de carbone et d'énergie, aucune ou très faiblement la cystéine.

**Tableau I.** Fréquence des odeurs dominantes des souches sélectionnées en fonction des familles bactériennes (Micrococcaceae et bactéries corynéformes) et souches retenues pour l'étude des composés soufrés.

*Frequency of dominant odours of selected strains in function of the bacteria families (Micrococcaceae and coryneform bacteria) and the number of strains choiced for the sulfur compounds study.*

Odeurs dominantes (*)	Micrococcaceae		Bactéries corynéformes	
	Effectif	Souches retenues	Effectif	Souches retenues
Chocolaté	2	-	3	2
Choc/fruité	5	-	3	1
Fruité/caillé	12	-	2	-
Rance	2	-	2	-
Fromager doux	4	2	2	1
Fromager/NH3	1	1	1	1
Fromager/sulfuré	4	3	13	7
Fromager/moisi	2	1	1	-
Fromager/animal	-	-	3	1

\* Odeur produite par la culture dans le modèle fromager, après 3 ou 4 jours d'incubation à 25 °C, sur table d'agitation rotative.

\* *Odour produced by the cultures in the cheese model, after 3 or 4 days at 25 °C on rotative agitation table.*

**Tableau II.** Caractéristiques des souches retenues pour l'étude des composés soufrés.  
*Main features of selected strains for sulfur compounds study.*

<i>Souche</i>	<i>Espèce ou groupe<sup>a</sup></i>	<i>Origine</i>	<i>Odeurs<sup>b</sup></i>	<i>pH<sup>c</sup></i>
<b>Micrococcaceae</b>				
G9	<i>M luteus</i>	Pâte pressée	Sulfuré, fromager	8,2
G12	<i>M luteus</i>	Camembert	Fromager, NH3	8,2
G13	<i>M luteus</i>	Fromage	Fromager, moisi	8,0
G14	<i>M luteus</i>	Gruyère	Fromager, sulfuré	8,8
G16	<i>S equorum</i>	Camembert	Fromager doux	7,6
G101	<i>S equorum</i>	Saucisson	Fromager, sulfuré	8,4
G126	<i>S lentus</i>	Fromage de brebis	Caillé frais, beurré	8,4
<b>Bactéries corynéformes</b>				
C1	8-bl,cr	Livarot	Fromager, sulfuré	7,7
C6	11-bg	Maroilles	Fromager carapace	9,4
C41	15.2-bg	Langres	Malté, chocolaté	7,4
C49	16-ja	Munster	Fromager, sulfuré	8,7
C67	24.2-ja	Epoisses	Fromager doux, caramel	9,2
C70	10-ja.cr	Petit Langres	Fromager, moutarde	8,7
C71	23-ja	Vacherin	Choux fleur	8,4
C120	19.1-ja	Camembert	Fromager, NH3	8,7
C310	18-ja	Camembert	Fromager, animal	8,7
C93	27.1-cr.bl	Fromage chèvre	Chocolaté, fruité	5,9
C141	11.1-bg	Reblochon	Fromager	9,3
C150	11.2-bg	Reblochon	Fromager, animal	9,2
C161	13-bg.cr	Vacherin suisse	Chocolaté, malté	6,6
C171	<i>B linens</i> -7-bg	Comté	Fromager, sulfuré	8,9
CNRZ 918	<i>B linens</i> - or	Gruyère de comté	fromager, sulfuré	9,1

<sup>a</sup> Espèces : staphylocoques (Irlinger et al. 1996) et microcoques (résultats non publiés), groupes « provisoires » de bactéries corynéformes établis d'après les 53 caractères taxonomiques de Seiler (1986) et pigmentation ; or : orange, ja : jaune, bl : blanc, cr : crème et bg : beige. <sup>b</sup> Odeur produite par la culture sur rétentat complétement, après 3 ou 4 jours d'incubation à 25 °C sur table d'agitation rotative. <sup>c</sup> pH de la culture sur rétentat au moment du flai-rage après 3 ou 4 jours d'incubation à 25 °C.

<sup>a</sup> Species : *Staphylococcus* (Irlinger and al, 1996) and *Micrococcus* (not published results). Provisional groups of coryneform bacteria established from the 53 Seiler's taxonomic characters (1986) and pigmentation : or : orange, ja : yellow, bl : white, cr : cream and bg : beige. <sup>b</sup> Odour produced by the cultures, after 3 or 4 days at 25 °C on rotative agitation table. <sup>c</sup> pH of the culture at the moment of the degustation, after 3 or 4 days at 25 °C.

## Production de méthane-thiol

Parmi les sept *Micrococcaceae* testées, six produisent du méthane-thiol à partir de méthionine, avec néanmoins une activité spécifique inférieure ou égale à 70 nkat/g (tableau IV). Seul, *S lentus* (G126) ne produit pas de méthane-thiol en quantité suffisante pour être détectée, compte tenu du seuil de sensibilité de la méthode.

Chez les bactéries corynéformes, l'activité spécifique de production de méthane-thiol est comprise entre 10 et 380 nkat/g sauf pour une souche (C150) qui ne produit pas ou que très peu de ce composé. Pour plus du quart des individus, elle est supérieure à 100 nkat/g de poids sec.

