Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort

I. - Action des entérocoques vis-à-vis des streptocoques lactiques et des leuconostoc

NATURE DES SUBSTANCES STIMULANTES PRODUITES PAR

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens*

par

J. J. DEVOYOD et M. DESMAZEAUD

Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits Animaux
I.N.R.A., Jouy-en-Josas (Yvelines)

avec la collaboration de Dominique SPONEM et C. AURIAULT

INTRODUCTION

Lors d'une étude précédente sur la flore microbienne du fromage de Roquefort, l'un de nous avait constaté que des filtrats de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* sur lait présentaient une action stimulante très nette sur la croissance des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*, sur la production d'acide des streptocoques lactiques et sur la production de gaz des *Leuconostoc*; tandis que des filtrats de culture de ces mêmes entérocoques sur lactosérum ne présentaient aucune action stimulante (Devoyod et Muller, 1969). Dans le présent travail nous avons recherché quelle était la nature des substances stimulantes produites par une souche protéolytique d'entérocoque en comparant l'action stimulante de filtrats de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* à celle des protéolysats obtenus par action directe des enzymes protéolytiques produits par ce micro-organisme sur de la caséine totale.

MATERIEL ET METHODES

1) Souches microbiennes

Toutes les souches microbiennes utilisées au cours de cette étude ont été isolées du fromage de Roquefort. Les caractéristiques

de ces souches ont fait l'objet de travaux antérieurs (Devoyod et Muller, 1969 ; Devoyod, 1969).

- a) ENTÉROCOQUE : *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 354.
- b) STREPTOCOQUES LACTIQUES : *Streptococcus lactis* 272 et 733. *Streptococcus cremoris* 2923 et 311.
- c) LEUCONOSTOC : *Leuconostoc mesenteroides* 471. *Leuconostoc lactis* 6.

2) Mesure de l'activité stimulante

L'activité stimulante des substances isolées des filtrats de culture d'entérocoque sur lait ou des protéolysats de caséine totale était appréciée soit par la mesure de la croissance des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc* sur lactosérum, soit par la mesure de la production d'acide des streptocoques lactiques sur lait autoclavé (20 mn à 118° C), soit par la production de gaz des *Leuconostoc* sur lait autoclavé ou chauffé à 142° C pendant 10 s (appareil Laguillharre décrit par Hermier et *al.*, 1959).

a) MESURE DE LA CROISSANCE PAR PHOTOMÉTRIE

La croissance des souches de streptocoques lactiques et des *Leuconostoc* était étudiée à l'aide d'un biophotomètre enregistreur Bonnet-Maury et Jouan. Le milieu de culture utilisé était un lactosérum obtenu par action de la présure sur du lait reconstitué (100 g de lait en poudre écrémé Spray pour 1 000 ml d'eau désionisée).

Ce lactosérum était stérilisé par filtration sur filtre Seitz EKS.

b) PRODUCTION D'ACIDE PAR LES STREPTOCOQUES LACTIQUES

L'acidification des bactéries lactiques était suivie à différents intervalles de temps par titration par de la soude N/10 de l'acidité produite par les cultures sur lait reconstitué autoclavé.

On suivait d'autre part, à l'aide d'un pH-mètre enregistreur Metrohm E. 361, l'acidification des cultures de bactéries lactiques sur lait autoclavé avec et sans addition des différentes substances isolées à essayer.

c) PRODUCTION DE GAZ PAR LES LEUCONOSTOC

— Préparation des cultures

500 ml de milieu MRS (De Man et *al.*, 1960) étaientensemencés avec 1 ml d'une culture de 48 h à 22° C de *Leuconostoc* sur ce même milieu. Après 48 h d'incubation à 22° C, les cultures étaient centrifugées, lavées avec une solution stérile de Ringer au 1/4, centrifugées à nouveau puis mises en suspension dans 10 ml de solution stérile de Ringer au 1/4. La teneur en micro-organismes de ces suspensions était appréciée par dénombrement sur le milieu décrit par Mayeux et *al.* (1962).

— *Mesure de la production de gaz par la méthode des fioles jaugées graduées* (Holmes et al., 1968).

Cette méthode consiste à cultiver les micro-organismes dans une fiole jaugée graduée de 100 à 110 ml. 100 ml de lait autoclavé (20 mn à 118° C),ensemencés, additionnés ou non des différentes substances à essayer, étaient versés dans les fioles et un bouchon de Vaspar était coulé à la surface. Le mélange Vaspar est constitué de 50 g de vaseline, de 2 g de gélose, de 1 ml de Tween 80 et de 50 ml d'eau distillée. Lors de l'incubation, s'il y a production de gaz, le bouchon est soulevé et l'on peut mesurer la quantité de gaz produite dans la partie graduée du col de la fiole.

