

Le catabolisme des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée chez *Lactococcus lactis*

Florence Roudot-Algaron, Mireille Yvon

*Unité de recherches de biochimie et structure des protéines, Inra, domaine de Vilvert,
78352 Jouy-en-Josas, France*

Abstract — **Aromatic and branched chain amino acids catabolism in *Lactococcus lactis*.** The enzymatic degradation of amino acids in cheeses is believed to generate aroma compounds. In lactococci, transamination is the first step in the degradation of aromatic and branched-chain amino acids. Several aminotransferase activities have been detected and, an aromatic-aminotransferase has been purified and characterised. Ketoacids resulting from transamination are mainly degraded to carboxylic acids or to hydroxyacids, depending on the reaction conditions. These degradations could be catalysed by lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase which are involved in pyruvate catabolism. However, we also suggest the existence of other dehydrogenases, more specific for ketoacids from amino acids. Whereas amino acids catabolism need to be clarified, we can state that lactococci have the enzymatic equipment required for the transformation of aromatic and branched chain amino acids to volatile aroma compounds. © Inra/Elsevier, Paris.

catabolism / amino acids / *Lactococcus lactis* / aroma

Résumé — La dégradation enzymatique des acides aminés est une voie possible pour la formation de molécules aromatiques dans les fromages. Chez les lactocoques, la transamination est la première étape de dégradation des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée. Plusieurs aminotransférases ont été mises en évidence et, en particulier, une aminotransférase aromatique a été purifiée et caractérisée. Les cétoacides formés au cours de la transamination sont ensuite essentiellement dégradés en acide, en absence de glucose, ou en hydroxyacide, en présence de glucose. Ces dégradations pourraient être catalysées par la lactate déhydrogénase et la pyruvate déhydrogénase intervenant dans le catabolisme du pyruvate. Toutefois, l'existence d'autres déhydrogénases plus spécifiques des cétoacides issus des acides aminés est suggérée. Bien que le catabolisme des acides aminés ne soit pas encore totalement élucidé, la mise en évidence de ces activités de dégradation des acides aminés nous permet d'affirmer, d'ores et déjà, que les lactocoques ont le potentiel enzymatique nécessaire à la dégradation des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée en molécules volatiles aromatiques. © Inra/Elsevier, Paris.

catabolisme / acides aminés / *Lactococcus lactis* / arôme

1. INTRODUCTION

La dégradation des acides aminés est l'une des voies de formation de molécules aromatiques dans les fromages. Au cours de l'affinage, les acides aminés sont libérés sous l'action des enzymes protéolytiques. Ces acides aminés libres interviennent directement dans la saveur de base des fromages [16, 17]. De plus, ils contribuent au développement de certaines saveurs typiques, par l'intermédiaire de leurs produits de dégradation, puisqu'ils sont précurseurs de composés aromatiques de type aldéhyde, alcool, cétone, ester, acide (figure 1). En particulier, les composés issus des acides aminés aromatiques, soufrés ou à chaînes ramifiées ont des arômes caractéristiques floraux, soufrés ou fromagers.

La dégradation des acides aminés dans le fromage est principalement due aux

enzymes microbiennes bien que des réactions chimiques (dégradation de Strecker) puissent également y participer. Les voies de dégradation des acides aminés ont été étudiées chez quelques microorganismes [10, 12] utilisés comme flore d'affinage et connus pour produire des composés aromatiques. En général, ces voies de dégradation font intervenir désaminations, transaminations, décarboxylations ou encore le clivage des chaînes latérales [1, 9].

Bien que les bactéries lactiques en général, et plus particulièrement les lactocoques, soient présentes dans tous les levains de fromagerie et par conséquent dans tous les fromages, et bien qu'elles aient un rôle majeur dans la production d'acides aminés libres, leur potentiel de dégradation des acides aminés a été peu étudié. Cela est probablement lié au fait que les bactéries lactiques sont supposées ne pas intervenir dans la formation de