Dans les conditions adoptées, les meilleures souches productrices de méthane-thiol sont donc les bactéries corynéformes,

**Tableau III.** Dégradation et utilisation comme seule source de carbone de la méthionine et de la cystéine par des *Micrococcaceae* et des bactéries corynéformes.

*Degradation and use as carbon sources of methionine and cystein by Micrococcaceae and coryneform bacteria isolated from cheeses.*

Souche	Méthionine		Croissance sur	
	Décarboxylation	Désamination	Méthionine	Cystéine
<b>Micrococcaceae</b>				
G9	-	++	-	-
G12	-	+++	-	-
G13	-	-	-	-
G14	-	+++	-	-
G16	+++	+++	-	-
G101	-	+++	-	-
G126	+	+	-	-
<b>Bactéries corynéformes</b>				
C1	-	++	-	-
C6	-	+++	-	-
C41	-	++	-	-
C49	-	++	-	-
C67	-	+++	-	-
C70	-	++	+	-
C71	-	++	-	-
C120	-	+++	-	-
C310	-	+	-	-
C93	-	+	-	-
C141	-	+++	-	-
C150	-	+	-	-
C161	-	++	-	-
C171	-	-	+	-
CNRZ 918	+	+++	+	+/-

- Pas d'activité ou pas de croissance ; + activité faible ou croissance ; ++ activité moyenne ; +++ forte activité.

- No activity or negative growth ; + little activity or growth ; ++ medium activity ; +++ strong activity.

par rapport aux *Micrococcaceae*. De plus, parmi les bactéries corynéformes, les deux souches de *B. linens* testées (CNRZ 918 et C171) sont les meilleures productrices de méthane-thiol, avec une activité spécifique respective de 386 et 194 nkat/g.

### Production d'H<sub>2</sub>S

Les sept souches de *Micrococcaceae* testées produisent de l'H<sub>2</sub>S à partir de la cystéine, comme toutes les bactéries corynéformes (tableau IV). Cependant, le potentiel

de production dépend fortement des souches, puisqu'il varie d'un facteur 5 pour les bactéries corynéformes et 4 pour les *Micrococcaceae*.

Parmi l'ensemble des *Micrococcaceae* analysés, le meilleur producteur d'H<sub>2</sub>S est *M. luteus*.

### Les autres composés soufrés produits

Il est intéressant de constater que sur les sept *Micrococcaceae* testées, seules les souches du genre *Micrococcus* semblent

capables de produire des esters de méthane-thiol : le S-méthylthioacétate et le S-méthylthiobunatoate, à des concentrations maximales respectives de 67 et 28 µg/L (tableau V). Cependant, deux des trois souches de staphylocoques étudiées (G16 et G126), qui ne synthétisent pas de thioesters, ne produisent pas ou très peu de méthane-thiol, substrat de la réaction.

Certaines bactéries corynéformes sont également capables d'estérifier le méthane-

thiol pour produire divers esters, comme le S-méthylthioacétate, le S-méthylthiobunatoate ou le S-méthylthiopentanoate, à des concentrations importantes pour deux souches : C41 et C6 (tableau V). Les deux souches de *B. linens* (C171 et CNRZ 918) produisent également des thioesters. C171 est d'ailleurs celle qui, parmi la totalité des souches étudiées, produit le S-méthylthioacétate en concentration la plus importante (5345 µg/L).

**Tableau IV.** Production de méthane-thiol, d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S), de diméthylsulfure (DMS) et de diméthyldisulfure (DMDS) par des *Micrococcaceae* et des bactéries corynéformes fromagères.

*Production of methanethiol, hydrogen sulfur (H<sub>2</sub>S), dimethylsulfur (DMS), and dimethyldisulfur (DMDS) by Micrococcaceae and coryneform bacteria isolated from cheeses.*

<i>Souche</i>	<i>Méthane-thiol</i> ( <i>nkat/g de poids sec</i> )	<i>H<sub>2</sub>S</i> ( <i>ΔDO/min/g</i> <i>de poids sec</i> )	<i>DMS</i> ( <i>ppm</i> )	<i>DMDS</i> ( <i>ppm</i> )
<b>Micrococcaceae</b>				
G9	64	1,83	0,30	1,90
G12	67	2,49	0,60	1,60
G13	20	2,67	0,02	0,05
G14	65	1,61	0,01	0,30
G16	11	0,70	0,10	0,06
G101	52	1,76	0,10	< 0,02
G126	< 5	1,56	0,09	< 0,02
<b>Bactéries corynéformes</b>				
C1	62	1,02	0,50	2,00
C6	17	1,53	1,20	3,20
C41	23	2,99	0,20	2,00
C49	56	0,55	0,20	2,00
C67	37	2,47	0,30	0,20
C70	90	0,40	0,02	2,00
C71	158	0,67	1,50	3,30
C120	93	1,28	0,30	2,00
C310	156	1,72	0,20	< 0,02
C93	46	1,22	1,20	< 0,02
C141	14	2,14	0,70	0,20
C150	7	1,95	0,30	0,10
C161	26	0,60	0,10	0,04
C171	194	2,44	0,90	3,30
CNRZ 918	386	2,18	0,50	2,70
<b>Fromages</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

Production de méthane-thiol à partir de méthionine, d'H<sub>2</sub>S à partir de cystéine, de DMS et DMDS dans le rétentat complétement et présence déjà mentionnée dans des fromages.

