Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages

III. INFLUENCE DES MICRO-ORGANISMES

(*Streptococcus lactis*, *Penicillium caseicolum* et *P. roqueforti*)

par

M. J. DESMAZEAUD, J.-C. GRIPON, D. LE BARS
et J. L. BERGERE

*Laboratoire de Biochimie Microbienne,
Institut National de la Recherche Agronomique, C.N.R.Z.
78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

Plusieurs études — en particulier Lenoir (1963), Lenoir et *al.* (1970), Poznanski et Rymaszewski (1965), Tokita et Hosono (1968), Creamer (1970), Do Ngoc et *al.* (1971) et Weckx et Vanderpoorten (1973) — ont été consacrées à la mise en évidence de la dégradation des protéines lors de l'affinage des fromages ou à la description des multiples phénomènes constituant celui-ci (Jacquet et Lenoir, 1969) ; (Schormüller, 1968). Cependant peu de travaux ont eu pour but de définir le rôle propre de chaque espèce microbienne (Mabbitt et *al.*, 1959 ; Reiter et *al.*, 1967 ; Ohmiya et Sato, 1970 ; Green et Foster, 1974) et surtout celui de leurs enzymes. C'est pourquoi nous avons entrepris cette étude et donné dans deux mémoires précédents, la description d'un « caillé-modèle » aseptique (Le Bars et *al.*, 1975) et décrit la part qui revient à l'action individuelle de la présure commerciale seule sur les caséines du caillé (Gripon et *al.*, 1975). Le présent mémoire décrit les transformations que l'on peut observer dans un fromage à flore contrôlée sous l'action de la présure et d'une souche de *Streptococcus lactis* ou de *Penicillium* et de leur association. En outre, ce travail permettra ultérieurement de comparer l'action d'enzymes isolées de micro-organismes d'intérêt laitier à celle de ces germes eux-mêmes.

MATERIEL ET METHODES

1. Caillé témoin

La technique de fabrication des caillés aseptiques a été décrite précédemment, la dose de présure stérile au 1/5000 utilisée étant de 10 ml pour 10 l de lait (Le Bars et *al.*, 1975).

2. Fromages à flore contrôlée

2.1. Fromagesensemencés avec une souche de streptocoques lactiques

La souche utilisée dans ce travail est une souche de *Streptococcus lactis* (CNRZ 304). La fabrication des caillés décrite précédemment (Le Bars et *al.*, 1975) est modifiée par suppression de l'addition des trois antibiotiques et de la gluconolactone. L'acidification du lait est obtenue par l'action des bactéries lactiques : 10 ml de suspension concentrée congelée de *S. lactis* CNRZ 304 sont ajoutés au lait 15 mn avant l'addition de présure.

2.2. Fromagesensemencés avec *P. caseicolum* ou *P. roqueforti* seul

La souche P 1 de *Penicillium caseicolum* utilisée dans ce travail provient de la collection du Laboratoire de Technologie de l'I.N.A. Paris-Grignon (Centre de Grignon) (Lenoir et *al.*, 1971 et 1973) ; la souche 431 de *P. roqueforti* de la collection du Laboratoire de Biochimie Microbienne du C.N.R.Z. (Gripon et Bergère, 1972).

La fabrication des caillés est identique à celle décrite précédemment (Le Bars et *al.*, 1975) ; l'acidification est par conséquent obtenue par l'addition de gluconolactone et les trois antibiotiques sont ajoutés au lait. Les spores de *P. caseicolum* ou de *P. roqueforti* étaient pulvérisées (suspension de $3,7 \times 10^8$ spores dans 50 ml d'eau distillée stérile) sur les fromages de 24 h avant leur mise en isolateurs. Le développement ultérieur des moisissures avait lieu exclusivement en surface des fromages.

3. Mise en suspension du fromage. Dosage des différentes formes d'azote. Mesure du pH

L'obtention de la solution citratée, les dosages de l'azote total, de l'azote soluble total, de l'azote non-protéique, de l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique ont été décrits précédemment (Gripon et *al.*, 1975).

Le pH était mesuré à l'aide d'une électrode de verre combinée sur un broyat de fromage.

4. Fractionnement des produits azotés par chromatographie sur gel

Les techniques de fractionnement de l'azote soluble à pH 4,6 par chromatographie sur gel Sephadex G 25 et de l'azote insoluble,

par chromatographie sur gel Bio-Gel A 5 M en présence de dissociant et en milieu réducteur, ont été décrites précédemment (Gripon et *al.*, 1975).