— *Mesure de la production de CO₂ par la méthode manométrique*

La mesure de la production de CO₂ a été effectuée au respiromètre différentiel Gilson G 14 en utilisant la méthode manométrique directe de Umbreit et al. (1964). Toutes les expériences ont été effectuées à 30° C.

3) Préparation d'un filtrat de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur lait

Str. faecalis var. *liquefaciens* 354 était cultivé pendant 16 h à 37° C à pH constant (6,8) sur lait écrémé reconstitué autoclavé (20 mn à 118° C). La régulation du pH était obtenue par addition automatique de la solution neutralisante (NaOH 5N), avec agitation, à l'aide d'un pH-mètre régulateur enregistreur Metrohm modèle E. 361, selon une technique utilisée antérieurement pour les streptocoques lactiques (Bergère et Hermier, 1968). Après incubation, la culture était filtrée sur filtre Durieux n° 127, puis chauffée à 80° C pendant 30 mn et stérilisée par filtration sur filtre Seitz EKS. Le filtrat était conservé à + 4° C.

4) Préparation d'un hydrolysate enzymatique de caséine totale

— *Préparation de l'extrait enzymatique*

1 500 ml de filtrat de culture sur lait à pH 6,8 étaient centrifugés à 9 000 g pendant 30 mn afin d'éliminer les cellules bactériennes. Les enzymes protéolytiques étaient ensuite précipités par le sulfate d'ammonium : on effectuait une dialyse à 4° C contre une solution sursaturée de sulfate d'ammonium dont la quantité était calculée de façon à obtenir une concentration égale à 75 p. 100 de la saturation une fois l'équilibre des concentrations réalisé. Lorsque tout le sulfate d'ammonium était dissous, le pH de la solution extérieure était amené à 6,8 par addition de NH₄OH 6 N ; la dialyse était effectuée pendant 24 h. Le précipité obtenu était recueilli après centrifugation à 30 000 g pendant 1 h à 4° C. Il était dissous dans 100 ml de tampon Tris-acide maléique 0,05 M à pH 7,0. On effectuait alors une dialyse pendant 48 h à 4° C contre ce même tampon avec quatre changements de

tampon afin d'éliminer le sulfate d'ammonium restant. L'extrait enzymatique ainsi obtenu représentait 70 p. 100 de l'activité protéolytique du surnageant de culture mesurée selon la méthode décrite par Kunitz (1947).

— *Condition d'hydrolyse de la caséine totale*

2 g de caséine totale Hammarsten (N.B.C.) étaient mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Le pH était ajusté à 7,5 par addition de soude N. On ajoutait du butanol comme conservateur (concentration finale 4 p. 1000). Après addition de 1 ml de la solution d'enzymes protéolytiques, la protéolyse était effectuée à 22° C pendant 22 h. L'hydrolyse était contrôlée par mesure de l'absorption à 275 m μ sur le filtrat trichloracétique (Kunitz, 1947).

— *Préparation des hydrolysats de caséine totale*

Au temps d'hydrolyse étudié, 5 ml de mélange réactionnel étaient prélevés. On ajoutait goutte-à-goutte 0,5 ml d'acide acétique 2M pour arrêter la protéolyse et précipiter la caséine non hydrolysée. Après 4 h de contact à 22° C, le précipité était éliminé par centrifugation à 30 000 g pendant 20 mn. Le surnageant était desséché sous vide à 42° C, lavé à l'eau distillée stérile puis redesséché sous vide ; l'opération était répétée deux fois. Les hydrolysats ainsi obtenus étaient conservés à 4° C.

5) Séparation des substances stimulantes par filtration sur gel

On déposait 5 à 10 ml de filtrat de culture ou de protéolysat au sommet de la colonne (chargée en Biogel P-6, 100-200 mesh) puis on éluait avec de l'acide acétique 0,2 M. Les fractions étaient recueillies au moyen d'un collecteur de fraction GME et analysées par mesure de l'absorption à 280 et 254 m μ à l'Elugraph Seive et par coloration à la ninhydrine selon Moore et Stein (1954) sur 0,1 ml d'éluat. La quantité de tryptophane était appréciée de façon semi-quantitative par la méthode de Feigl (1956). Le contenu des tubes qui correspondaient aux pics d'absorption était desséché sous vide à 42° C, lavé à l'eau distillée stérile puis desséché à nouveau. Les résidus ainsi obtenus étaient conservés à 4° C. Pour mesurer l'activité stimulante, les résidus des différentes fractions étaient dissous dans 5 à 10 ml d'eau distillée stérile.