*Production of methanethiol from methionin, hydrogen sulfur from cystein, dimethylsulfur and dimethyldisulfur in complemented retentat and presence mentioned in cheeses.*

**Tableau V.** pH et concentrations en quelques thioesters dans les cultures de *Micrococcaceae* et de bactéries corynéformes effectuées en rétentat complémenté ( $\mu\text{g/L}$  de milieu).*pH and some thioesters concentrations in the cultures of Micrococcaceae and bacteria coryneform ( $\mu\text{g/L}$ ).*

Souche	pH	1	2	3	4	5	6
<b>Micrococcaceae</b>							
G9	8,20	67	-	-	-	-	-
G12	8,20	5	28	-	-	-	-
G13	8,00	2	-	-	-	-	-
G14	8,80	2	-	-	-	-	-
G16	7,60	-	-	-	-	1	-
G101	8,40	-	-	-	-	-	-
G126	8,40	-	-	-	-	-	-
<b>Bactéries corynéformes</b>							
C1	7,70	2	-	-	2	1	-
C6	9,40	243	201	47	-	-	-
C41	7,40	1450	-	-	-	-	-
C49	8,70	-	0,5	-	-	-	1
C67	9,20	-	-	-	-	-	-
C70	8,70	-	3	-	-	-	-
C71	8,40	10	25	26	-	-	-
C120	8,70	0,4	-	14	-	-	-
C310	8,90	-	-	-	-	-	-
C93	5,90	-	-	-	-	-	76
C141	9,30	-	-	-	-	0,4	2
C150	9,20	1	-	-	-	-	-
C161	6,60	18	4	4	-	-	7
C171	8,90	5345	5	38	-	-	0,6
CNRZ 918	9,10	85	14	6	-	-	-
Fromages*		+	+	+	+	+	+

1 : S-méthylthioacétate, 2 : S-méthylthiobutanoate, 3 : S-éthylthiopentanoate, 4 : S-propylthio 3-méthylbutanoate, 5 : S-propylthiohexanoate, 6 : S-hexylthiobutanoate. \* Présence de ces composés dans des fromages.

1 : S-méthylthioacétate, 2 : S-méthylthiobutanoate, 3 : S-éthylthiopentanoate, 4 : S-propylthio 3-méthylbutanoate, 5 : S-propylthiohexanoate, 6 : S-hexylthiobutanoate. \*Présence of these compounds in cheeses.

Parmi les autres composés soufrés identifiés, on peut noter l'importance des sulfures : diméthylsulfure, diméthyldisulfure, diméthyltrisulfure (tableaux IV et VI), principalement pour les bactéries corynéformes et *B. linens*, de divers thiols comme le 2-propanethiol, aussi bien chez des *Micrococcaceae* (G12 et G14) que chez des bactéries corynéformes (C1, C6, C171 et CNRZ 918), le 2-méthyl-1-pentanethiol chez un *Staphylococcus equorum* (G101) et deux coryné-

bactéries (C93 et surtout C161) et le 1,2-éthanédithiol. Enfin, certaines souches sont capables de produire, parfois en quantités qui paraissent importantes, de nombreux autres composés soufrés volatils, dont certains n'ont pu être identifiés avec les méthodes employées. C'est le cas de G12, G14 ou G16 pour les *Micrococcaceae*, ainsi que C1, C6, C71, C120, C171 et C161 pour les bactéries corynéformes.

**Tableau VI.** Autres composés soufrés volatils détectés dans les cultures effectuées dans le rétentat complémenté après 3 jours d'incubation. A. Des *Micrococcaceae*.

*Others volatil sulfur compounds detected in the cultures after 3 days. A. The Micrococcaceae.*