5. Fractionnement des produits d'hydrolyse insolubles à pH 4,6, par électrophorèse

Les techniques de préparation de l'échantillon et d'électrophorèse ont été décrites précédemment (Gripon et *al.*, 1975).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Evolution du pH

Après 24 h le pH des fromages comportant des streptocoques lactiques est sensiblement inférieur (pH 4,7) à celui des caillés témoins (pH 5,3) ou à celui des fromages ensemencés avec du *Penicillium* seul (pH 5,2-5,4) (fig. 1). D'autre part, le pH de ceux ne comportant que

fig. 1

Courbes d'évolution du pH

- — □ Témoine présure seule
- — ■ Bactéries lactiques
- — ○ *P. caseicolum*
- △ — △ *P. roqueforti*
- — ● *P. caseicolum* + bactéries lactiques

des streptocoques lactiques reste remarquablement constant au cours des 46 j d'affinage. Pour les fromages comportant du *Penicillium* on observe une nette augmentation de la valeur du pH à partir du 12^e jour, mais, après 27 j le pH reste sensiblement constant à une valeur voisine de 7 (fig. 1).

Il est important de noter que les différences de pH observées dans les caillés avec ou sans bactéries lactiques, influenceront sur l'activité des enzymes (présure et protéases microbiennes). Il conviendra donc d'en tenir compte en comparant l'action des différents micro-organismes.

2. Evolution des différentes formes d'azote

Après 46 j d'affinage, dans les fromages avec les bactéries seules (fig. 2 B), l'azote soluble total reste sensiblement égal à celui des fromages témoins (fig. 2 A). Par contre, on observe un doublement des valeurs de l'azote non protéique et de l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique par rapport à celui du témoin. En ce qui concerne les fromages avec *P. roqueforti* (fig. 2 C) et *P. caseicum* (fig. 2 D) on observe une dégradation beaucoup plus intense du caillé ; en fin d'affinage l'azote soluble total est proche de 58 p. 100 de l'azote total. L'azote non protéique représente de 35 à 40 p. 100 de l'azote total et l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique environ 10 p. 100. Pour les fromagesensemencés avec *P. roqueforti* seul, les valeurs de ces différentes formes d'azote augmentent plus rapidement entre 10 et 20 j que pour *P. caseicum* seul, ce qui peut s'expliquer par une croissance un peu plus rapide de cette moisissure.

Pour les fromagesensemencés avec les streptocoques lactiques et *P. caseicum* (fig. 2 E) il est tout à fait remarquable qu'aucun effet synergique n'apparaisse bien que le développement du *Penicillium* soit identique à celui observé sur les caillésensemencés avec cette moisissure seule. En effet les valeurs d'azote soluble total et d'azote non protéique ne représentent que 60 p. 100 de celles obtenues dans des fromages avec *P. caseicum* seul. Toutefois l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique en fin d'affinage est nettement supérieur à celui obtenu avec *P. caseicum* seul.

Un certain nombre de raisons peuvent être invoquées pour expliquer ce fait :

1) Une utilisation de l'azote soluble du fromage par les bactéries lactiques se produit certainement, ainsi qu'il a été proposé par Reiter et al. (1969) comparant des caillés aseptiques à des caillésensemencés avec *S. cremoris*. Toutefois, l'azote bactérien est de l'ordre de 0,1 mg/g de fromage et cette quantité ne représente que 1,25 p. 100 de la différence en azote soluble entre les caillés avec *Penicillium* seul et ceux avec *P. caseicum* et bactéries lactiques. Elle ne peut donc pas rendre compte de ce phénomène.

2) On peut également supposer que les différences obtenues sont dues à l'action de la présure. Cette enzyme pourrait être davantage retenue, ou moins inactivée, dans les caillés avec *P. caseicum* seul qui ont un pH plus élevé (pH 5,3 au lieu de 4,7). En outre Fox (1969) a montré par des méthodes électrophorétiques que le pH optimum

fig. 2

Courbes d'évolution des différentes fractions azotées

- △—△ Azote soluble total.
- Azote non protéique.
- Azote soluble dans l'acide phosphotungstique.

d'action de la présure sur les caséines est plutôt proche de pH 5,8 ce qui favoriserait donc l'action de la présure dans les fromages avec *P. caseicolum* seul. Cependant, il est peu probable que la présure soit en cause puisque les différentes formes d'azote restent très sensiblement identiques au cours de la première période de l'affinage que ce soit dans les fromages témoins ou avec *P. caseicolum* seul ou avec *P. caseicolum* plus bactéries lactiques (fig. 2).

