Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort

III. Action des entérocoques et des levures fermentant le lactose vis-à-vis des lactobacilles

par

J. J. DEVOYOD et M. DESMAZEAUD

Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits Animaux
IN.R.A. (78) Jouy-en-Josas

(avec la collaboration de Dominique MELCION, Christiane DEGAS
et C. AURIAULT)

Introduction

Au cours des premières étapes de la fabrication du fromage de Roquefort, les lactobacilles présents dans le lait en flore sous dominante se multiplient jusqu'au salage du fromage ; la majorité des souches que l'on isole en début de fabrication appartiennent à l'espèce *Lactobacillus casei* (Devoyod, 1970). On sait que cette espèce est exigeante sur le plan nutritionnel ; sa croissance est favorisée, en particulier, par les vitamines du groupe B (Sharpe, 1962), et par des peptides (« strépogénines ») provenant de l'hydrolysate de protéines (Woolley, 1946 et 1948 ; Baudet et Cherbuliez, 1960). Pour que *L. casei* se développe dans le fromage il faut qu'il y trouve les substances, soit azotées, soit de type vitaminique, indispensables à son développement. Ces substances peuvent provenir du lait lui-même ou du métabolisme microbien. Bien que le lait contienne plusieurs vitamines du groupe B, il est pauvre en acide folique et en ses dérivés (Causeret et al., 1970). On sait aussi que le lait ne contient que peu de peptides et d'acides aminés libres.

Or, les entérocoques, par l'intermédiaire de leur système protéolytique, libèrent des peptides à partir de la caséine (Devoyod et Desmazeaud, 1970). D'autre part les levures fermentant le lactose produisent des vitamines et plus particulièrement des vitamines du groupe B (Wasserman, 1961). On peut donc supposer que les entérocoques et les levures apportent aux lactobacilles les peptides et vitamines indispensables à leur développement. Le présent travail avait pour objectif de vérifier cette hypothèse et de rechercher dans

quelle mesure les entérocoques et les levures, nombreux au cours des premiers stades de la fabrication, stimulent la croissance des lactobacilles.

L'influence stimulante d'un micro-organisme sur un autre peut se manifester soit par une action sur la croissance (croissance plus rapide, maximum de croissance plus élevé), soit par une action sur le métabolisme (augmentation de la quantité d'acide produite ou de celle des substances aromatiques). Nous avons étudié ces différents aspects d'une part en observant l'évolution des cultures de lactobacilles en association avec les entérocoques et les levures et en étudiant d'autre part l'action des filtrats de culture de ces micro-organismes (sur lait et sur lactosérum) vis-à-vis de *L. casei*. Les substances stimulantes produites par les entérocoques ont été isolées et nous les avons comparées aux substances contenues dans un hydrolysât enzymatique de caséine entière obtenu par action de la protéase de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*.

Matériel et méthodes

I. — SOUCHES MICROBIENNES

Toutes les souches microbiennes utilisées au cours de cette étude ont été isolées de fromages de Roquefort. Les caractéristiques biochimiques de ces souches ont été décrites antérieurement (Devoyod, 1969 et 1970 ; Devoyod et Sponem, 1970). Elles comprenaient :

A) ENTÉROCOQUES : 2 souches

Streptococcus faecalis 155 (Stf 155) et *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 354 (Stfl 354).

B) LEVURES FERMENTANT LE LACTOSE : 3 souches

Saccharomyces fragilis 1 (Sf 1), *Sacch. lactis* 310 (Sl 310) et *Torulopsis sphaerica* 9 (Ts 9).

C) LACTOBACILLES : 4 souches

L. casei 11 et 12, *L. plantarum* 20 et 22.

II. — MESURE DE L'ACTIVITE STIMULANTE D'UN MICRO-ORGANISME SUR UN AUTRE

A) CULTURES ASSOCIÉES

Cette méthode consiste à cultiver ensemble, dans le même milieu, les lactobacilles d'une part et les entérocoques ou les levures d'autre part.

Les milieux de culture utilisés étaient d'une part du lait écrémé chauffé à 118° C pendant 20 mn à l'autoclave (« lait autoclavé ») soit à 142° C pendant 10 s dans un appareil de stérilisation à ultra haute

température, appareil Laguilharre décrit par Hermier et *al.* (1959), (« lait UHT »), d'autre part du lactosérum stérilisé par filtration sur filtre Seitz EKS.