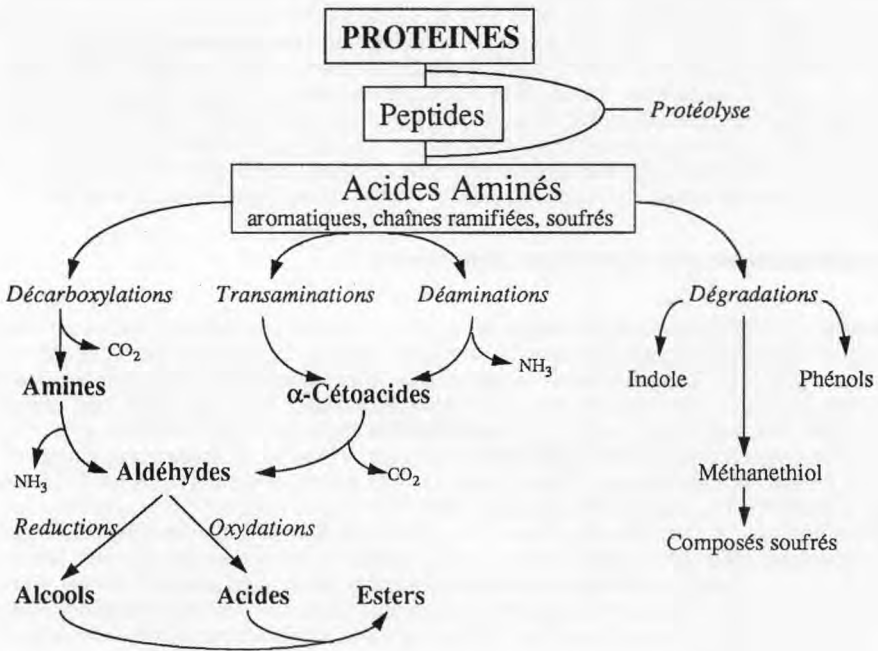


Figure 1. Schéma général du catabolisme microbien des acides aminés [9].

Figure 1. General scheme of aminoacids microbial catabolism [9].

composés d'arôme. Pourtant, ce sont les seules bactéries présentes dans certains fromages tels que le cheddar ou le gouda, dans lesquels se développent des saveurs typiques au cours de longs affinages. C'est pourquoi depuis quelques années, plusieurs équipes s'intéressent au catabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques.

Dans cet article, nous nous efforcerons de faire un état des connaissances actuelles dans ce domaine, et tout particulièrement en ce qui concerne les acides aminés aromatiques et à chaînes ramifiées. Les travaux publiés étant encore peu nombreux, nous intégrerons à ce bilan les résultats obtenus dans notre laboratoire.

2. MISE EN ÉVIDENCE D'ACTIVITÉ DE DÉGRADATION DES ACIDES AMINÉS AROMATIQUES ET DES ACIDES AMINÉS À CHAÎNES RAMIFIÉES CHEZ LES LACTOCOQUES

Les principales activités enzymatiques pouvant intervenir dans la dégradation de ces acides aminés ont été recherchées sur

des cellules entières et dans des extraits cellulaires, chez plusieurs souches de *Lactococcus lactis* [8, 18]. Ce sont des activités aminotransférases, oxydases, déshydrogénases, décarboxylases spécifiques des acides aminés, ainsi que des activités décarboxylases et déshydrogénases des cétoacides correspondants. Des activités plus spécifiques du tryptophane, telles que tryptophanase, Trp-2-monooxygénase ou oxydase de la chaîne latérale ont également été recherchées dans les extraits cellulaires. Aucune désamination oxydative ni décarboxylation des acides aminés n'a été observée dans ces souches et les activités spécifiques du tryptophane n'ont pas été détectées. Seules des activités aminotransférases ont été trouvées pour les deux groupes d'acides aminés dans les extraits cytoplasmiques de toutes les souches testées (tableau I). Les deux équipes ont observé que ces activités aminotransférases variaient peu d'une souche à l'autre. Seule une souche de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* possédait une activité beaucoup plus faible que les autres souches sur les acides aminés aromatiques. Les activités aminotransférases observées sont peu affectées par le milieu de culture [18] et il est intéressant de noter

Tableau I. Activité Leu-aminotransférase et Phe-aminotransférase détectées dans des extraits cellulaires de quelques souches de lactocoques [18].

Table I. Leu-aminotransferase and Phe aminotransferase activity detected in some cell-free extracts of lactococci strains [18].

