

## Valorisation du potentiel de *Streptococcus thermophilus* par une meilleure connaissance du métabolisme des sucres

Durée : 06/02 - 05/05

### Résumé

La disponibilité de souches bactériennes plus performantes ou possédant des propriétés nouvelles, que ce soit sur le plan nutraceutique ou probiotique, déterminera, dans un avenir rapproché, la compétitivité des produits laitiers fermentés. L'objectif du projet consistait à concevoir par ingénierie génétique une souche de *Streptococcus thermophilus* capable de fermenter le galactose et de produire des quantités plus abondantes d'exopolysaccharides (EPS). L'atteinte de ces objectifs visait à : 1) apporter des pistes de solutions à un problème spécifique de l'industrie laitière qui est celui de l'accumulation de galactose dans différents produits due à la fermentation incomplète du lactose par *Streptococcus thermophilus*; 2) de générer une souche de *Streptococcus thermophilus* produisant des quantités accrues de EPS permettant de hausser la valeur nutraceutique des produits laitiers et d'améliorer leurs propriétés rhéologiques et organoleptiques. Nos résultats indiquent qu'il est possible de transformer des souches de *Streptococcus thermophilus* pour leur permettre de croître sur galactose et de produire plus de EPS. Ces souches transformées continuent cependant de rejeter du galactose au cours d'une croissance sur lactose. Plusieurs pistes d'explication de cette caractéristique indésirable ont été documentées dans le cadre du projet, notamment le transport du lactose chez *Streptococcus thermophilus*, la régulation de la transcription des gènes du lactose et du galactose et la faible activité de la mutarotase, une enzyme nécessaire au métabolisme du galactose. Cette étude a aussi permis de mettre au point une nouvelle technique de dosage des EPS capsulaires.

### Objectifs et méthodologie

L'objectif général était de concevoir par ingénierie génétique une souche de *Streptococcus thermophilus* capable de fermenter le galactose (Gal<sup>+</sup>) et de produire des quantités plus abondantes d'exopolysaccharides (EPS). En tenant compte des résultats obtenus au cours des années antérieures, nous avons proposé une méthodologie basée sur une étude comparative de *Streptococcus thermophilus* avec *Streptococcus salivarius*, une espèce bactérienne apparentée et capable de métaboliser le galactose. Notre approche comportait les objectifs spécifiques suivants:

1. Caractériser les propriétés d'une souche de *Streptococcus thermophilus* Gal<sup>+</sup>
2. Poursuivre l'étude de la régulation du transporteur du lactose (LacS) chez *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus salivarius*

3. Étudier le rôle du régulateur GalR sur la transcription des gènes du galactose et du lactose chez *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus thermophilus*
4. Étudier le rôle de l'enzyme mutarotase (GalM) dans le métabolisme du lactose chez *Streptococcus thermophilus*
5. Introduire le gène de l'enzyme galactokinase (galK) de *Streptococcus salivarius* dans une souche de *Streptococcus thermophilus* capable de produire des EPS et comparer la synthèse des EPS chez la souche mère Gal<sup>+</sup> et le mutant Gal<sup>-</sup>
6. Procéder à une analyse comparative des propriétés fonctionnelles des produits transformés sous l'effet des souches de *Streptococcus thermophilus* EPS<sup>+</sup> et EPS<sup>-</sup> capables ou non d'utiliser le galactose

### Résultats et applications

**Objectif 1.** Nous avons montré que l'incapacité de *Streptococcus thermophilus* à métaboliser le galactose résulte d'une déficience en galactokinase, premier enzyme du métabolisme du galactose. La transformation d'une souche Gal<sup>-</sup> de *Streptococcus thermophilus* (souche SMQ-301) avec un plasmide portant le gène galK (codant pour la galactokinase) de *Streptococcus salivarius* nous a permis d'obtenir une souche de *Streptococcus thermophilus* capable de métaboliser le galactose (Gal<sup>+</sup>) (souche SMQ-301K01). La caractérisation de la souche SMQ-301K01 a démontré les points suivants :

1. La souche SMQ-301K01 est capable de croître sur galactose. Cette nouvelle propriété n'affecte pas la croissance sur lactose
2. La souche SMQ-301K01 (Gal<sup>+</sup>) croît plus rapidement dans du lait et acidifie le milieu plus rapidement que sa parente Gal<sup>-</sup>

3. La souche SMQ-301K01 rejette toujours du galactose lorsqu'elle croît sur du lactose. Le rejet de galactose chez *Streptococcus thermophilus* n'est donc pas dû uniquement à l'absence d'activité galactokinase

**Objectif 2.** Nous nous sommes aussi intéressés à la régulation du transport du lactose chez *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus salivarius*. Le lactose entre dans la cellule via un transporteur nommé LacS dont l'activité est contrôlée par phosphorylation, une modification chimique qui consiste à ajouter une molécule de phosphate à un acide aminé de la protéine LacS. Suite à des travaux menés chez *Streptococcus salivarius* et chez *Streptococcus thermophilus*, nous avons montré que l'incapacité de *Streptococcus thermophilus* à métaboliser le galactose ne serait pas due au contrôle de LacS par phosphorylation.