Pour chacun des micro-organismes l'inoculum était de 0,1 p. 100 et l'on suivait leur croissance par dénombrement sur milieux gélosés. Les lactobacilles étaient dénombrés sur milieu MRS (De Man et *al.*, 1960) ; les entérocoques sur le milieu de Packer (1943) modifié par Mossel et *al.* (1957) et les levures sur gélose à l'extrait de pomme de terre (Potato Dextrose Agar Difco n° 13) ajustée à pH = 3,5 avec de l'acide tartrique.

B) CULTURES DIALYSÉES

Le principe de cette méthode est le suivant : deux micro-organismes sont cultivés de part et d'autre d'une membrane de dialyse ; ainsi, seules sont échangées les substances de poids moléculaires inférieurs à 6 000, en particulier les facteurs de croissance (peptides, vitamines, etc.). Nous nous sommes inspirés de la technique décrite par Nurmikko (1955, 1957 et 1958) ; le schéma du dispositif utilisé est donné dans la figure 1.

Cette technique permet d'utiliser des milieux de culture différents pour chacun des organismes et de mettre ainsi en évidence

fig. 1

Schéma du dispositif utilisé pour les cultures associées dialysées

l'effet stimulant d'un des micro-organismes sur l'autre. Elle permet également de préciser la nature des substances stimulantes si l'on utilise pour la culture du micro-organisme « stimulé » un milieu déséquilibré, soit en vitamines, soit en peptides, etc.

C'est ainsi que les entérocoques et les levures étaient cultivés sur lait ou sur lactosérum comme dans le cas des cultures associées, tandis que les lactobacilles étaient cultivés soit sur le milieu de Pollack et Lindner (1943) (milieu mis au point pour la recherche des substances de croissance pour *L. casei*), soit sur les milieux couramment utilisés pour la recherche de l'acide folique (Folic Acid Assay Medium Difco n° 318 et Folic Acid Casei Medium Difco n° 822). La croissance des lactobacilles était appréciée soit par dénombrement, soit par néphélométrie.

C) OBTENTION DES FILTRATS DE CULTURE

Les souches d'entérocoques et de levures étaient cultivées sur lait ou sur lactosérum (pendant 16 h à 37° C pour les entérocoques et pendant 72 h à 22° C pour les levures). Après incubation, les cultures étaient centrifugées à 9 000 g pendant 30 mn. Dans le cas des cultures d'entérocoques on chauffait la culture à 80° C pendant 30 mn avant la centrifugation de façon à inactiver la protéase de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Le surnageant était stérilisé par filtration sur filtre Seitz EKS. Les filtrats ainsi obtenus étaient conservés à + 4° C.

Ces filtrats de culture étaient ajoutés à du lait autoclavé ensemencé à 0,1 p. 100 avec les souches de lactobacilles. L'action stimulante de ces filtrats était appréciée soit par dénombrement des lactobacilles, soit par mesure de la quantité d'acide produite par ces micro-organismes. On a mesuré également la quantité de substances volatiles (acétaldéhyde, acétoïne, diacétyl) produite par les cultures de lactobacilles additionnées de filtrats de culture selon la technique chromatographique de Yoshioka et *al.* (1969) et par la méthode de Lees et Jago (1970).

L'action des filtrats de culture sur les lactobacilles a également été essayée sur le milieu de Pollack et Lindner et sur les milieux servant à la recherche de l'acide folique.

D) OBTENTION D'UN HYDROLYSAT ENZYMATIQUE DE CASÉINE ENTIÈRE

Pour préciser la nature des substances stimulantes produites par les entérocoques, nous les avons comparées aux substances contenues dans un hydrolysat enzymatique de caséine entière obtenu par action d'un extrait enzymatique de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Les techniques d'obtention de cet extrait enzymatique et de séparation en différentes fractions du protéolysat obtenu par action de cet extrait enzymatique sur de la caséine entière ont été décrites antérieurement (Devoyod et Desmazeaud, 1970).