6) Autres préparations essayées

a) FILTRATS OBTENUS APRÈS ACTION D'EXTRAIT ENZYMATIQUE SUR LAIT

1 ml de solution d'extrait enzymatique de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* était ajouté à 100 ml de lait reconstitué autoclavé et de lait de grand mélange écrémé, soit cru, soit chauffé à 142° C pendant 10 s. Les méthodes d'obtention de ces « hydrolysats » étaient les mêmes que celles utilisées pour la préparation d'un hydrolysat enzymatique

de caséine totale. Ces hydrolysats ont été également chromatographiés sur Biogel P-6.

b) HYDROLYSAT ACIDE DE CASÉINE

Une solution à 10 p. 100 d'hydrolysat de caséine totale (N.B.C.), stérilisée par filtration sur filtre Seitz EKS, a été utilisée. Afin de nous assurer que cette solution ne contenait que les acides aminés constitutifs de la caséine (à l'exception du tryptophane), nous avons effectué une chromatographie bi-dimensionnelle sur papier. Le premier solvant était le mélange Butanol - Acide acétique - Eau (4:1:5) (v/v) et le deuxième solvant était le mélange Méthyléthylcétone - Butanol - NH_4OH 17N - Eau (3:5:1:1) (v/v).

fig. 1

Courbe d'élution d'un filtrat de culture de
Streptococcus faecalis var. *liquefaciens* 354 sur lait

Colonne : $\varnothing$ 25 mm, h 1400 mm.

Biogel P-6.

Eluant CH_3COOH 0,2 M, pH 3.

Charge : 10 ml de filtrat concentré 3 fois.

Fractions : 5,8 ml.

Lecture à 570 $\text{m}\mu$ (après coloration à la ninhydrine selon Moore et Stein, 1954).

RESULTATS

1) Caractérisation des substances stimulantes d'un filtrat de culture

La figure 1 montre la courbe d'élution obtenue après filtration sur gel du filtrat de culture sur lait autoclavé de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 354. On observe 5 pics d'absorption. Le pic P 1 correspond à la zone d'élution des substances de poids moléculaire compris entre 1 500 et 2 000 ; le pic P 2 contient des substances de poids moléculaire inférieur à 1 000 et le pic P 3 correspond à la zone d'élution des substances de poids moléculaire compris entre 300 et 600. Quant aux pics P 4 et P 5 dont le volume d'élution est supérieur au volume total de la colonne, ils contiennent des peptides riches en acides aminés aromatiques (nette absorption à 280 m μ et forte coloration en présence de p-diméthylbenzaldéhyde), ce qui explique leur comportement anormal vis-à-vis de la chromatographie sur gel.

a) ACTION SUR LA CROISSANCE SUR LACTOSERUM

La croissance des streptocoques lactiques sur lactosérum était stimulée par les substances contenues dans les fractions correspondant aux pics P 1 et P 3 ; en effet, en présence de ces substances le taux de croissance des cultures était plus élevé que dans le cas des cultures témoins. Ainsi, dans le cas de *Str. lactis* 733, par exemple, lorsqu'on ajoutait au lactosérum les substances des pics P 1 et P 3 (0,03 p. 100 de concentration finale), les valeurs du taux de croissance étaient respectivement de 2 fois et de 1 fois 3/4 supérieures au taux de croissance de *Str. lactis* 733 seul.

Ces substances présentaient également une action stimulante vis-à-vis de la croissance des *Leuconostoc*. Ainsi, par addition des substances des pics P 1 et P 3 (0,03 p. 100 concentration finale), le taux de croissance de *L. lactis* 6 était augmenté respectivement de 2 fois 1/2 et de 2 fois. Les *Leuconostoc* étaient aussi stimulés par les fractions, riches en acides aminés aromatiques, correspondant au pic P 5. Cette stimulation était un peu inférieure à celle constatée avec les substances du pic P 3. Nous avons ajouté au lactosérum de la tyrosine et du tryptophane, seul ce dernier acide aminé présentait une action stimulante sur le taux de croissance des cultures des *Leuconostoc* sur lactosérum.

b) ACTION SUR LA PRODUCTION D'ACIDE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES SUR LAIT AUTOCLAVÉ

En suivant les variations de pH des cultures de bactéries lactiques avec et sans addition des substances contenues dans les fractions correspondant aux différents pics d'absorption, nous avons constaté que seules les fractions des pics P 1 et P 3 stimulaient la

production d'acide des streptocoques lactiques. Ainsi, dans le cas de *Str. lactis* 272, par exemple, après 30 h d'incubation à 30° C, la différence de pH entre les cultures de *Str. lactis* seul et les cultures de *Str. lactis* additionnées avec les substances des pics P 1 et P 3 (0,01 concentration finale) était respectivement de 0,8 et 0,5 unité.