3) Il est à noter que la source de carbone dans les fromages avec *P. caseicolum* seul, est principalement du lactose et de l'acide gluco-

nique. Par contre, dans ceux contenant *P. caseicum* avec les streptocoques elle est essentiellement de l'acide lactique. Or, Lenoir et *al.* (1973) ont montré que la source de carbone influait sur la production d'enzymes protéolytiques et un tel phénomène pourrait expliquer la différence de protéolyse entre les deux types de caillé.

4) Une autre hypothèse serait que les bactéries lactiques produisent des inhibiteurs des enzymes protéolytiques de *Penicillium*. De tels inhibiteurs ont déjà été mis en évidence chez certains micro-organismes en particulier chez des *Streptomyces* (Sato et Murao, 1971). Toutefois nous manquons de données sur ce point en ce qui concerne les bactéries lactiques.

5) L'acidification obtenue avec les bactéries lactiques est supérieure à celle obtenue avec la gluconolactone ce qui entraîne une déminéralisation plus importante du caillé. Ceci peut influencer sur la sensibilité du caillé aux enzymes protéolytiques. Cette hypothèse serait opposée aux résultats de Fox (1970) qui a observé que les micelles de caséine sans phosphate de calcium colloïdal étaient plus hydrolysées que des micelles normales.

3. Etude de la fraction azotée soluble

Les fractions azotées solubles ou non à pH 4,6 ont été étudiées par chromatographie sur gel dans les caillés témoins, les caillés avec streptocoques lactiques et avec ceux contenant *P. caseicum* seul ou en association. Les caillés contenant *P. roqueforti* n'ont pas été soumis à cette analyse en raison de la similitude existant entre l'évolution de leurs différentes formes d'azote et celle des fractions azotées des caillés ensemencés avec *P. caseicum*.

Après 40 j d'affinage le chromatogramme obtenu sur Sephadex G-25 de la fraction azotée soluble à pH 4,6 (fig. 3 C) sous l'influence des bactéries lactiques se rapproche de celui du fromage aseptique ne contenant que la présure (Le Bars et *al.*, 1975). Cependant les fractions V à VII contenant les peptides de poids moléculaire les plus bas et les acides aminés représentent 23,5 p.100 de l'azote soluble (tab. 1) alors que dans le fromage témoin elles ne représentent que 13,5 p.100. Il apparaît donc que la souche utilisée libère principalement des peptides de poids moléculaire < 2 000 daltons et des acides aminés. La présence de ces derniers composés peut être expliquée par l'existence d'exopeptidases chez les bactéries lactiques ainsi que l'ont montré Mou et *al.* (1975) chez les streptocoques du groupe N ou Rabier et Desmazeaud (1973) chez *S. thermophilus*.

Par contre, dans les fromages contenant *P. caseicum* seul ou en association (fig. 3 A et B) un diagramme tout à fait différent est obtenu : on a à la fois une augmentation des fractions contenant les gros peptides (I à III) respectivement 23,9 p.100 ou 16,6 p.100 de l'azote total au lieu de 12,9 p.100 dans les fromages témoins, et

des fractions (V à VII) contenant les courts peptides et les acides aminés, respectivement 27,5 ou 16,5 p. 100 de l'azote total au lieu de 2,1 p. 100. Ceci traduit donc surtout une augmentation considérable

fig. 3

Fractionnement de l'azote soluble par chromatographie sur Sephadex G-25

— Densité optique à 280 nm
 --- Densité optique à 570 nm

TABLEAU 1

Répartition de l'azote soluble total en fonction de la masse moléculaire des peptides et acides aminés, sous l'influence des micro-organismes

N° de la fraction*	I	II	III	IV	V	VI	VII
Masse moléculaire (daltons)	> 5 000	4 000 à 5 000	3 000 à 4 000	2 000 à 3 000	1 000 à 2 000	< 1 000 et acides aminés	ac. aminés et peptides aromatiques
Témoins (a)	22	29	21	14	5	4	4,5
(b)	3,9	5,2	3,8	2,5	0,5	0,8	0,8
Bactéries lactiques (a)	17	30,5	18	11	10	11	2,5
(b)	3,2	5,8	3,4	2,1	1,9	2,1	0,5
<i>P. caseicolum</i> (a)	20,5	10	10	13	14	24	8,5
(b)	12,1	5,9	5,9	7,7	8,3	14,2	5,0
Bactéries lactiques (a) + <i>P. caseicolum</i> (b)	11,5 4,1	21 7,6	13,5 4,9	8 2,9	11,5 4,1	29,5 10,6	5 1,8

(a) Ces résultats sont exprimés en p. 100 de l'azote soluble total mis sur la colonne de Sephadex G-25.