Résultats

I. — ACTION STIMULANTE DES ENTEROCOQUES SUR LES LACTOBACILLES

A) EN CULTURE ASSOCIÉE

En cultivant les lactobacilles en association avec Stfl 354 sur lait, nous avons constaté une stimulation de la croissance des lactobacilles. Ainsi après une incubation de 16 h à 30° C, les lactobacilles étaient 10 à 50 fois plus nombreux dans les cultures associées que dans les cultures pures de lactobacilles. Cette stimulation était plus marquée pour les souches de *L. casei* que pour les souches de *L. plantarum*. Par contre on ne constatait aucune stimulation lorsque les cultures étaient faites sur lactosérum.

En cultivant les souches de lactobacilles en association avec Stf 155 sur lait autoclavé, sur lait UHT et sur lactosérum, nous n'avons constaté aucune stimulation sensible de la croissance des lactobacilles.

B) EN CULTURE DIALYSÉE

La croissance des lactobacilles sur milieu de Pollack et Lindner était stimulée par les substances dialysables provenant de la culture de Stfl 354 sur lait. Cette stimulation était très marquée pour les souches de *L. casei* comme le montrent les résultats donnés dans le tableau 1. En effet après 16 h d'incubation à 30° C nous mesurons une densité optique de 0,70 dans les cultures de *L. casei* dialysées contre du lait autoclavé ensemencé avec Stfl 354 et une densité

TABLEAU 1

Action de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur la croissance des lactobacilles

Souches	Croissance des lactobacilles sur milieu de Pollack et Lindner		
	Tel quel	Dialysé contre Lait autoclavé non ensemencé	Lait autoclavé ensemencé avec <i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i> 354
<i>L. casei</i> 11	0,32	0,30	0,70
<i>L. casei</i> 12	0,30	0,28	0,77
<i>L. plantarum</i> 20	0,40	0,40	0,55
<i>L. plantarum</i> 22	0,44	0,42	0,50

(Les résultats sont donnés en densité optique).

Incubation : 16 h à 30° C.

Inoculum : 0,1 p. 100.

optique de 0,30 dans les cultures de *L. casei* dialysées contre le même lait autoclavé non ensemencé. Les phénomènes de stimulation étaient plus marqués lorsque la souche d'entérocoque était cultivée sur lait autoclavé que lorsqu'elle était cultivée sur lait UHT.

Le fait qu'il n'y ait aucune différence entre les densités optiques des cultures de lactobacilles sur milieu de Pollack et Lindner seul et sur ce même milieu dialysé contre du lait autoclavé non ensemencé, montre qu'aucun facteur de croissance de nature peptidique n'est présent dans le lait autoclavé.

Les substances dialysables provenant de la culture de Stf 155 sur lait n'ont aucune action, ni stimulante, ni inhibitrice, vis-à-vis de la croissance des lactobacilles sur milieu de Pollack et Lindner.

c) FILTRAT DE CULTURE

Nous avons porté sur la figure 2 les courbes de croissance d'une souche de *L. casei* sur milieu de Pollack et Lindner additionné d'un

fig. 2

Action de filtrats de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* sur la croissance de *Lactobacillus casei* 12

Inoculum : 0,05 p. 100.

Température d'incubation : 30° C.

Milieu de culture : milieu de Pollack et Lindner (1943).

(a) : *L. casei* 12.

(b) : *L. casei* 12 + 3 p. 100 filtrat de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 354 sur lait.

(c) : *L. casei* 12 + 3 p. 100 filtrat de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 354 sur lactosérum.

filtrat de culture de Stfl 354 sur lait ou sur lactosérum. Nous voyons qu'en présence du filtrat de culture sur lait la croissance de *L. casei* est stimulée : la phase de latence est plus courte et le taux de croissance est plus élevé. Par contre le filtrat de la culture de Stfl 354 sur lactosérum n'a aucune action sur la croissance de *L. casei*.

La figure 3 montre les courbes de croissance de *L. plantarum* sur milieu de Pollack et Lindner additionné d'un filtrat de culture de Stfl 354 sur lait : la croissance de *L. plantarum* est stimulée, comme celle de *L. casei*, mais d'une façon moindre ; la diminution de la phase de latence et l'augmentation de la vitesse de croissance sont en effet moins importantes.

Les filtrats de culture de Stfl 354 sur lait et sur lactosérum n'ont aucune action sur la croissance des lactobacilles sur le milieu servant à la recherche de l'acide folique.