Souche	Activité (nmol Glu formé/mg protéines/min)	
	Phe ATase	Leu ATase
Z145 ¹	114	481
IL 570 ¹	114	363
IL641 ¹	150	326
Z116 ²	167	530
Z118 ²	98	502
TIL81 ²	144	320
TIL10 ²	137	345

¹ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

² *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

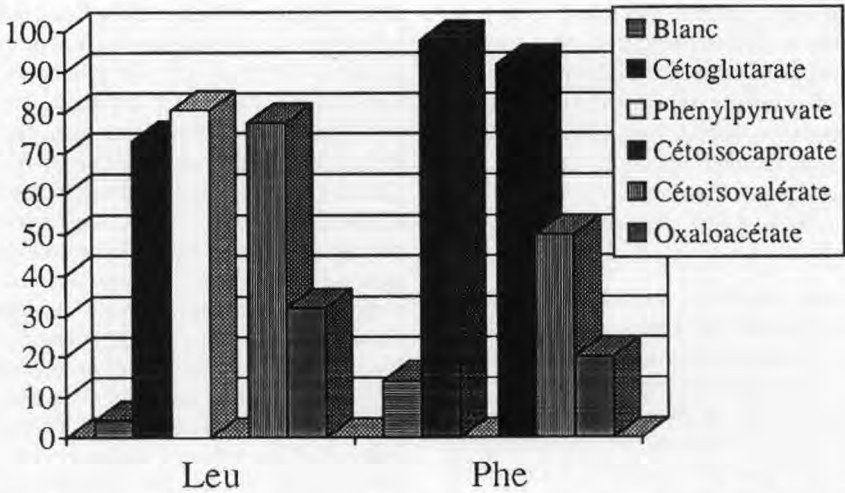


Figure 2. Influence du cétoacide accepteur sur la transamination de la leucine et de la phénylalanine par des cellules de *Lactococcus lactis* NCDO763 : pourcentage d'acide aminé dégradé après 40 heures de réaction dans un milieu tamponné à pH 8 contenant l'acide aminé, les cellules (resting cells) et le cétoacide. Blanc : sans cétoacide.

Figure 2. Effect of the keto-acid on leucine and phenylalanine transamination by *Lactococcus lactis* NCDO763 cells: percentage of degraded amino acid after 40 h in a pH 8 buffer, containing amino acid, cells (resting cells) and keto-acid. Blanc: without any keto-acid.

que ces activités s'expriment et sont stables dans un milieu modèle qui simule la composition du cheddar, et dans des conditions proches de celles rencontrées au cours de l'affinage [8].

Enfin, en ce qui concerne les activités de dégradation des cétoacides, seule la dégradation du phénylpyruvate (cétoacide de la phénylalanine) par des cellules entières a été observée.

2.1. La transamination et les aminotransférases

La transamination est la première étape de dégradation des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée chez les lactocoques. En effet, la présence d'un cétoacide accepteur est essentielle à la dégradation de ces acides aminés (figure 2). Ce cétoacide est en général du cétooglutarate mais d'autres

cétoacides peuvent être utilisés en fonction des enzymes et du substrat. Ainsi, nous avons testé l'activité Leu-amino-transférase et Phe-amino-transférase sur des cellules de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NCDO763 en présence de différents cétoacides et nous avons observé que le phénylpyruvate (cétoacide de la Phe) ou le cétoisocaproate (cétoacide de la Leu) peuvent être d'aussi bon substrats que le céto-glutarate.

Puisque les aminotransférases initient la dégradation des acides aminés chez les lactocoques, elles ont suscité l'intérêt de plusieurs équipes dont l'objectif est de construire des mutants pour évaluer le rôle de ces enzymes dans le développement de la flaveur des fromages. Ainsi, plusieurs aminotransférases agissant sur les acides aminés aromatiques ou sur les acides aminés à chaîne ramifiée ont été mises en évidence chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* [6, 7]. L'une d'elles (Ar-AT), purifiée