TABLEAU 1

Action sur la production de CO₂ des *Leuconostoc* des différentes fractions d'un filtrat de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 345 sur lait (Les résultats sont donnés en p. 100 de la production de CO₂ des *Leuconostoc* seuls après 3 h à 30° C)

Fractions correspondant aux pics d'absorption	<i>L. lactis</i> 6 30×10 ⁹ cellules	<i>L. mesenteroides</i> 471 30×10 ⁹ cellules
P 1	+ 46	+ 38
P 2	+ 32	+ 25
P 3	+ 20	+ 22
P 4	— 13	— 7
P 5	0	+ 2
Hydrolysate acide de caséine	+ 23	+ 24
Quantité de substances ajoutées : 0,06 p. 100 (concentration finale)		

La stimulation obtenue par addition d'hydrolysate acide de caséine était voisine de celle obtenue avec les substances du pic P 3. Par contre la tyrosine et le tryptophane n'avaient aucune action, ni stimulante, ni inhibitrice.

c) ACTION SUR LA PRODUCTION DE CO₂ PAR LES LEUCONOSTOC

La figure 2 montre les courbes de production de CO₂ sur lait autoclavé de *L. lactis* 6 avec ou sans addition des fractions séparées par chromatographie, à partir du même filtrat de culture. Le fait que la production de CO₂ soit linéaire en fonction du temps montre qu'aucune multiplication sensible des *Leuconostoc* n'a eu lieu au cours de l'expérience. Nous constatons que les substances contenues dans les fractions correspondant aux pics P 1, P 2 et P 3, ainsi que l'hydrolysate acide de caséine, stimulent la production de CO₂ de *L. lactis*. Par contre les substances du pic P 4 inhibent cette production de gaz. Des résultats identiques ont été obtenus en utilisant du lait chauffé à 142° C pendant 10 s comme substrat.

fig. 2

Action sur la production de CO_2 de *Leuconostoc lactis* 6 des différentes substances, séparées par chromatographie, d'un filtrat de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 354 sur lait. Quantité de cellules : 30×10^6 .

Température : 30°C .

Substrat : lait reconstitué autoclavé.

- — ■ *L. lactis* 6 seul.
- ▲ — ▲ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 1.
- ▼ — ▼ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 2.
- — □ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 3.
- — ○ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 4.
- — ■ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 5 (confondue avec courbe témoin).
- — ● *L. lactis* 6 + 3 p. 100 hydrolysate acide de caséine.

Dans le tableau 1, nous avons porté les productions de CO_2 des *Leuconostoc* exprimées en p. 100 de la quantité de CO_2 dégagée par les *Leuconostoc* seuls, en l'absence de toute substance ajoutée. Ces résultats confirment ceux de la figure 2. Par contre, dans le cas de *L. mesenteroides* 471, on constate que l'effet inhibiteur des substances du pic P 4 est très faible; la diminution de 7 p. 100 de la production de gaz ne pouvant être considérée comme significative.

Les hydrolysats obtenus par action de HCl 6N (à 120°C pendant 24 h, en tubes scellés, sous vide) sur les substances des pics P 1 et P 3 stimulaient la production de gaz des *Leuconostoc*.

2) Caractérisation des substances stimulantes de l'hydrolysat enzymatique de caséine totale

L'hydrolysat enzymatique de caséine totale a été séparé en plusieurs fractions par chromatographie sur gel. La figure 3 montre la

fig. 3

Courbe d'élution d'un hydrolysat de caséine totale par les enzymes protéolytiques de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 354

Colonne : $\varnothing$ 25 mm, h 1400 mm.

Biogel P-6.

Eluant : CH_3COOH 0,2 M, pH 3.

Charge : 5 ml d'hydrolysat concentré 6 fois.

Fractions : 5,4 ml.