Les filtrats de culture de Stf 155 sur lait et sur lactosérum n'ont aucune action sur la croissance des lactobacilles quel que soit

fig. 3

Action de filtrats de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 354 sur lait, sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*

Inoculum : 0,05 p. 100.

Température d'incubation : 30° C.

Milieu de culture : milieu de Pollack et Lindner (1943).

(a) : *L. plantarum* 20.

(b) : *L. plantarum* 20 + 3 p. 100 filtrat de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 354.

(c) : *L. plantarum* 22.

(d) : *L. plantarum* 22 + 3 p. 100 filtrat de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 354.

le milieu utilisé : lactosérum, milieu de Pollack et Lindner ou milieu pour la recherche de l'acide folique.

D) HYDROLYSAT ENZYMATIQUE DE CASÉINE ENTIÈRE

Comme il a été décrit antérieurement, l'hydrolysat de caséine entière par la protéase de Stfl 354 a été séparé en 5 fractions par chromatographie sur gel (Devoyod et Desmazeaud, 1970). Sur la figure 4 nous avons rappelé ces résultats ; les pics P1, P2, P3, P4 et P5 correspondent aux zones d'élution des substances de poids moléculaire compris entre 2 000 et 1 500, compris entre 1 000 et 800, compris entre 600 et 300 et des peptides riches en acides aminés aromatiques.

fig. 4

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

Colonne : Ø 25 mm, h 1400 mm.

Biogel P6.

Eluant : CH_3COOH 0,2 M, pH 3

Charge : 5 ml d'hydrolysat concentré 6 fois.

Fractions : 5,4 ml.

Lecture à 570 mμ (après coloration à la ninhydrine selon Moore et Stein, 1954).

(Cf : Devoyod et Desmazeaud
Le Lait, 1970, n° 497, p. 382).

Nous avons porté sur la figure 5 les courbes de croissance d'une souche de *L. casei* sur milieu de Pollack et Lindner additionné de fractions correspondant aux 5 pics précédents. Nous voyons que les substances contenues dans les fractions correspondant aux poids moléculaires compris entre 1 000 et 800 (pic P2) et compris entre 600 et 300 (pic P3) stimulent la croissance de *L. casei* 12 tandis que les substances contenues dans les fractions correspondant aux poids moléculaires compris entre 2 000 et 1 500 ou aux peptides riches en acides aminés aromatiques n'ont aucune action sur la croissance de cette souche de *L. casei*.

Des résultats semblables ont été obtenus avec les deux souches de *L. plantarum*.

fig. 5

Action sur la croissance de *Lactobacillus casei* 12 des différentes substances, séparées par chromatographie, d'un hydrolysât de caséine totale par les enzymes protéolytiques de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 354

Inoculum : 0,05 p. 100.

Température d'incubation : 30° C.

Milieu de culture : milieu de Pollack et Lindner (1943).

- (a) : *L. casei* 12 seul.
- (b) : *L. casei* 12 + 3 p. 100 substances pic P1.
- (c) : *L. casei* 12 + 3 p. 100 substances pic P2.
- (d) : *L. casei* 12 + 3 p. 100 substances pic P3.
- (e) : *L. casei* 12 + 3 p. 100 substances pics P4 et P5 (confondue avec courbe témoin).

II. — ACTION STIMULANTE DES LEVURES FERMENTANT LE LACTOSE SUR LES LACTOBACILLES

A) EN CULTURE ASSOCIÉE

En cultivant les souches de lactobacilles en association avec SI 310, Sf 1 et Ts 9 sur lait, nous avons constaté une stimulation de la croissance des souches de lactobacilles par les levures. Ainsi après incubation de 24 h à 30° C, les lactobacilles étaient 20 à 60 fois plus nombreux dans les cultures associées que dans les cultures pures de lactobacilles. Cette stimulation de la croissance était plus marquée pour les souches de *L. casei* que pour les souches de *L. plantarum*.