et caractérisée par Yvon et al [20], est active sur les trois acides aminés aromatiques, sur la leucine et sur la méthionine. En plus du cétooglutarate, cette aminotransférase peut utiliser tous les cétoacides correspondant à ses acides aminés substrats comme accepteur du groupement aminé. Son pH optimal d'activité se situe entre 6,5 et 8 et sa température optimale entre 35 et 45 °C, mais elle est encore active à 10 °C, ce qui signifie qu'elle peut être active pendant l'affinage des fromages. Ar-AT est constituée de deux sous-unités identiques de 43,5 kDa. Sa séquence N-terminale ainsi que quelques séquences internes ont été identifiées, ce qui a permis de cloner le gène. Celui-ci a pu être complètement séquencé et un mutant négatif de qualité alimentaire a été construit [15]. Contrairement à la plupart des aminotransférases aromatiques, cette enzyme n'a pas d'action sur l'acide aspartique et n'utilise pas l'oxaloacétate comme cosubstrat. Toutefois, il faut noter que *Lactococcus lactis* NCDO763 possède une autre aminotransférase capable de dégrader l'acide aspartique [7]. D'autres aminotransférases actives sur les acides aminés à chaîne ramifiée et sur la méthionine (tableau II) sont en cours de caractérisation.

2.2. La dégradation des α -cétoacides

Les cétoacides produits par la transamination peuvent ensuite subir des dégradations spontanées ou enzymatiques. En effet, Gao et al [8] et Ouvry [14] ont observé une dégradation spontanée de l'indolepyruvate (cétoacide du tryptophane) en indole-3-aldéhyde et indoleacétate et du 4-hydroxyphénylpyruvate (cétoacide de la tyrosine) en hydroxybenzaldéhyde et hydroxyphénylacétate.

Nous avons d'autre part observé des dégradations d'origine enzymatique qui dépendent des conditions de la réaction (figure 3). Ainsi, en présence de glucose ou de fructose-di-phosphate, à pH 8, des cellules de *Lactococcus lactis* au repos dégradent principalement les cétoacides des acides aminés aromatiques et à chaînes ramifiées en hydroxyacides (figure 4A). Cette dégradation, qui n'a pas lieu en absence de sucre, pourrait être catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH) de *Lactococcus lactis* puisque cette enzyme, connue pour transformer le pyruvate en lactate, est FDP-dépendante [3]. De plus, Meister [13] a montré que la LDH de cœur de bœuf était capable de dégrader d'autres cétoacides que le pyruvate. Une autre enzyme, homologue de la D-2-hydroxyisocaproate déshydrogénase identifiée chez *Lb. casei* et chez *Lb. bulgaricus* ou homo-

Tableau II. Activité relative des leucine-aminotransférases partiellement purifiées chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Table II. Relative activity of the pre-purified leucine-aminotransferases isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Substrat	(Engels et al., 1996) [6]		(Algaron, communication personnelle)	
	AT A	AT B	Leu-AT 1	Leu-AT 2
Leu	282	327	288	238
Ile	N.D.	N.D.	365	227
Val	N.D.	N.D.	212	214
Met	100	100	100	100

N.D. : Non déterminé.

N.D. : Not determined.

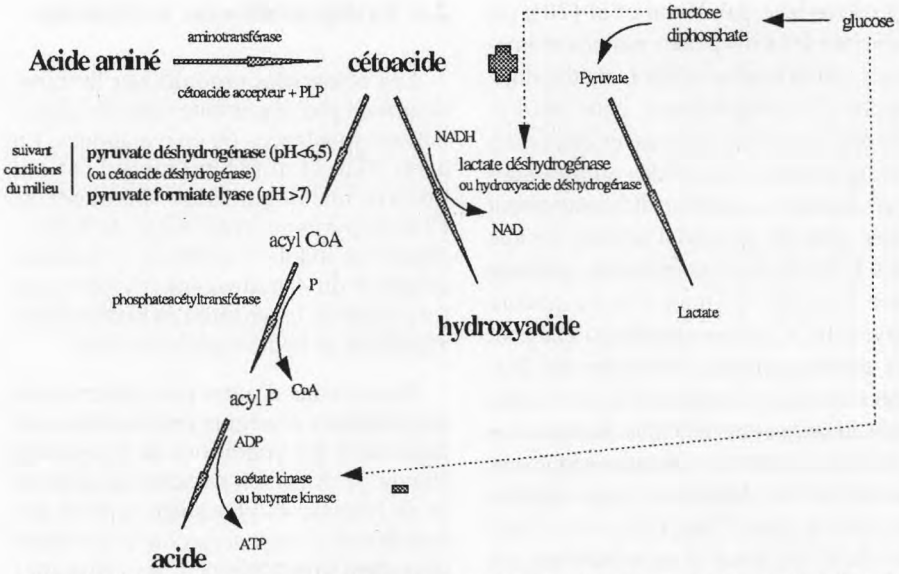


Figure 3. Schéma de dégradation des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaînes ramifiées proposé pour *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NCDO 763.