Autres Composés soufrés détectés	Temps de rétention (s)	Temps relatif au DMDS	Odeurs perçues en sortie de colonne (CPG)	G9	G12	G13	G14	G16	G101	G126
2-propanethiol	3,09	0,27	Alliacé, égot	-	+++++	-	++++	-	-	-
2-butanethiol	5,23	0,45	alliacé	-	-	-	-	+	-	-
2-méthyl-1-pentanethiol	10,47	0,91	?	-	-	+/-	-	-	+++++	-
DMDS	11,52	1,00	Alliacé	+++++	+++++	++++	++++	+++++	++	++
ni	12,29	1,07	Fruité	-	-	-	++	-	-	-
ni	13,99	1,21	Celluloïde, caoutchouc	-	+++	-	-	-	-	-
1,2-éthanedithiol	14,63	1,27	Alliacé	-	++	-	++	-	-	-
S-Méthyl thiopropanoate	15,84	1,37	Alliacé	-	+++	-	-	-	-	-
ni	16,62	1,44	Poireau, alliacé	-	-	-	++	-	-	-
S-Méthyl thio-isobutanoate	18,06	1,57	Sulfuré	-	++	-	+++	-	-	-
2,4-dithiapentane	22,23	1,93	Sulfuré	-	++++	+/-	-	+/-	-	-
S-éthyl 3-méthylthiobutanoate	25,23	2,19	Animal	-	-	-	-	-	-	-
DMTS	27,33	2,37	Alliacé, fromager	+++	+++++	++	+++	+++	+++	++
ni	32,16	2,79	Alliacé	-	-	-	-	-	+	-
ni	32,53	2,82	?	-	-	-	-	-	-	-
1-éthyl-dithio-2-propanone	34,30	2,98	Alliacé	-	-	-	-	-	-	-
dibutylsulfure	34,92	3,03	Alliacé	-	-	+/-	-	++	+	+
ni	36,18	3,14	?	-	-	-	-	-	-	-
diméthylthiométhyl-disulfure	37,96	3,29	Sulfuré, fromager	-	-	-	-	-	-	-
ni	38,56	3,45	Alliacé, fromager	-	-	-	-	++	-	-
ni	41,21	3,58	Alliacé	-	-	-	-	++	-	-
benzothiazole	42,05	3,65	Alliacé, brûlé, Caoutchouc	-	-	-	-	++	-	-
ni	44,72	3,88	Fruité	-	-	-	-	-	-	-
ni	46,90	4,07	?	-	-	-	-	-	-	-
ni	48,59	4,22	Alliacé	-	-	-	-	-	-	-
ni	49,60	4,30	Alliacé, sulfuré	-	-	-	-	-	-	-
Sphénylbenzène sulfinothioate	51,41	4,46	Alliacé, sulfuré	-	-	-	-	-	-	-
N butylsulfonamide benzène	56,37	4,89	Sulfuré, égot	-	-	-	-	-	-	-

**Tableau VI.** (suite). **B.** Des bactéries corynéformes.*The coryneform bacteria.*

Autres Composés soufrés détectés	Temps de rétention (s)	C1	C6	C41	C49	C67	C70	C71	C120	C310	C93	C141	C150	C161	CNRZ 918	C171
2-propanethiol	3,09	++++	+++++	-	-	-	+++	-	+++	-	-	++	-	++++	++++	-
2-butanethiol	5,23	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++
2-méthyl-1-pentanethiol	10,47	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+++	+++++	-	-	-	-
DMDS	11,52	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	+++++	+++++	+++	++	++++	++++	++++	+++++	+++++
ni	12,29	++	+++++	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-
ni	13,99	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
1,2-éthanédithiol	14,63	-	+++	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	++
S-Méthyl thiopropanoate	15,84	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	++
ni	16,62	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
S-Méthyl thio-isobutanoate	18,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++++
2,4-dithiapentane	22,23	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S-éthyl 3-méthylthiobutanoate	25,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++
DMTS	27,33	+++++	+++++	+++	++++	++	-	++++	++++	++	++	++++	++	+++	+++++	++++
ni	32,16	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ni	32,53	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1-éthylthio-2-propanone	34,30	-	-	++	-	-	-	++++	-	-	-	++	-	-	-	-
Dibutylsulfure	34,92	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	++
ni	36,18	++	+++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Diméthylthiométhylsulfure	37,96	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	+++	-	-	+++	++	+/-
ni	38,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-
ni	41,21	-	++++	-	++	-	-	++++	-	-	-	++	-	++	-	+++
Benzothiazole	42,05	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
ni	44,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
ni	46,90	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++
ni	48,59	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-
ni	49,60	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-	-	-	-
S-phénylbenzène sulfinothioate	51,41	++++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	-
N-butylsulfonamide benzène	56,37	-	+/-	-	-	-	-	++++	++	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats montrent que les souches étudiées présentent un potentiel de production de composés soufrés volatils variable, tant par leur nature que par leurs quantités, ce qui n'était, jusqu'à présent, que très mal connu en dehors de *B. linens*. Beaucoup de ces composés ont d'ailleurs déjà été signalés dans des fromages (tableaux IV et V).

Parmi ces molécules, on note d'abord l'importance du méthane-thiol. Ce thiol est, en effet, un composé clé dans l'arôme de nombreux aliments, notamment dans les fromages. Il s'agit d'un composé très volatil, présentant un point de fusion de 6,2 °C, une odeur très intense (putride à fécale à faible concentration) ainsi qu'un seuil de détection dans l'air relativement bas, de 0,02 ppb (Lindsay et Rippe, 1986). De plus, comme beaucoup de molécules possédant un ou plusieurs atomes de soufre, il est très réactif et peut donc être à l'origine de nombreux autres composés d'arôme importants. On le rencontre non seulement dans le cheddar (Manning et Price, 1977 ; Manning et al, 1976), mais aussi dans de nombreux fromages français à croûte fleurie ou lavée (Dumont et al, 1974, 1976a, 1976b ; Moinas et al, 1973).

Nos résultats montrent que six souches de *Micrococcaceae* sur les sept étudiées ont la capacité de produire, par voie enzymatique, des résidus sulfhydryls libres, avec des activités spécifiques variables, mais qui peuvent atteindre jusqu'à 70 nkat/g de poids sec chez des souches de *M. luteus*.