B) EN CULTURE DIALYSÉE

Les substances dialysables provenant de la culture des levures sur lait et sur lactosérum ont une action stimulante vis-à-vis de la croissance de *L. casei* cultivé sur le milieu servant à la recherche de l'acide folique. Les résultats portés dans le tableau 2 montrent une croissance importante de *L. casei* (densité optique de 0,70) quand le

TABLEAU 2

Action des levures fermentant le lactose sur la croissance de *Lactobacillus casei*

Souches de <i>L. casei</i>	Cultures de <i>L. casei</i> sur milieu « Folic Acid Casei Medium Difco » dialysées contre			
	Lactosérum non ensemencé	Lactosérum ensemencé avec		
		<i>Sacch. fragilis</i> 1	<i>Sacch. lactis</i> 310	<i>T. sphaerica</i> 9
11	0,01	0,70	0,74	0,66
12	0,02	0,74	1,00	0,82

(Les résultats sont donnés en densité optique).

Incubation : 36 h à 25° C.

Inoculum : 0,1 p. 100.

milieu de culture est dialysé contre du lactosérum ou du lait ensemencé avec les levures tandis que la culture témoin (culture de *L. casei* dialysée contre du lactosérum ou du lait non ensemencé) ne s'est pas développée. Le fait qu'il n'y ait pas eu de croissance dans la culture témoin démontre l'absence d'acide folique ou de ses conjugués dans le lait et le lactosérum non ensemencés.

Par contre aucun phénomène de stimulation n'apparaît quand *L. casei* est cultivé sur milieu de Pollack et Lindner. Cela indique que les 3 souches de levures essayées ne possèdent pas de système enzymatique exogène capable de produire, à partir de la caséine ou des protéines du sérum, des substances stimulantes pour *L. casei*.

c) FILTRATS DE CULTURE

Sur la figure 6, on voit que la croissance de *L. casei* 12 sur le milieu servant à la recherche de l'acide folique est stimulée par l'addition d'un filtrat de culture des souches de levures Sl 310, Sf 1 et Ts 9 sur lactosérum. Par contre cet effet de stimulation n'apparaît pas quand *L. casei* est cultivé sur le milieu de Pollack et Lindner.

fig. 6

Action de filtrats de culture de levures fermentant le lactose
sur la croissance de *Lactobacillus casei* 12

Inoculum : 0,05 p. 100 d'une culture de 24 h à 30° C sur bouillon « Bacto Lactobacilli Broth, AOAC Difco n° 901 ».

Température d'incubation : 30° C.

Milieu de culture : « Folic Acid Casei Medium Difco n° 822 ».

(a) : *L. casei* 12.

(b) : *L. casei* 12 + 15 p. 100 filtrat de culture de *Sacch. fragilis* 1 sur lactosérum.

(c) : *L. casei* 12 + 15 p. 100 filtrat de culture de *Sacch. Lactis* 310 sur lactosérum.

(d) : *L. casei* 12 + 15 p. 100 filtrat de culture de *T. sphaerica* 9 sur lactosérum.

(e) : *L. casei* 12 + 0,1 µg d'acide folique.

TABLEAU 3

Mise en évidence de la présence de composés analogues à l'acide folique dans les filtrats de culture de levures fermentant le lactose sur lactosérum

Souches de <i>L. plantarum</i>	Milieu « Folic Acid Assay Medium Difco n° 318 »						
	seul	+ sulfanilamide	+ sulfanilamide + acide folique	+ sulfanilamide + lactosérum	+ sulfanilamide + filtrat de culture sur lactosérum de :		
					<i>Sacch. fragilis</i> 1	<i>Sacch. lactis</i> 310	<i>T. sphaerica</i> 9
20	0,70	0,01	0,66	0,01	0,59	0,60	0,52
22	0,70	0,02	0,74	0,01	0,62	0,64	0,57

(Les résultats sont donnés en densité optique).

Incubation : 16 h à 30° C.

Inoculum : 0,1 p. 100.

Ces résultats sont donc comparables à ceux obtenus avec les cultures dialysées.

A l'inverse des souches de *L. casei*, les souches de *L. plantarum* se développent bien sur le milieu servant à la recherche de l'acide folique qui contient de l'acide p-aminobenzoïque. Quand on ajoute à ce milieu de la sulfanilamide, qui est un inhibiteur de la synthèse de l'acide folique et de ses dérivés à partir de l'acide p-aminobenzoïque (Miller, 1944 ; Lampen et Jones, 1946 ; Nimmo-Smith et al., 1948), la croissance de *L. plantarum* est inhibée. Cette inhibition est supprimée lorsqu'on ajoute au milieu contenant de la sulfanilamide soit de l'acide folique, soit un filtrat de culture de Sl 310, Sf 1 ou de Ts 9 (cf. tab. 3). Ces résultats montrent que les filtrats de culture de ces souches de levures sur lactosérum contiennent de l'acide folique ou l'un (ou plusieurs) de ses conjugués.