Lecture à 570 $\text{m}\mu$ (après coloration à la ninhydrine selon Moore et Stein, 1954).

courbe d'élution de cet hydrolysate. On observe 5 pics d'absorption. Ces pics contiennent des substances de même poids moléculaire que les pics du filtrat de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur lait (2 000-1 500, inférieurs à 1 000, 600-300 et peptides riches en acides aminés aromatiques).

a) ACTION SUR LA CROISSANCE SUR LACTOSÉRUM

La croissance des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc* sur lactosérum était stimulée par les substances contenues dans les fractions correspondant aux pics P 1 et P 3. Les *Leuconostoc* étaient de plus stimulés par les substances riches en tryptophane du pic P 5.

b) ACTION SUR LA PRODUCTION D'ACIDE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES

Les substances des pics P 1 et P 3 stimulaient la production d'acide des streptocoques lactiques. Ainsi, par exemple, après 30 h d'incubation à 30° C, nous constatons une différence de pH respectivement de 0,9 et 0,5 unité entre la culture de *Str. lactis* 272 seule et les cultures de ce même micro-organisme additionnées des substances des pics P 1 et P 3 (0,01 concentration finale).

c) ACTION SUR LA PRODUCTION DE CO₂ PAR LES LEUCONOSTOC

Nous avons porté dans la figure 4 les courbes de production de CO₂ de *L. lactis* 6 sur lait autoclavé avec ou sans addition des fractions séparées par chromatographie de l'hydrolysate de caséine totale. Nous voyons que les substances des pics P 1 et P 3 sont stimulantes tandis que celles du pic P 4 inhibent la production de gaz.

Dans le tableau 2, nous avons porté les productions de CO₂ des *Leuconostoc* sur lait autoclavé (exprimées en p. 100 de la quantité

TABLEAU 2

Action sur la production de CO₂ des *Leuconostoc* des différentes fractions d'un hydrolysate de caséine totale par les enzymes protéolytiques de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 354

(Les résultats sont donnés en p. 100 de la production de CO₂ des *Leuconostoc* seuls après 3 h. à 30° C)

Fractions correspondant aux pics d'absorption	<i>L. Lactis</i> 6 25×10 ⁹ cellules	<i>L. mesenteroides</i> 471 12×10 ⁹ cellules
P 1	+ 56	+ 35
P 2	+ 7	+ 15
P 3	+ 24	+ 21
P 4	— 21	— 2
P 5	0	+ 3
Hydrolysate acide de caséine	+ 30	+ 22

Quantité de substances ajoutées : 0,06 p. 100 (concentration finale)

fig. 4

Action sur la production de CO_2 de *Leuconostoc lactis* 6 des différentes substances, séparées par chromatographie, d'un hydrolysate de caséine totale par les enzymes protéolytiques de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 354

Quantité de cellules : 25×10^9 .

Température : 30°C .

Substrat : lait reconstitué autoclavé.

■ — ■ *L. lactis* 6 seul.

▲ — ▲ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 1.

▼ — ▼ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 2.

□ — □ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 3.

○ — ○ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 4.

■ — ■ *L. lactis* 6 + 3 p. 100 substances pic P 5 (confondue avec courbe témoin).

● — ● *L. lactis* 6 + 3 p. 100 hydrolysate acide de caséine.

de CO₂ dégagée par les *Leuconostoc* seuls) additionné des substances des différentes fractions. Ces résultats montrent que les substances des pics P 1 et P 3 ont une action stimulante sur la production de gaz des *Leuconostoc*, tandis que les substances du pic P 2 ne stimulent que *L. mesenteroides* 471.

DISCUSSION

Si l'on compare la courbe d'élution du filtrat de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur lait reconstitué, écrémé, autoclavé (fig. 1) à celle de l'hydrolysate de caséine totale par les enzymes protéolytiques de ce même micro-organisme (fig. 3), on constate une grande similitude tant dans le nombre que dans les positions respectives des pics d'absorption. La même similitude existe dans les courbes d'élution des hydrolysats enzymatiques de lait écrémé reconstitué autoclavé et de lait de grand mélange, écrémé, cru ou chauffé à 142° C pendant 10 s. Ces résultats semblent montrer que l'extrait enzymatique de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* est particulièrement actif vis-à-vis de la fraction caséine du lait.