En outre, toutes les bactéries corynéformes étudiées produisent du méthane-thiol, certaines avec des activités spécifiques presque aussi fortes qu'une des deux souches de *B. linens* (C171).

Cela confirme les résultats déjà obtenus par Hemme et Richard (1986), Kim et Olson (1989) et Kim et al (1990) à propos du rôle important de *B. linens* dans la production de méthane-thiol.

Ferchichi et al (1985) quant à eux, ont estimé l'activité spécifique de production du méthane-thiol chez *B. linens* CNRZ 918, dans des conditions optimales : celle-ci varie entre 25 nkat/g pour les formes coccoïdes et 210 nkat/g pour les formes bacillaires. Beaucoup de nos bactéries ont des activités spécifiques de cet ordre de grandeur bien qu'elles ne soient certainement pas toutes dans des conditions optimales de production.

Malgré l'importance évidente de *B. linens*, le rôle de certaines *Micrococcaceae* et d'autres bactéries corynéformes dans la production de méthane-thiol au cours de l'affinage devrait être non négligeable compte tenu de leur importance numérique dans la flore de surface de certains fromages. Hemme et Richard (1986) ont d'ailleurs considéré que ce doit être le cas pour les bactéries dont l'activité spécifique excède 10 nkat/g, seuil dépassé, dans leur étude, seulement par des souches de *B. linens* du camembert, à l'exception de deux *S. xylo-sus*. De même, Cuer et al (1979c) n'ont pas trouvé de microcoques fromagers producteurs de méthane-thiol, contrairement à près de 45 % des microcoques et 30 % des bactéries corynéformes de la flore de la peau humaine (Marshall et al, 1988). Des souches de *B. casei* pouvant provenir de la peau produisent aussi du méthane-thiol (Sharpe et al, 1977 ; Law et Sharpe, 1978), ainsi qu'une souche de *Microbacterium* (Jollivet et al, 1992).

Les voies de production du méthane-thiol ont déjà fait l'objet d'études. Dans les fromages, il aurait deux origines possibles à partir de la méthionine : l'une purement chimique, par la voie de dégradation de Strecker à partir de précurseurs issus du métabolisme des streptocoques (Law et Sharpe, 1978 ; Lindsay et Rippe, 1986) ; la réactivité du méthane-thiol est d'ailleurs fonction des paramètres physico-chimiques du milieu tels que le pH ou le potentiel redox. L'autre

voie est purement enzymatique et vraisemblablement plus efficace et plus rapide.

Chez *B. linens*, cette dernière voie est aujourd'hui relativement bien caractérisée. L'enzyme clé dégradant la méthionine pour former du méthaneéthiol : la L-méthionine  $\gamma$ -déméthiolase a d'ailleurs été isolée et caractérisée chez une souche : NCDO 739 (ATCC 9175), isolée de camembert (Collin et Law, 1989). Son pH et sa température optimale d'activité sont respectivement de 8 et 20 °C. De plus, la méthionine est nécessaire pour l'induction de cette enzyme.

D'autres voies de production ont également été décrites chez d'autres microorganismes. Ainsi, Segal et Starkey (1969) ont décrit une voie de synthèse : la réaction débiterait par une désamination oxydative de la méthionine suivie par la déméthioloation. En revanche, pour Esaki et Soda (1977), deux voies coexisteraient chez *Pseudomonas putida* et *Aeromonas* : soit l' $\alpha, \gamma$ -élimination de l'acide aminé pour former de l' $\alpha$ -cétobutyrate, du méthaneéthiol et de l'ammoniac, soit un  $\gamma$ -remplacement. Dans ce dernier cas, il peut donc y avoir production de méthaneéthiol sans désamination de l'acide aminé, ce qui semblerait être le cas de *M. luteus* G13 (tableau III).

Cependant, parmi nos bactéries productrices de méthaneéthiol autres que *B. linens*, seules trois d'entre elles sont capables d'utiliser la méthionine comme unique source de carbone et d'énergie et d'ailleurs, aucune n'utilise la cystéine dans un milieu qui leur permet pourtant d'utiliser bien d'autres composés.

La production de méthaneéthiol comme celle d'hydrogène sulfuré n'impliquerait donc pas systématiquement l'utilisation de la méthionine ou de la cystéine en tant que source de carbone comme l'avaient pourtant trouvé Hemme et Richard (1986), chez des bactéries corynéformes isolées de camembert. Des cas similaires au nôtre ont déjà été signalés chez d'autres microorganismes pour lesquels les voies de produc-

tion de méthaneéthiol sont vraisemblablement différentes. Ainsi, Ruiz Herrera et Starkey (1970) ont constaté que certains champignons produisent effectivement du méthaneéthiol à partir de méthionine. Or, l'acide  $\alpha$ -cétobutyrique, coproduit du méthaneéthiol, n'intègre pas le cycle de Krebs et la méthionine n'est donc pas une source d'énergie possible.