Figure 3. Aromatic and branched chain amino acid degradation scheme proposed for the strain *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NCDO763.

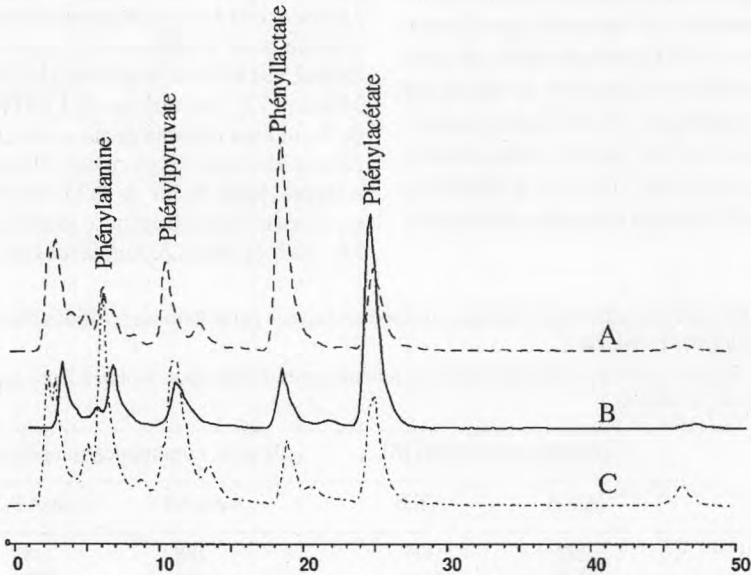


Figure 4. Identification par HPLC des catabolites issus de la phénylalanine en fonction des conditions de réaction : en présence de glucose à pH 8 (A), en absence de glucose à pH 5,5 (B) ou à pH 8 (C).

Figure 4. HPLC identification of phenylalanine catabolites depending on the reaction conditions: with glucose pH 8 (A), without glucose pH 5.5 (B) or pH 8 (C).

logue de la L-2-hydroxyisocaproate déhydrogénase identifiée chez *Lb. confusus*, pourrait également dégrader les cétoacides en hydroxyacides. En effet ces enzymes, qui présentent une forte homologie avec les lactate déhydrogénases, catalysent la réduction réversible de nombreux alpha-cétoacides [2].

En absence de glucose, les cétoacides sont essentiellement dégradés par les cellules de lactocoques en acide, sans formation transitoire d'aldéhyde. De plus, cette dégradation relativement faible à pH 8 est importante à pH 5,5 (figure 4, B, C) en particulier pour les acides aminés aromatiques. Ces résultats suggèrent que cette dégradation est catalysée par une α -cétoacide-déhydrogénase qui généralement est plus active à pH 5,5–6,5 qu'à pH > 7 [4]. Il pourrait s'agir soit de la pyruvate déhydrogénase (PDH) qui aurait une faible activité sur les autres α -cétoacides, comme cela a été décrit pour la PDH de *Bacillus subtilis* [11], soit d'une autre α -cétoacide déhydrogénase plus spécifique des cétoacides provenant des acides aminés. Ainsi, plusieurs α -cétoacides déhydrogénases spécifiques des acides aminés ramifiés ont été identifiés chez différents microorganismes [5] et en particulier chez *Enterococcus faecalis* qui est une bactérie lactique [19].

La pyruvate formate lyase (PFL) qui est l'autre enzyme dégradant le pyruvate en acétate pourrait également participer à cette dégradation à pH supérieur à 7. Mais son action est probablement limitée puisque cette enzyme est irréversiblement inhibée par l'oxygène.

Un certain nombre d'autres produits issus de la dégradation des acides aminés aromatiques ou à chaînes ramifiées ont été obtenus en quantités variables en fonction des conditions de réaction. L'identification de ces composés devrait nous permettre de déterminer les voies de dégradation secondaires des acides aminés par les bactéries lactiques.