Plusieurs auteurs ont montré que l'activité des bactéries lactiques augmentait lorsqu'elles étaient cultivées dans un lait où s'étaient développés des micro-organismes doués de propriétés protéolytiques tels que *Bacillus subtilis* (Rice, 1949), *Escherichia coli* (Hall, 1956), *Pseudomonas fluorescens* (Claydon et Koburger, 1961), *Streptococcus liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus ammoniae* (Peppler, 1942). Nurmikko (1953) a montré que *Str. faecalis* avait une action stimulante vis-à-vis de certains lactobacilles. Nos résultats montrent que les substances stimulantes produites par *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sont de nature peptidique. Le fait que ces substances sont obtenues par action des enzymes protéolytiques sur la caséine totale et qu'une culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur lactosérum ne présente aucune action stimulante montre que les substances stimulantes proviennent bien de la dégradation des caséines par les enzymes protéolytiques de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* (à l'exception des glycopeptides libérés par la présure et que l'on retrouve dans le lactosérum). Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Somkuti et Babel (1969). Ces auteurs ont montré en effet que la protéinase d'une souche de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* était surtout active vis-à-vis des caséines.

Il est bien connu que l'action sur les streptocoques lactiques des substances stimulantes ajoutées au lait est bien plus marquée vis-à-vis des cultures « lentes » que vis-à-vis des cultures « bonnes acidifiantes » (Anderson et Elliker, 1953 ; Garvie et Mabbitt, 1956, Speck et al., 1958 ; Speck, 1962). Or nous avons constaté que les souches de streptocoques lactiques isolées du lait de brebis servant à la fabrication du fromage de Roquefort appartenaient plutôt au

type « lent » (Devoyod et Muller, 1969). C'est vraisemblablement la raison pour laquelle ces streptocoques sont plus sensibles à l'action des substances produites par les cultures de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur lait que ne le sont des souches de streptocoques très acidifiantes. Ainsi avec *Str. lactis* C 10, les différences de pH entre les cultures additionnées des substances stimulantes et les cultures témoins ne dépassaient pas dans les meilleurs cas 0,15 unité pH. Des résultats identiques ont été obtenus avec d'autres souches très acidifiantes de streptocoques lactiques (Devoyod, 1969 : résultats non publiés).

D'après Fox (1961), les peptides obtenus par digestion enzymatique de la caséine stimulent la synthèse des protéines chez les streptocoques. De plus McLeod et Gordon (1961) estiment que ces peptides agissent comme source d'acides aminés essentiels. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse ; puisque nous avons constaté en effet qu'un hydrolysate acide de caséine, hydrolysate contenant tous les acides aminés constitutifs de la caséine, à l'exception du tryptophane, augmentait l'activité des streptocoques lactiques essayés.

Comme pour les streptocoques lactiques, l'effet stimulant de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur la croissance des *Leuconostoc* sur lactosérum a pour origine la présence de substances de nature peptidique produite par l'hydrolyse des caséines du lait par les enzymes protéolytiques de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Cependant, à l'inverse de ce que l'on constate pour les streptocoques mésophiles, le phénomène d'activation chez les *Leuconostoc* est moins spécifique puisque les peptides stimulants se répartissent en trois classes très différentes. Nos résultats ont montré en effet que ces peptides stimulants correspondent à des substances de poids moléculaires de 1 500-2 000, de 300-600 et de substances riches en acides aminés aromatiques en particulier de tryptophane. Notons que ces dernières substances n'ont aucune action vis-à-vis de *Str. lactis* et de *Str. cremoris*. Nos résultats ont montré que les peptides stimulants se situaient dans différentes classes, des résultats semblables ont été obtenus lors de l'étude de la stimulation de *Str. thermophilus* par *Micrococcus caseolyticus* (Desmazeaud et Devoyod, 1970). Nos connaissances actuelles ne nous permettent pas de savoir s'il existe réellement une relation entre certaines tailles de peptides et leur pouvoir stimulant. Il semblerait qu'il y ait là une voie de recherche intéressante pour mieux comprendre les phénomènes de stimulation que l'on rencontre fréquemment entre différentes espèces microbiennes.

Quant au phénomène de stimulation de la production de gaz chez les *Leuconostoc* il est beaucoup plus difficile à interpréter car il est influencé à la fois par la nature des substances stimulantes et par les différences existant entre les espèces de *Leuconostoc*. En effet la stimulation de la production de CO₂ chez *L. lactis*, comme chez *L. mesenteroides* est due à des substances de nature peptidique provenant de l'hydrolyse de la caséine par les enzymes protéolytiques

de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Pour ces deux espèces, ces substances stimulantes correspondent à des peptides de poids moléculaires de 1 500-2 000 et de 300-600. Pour *L. mesenteroides* des peptides de poids moléculaire d'environ 1 000 ont aussi une action stimulante tandis que dans le cas de *L. lactis*, des substances ne provenant pas de l'hydrolyse enzymatique de la caséine totale, substances qui se comportent en chromatographie sur gel comme des substances de poids moléculaire de 1 000 environ, stimulent aussi la production de CO₂.