Alors que la plupart des souches désaminent la méthionine, à l'exception de deux souches G13 et C171, la décarboxylation de cet acide aminé est beaucoup plus exceptionnelle. Ces nombreux résultats négatifs peuvent malheureusement être liés à la méthode, qui est peu précise et pas spécifique. En effet, certaines souches, et en particulier la quasi-totalité des bactéries corynéformes, alcalinisent très fortement le témoin sans méthionine, compte tenu de leur métabolisme particulier : ces bactéries utilisent très peu les hydrates de carbone, mais préférentiellement les acides organiques et surtout les matières azotées comme sources de carbone et d'énergie. La libération importante d'ammoniac provoque donc une forte augmentation du pH et peut donc masquer la variation de pH qui résulterait de la formation de l'amine. L'écart de pH observé n'est donc plus significatif et ne permet donc pas de conclure sur la capacité de décarboxylation de l'acide aminé. Il est également possible que la décarboxylation de la méthionine ne soit pas une réaction courante chez cette famille bactérienne, ce qui semblerait être confirmé par l'absence de données dans la littérature.

Parmi les composés soufrés volatils identifiés, certains proviennent vraisemblablement en partie de réactions chimiques, indépendantes de toute activité enzymatique. C'est le cas, par exemple, du DMDS qui peut résulter d'une oxydation spontanée du méthaneéthiol. Il se forme donc au détriment de ce dernier (Lindsay et Rippe, 1986 ; Segal et Starkey, 1969). Ainsi, dans une culture, la présence de DMDS montre qu'il y a eu pro-

duction préalable de méthane-thiol, même si ce dernier a disparu. En outre, ce disulfure, également identifié dans l'arôme de nombreux fromages, en particulier dans les pâtes molles (Dumont et al, 1974 ; Law, 1981 ; Parliment et al, 1982) possède des propriétés organoleptiques intéressantes, une odeur sulfurée et alliagée intense et un seuil de détection dans l'air relativement faible (12 ppb). On lui a donc attribué un rôle important dans l'arôme des fromages.

La production de thioesters, quant à elle, relève probablement plus de réactions enzymatiques et elle varie d'ailleurs selon les souches de *Micrococcaceae* et de bactéries corynéformes, tant en concentrations obtenues dans les cultures qu'en nature des composés.

Les plus importants sont ceux qui proviennent du méthane-thiol : le S-méthylthioacétate et S-méthylthiobutanoate. Les concentrations maximales sont obtenues pour certaines bactéries corynéformes : C41, C6 et *B linens* C171, souches qui ne sont pas forcément les plus productrices de méthane-thiol. Cette aptitude à estérifier le méthane-thiol a déjà été signalée chez quelques souches de microcoques et de *B linens* (Cuer et al, 1979 a et b ; Jollivet et al, 1992). Pour cette dernière espèce, le taux de production du S-méthylthioacétate était faible et variait entre 3 et 19 µg/L de milieu de culture (Cuer et al, 1979b), soit 250 fois moins que l'une de nos souches de *B linens* (C171) qui est certainement exceptionnelle car la souche CNRZ 918 ne produit pas plus que celle étudiée par Jollivet et al (1992).

Le point le plus original est l'aptitude à produire des thioesters, notamment du S-méthylthioacétate, chez d'autres bactéries corynéformes fromagères, ce qui n'avait jamais été signalé. Il ne s'agit pas de *B linens*, ni même, pour la plupart, d'autres *Brevibacterium*, d'après ce que nous savons actuellement sur leur identité (résultats encore non publiés).

Trois hypothèses peuvent expliquer l'absence de production de méthylthioesters par certaines des souches. Elles sont incapables de former du méthane-thiol (tableau IV), ou n'en fabriquent pas suffisamment dans le milieu utilisé ; les très faibles concentrations en DMDS en sont la preuve indirecte. Presque toutes les souches qui produisent moins de 0,2 ppm de DMDS ne donnent pas de méthylthioesters (tableaux IV et V). La génération des résidus acyls pourrait également être limitante, mais cette hypothèse n'a pas encore été testée. De même, le système enzymatique responsable de la formation des thioesters, la « thiolal-cool-acyl-transacylase » (Brady et Stadtman, 1954), peut être absente ou inefficace. Enfin, la dernière hypothèse, avancée par Cuer et al (1979b) concerne l'instabilité des thioesters en solution. Ceux-ci pourraient s'hydrolyser rapidement en pH alcalin. Cela se vérifie pour les souches G101, G126, C49, C70, C310, C150, C141 et surtout C67 mais pas pour C171 et C6. Chez ces dernières, la production des thioesters doit être plus rapide que leur dégradation.

Les autres thioesters détectés sont en concentrations relativement faibles, sauf pour certaines souches comme C6 et C171 pour le S-éthylthiopentanoate (respectivement à 45 et 38 µg/L) et C93 pour le S-hexylthiobutanoate (76 µg/L).

Cette famille chimique est très intéressante car les thioesters renforcent énormément l'arôme fromagère, en apportant des notes de choux fleur, d'ail, de ciboulette ou de fruit avancé (Cuer et al, 1979c) et sont caractéristiques des fromages à croûte lavée (Dumont et al, 1974). Un travail sur leur mode de formation est actuellement en cours dans notre laboratoire (Lamberet et al, 1995).