## Résultats et applications (suite)

**Objectif 3.** Afin de mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes du galactose et du lactose chez *Streptococcus thermophilus*, nous avons étudié le rôle régulateur de la protéine GalR chez *Streptococcus thermophilus* SMQ-301 (Gal). L'inactivation du gène galR n'empêche pas la transcription des gènes du galactose et du lactose ni la croissance sur lactose. Ces résultats indiquent que la protéine GalR n'est pas essentielle à l'expression des gènes du lactose. Bien que l'influence que pourrait avoir cette protéine en regard du rejet de galactose reste à vérifier, il est établi que le mutant GalR<sup>-</sup> ne pousse pas sur galactose.

**Objectif 4.** Nous avons ensuite entrepris une étude visant à déterminer si l'incapacité d'une souche Gal<sup>+</sup> de *Streptococcus thermophilus* à métaboliser le galactose au cours d'une croissance sur lactose ne serait pas due à une faible activité mutarotase. La mutarotase, produit du gène galM, est une enzyme nécessaire à la transformation rapide du  $\beta$ -galactose, issu de l'hydrolyse du lactose par la  $\beta$ -galactosidase, en  $\beta$ -galactose, substrat reconnu par la galactokinase. L'approche méthodologique consistait à étudier le métabolisme du lactose et du galactose chez des souches de *Streptococcus thermophilus* transformées avec un plasmide portant le gène galM de *Streptococcus salivarius*. Les souches étudiées sont: SMQ-301 et les souches transformées Gal<sup>+</sup> issues de SMQ-301 qui produisent des niveaux d'activité galactokinase différents soit SMQ-301K01, SMQ-H2TK, et SMQ-L2TK. Les souches ont été construites et les études de caractérisation sont en cours. Les résultats préliminaires indiquent que l'insertion du gène galM chez les différentes souches de *Streptococcus thermophilus* ne modifie pas significativement leur croissance sur galactose et sur lactose.

**Objectif 5.** En collaboration avec l'équipe du CRDA à St-Hyacinthe, nous avons étudié la synthèse des exopolysaccharides (EPS) chez une souche de *Streptococcus thermophilus* productrice d'EPS capable de croître sur galactose après avoir été transformée avec un plasmide portant le gène de *Streptococcus salivarius* codant pour la galactokinase. La souche transformée a été nommée RD534-S1. Les résultats, à ce jour, démontrent les points suivants :

1. La souche RD534-S1 a acquis la capacité de croître sur galactose.
2. Selon les tests de viscosité effectués, RD534-S1 montre un temps d'écoulement deux fois supérieur à celui de la souche mère, ce qui laisse supposer une synthèse accrue d'EPS.
3. L'acidification du lait est légèrement plus rapide avec RD534-S1 qu'avec la souche mère.
4. Au cours d'une croissance dans du lait, la souche RD534-S1 consomme la même quantité de lactose que la souche mère mais rejette 25% moins de galactose.

L'équipe du CRDA a entrepris un deuxième projet portant sur l'étude de la synthèse des exopolysaccharides capsulaires (CPS) chez une souche capsulaire non filante et Gal<sup>+</sup> de *Streptococcus thermophilus*, la souche MR-AAC, qui a été obtenue après transformation de la souche MR-1C avec un plasmide portant le gène galK de *Streptococcus salivarius*. Ce projet a permis de développer une nouvelle technique de quantification des CPS via l'utilisation d'une lectine. Les résultats suggèrent que la capacité de la souche MR-AAC à croître sur galactose n'affecte pas la synthèse des CPS ni la vitesse d'acidification. De plus, les deux souches rejettent des quantités comparables de galactose au cours d'une croissance sur lactose.

## Transfert des résultats

Plusieurs articles détaillant les résultats obtenus ont déjà été publiés dans des revues scientifiques et plusieurs autres ont été soumis ou sont en rédaction. Une liste exhaustive des publications pourra être obtenue auprès du responsable de projet. Certains résultats du projet ont fait l'objet de présentation au colloque du Centre STELA tenu en mai 2005 à Québec et d'autres présentations à des congrès locaux et internationaux sont prévus. Les souches de *Streptococcus thermophilus* générées au cours de ce projet ne peuvent être utilisées à des fins industrielles puisqu'elles contiennent des gènes de résistance à des

antibiotiques. Cependant, les connaissances acquises permettent d'envisager des avenues permettant de générer des souches utilisables par l'industrie. Les souches générées au cours de ce projet peuvent cependant s'avérer d'excellents outils de recherche pour améliorer nos connaissances du métabolisme du galactose et du lactose chez *Streptococcus thermophilus*. Les partenaires industrielles intéressés à obtenir ces souches peuvent en faire la demande au responsable du projet.

## Partenaires financiers

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies

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

Agriculture et Agroalimentaire Canada

Novalait inc.

**BUDGET TOTAL : 388 500 \$**



2750, rue Einstein, bureau 220-A, Sainte-Foy (Québec) G1P 4R1  
Tél. : (418) 527-7947 • Téléc. : (419) 527-5957  
novalait@novalait.ca

## Point de contact

**Responsable du projet :**  
**Christian Vadeboncoeur**

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

**Collaborateurs :**

**Sylvain Moineau et Michel Frenette**, Université Laval  
**Michel Britten, Daniel St-Gelais et Gilles Robitaille**,  
Agriculture et Agroalimentaire Canada