(b) Ces résultats sont exprimés en p. 100 de l'azote total du fromage.

* Selon la figure 3.

des composés de faible poids moléculaire (courts peptides et acides aminés). La forte concentration en peptides de poids moléculaire inférieur à 5 000 daltons est en accord avec les résultats des travaux effectués sur le système protéolytique de *P. caseicolum* qui ont montré la présence d'activités endopeptidasiques chez cette moisissure (Lenoir et Choisy, 1971 ; Lenoir *et al.*, 1973 ; Tsugo et Matsuoka,

fig. 4

Fractionnement de l'azote insoluble en présence de dissociant sur Bio-Gel A 5 M

TABLEAU 2

Répartition de l'azote insoluble en fonction de la masse moléculaire des produits, sous l'influence des micro-organismes

N° de la fraction*	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Masse moléculaire (daltons)	supérieur à 440 000	440 000 à 140 000	140 000 à 52 000	52 000 à 28 000	28 000 à 22 400	22 400 à 16 000	16 000 à 8 500	8 500 à 1 750	inférieur à 1 750
Témoins (a)			2	13	6	18	36	25	1
Témoins (b)			1,6	10,7	4,9	14,8	29,5	20,5	
Bactéries (a)	< 1	< 1	< 1	1	1,5	10,5	23	57	7
lactiques (b) 81				0,8	1,2	8,5	18,6	46,1	5,7
<i>P. caseicolum</i> (a)	< 1	< 1	0,5	3	2,5	8,5	21,5	61,5	2,5
<i>P. caseicolum</i> (b) 41			0,2	1,2	1,0	3,5	8,8	25,2	1,0
Bactéries lactiques (a)	< 1	< 1	3	9	5	14	48	21	< 1
+ <i>P. caseicolum</i> (b) 64			1,9	5,8	3,4	9,0	30,7	13,4	< 1

(a) Ces résultats sont exprimés en p. 100 de l'azote insoluble à pH 4,6, mis sur la colonne.

(b) Ces résultats sont exprimés en p. 100 de l'azote total du fromage.

* Selon la figure 4.

1963 ; Kikuchi et Takafugi, 1971). Les teneurs élevées en produits de faible poids moléculaire laissent supposer la présence d'activités exopeptidasiques chez cette moisissure.

4. Etude par chromatographie de la fraction azotée insoluble à pH 4,6

Contrairement à ce que laissait supposer la simple analyse des différentes fractions solubles (§ 2), dans les fromages avec les bactéries lactiques seules on observe la présence de moins de caséines non dégradées (fractions I à VI) que dans les fromages témoins (10,5 p. 100 de l'azote total par rapport à 32 p. 100 dans les fromages témoins) (fig. 4 C, tab. 2). Par contre les caséines partiellement dégradées et les très gros peptides (fractions VII et VIII) sont plus importants : 64,7 p. 100 au lieu de 50 p. 100 dans les fromages témoins. On peut donc penser que ces bactéries possèdent des activités endopeptidasiques propres libérant des produits de poids moléculaire élevé. En effet, il est improbable que ces caséines partiellement dégradées résultent de l'action d'exopeptidases. D'ailleurs, si cela était le cas les quantités d'azote soluble dans l'acide phosphotungstique auraient été nettement supérieures à celles que l'on a observées. Dans les fromages avec *P. caseicolum* seul on observe la présence d'une faible quantité de caséine non dégradée (6 p. 100). La majeure partie de l'azote insoluble est constituée par des caséines dégradées (83 p. 100 de l'azote insoluble ou 34 p. 100 de l'azote total) (fig. 4, tab. 2). Lorsque les deux micro-organismes sont associés on observe une plus grande proportion de caséine intacte (20,1 p. 100 de l'azote total) que dans les fromages avec bactéries lactiques seules alors que les courbes traduisant la libération des différentes formes d'azote (fig. 2 B et 2 E) montrent clairement que la protéolyse est nettement plus intense dans les fromages à flore mixte que dans ceux avec bactéries lactiques seules.