3. CONCLUSION

Nos résultats et les données bibliographiques actuelles, nous permettent d'affirmer que les lactocoques ont le potentiel enzymatique nécessaire pour dégrader les acides aminés aromatiques et les acides aminés à chaînes ramifiées en composés volatils. Toutefois, il semble que cette dégradation soit relativement limitée dans les fromages. Après avoir élucidé les différentes voies impliquées dans le catabolisme des acides aminés précurseurs d'arômes chez les lactocoques, il deviendra essentiel de déterminer les facteurs limitant cette dégradation au cours de l'affinage.

RÉFÉRENCES

- [1] Altling A.C., Engels W.J.M., Van Schalkwijk S., Exterkate F.A., Purification and characterization of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 4037–4042.
- [2] Bernard N., Johnsen K., Ferain T., Garmyn D., Hols P., Holbrook J.J., Delcour J., NAD⁺-dependant D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Gene cloning and enzyme characterization, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 439–446.
- [3] Brown A.T., Wittenberger C.L., Fructose-1,6-diphosphate-dependant lactate dehydrogenase from a cariogenic streptococcus: purification and regulatory properties, *J. Bacteriol.* 110 (1972) 604–615.
- [4] Coccagn-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P., Lindley N., Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*, *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (1996) 253–267.
- [5] Dickinson J.R., Dawes I.W., The catabolism of branched-chain amino acids occurs via 2-oxoacid dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* 137 (1992) 2029–2033.
- [6] Engels W.J.M., Altling A.C., Visser S., Conversion of methionine by enzymes from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* B78. poster 32. IDF Symposium on Ripening and Quality of Cheeses, 26–28 février, Besançon, France, 1996.

- [7] Fromentier D., Purification et caractérisation d'une aminotransférase de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NCDO763, Mémoire de D.E.A., 41p, ENSIA-Massy, France, 1995
- [8] Gao S., Oh D.H., Broadbent J.R., Johnson M.E., Weimer B.C., Steele J.L., Aromatic aminoacid catabolism by Lactococci, Lait 3 (1997) 371–381.
- [9] Hemme D., Bouillanne C., Métro F., Desmazeaud M.J., Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening, Sci. Aliments 2 (1982) 113–123.
- [10] Lee C.W., Lucas S., Desmazeaud M.J., Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria, FEMS Microbiol. Lett. 26 (1985) 201–205.
- [11] Lowe P.N., Hogdson J.A., Perham R.N., Dual role of a single multienzyme complex in the oxidative decarboxylation of pyruvate and branched-chain 2-oxo acids in *Bacillus subtilis*, Biochem. J. 215 (1983) 133–140.
- [12] Massey L.K., Sokatch J.R., Conrad R.S., Branched chain amino acid catabolism in bacteria, Bacteriol. Rev. 40 (1976) 42–54.
- [13] Meister A., Reduction of α,γ -diketo and α -keto acids catalyzed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase, J. Biol. Chem. 214 (1949) 117–129.
- [14] Ouvry A., Catabolisme des acides aminés aromatiques chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NCDO763, Mémoire de D.E.A., 36 p, ENSIA-Massy, France, 1996.
- [15] Rijnen L., Thirouin S., Fromentier D., Gripon J.C., Yvon M., Une aminotransférase de *Lactococcus lactis* initie la conversion des acides aminés en composés d'arôme de fromage : purification et caractérisation biochimique et génétique de l'enzyme. Aff. A13, 8^e Colloque du Club des bactéries lactiques, 28–30 mai, Dijon, France, 1997.
- [16] Roudot-Algaron F., Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines : exemples de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines, Lait 76 (1996) 313–348.
- [17] Salles C., Septier C., Roudot-Algaron F., Guillot A., Etiévant P.X., Sensory and chemical analysis of fractions obtained by gel permeation of water-soluble Comté cheese extracts, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 1659–1668.
- [18] Thirouin S., Rijnen L., Gripon J.C., Yvon M., Inventaire des activités de dégradation des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaînes ramifiées chez *Lactococcus lactis*, Aff. M4, 7^e Colloque du Club des bactéries lactiques, 13–15 septembre, Paris, France, 1995.
- [19] Ward D., Ross P., Molecular and transcriptional analysis of an unusual α -keto acid dehydrogenase gene cluster in *Enterococcus faecalis*, poster H3, Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria, 8–12 septembre, Veldhoven, Pays-Bas, 1996.
- [20] Yvon M., Thirouin S., Rijnen L., Fromentier D., Gripon J.C., An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds, Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997) 414–419.