Enfin, pour les autres composés soufrés produits par ces souches, les voies de synthèse sont encore obscures et l'importance relative des voies chimique et enzymatique n'est pas identifiée. Pourtant, compte tenu de

leur odeur caractéristique (allié, sulfuré et fromager), certains de ces composés, identifiés ou non, doivent aussi intervenir dans l'arôme des cultures et dans celui des fromages s'ils sont présents, comme cela a déjà été avancé pour le DMDS et le DMS.

L'ensemble des connaissances concernant le potentiel de production de composés d'arôme, composés soufrés ou non chez des bactéries fromagères les plus importantes en dehors de *B. linens* (Bloes et Bergère, 1994), doit permettre non seulement de recourir à des levains d'affinage nouveaux et spécifiques, mais également de maîtriser leur production et leur emploi dans le fromage ou dans des préparations particulières.

## RÉFÉRENCES

- Adda J (1986) Les mécanismes de formation de la flaveur dans les fromages. *CR XXII Congr Int Lait*, La Haye, 169-177
- Bhowmik T, Marth EH (1988) Protease and peptidase activity of *Micrococcus* species. *J Dairy Sci* 71, 2358-2365
- Bhowmik T, Marth EH (1990a) Esterase of *Micrococcus* species : Identification and partial characterization. *J Dairy Sci* 73, 33-40
- Bhowmik T, Marth EH (1990b) Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* in cheese ripening : a review. *J Dairy Sci* 73, 859-866
- Bloès-Breton S, Bergère JL (1994) Potentiel aromatique de bactéries corynéformes d'origine fromagère, autres que *B. linens*. In : CR Congrès SFM, Dijon, 9-10 mars 1994, Paris, 120-133
- Boyaval P, Desmazeaud MJ (1983) Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. *Lait* 63, 187-216
- Brady RO, Stadtman ER (1954) Enzymatic thioacetate acetylation. *J Biol Chem* 211, 621-629
- Brisou J (1971) *Techniques d'enzymologie bactérienne*, Masson, Paris, 212-213
- Clancy M, O'Sullivan M (1993) Partial purification and characterization of a proteinase from *Brevibacterium linens*. *Irish J Agric Food Res* 32, 185-194
- Collin JC, Law BA (1989) Isolation and characterization of the L-methionine gamma demethylase from *Brevibacterium linens* NCDO 739. *Sci Aliments* 9, 805-812
- Cuer A, Dauphin D, Kergomard A, Dumont JP, Adda J (1979a) Production of S-methylthioacetate by *Micrococcus* cheese strains. *Agric Biol Chem* 43, 1783-1784
- Cuer A, Dauphin D, Kergomard A, Dumont JP, Adda J (1979b) Production of S-methylthioacetate by *Brevibacterium linens*. *Appl Env Microbiol* 38, 332-334
- Cuer A, Dauphin G, Kergomard A, Roger S, Dumont JP, Adda J (1979c) Flavour properties of some sulphur compounds isolated from cheeses. *Lebensm Wiss Technol* 12, 258-261
- Delarras C (1982) Étude de l'activité lipolytique des *Micrococcaceae*. *Rev Fr Corps Gras* 28, 165-167
- Dumont JP, Roger S, Adda J (1974) Étude des constituants volatils neutres présents dans les fromages à pâte molle et à croûte lavée. *Lait* 54, 31-43
- Dumont JP, Roger S, Adda J (1976a) L'arôme du camembert : Autres composés mineurs mis en évidence. *Lait* 56, 595-599
- Dumont JP, Roger S, Adda J (1976b) L'arôme du Pont l'Évêque. Mise en évidence de constituants volatils quantitativement mineurs. *Lait* 56, 177-180
- Eliskases-Lechner F, Ginzinger W (1995) The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regards to coryneforms. *Lait* 75, 571-584
- El Shafei H, Ezzat N, El Soda M (1989) The esterolytic activity of several strains of *Brevibacterium linens*. *Egypt J Dairy Sci* 17, 171-178
- Esaki N, Soda K (1987) L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Pseudomonas putida* and *Aeromonas*. *Methods Enzymol* 143, 459-465
- Ezzat N, El Soda M, El Shafei H, Olson NF (1993) Cell wall associated peptide hydrolase and esterase activities in several cheese related bacteria. *Food Chem* 48, 19-23
- Ferchichi M, Hemme D, Nardi M (1985) Production of methanethiol from methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *J Gen Microbiol* 131, 715-723
- Ferchichi M, Hemme D, Nardi M (1986) Induction of methanethiol production by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *J Gen Microbiol* 131, 3075-3082
- Frings E, Holtz C, Kunz B (1993) Studies about casein degradation by *Brevibacterium linens*. *Milchwissenschaft* 48, 130-133
- Garcia de Fernando GD, Fox PF (1991) Extracellular proteinases from *Micrococcus* GF : 2. Isolation and characterization. *Lait* 71, 371-383
- Grand M, Weber A, Perret J, Zehntner U, Glaetli H (1992) Development of ripening flora on the surface of gruyere cheese. *Schweiz Milchforsch Forsch* 21, 3-5
- Hemme D, Richard J (1986) Utilization of L-methionine and production of methanethiol by bacteria isolated from milk camembert cheese. *Lait* 66, 135-142
- Hemme D, Bouillanne C, Metro F, Desmazeaud MJ (1982) Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sci Aliments* 2, 113-123