5. Etude par électrophorèse de la fraction insoluble à pH 4,6

Les enregistrements densitométriques des électrophorèses obtenues à partir des fromagesensemencés avec les bactéries lactiques seules, diffèrent relativement peu des fromages témoins. Seul le composé α_{81} I produit de décomposition de α_{81} par la présure, est nettement dégradé en un produit de mobilité supérieure (LI). Ceci confirme que les bactéries lactiques possèdent une activité endopeptidasique (Sorrells et al., 1972 ; Desmazeaud et Zevaco, résultats non publiés). La surface du pic correspondant à la caséine β par rapport à la surface de l'ensemble des pics est par contre sensiblement identique pour les deux électrophorèses. Avec *P. caseicolum* seul (fig. 5 D) la dégradation des protéines apparaît plus intense. En effet, la surface des pics correspondant à la caséine β et au composé α_{81} I a une importance relative plus faible que dans les témoins, ce qui traduit

fig. 5

Enregistrement densitométrique des plaques d'électrophorèse

- A : Caillé témoin sans micro-organisme.
- B : Cailléensemencé avec des bactéries lactiques.
- C : Cailléensemencé avec *P. roqueforti*.
- D : Cailléensemencé avec *P. caseicolum*.
- E : Cailléensemencé avec *P. caseicolum* et bactéries lactiques.

Les chiffres portés sous les graphiques, représentent la surface de chaque pic en pourcentage de la surface de l'ensemble des pics (fromages après 40 j d'affinage).

leur dégradation. Par contre, l'importance des pics correspondant aux caséines γ et χ augmente nettement et traduit le fait que ces produits sont moins attaqués que les caséines β et α_{s1} ou que leurs produits de dégradation par la présure. On peut noter la présence de deux pics caractéristiques, P 1 et P 2, de faible mobilité électrophorétique. Pour les fromagesensemencés avec *P. roqueforti* (fig. 5 C) on observe un diagramme présentant de fortes analogies avec celui de *P. caseicolum*. Les caséines γ et χ ont également une importance relative plus forte que dans les témoins et la caséine β est également très dégradée. Une bande (P'1) de faible mobilité, analogue à P 1, P 2, est observée. Il apparaît donc que les *Penicillium* sont à l'origine d'une profonde modification du caillé et qu'une faible proportion de caséine reste intacte. Chez *P. roqueforti* la présence d'une protéase acide (Zevaco et al., 1972 ; Modler et al., 1974) et d'une protéase neutre (Gripon et Hermier, 1974) a été démontrée et doit être à l'origine de ces profondes dégradations.

Les électrophorèses concernant l'association : bactéries lactiques plus *P. caseicolum* (fig. 5 E), traduisent l'action respective de chaque micro-organisme. Le composé α_{s1} I a une faible importance et on observe un pic analogue à LI révélant la présence des bactéries lactiques. Comme dans les fromages avec *P. caseicolum* seul, les caséines β et α_{s1} ainsi que leurs produits de dégradation par la présure, ont une importance plus faible que dans les témoins. Par contre la caséine γ et les caséines χ voient leur importance relative augmenter ce qui indique qu'ils sont moins dégradés que les caséines précédentes. De même, on observe les pics P 1 et P 2 caractéristiques de l'activité de *P. caseicolum*.

Les résultats obtenus par analyse chromatographique et électrophorétique de la fraction azotée insoluble à pH 4,6 montrent sa complexité et font apparaître clairement que la simple analyse globale de cette fraction (§ 2) est insuffisante pour rendre compte de la nature des produits apparus.

CONCLUSIONS

Le caillé à flore contrôlée nous a permis d'isoler l'action spécifique d'un groupe microbien, associée à celle de la présure. Or, O'Keeffe et al. (1975) ont démontré que les fromages acidifiés artificiellement (gluconolactone) selon la technique de Mabbitt et al. (1955) ne constituaient pas un modèle valable en particulier pour les études de protéolyse. En effet cette technique entraînerait dans les Cheddar une augmentation brutale de la protéolyse au cours des premières 24 h, comparable à celle obtenue dans des fromages classiques de 2 mois. Avec la technologie employée dans ce travail (Le Bars et al.,

1975) nous n'avons pas mis en évidence de différences concernant la protéolyse entre les fromages de 24 h acidifiés par la gluconolactone et les fromages de 24 h acidifiés par *S. lactis*. En effet, les valeurs des azotes solubles à pH 4,6, non protéique et soluble dans l'acide phosphotungstique, ainsi que les diagrammes électrophorétiques des fromages âgés de 24 h étaient identiques pour les deux fabrications.