III. — PRODUCTION DES SUBSTANCES VOLATILES PAR LES LACTOBACILLES

Nous avons recherché si l'effet stimulant des entérocoques et des levures fermentant le lactose constaté sur la croissance de *L. casei* et de *L. plantarum* se manifestait aussi vis-à-vis de la production de diacétyle par ces lactobacilles.

Cette production de diacétyle était bien stimulée par l'addition des filtrats de culture de Stfl 354 (augmentation de 30 à 60 p. 100) et par l'hydrolysat enzymatique de caséine (augmentation de 100 à 200 p. 100 de la production de diacétyle) ; par contre le filtrat de culture des levures n'avait que peu d'action sur la production de diacétyle.

Discussion

Nous avons montré antérieurement que, parmi les entérocoques isolés du fromage de Roquefort, seules les souches appartenant à l'espèce *Str. faecalis* var. *liquefaciens* stimulaient la croissance des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc* (Devoyod et Muller, 1969 ; Devoyod et Desmazeaud, 1970). Il semble qu'il en est de même dans le cas de la stimulation des lactobacilles par les entérocoques. Les substances responsables de cette stimulation sont des peptides qui proviennent de la protéolyse des caséines par les protéases de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Comme l'ont montré en effet nos résultats, ces substances stimulantes se retrouvent dans les filtrats de culture de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur lait mais non dans les filtrats de culture sur lactosérum ; elles proviennent donc des caséines. D'autre part, les substances stimulantes sont obtenues, en l'absence de tout corps cellulaire, par action directe du système protéolytique de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* sur la caséine entière : elles sont de nature peptidique.

Les substances stimulantes libérées dans le lait par *Str. faecalis* var. *liquefaciens* s'apparentent donc aux « strépogénines » (Woolley et Sprince, 1944). Les strépogénines obtenues à partir des caséines possédaient des poids moléculaires de l'ordre de 1 300-1 400 (11 à 12 acides aminés) (Baudet et Cherbuliez, 1960 ; Baudet et al., 1960) alors que celles isolées de l'insuline (Merrifield et Woolley, 1956) avaient un poids moléculaire de 600-800 (5 à 7 acides aminés). Ces dernières ont d'ailleurs été synthétisées par Woolley et al. (1955), par Merrifield et Woolley (1958) et par Baudet et al. (1968).

Puisque les peptides stimulants produits par *Str. faecalis* var. *liquefaciens* à partir des caséines ont un poids moléculaire compris entre 800 et 1 000, il est probable que leur composition chimique est différente des strépogénines obtenues à partir des caséines.

L'effet stimulant des levures fermentant le lactose sur la croissance des lactobacilles relève d'un mécanisme différent de celui observé chez *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Nos résultats montrent en effet que les substances stimulantes sont présentes dans le filtrat de culture des levures que la culture soit faite sur lait ou sur lactosérum. Ces substances n'ont cependant aucune action lorsque *L. casei* est cultivé sur milieu de Pollack et Lindner, et appartiennent probablement au groupe de l'acide folique.

Allfrey et King (1950) ont montré qu'il existait dans les autolysats de levure un complexe acide folique-protéine qui ne pouvait être utilisé directement par *L. casei*. Il était utilisé seulement après hydrolyse enzymatique. De même Wasserman (1961) a montré que *Sacch. fragilis*, cultivé sur lactosérum, renfermait de nombreuses vitamines du groupe B, dont l'acide folique, et que ces vitamines ne pouvaient être utilisées qu'après lyse des cellules de levure. Or il semble bien que dans le phénomène de stimulation de *L. casei* par les levures fermentant le lactose, l'acide folique (ou l'un de ses conjugués) soit excrété dans le milieu. Ce phénomène de stimulation apparaît sans qu'il y ait lyse des corps cellulaires des levures ; en effet ces levures possèdent des protéases endocellulaires très actives et s'il y avait lyse des cellules, les protéines du lait seraient hydrolysées en donnant des peptides et des acides aminés qui stimuleraient la croissance des lactobacilles sur milieu de Pollack et Lindner (Desmazeud et Devoyod, résultats non encore publiés). La stimulation de *L. casei* par *Sacch. lactis*, *Sacch. fragilis* et *T. sphaerica* rentre donc bien dans le cadre des associations microbiennes.