Le fait qu'un hydrolysate acide des substances contenues dans les fractions stimulantes, de même qu'un hydrolysate acide de caséine, stimulent la production de gaz des *Leuconostoc* permet de penser que, comme dans le cas des streptocoques lactiques, les peptides provenant de la dégradation de la caséine par *Str. faecalis* var. *liquefaciens* agissent comme sources d'acides aminés essentiels. Virtanen et Nurmikko (1951) ont montré en effet que des dipeptides de la glycine avaient une action stimulante, comme la glycine, sur la croissance de *L. mesenteroides*. Il est bien connu que les acides aminés jouent un rôle important dans les besoins nutritifs des *Leuconostoc* (Carlson et Rosano, 1951 ; Prouty, 1961 ; Garvie, 1967) et que ces besoins sont variables avec les espèces et même avec les souches.

Il n'est pas interdit de penser que dans la fabrication du fromage de Roquefort les entérocoques appartenant à l'espèce *Str. faecalis* var. *liquefaciens* jouent un rôle important vis-à-vis des *Leuconostoc*. Les produits de dégradation de la caséine stimulent la croissance des *Leuconostoc*, permettant ainsi à ces micro-organismes d'atteindre dans le lait une concentration en cellules de 10⁸/ml, concentration en-dessous de laquelle aucune production de gaz n'est décelable (Holmes et al., 1968 ; Devoyod et Muller, 1969). Les produits de dégradation de la caséine par les enzymes protéolytiques de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* stimulent de plus la production de CO₂ par les *Leuconostoc*.

Remerciements

Nous remercions vivement M. Valles pour la préparation d'une culture neutralisée d'entérocoques et M. Cerf pour la préparation du lait stérilisé à ultra-haute température.

Nos remerciements vont également à MM. Auclair et Hermier pour leurs suggestions et leurs critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans l'élaboration et la présentation de ce travail.

Résumé

Nous avons recherché, dans un filtrat de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* sur lait, la nature de substances stimulantes vis-à-vis des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*.

Nous avons comparé l'effet stimulant de ce filtrat sur la croissance des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc* sur lactosérum, sur la production d'acide des streptocoques lactiques sur lait et sur la production de CO₂ des *Leuconostoc* sur lait, à celui d'un protéolysat obtenu par action directe des enzymes protéolytiques de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur de la caséine totale.

Les substances stimulantes ont été fractionnées par chromatographie sur gel en plusieurs classes de poids moléculaires différents. Ces substances sont de nature peptidique et proviennent principalement de la protéolyse de la caséine totale par les enzymes protéolytiques de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*.

Summary

Microbial associations in Roquefort cheese

I. - Action of enterococci on lactic streptococci and Leuconostoc

Filtrates of milk cultures of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* contain stimulatory substances for lactic streptococci and *Leuconostoc*. These substances increase the growth rate of these microorganisms in whey, they increase also the acid production by lactic streptococci in milk and the CO₂ production by *Leuconostoc* in milk.

In order to investigate the nature of the stimulatory substances, we compared a filtrate of a milk culture of *Str. faecalis* var. *liquefaciens* with proteolysates obtained by the direct action of proteolytic enzymes of this organism on whole casein.

Stimulatory substances were fractionated by gel chromatography. These substances are peptides and derive mainly from the proteolysis of whole casein by proteolytic enzymes of *Str. faecalis* var. *liquefaciens*.

Références bibliographiques

- [1] ANDERSON (A.W.) et ELLIKER (P.R.) (1953). — The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. II. A stimulatory factor required for rapid growth of some strains in reconstituted non fat milk solids. *J. Dairy Sci.*, 36, p. 608.
- [2] ANDERSON (A.W.), PARKER (R.B.) et ELLIKER (P.R.) (1955). — The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. III. Variation in growth-promoting properties of fresh whole milks. *J. Dairy Sci.*, 38, p. 1083.
- [3] Mc ANELLY (J.K.) et SPECK (N.L.) (1956). — The response of lactic acid bacteria to stimulants present in pancreas tissue. *J. Dairy Sci.*, 39, p. 914.
- [4] BERGERE (J.L.) et HERMIER (J.) (1968). — La production massive de cellules de streptocoques lactiques. II. Croissance de *Streptococcus lactis* dans un milieu à pH constant. *Le Lait*, 471-472, p. 13.