Il apparaît que la souche de *S. lactis* utilisée dans ce travail libère principalement des produits de bas poids moléculaire en particulier des acides aminés ainsi que le montre la concordance entre les résultats des précipitations fractionnées ou les chromatogrammes de la fraction soluble à pH 4,6 ce qui peut traduire l'existence chez les bactéries lactiques d'activités de type exopeptidasique. Toutefois, l'existence d'une activité endopeptidasique a pu être aussi mise en évidence par électrophorèse et par filtration de la fraction azotée insoluble à pH 4,6. Il faut noter toutefois que le pH des fromages est resté constant à une valeur de 4,7 au cours de la maturation. Ce pH est défavorable à l'action des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques qui ont un pH optimum d'action voisin de la neutralité (Kikuchi et al., 1974). Il est donc possible que la protéolyse observée dans les caillés avec les bactéries lactiques seules soit inférieure à celle ayant lieu normalement dans les fromages. Ceci permet de penser que leur rôle est réel au cours de la maturation des fromages et que leur action est complémentaire à celle de la présure commerciale. Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus précédemment par Poznanski et al. (1965), Reiter et al. (1969), Ohmiya et Sato (1972). Par électrophorèse il apparaît que l'action des bactéries lactiques (*S. lactis*) s'exerce principalement sur α_{s1} I produit de la dégradation de α_{s1} par la présure. Une action comparable a été observée par Ledford et al. (1966) qui ont montré sur différents types de fromages que la caséine β était difficilement attaquée par les micro-organismes alors que la caséine α_{s1} était profondément dégradée.

En ce qui concerne les *Penicillium* l'ensemble des résultats démontre qu'ils ont une action profonde et qu'ils libèrent aussi bien des produits de poids moléculaire élevé que faible. Leur action se manifeste à la fois sur les caséines β et α_{s1} ainsi que leurs produits de dégradation et reflète bien l'existence d'activités endo et exopeptidasiques (Gripon, résultats non publiés) chez ces moisissures. Dans des fromages à pâte persillée une forte protéolyse est observée et plusieurs auteurs ont mis en évidence, comme dans notre cas, la dégradation des caséines α_{s1} et β (Assenat, 1967 ; Ledford et al., 1966 ; Takahashi, 1973) et l'apparition d'une forte concentration d'acides aminés libres (Ismail et Hansen, 1972). Par contre Ledford et al. (1966) et Takahashi (1973) ont observé que la caséine β était très peu dégradée dans des fromages de Camembert ce qui n'est pas en accord avec nos résultats.

Bien entendu nos résultats ont été obtenus dans un caillé modèle et doivent être interprétés avec précaution au moins en ce qui concerne l'aspect quantitatif si on cherche à les comparer avec ce qui se passe au cours de l'affinage de fromages traditionnels en raison des différences de pH ou de teneurs en calcium. Néanmoins ce modèle constitue un outil de laboratoire très utile pour l'étude du processus d'affinage des fromages. Les résultats obtenus avec différentes espèces de micro-organismes vivants, seuls ou en combinaison, présentés dans ce travail sont une voie d'approche pour la compréhension des mécanismes de l'affinage. Il est nécessaire de connaître également la nature et les propriétés des enzymes protéolytiques de ces micro-organismes ainsi que leur action dans le fromage ce qui fera l'objet d'une publication ultérieure.

Résumé

Le rôle de différents micro-organismes (*Streptococcus lactis*, *Penicillium caseicolum*, *P. roqueforti*) a été étudié dans un caillé modèle aseptique où ils peuvent se développer seuls ou en association. La dégradation des caséines dans les différents caillés a été suivie simultanément par précipitations fractionnées, chromatographie sur gel en présence ou non de dissociant et électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose.

S. lactis libère principalement des peptides de faible poids moléculaire et des acides aminés ; cependant une activité endopeptidasique a pu être mise en évidence par électrophorèse et filtration sur gel de la fraction azotée insoluble à pH 4,6.

Les *Penicillium* libèrent des acides aminés et des peptides de faible poids moléculaire en grande quantité. Leur action endopeptidasique est également importante et se manifeste à la fois sur les caséines α_{s1} et β .