On peut donc penser que dans la fabrication du fromage de Roquefort, les entérocoques appartenant à l'espèce *Str. faecalis* var. *liquefaciens* et les levures fermentant le lactose contribuent au développement de *L. casei* en apportant au milieu les peptides et vitamines indispensables aux lactobacilles, substances qui font normalement défaut dans le lait.

Remerciements

Nous remercions le personnel de l'atelier de la Laiterie Expérimentale pour la réalisation du matériel utilisé au cours de l'étude des cultures associées dialysées.

Nous tenons à remercier également MM. Auclair et Hermier qui nous ont prodigué leurs conseils et leur aide stimulante tout au long de cette étude.

Résumé

L'action des entérocoques et des levures fermentant le lactose sur la croissance et l'activité des lactobacilles a été étudiée.

Parmi les entérocoques, seul *Str. faecalis* var. *liquefaciens* avait une action stimulante vis-à-vis des lactobacilles. Cette action était plus marquée pour *L. casei* que pour *L. plantarum*. Les substances stimulantes sont des peptides provenant de l'hydrolyse de la caséine par la protéase de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, elles peuvent être considérées comme appartenant au groupe des « strépogénines ».

Saccharomyces lactis, *Saccharomyces fragilis* et *Torulopsis sphærica* ont une action stimulante vis-à-vis des lactobacilles. Cette action était plus marquée pour *L. casei* que pour *L. plantarum*. Les substances stimulantes sont des composés de l'acide folique.

Summary

Microbial associations in Roquefort cheese

III. Action of enterococci and lactose-fermenting yeasts on lactobacilli

The action of enterococci and lactose-fermenting yeasts on growth and activity of lactobacilli was studied.

Among the enterococci, *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* only stimulated lactobacilli. Growth promoting substances were peptides obtained by action of proteolytic enzymes of *Str. faecalis* var. *liquefaciens* on whole casein. These substances can be considered like « strepogenin ».

Saccharomyces lactis, *Sacch. fragilis* and *Torulopsis sphærica* stimulated the growth of *L. casei* and *L. plantarum*. Growth promoting substances were folic acid like substances.

Références bibliographiques

- [1] ALLFREY (V. G.) and KING (C. G.) (1950). — An investigation of the folic acid protein complex in yeast. *J. Biol. Chem.*, 182, 367.
- [2] BAUDET (P.), BORECKA (I.) et CHERBULIEZ (E.) (1968). — Sur les relations entre structure polypeptidique et activité strépogénique. I. Peptides de la cystine. *Helv. Chim. Acta*, 51, 1.