- [5] CARLSON (V.W.) et ROSANO (C.L.) (1951). — The nutritional requirements of *Leuconostoc dextranicum* for growth and dextran synthesis. *J. Bact.*, 62, p. 583.
- [6] CLAYDON (T.J.) et KOBURGER (J.A.) (1961). — Stimulation of lactic starter cultures by filtrates from milk cultures of *Pseudomonas fluorescens*. *J. appl. Microbiol.*, 9, p. 117.
- [7] DESMAZEAUD (M.) et DEVOYOD (J.J.) (1970). — Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques thermophiles. Mise en évidence de la nature peptidique des substances stimulantes. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, vol. 3.
- [8] DEVOYOD (J.J.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques. *Le Lait*, 489-490, p. 637.
- [9] DEVOYOD (J.J.) et MULLER (M.) (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*. Influence de différents micro-organismes de contamination. *Le Lait*, 487, p. 369.
- [10] FEIGL (F.) (1956). — Spot test in organic analysis. 5th ed. *Elsevier Publishing Co*, p. 278.
- [11] FOX (E.N.) (1961). — Peptide requirements for the synthesis of streptococcal proteins. *J. Biol. Chem.*, 236, p. 166.
- [12] GARVIE (E.I.) (1967). — The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J. gen. Microbiol.*, 48, p. 439.
- [13] GARVIE (E.I.) et MABBITT (L.A.) (1956). Acid production in milk by starter cultures. The effect of peptone and other stimulatory substances. *J. Dairy Res.*, 23, p. 305.
- [14] HALL (N.J.) (1956). — Influence of *Bacterium coli* on starter production. *Proc. Intern. Dairy Congr. Rome*, 2, p. 221.
- [15] HERMIER (J.), VERGE J. et GROSCLAUDE (G.) (1959). Détermination de la durée de chauffage dans un appareil de stérilisation du lait à très haute température. *Le Lait*, 39, p. 20.
- [16] HOLMES (B.), SANDINE (W.E.) et ELLIKER (P.R.) (1968). — Some factors influencing carbon dioxide production by *Leuconostoc citrovorum*. *Appl. Microbiol.*, 16, p. 56.
- [17] KUNITZ (M.) (1947). — Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. gen. Physiol.*, 30, p. 291.
- [18] Mc LEOD (P.) et GORDON (D.F.) (1961). — Peptides as sources of essential amino acids for lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 44, p. 237.
- [19] DE MAN (J.C.), ROGOSA (M.) et SHARPE (E.) (1960). — A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. appl. Bact.*, 23, p. 130.
- [20] MAYEUX (J.V.), SANDINE (W.E.) et ELLIKER (P.R.) (1962). — A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45, p. 655.
- [21] MOORE (S.) et STEIN (W.H.) (1954). — A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211, p. 907.
- [22] NURMIKKO (V.) (1953). — Factors affecting the growth of lactic acid bacteria in association. *Int. Dairy Congr.*, 3, p. 1154.
- [23] PROUTY (C.C.) (1961). — Amino-acid requirements of *Leuconostoc citrovorum* and *Leuconostoc dextranicum* isolated from dairy starters and cultured milk products. *J. Dairy Sci.*, 44, p. 2100.
- [24] RICE (E.B.) (1949). — Studies on starters. VI. Further observations on associative growth of lactic streptococci with other bacteria. *Dairy Ind.*, 14, p. 498.

- [25] SANDINE (W.E.), SPECK (M.L.) et AURAND (L.W.) (1956). — Identification of constituent amino acids in a peptide stimulatory for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 39, p. 1532.
- [26] SOMKUTI (G.A.) et BABEL (F.J.) (1969). — Hydrolytic breakdown of casein by a proteinase of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *J. Dairy Sci.*, 52, p. 1186.
- [27] SPECK (M.L.), Mc ANELLY (I.K.) et WILBUR (J.D.) (1958). — Variability in response of lactic streptococci to stimulants in extracts of pancreas, liver and yeast. *J. Dairy Sci.*, 41, p. 502.
- [28] SPECK (M.L.) (1962). — Symposium on lactic starter cultures. IV. Starter culture growth and action in milk. *J. Dairy Sci.*, 45, p. 1281.
- [29] UMBREIT (W.W.), BURRIS (R.H.) et STAUFFER (J.F.) (1964). — Manometric techniques 4th ed. *Burgess Publishing Co.*, Minneapolis.
- [30] VIRTANEN (A.I.) et NURMIKKO (V.) (1951). — On the mode of action of peptides as growth factors for *Leuconostoc mesenteroides*. *Acta Chem. Scand.*, 5, p. 681.

Reçu pour publication le 24 mars 1970.