Summary

INFLUENCES OF MICROORGANISMS AND ENZYMES DURING CHEESE RIPENING

III. — INFLUENCES OF MICROORGANISMS (*S. LACTIS* AND *PENICILLIUM*)

A model-curd was used to study the action of different micro-organisms (*Streptococcus lactis*, *Penicillium caseicolum*, *P. roqueforti*) during cheese ripening. The aseptic model-curds were inoculated with one strain only of each microorganism or with their association. Casein degradation was followed using several methods : precipita-

tion techniques, gel filtration column with and without dissociating solvent system and acrylamide agarose gel electrophoresis.

S. lactis released mainly low molecular weight peptides and amino-acids. However an endopeptidase activity was detected by electrophoresis and gel filtration of the pH 4.6 insoluble nitrogen fraction.

Penicillium released great amount amino-acids and low molecular weight peptides. Their endopeptidase activity was also very important and they degraded simultaneously α_{s1} - and β -caseins.

Remerciements

Nous remercions vivement Mlle Marie-Françoise Outurquin, Mme Catherine Ansel-Lespinasse et M. D. Caby qui ont participé à ce travail en tant que stagiaires au Laboratoire de Biochimie Microbienne.

Reçu pour publication en décembre 1975.

Références bibliographiques

- ASSENAT (L.) (1967). — Contribution à l'étude d'une méthode d'identification des laits et fromages au moyen de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Le Lait*, 47, 393-414 et 495-502.
- CREAMER (L. K.) (1970). — Protein breakdown in Gouda cheese. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 5, 152-154.
- DO NGOC (M.), LENOIR (J.) et CHOISY (C.) (1971). — Les acides aminés libres des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. *Rev. Lait. Franç.*, 288, 447-462.
- FOX (P. F.) (1969). — Influence of temperature and pH on the proteolytic activity of rennet extract. *J. Dairy Sci.*, 52, 1214-1218.
- GRIPON (J. C.) et BERGÈRE (J. L.) (1972). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. I. Conditions de production et nature du système protéolytique. *Le Lait*, 52, 497-514.
- GRIPON (J. C.), DESMAZEAUD (M. J.), LEBARS (D.) et BERGÈRE (J. L.) (1975). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 55, 502-516.
- GRIPON (J. C.) et HERMIER (J.) (1974). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. III. Purification, propriétés et spécificité d'une protéase inhibée par l'E.D.T.A. *Biochimie*, 56, 1324-1332.
- ISMAIL (A. A.) and HANSEN (K.) (1972). — Accumulation of free amino acids during cheese ripening of some types of Danish cheese. *Milchwissenschaft*, 27, 556-559.
- JACQUET (J.) et LENOIR (J.) (1969). — Mécanismes intimes de l'affinage des fromages. *Economie Médecine Anim.*, 10, 38-71.