- Holtz C, Kunz B (1994) Studies on degradation of whey proteins by *Brevibacterium linens*. *Milch-wissenschaft* 49, 130-131
- Irlinger F, Morvan A, El Sohl N, Bergère JL (1996) Taxonomic characterization of coagulase-negative Staphylococci in ripening flora from french traditional cheeses. *J Syst Appl Microbiol* (in press)
- Jollivet N, Bezenger MC, Vayssier Y, Belin JM (1992) Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 790-794
- Kim SC, Olson NF (1989) Production of hydrogen sulfide in milk-coated microcapsules containing *Brevibacterium linens* and cysteine. *J Microencapsul* 6, 501-513
- Kim SC, Kim M, Olson NF (1990) Interactive effect of H<sub>2</sub>S production from cysteine and methanethiol production from methionine in milk fat microcapsules containing *Brevibacterium linens*. *J Dairy Res* 57, 579-585
- Kinik O, Akbulut N (1994) Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* in cheese ripening. *Ege Ueniversitesi Ziraat Fakueltesi Dergisi* 31, 253-259
- Laasko S, Nurmikko V (1976) A spectrometric assay for demethylating activity. *Anal Chem* 72, 600-605
- Lamberet G, Auberger B, Bergère JL (1995) Synthesis of methylthioesters by resting cells of coryneform bacteria and *Micrococcaceae* of cheeses. In: *Bioflavour 95* (P Etievant, P Schreir, eds) INRA, Paris, 14-17
- Law BA (1981) The formation of aroma and flavour compounds in fermented dairy products. *Dairy Sci Abstr* 43, 143-154
- Law BA, Sharpe ME (1978) Formation of methanethiol by bacteria isolated from raw milk and Cheddar cheese. *J Dairy Res* 45, 267-275
- Law BA, Castanon M, Sharpe ME (1976) The effect of non starter bacteria on the chemical composition and the flavour of Cheddar cheese. *J Dairy Res* 43, 117-125
- Lee SK, Johnson ME, Marth EH (1992) Characteristics of reduced fat Cheddar cheese made with added *Micrococcus* species LL3. *Lebensm Wiss Technol* 25, 552-558
- Lindsay RC, Rippe JK (1986) Enzymatic generation of methanethiol to assist in the flavor development of Cheddar cheese and other foods. In: *Biogeneration of aromas*, ACS Symposium Series 317, (H Parliment, R Croteau, eds) American Chemical Society, Washington DC, USA 286-308
- Mac Gagan (1975) Cheddar cheese flavor - A review of current progress. *J Agric Food Chem* 23, 1047-1050
- Manning DJ, Price JC (1977) Cheddar cheese aroma. The effect of selectivity removing specific classes of compounds from cheese headspace. *J Dairy Res* 44, 357-361
- Manning DJ, Chapman HR, Hosking ZD (1976) The production of sulphur compounds in Cheddar cheese and their significance in flavour development. *J Dairy Res* 43, 313-320
- Marshall J, Holland KT, Gribbon EM (1988) A comparative study of the cutaneous microflora of normal feet with low and high levels of odour. *J Appl Bacteriol* 65, 61-68
- Moinas M, Groux M, Horman I (1973) La flaveur des fromages : 1 - Une méthodologie nouvelle d'isolement de constituants volatils : application au roquefort et au camembert. *Lait* 53, 601-609
- Ortiz de Apodaca MJ, Selgas MD, Ordóñez JA (1993) Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food Res Inter* 26, 319-325
- Parliment TH, Kolor MG, Rozzo DJ (1982) Volatile components of Limburger cheese. *J Agric Food Chem* 30, 1006-1008
- Piton C (1988) Evolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l'affinage. *Lait* 68, 419-434
- Piton C, Fontanier C (1990) Caractérisation d'une collection de souches de bactéries corynéformes de la morge du gruyère de Comté. *Lait* 70, 383-398
- Richard J, Zadi H (1983) Inventaire de la flore bactérienne dominante des camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait* 63, 25-42
- Ruiz Herrera J, Starkey RL (1970) Dissimilation of methionine by *Achromobacter starkeyi*. *J Bacteriol* 104, 1286-1293
- Segal W, Starkey RL (1969) Microbial decomposition of methionine and identity of the resulting sulfur products. *J Bacteriol* 98, 908-913
- Seiler H (1983) Identification key of coryneform bacteria derived by numerical taxonomic studies. *J Gen Microbiol* 129, 1433-1471
- Sharpe ME, Law BA, Phillips BA (1977) Methanethiol production by coryneform bacteria : Strains from dairy and human skin sources and *Brevibacterium linens*. *J Gen Microbiol* 101, 345-349
- Si-Kyung L, Hyun-Kyu J (1993) Purification and partial characteristics of intracellular aminopeptidase from *Micrococcus* sp. *J Korean Agric Chem Soc* 36, 539-546
- Sloot D, Harkes PD (1975) Volatile trace components in Gouda cheese. *J Agric Food Chem* 23, 356-357
- Thomas LC, Fric BS, Chamberlin GJ (1974) *Colorimetric chemical analytical methods*, (Tintometer LDT ed) Salisbury, England, 508-509