- [3] BAUDET (P.) et CHERBULIEZ (E.) (1960). — Strépogénines de la caséine. I. Etude de leur libération et de leur purification. *Helv. Chim. Acta*, 43, 904.
- [4] BAUDET (P.), ROSSLER (R.) et CHERBULIEZ (E.) (1960). — Strépogénines de la caséine. II. Valyl-glutaminy-valyl-leucyl-prolyl-prolyl-prolyl-valyl-prolyl-glutaminy-lysine (TB-γ2/6) et alanyl-glutaminy-prolyl-valyl-prolyl-tyrosyl-alanyl-prolyl-prolyl-valyl-glutaminy-arginine (TB-γ2/5). *Helv. Chim. Acta*, 43, 1795.
- [5] CAUSERET (J.), LHUISSIER (M.) et HUGOT (D.) (1970). — Les vitamines dans les produits laitiers : lait en nature, crème, beurre, fromages (travaux récents). *Ann. Nutr. Alim.*, 24, B169.
- [6] DEVOYOD (J. J.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques. *Le Lait*, 489-490, 637.
- [7] DEVOYOD (J. J.) (1970). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. V. Les lactobacilles. *Le Lait*, 495-496, 277.
- [8] DEVOYOD (J. J.) et DESMAZEAUD (M.) (1970). — 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*. *Le Lait*, 497-498, 374.
- [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, 369.
- [10] DEVOYOD (J. J.) et SPONEM (D.) (1970). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Le Lait*, 498, 524.
- [11] 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, 20.
- [12] LAMPEN (J. O.) and JONES (M. J.) (1946). — The antagonism of sulfonamide by ptéroyl-glutamic acid and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 164, 485.
- [13] LEES (G. J.) and JAGO (G. R.) (1970). — The estimation of diacetyl in the presence of other carbonyl compounds. *J. Dairy Res.*, 37, 129.
- [14] DE MAN (J. C.), ROGOSA (M.) and SHARPE (E.) (1960). — A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. appl. Bact.*, 23, 310.
- [15] MERRIFIELD (R. B.) and WOOLLEY (D. W.) (1956). — The isolation and determination of structure of peptides with streptogenin activity. I. Serylhistidyl-leucylvalylglutamic acid and serylhistidylleucylvalylglutamylalanyl leucine from insulin. *J. Am. Chim. Soc.*, 78, 358.
- [16] MERRIFIELD (R. B.) and WOOLLEY (D. W.) (1958). — The synthesis of peptides with streptogenin activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6635.
- [17] MILLER (A. K.) (1944). — Folic acid and biotin synthesis by sulfonamide-sensitive and sulfonamide-resistant strains of *Escherichia coli*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 57, 151.
- [18] MOSSEL (D. A. A.), Van DIEPEN (H. M. J.) and DE BRUIN (A. S.) (1957). — The enumeration of faecal streptococci in foods using Packer's crystal violet sodium azide blood agar. *J. appl. Bact.*, 20, 265.
- [19] NIMMO-SMITH (R. H.), LASCELLES (J.) and WOODS (D. D.) (1948). — Synthesis of « *L. casei* factor » by *Streptobacterium plantarum* : competitive inhibition by sulfonamides. *J. gen. Microbiol.*, 2, XXV.
- [20] NURMIKKO (V.) (1955). — The dialysis technique in the study of the vitamins and amino acids affecting associations of microorganisms. *Acta Chem. Scand.*, 9, 1317.
- [21] NURMIKKO (V.) (1957). — Microbiological determination of vitamins and amino acids produced by microorganisms, using the dialysis cell. *Appl. Microbiol.*, 5, 160.

- [22] NURMIKKO (V.) (1958). — Symbiosis among homofermenting bacteria. *Fourth Intern. Cong. Biochem.*, 13, Colloquia, Pergamon Press, p. 395.
- [23] PACKER (R. A.) (1943). — The use of sodium azide (NaN_3) and crystal violet in a selective medium for streptococci and *Erysipelthrix rhusiopathiae*. *J. Bact.*, 46, 343.
- [24] POLLACK (M. A.) and LINDNER (M.) (1943). — A growth stimulant for *Lactobacillus casei*. *J. biol. Chem.*, 147, 183.
- [25] SHARPE (E.) (1962). — Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Sci. Abstr.*, 24, 109.
- [26] WASSERMAN (A.) (1961). — Amino acid and vitamin composition of *Saccharomyces fragilis* grown in whey. *J. Dairy Sci.*, 44, 379.
- [27] WOOLLEY (D. W.) (1946). — Some correlations of growth promoting powers of proteins with their strepogenin content. *J. biol. Chem.*, 162, 383.
- [28] WOOLLEY (D. W.) (1948). — Strepogenin activity of derivatives of glutamic acid. *J. biol. Chem.*, 172, 71.
- [29] WOOLLEY (D. W.), MERRIFIELD (R. B.), RESSLER (C.) and DU VIGNEAUD (V.) (1955). — Strepogenin activity of synthetic peptides related to oxytocin. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 89, 669.
- [30] WOOLLEY (D. W.) and SPRINCE (H.) (1944). — Studies on strepogenin, an unidentified vitamin. *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.*, p. 28B.
- [31] YOSHIOKA (M.), KITAMURA (M.) and TAMURA (Z.) (1969). — Rapid gaz chromatographic analysis of microbial volatile metabolites. *Japan J. Microbiol.*, 13, 87.

Reçu pour publication en mai 1971.