- KIKUCHI (T.), BERGÈRE (J. L.) et DESMAZEAUD (M. J.) (1974). — Aptitude des streptocoques lactiques à la protéolyse. II. Etude de l'action du système protéolytique de *Streptococcus lactis* sur la caséine entière. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 14, 313-326.
- KIKUCHI (T.) and TAKAFUJI (S.) (1971). — Studies on the microorganisms of Camembert cheese. II. Proteases of Camembert cheese moulds. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 42, 205-209.
- LE BARS (D.), DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.) et BERGÈRE (J. L.) (1975). — Etude du rôle des micro-organismes et de leurs enzymes dans la maturation des fromages. I. Fabrication aseptique d'un caillé modèle. *Le Lait*, 55, 377-389.
- LEDFOORD (R. A.), O'SULLIVAN (A. C.) and NATH (K. R.) (1966). — Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 49, 1098-1101.
- LENOIR (J.) (1962). — Sur la dégradation des protides au cours de la maturation du Camembert. *C.R. Acad. Agric.*, 48, 160-169.
- LENOIR (J.) (1963). — Note sur la composition en matières azotées des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. *Ann. Technol. Agric.*, 12, 51-57.
- LENOIR (J.) et CHOISY (C.) (1971). — Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait*, 51, 138-157.
- LENOIR (J.), CHOISY (C.) et DO NGOC (M.) (1970). — Chromatographie des acides aminés et maturation des fromages. *Technicien Lait*, (9), 8-12.
- LENOIR (J.), GLENZA (A.), BERGÈRE (J. L.), CERF (O.), CHOISY (C.), DESMAZEAUD (M.) et HERMIER (J.) (1973). — Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le Lait*, 53, 246-279.
- MABBITT (L. A.), CHAPMAN (H. R.) and BERRIDGE (N. J.) (1955). — Experiments in cheesemaking without starter. *J. Dairy Res.*, 22, 365-373.
- MABBITT (L. A.), CHAPMAN (H. R.) and SHARPE (E.) (1959). — Making Cheddar cheese on a small scale under controlled bacteriological conditions. *J. Dairy Res.*, 26, 105-112.
- MODLER (H. W.), BRUNNER (J. R.) and STINE (C. M.) (1974). — Extracellular protease of *Penicillium roqueforti*. I. Production and characteristics of crude enzyme preparation. *J. Dairy Sci.*, 57, 523-527.
- MOU (L.), SULLIVAN (J. J.) and JAGO (G. R.) (1975). — Peptidases activities in group N streptococci. *J. Dairy Res.*, 42, 147-155.
- OHMIYA (K.) and SATO (Y.) (1970). — Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part XI. The ripening of aseptic rennet curd by *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus helveticus*. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1463-1469.
- OHMIYA (K.) and SATO (Y.) (1972). — Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part XII. Significant contribution of intracellular protease of lactic acid bacteria to the casein hydrolysis in cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 27, 417-422.
- O'KEEFE (R. B.), FOX (P. F.) and DALY (C.) (1975). — Proteolysis in Cheddar cheese : influence of the rate of acid production during manufacture. *J. Dairy Res.*, 42, 111-122.
- POZNANSKI (S.), LENOIR (J.) et MOCQUOT (G.) (1965). — La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Le Lait*, 45, 3-26.
- POZNANSKI (S.) and RYMASZEWSKI (J.) (1965). — Proteolysis during the ripening of Edam cheese with the participation of some bacteria strains. I. Changes in particular nitrogen fractions. *Milchwissenschaft*, 20, 14-20.

- RABIER (D.) et DESMAZEAUD (M. J.) (1973). — Inventaire des différentes activités peptidasiques intracellulaires de *Streptococcus thermophilus*. Purification et propriétés d'une dipeptide-hydrolase et d'une aminopeptidase. *Biochimie*, 55, 389-404.
- REITER (B.), FRYER (T. F.), PICKERING (A.), CHAPMAN (H. R.), LAWRENCE (R. C.) and SHARPE (M. E.) (1967). — The effect of the microbial flora on the flavour and free fatty acid composition of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 34, 257-272.
- REITER (B.), SOROKIN (Y.), PICKERING (A.) and HALL (A. J.) (1969). — Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *J. Dairy Res.*, 36, 65-76.
- SATOI (S.) and MURAO (S.) (1971). — Studies on pepsin inhibitor (S-P1) from *Streptomyces naniwaensis*. Part II. Purification and general properties of S-P1. *Agr. Biol. Chem.*, 35, 1482-1487.
- SCHORMÜLLER (J.) (1968). — The chemistry and biochemistry of cheese ripening. *Adv. Food Res.*, 16, 231-334.
- SORRELLS (K. M.), COWMAN (R. A.) and SWAISGOOD (H. E.) (1972). — Hydrolysis of α_{S1} -casein B by *Streptococcus lactis* membrane proteinase. *J. Bacteriol.*, 112, 474-479.
- TAKAHASHI (F.) (1973). — A comparative study on the antigenicities of the degradation products of caseins in the various types of ripened cheeses. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 44, 241-247.
- TOKITA (F.) et HOSONO (A.) (1968). — An investigation about Limburger cheese ripening of gel filtration on Sephadex. *Milchwissenschaft*, 23, 758-761.
- TSUGO (T.) and MATSUOKA (H.) (1963). — Studies on the manufacture of semi-soft white mould cheese ripened by *Penicillium caseicolum*. II. Qualities of protease produced by *P. caseicolum*. *Jap. J. Zootch. Sci.*, 33, 480-483.
- WECKX (M.) and VANDERPOORTEN (R.) (1973). — Protein breakdown during the ripening of Herve cheese investigated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Milchwissenschaft*, 28, 332-338.
- ZEVACO (C.), HERMIER (J.) et GRIPON (J. C.) (1973). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. II. Purification et propriétés de la protéase acide. *Biochimie*, 55, 1353-1360.
-