Caractérisation des systèmes enzymatiques protéolytiques de deux souches psychrotrophes isolées de laits crus réfrigérés

par

MILLIERE (J. B.)* et VEILLET-PONCET (L.)**

Les bactéries psychrotrophes regroupent de nombreuses espèces qui dégradent activement la caséine lors du stockage au froid des laits crus (Juffs et Madsen [29], Lacrosse [39], Mikawa et Hoshino [50], Miller et Kandler [51], Pürshel et Pollack [63], Sandvick et Fossum [64], Storgards et Lindqvist [67], Thomas et Thomas [70]) et sont à l'origine d'accidents en fabrication et de mauvaise conservation des produits laitiers en général. La plupart des chercheurs s'accordent à montrer que le genre *Pseudomonas* et plus particulièrement l'espèce *P. fluorescens* constituent la flore psychrotrophe caséolytique dominante. De nombreuses études ont été consacrées à l'étude de la protéolyse du lait et des produits laitiers par cette espèce (Babel [5], Kielwein [30], Knaut [35], Knaut et Bruderer [36], Kozlova [38], Mickelsen *et al.* [57], Skean et Overcast [65], White et Marshall [73], Yanagiya *et al.* [74]) ; son système enzymatique protéolytique a été partiellement purifié et caractérisé, mais de nombreux résultats divergent (Hoshino [22], Hurley *et al.* [23], Juffs [26], Juffs *et al.* [28], Malik et Swanson [46], Mayerhofer [47], Mayerhofer *et al.* [48], Mayerhofer *et al.* [49], Newton [58], Peterson et Gunderson [62]).

Nous nous proposons, après avoir isolé de cinquante échantillons de laits crus réfrigérés provenant de la région de Nancy [52, 53] une flore caséolytique et psychrotrophe essentiellement constituée de bactéries élaborant un pigment caroténoïde orange, appartenant au genre *Cytophaga* (Gavini et Leclerc [21], et de *P. fluorescens*, de caractériser et de comparer les systèmes enzymatiques protéolytiques des deux souches élaborant les protéases les plus actives, *Cytophaga* 20 C 2 et *P. fluorescens* 28 P 12.

* I.U.T. de Biologie Appliquée - 54600 Villers-les-Nancy.

** Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, E.N.S.A.I.A.-I.N.P.L., 32, rue Sainte-Catherine - 54000 Nancy.

MATERIEL ET METHODES

1. Origine des souches retenues

P. fluorescens 28 P 12 et *Cytophaga* 20 C 2 ont été sélectionnés, en fonction de leur caractère psychrotrophe et de leur activité protéolytique, d'un lot de 996 souches isolées de cinquante échantillons de lait cru réfrigéré, collectés dans la région de Nancy. Les clones sont repiqués tous les mois sur un milieu gélosé nutritif (composition en g/l : bactocasitone 5 ; extrait de levures 2,5 ; glucose 1 ; lait écrémé 5 ml ; agar 15 ; pH 6,6-7,0) et stockés à + 4° C.

2. Production et purification partielle des protéases

Des essais préliminaires nous permettent de définir les conditions de culture et le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium pour l'obtention du système enzymatique brut. 5 l de lait écrémé UHT, restérilisé à 115° C pendant 10 mn, sontensemencés avec 20 ml d'une dilution au 1/10 de la culture de *P. fluorescens* 28 P 12, de 18 h à 25° C, en bouillon à l'extrait de levures, dont la turbidité a été préalablement ajustée à 0,220 à 540 nm (population initiale : $5,5 \cdot 10^4$ bactéries par ml). La souche de *Cytophaga* 20 C 2 présentant une activité protéolytique moindre estensemencée à un taux dix fois plus important, ce qui correspond à une concentration bactérienne dans le lait de $4,8 \cdot 10^5$ bactéries par ml.

Les cultures sur lait de *P. fluorescens* et de *Cytophaga* sont incubées pendant 120 h à, respectivement, 20 et 30° C, dans un bain d'eau thermostaté, sans agitation. L'élimination du culot bactérien est obtenue par centrifugation à 15 000 g pendant 20 mn à + 4° C (centrifugeuse Beckman, Spinco L2-65).

Le surnageant acellulaire additionné de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ jusqu'à 50 p. 100 de saturation est laissé au repos pendant 24 h à + 4° C, puis l'extrait enzymatique recueilli par centrifugation à 4° C (30 000 g pendant 30 mn) est mis en suspension dans un minimum d'eau distillée.

Une première dialyse est effectuée pendant 48 h contre cinquante fois son volume en eau distillée, à la température de 1,5° C, puis l'extrait enzymatique brut est dialysé à nouveau pendant 48 h à 1,5° C contre quarante fois son volume en tampon de Jenness et Koops [24], solution dont la composition minérale est identique à celle du lait. Les dialysats sont ensuite lyophilisés dans un appareil expérimental Froidlabo et la poudre obtenue est stockée à l'abri de l'humidité à 4° C, pendant plusieurs semaines, sans perte d'activité.

3. Dosage des protéines

Après réhydratation appropriée de l'extrait enzymatique brut lyophilisé, la concentration en protéines est déterminée selon la

méthode de Lowry modifiée [42], avec le réactif de Folin et Ciocalteu (Merck). La sérum-albumine bovine (Merck) est utilisée comme protéine-étalon.

4. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été étudiée sur caséine d'Hammarsten (Merck).

4.1. Réaction enzymatique

A 2 ml de caséine à 2 p. 100, en tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,8, contenant 0,005 M de CaCl_2 , est ajouté 1 ml d'extrait enzymatique (ces deux suspensions sont préalablement maintenues en bain d'eau à 42° C pendant 2 à 3 mn). Après agitation et incubation à 42° C, pendant des durées déterminées, la réaction est arrêtée par addition de 6 ml de T.C.A. 0,3 N. Après 15 mn de repos, le mélange est filtré sur filtre Laurent n° 1 et la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans le T.C.A., est déterminée selon la méthode de Lowry modifiée, à 700 nm.

L'unité d'activité protéolytique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère l'équivalent de 1 μg de tyrosine par ml d'extrait enzymatique et par mn, dans les conditions précédemment indiquées, par référence à une courbe-étalon établie à partir de concentrations croissantes en L-tyrosine (Serva).

Un essai à blanc, dans lequel l'extrait enzymatique est ajouté après l'addition du T.C.A., est effectué pour chaque essai.

4.2. Choix de la concentration en extrait enzymatique

Des concentrations croissantes en extrait enzymatique, de 5 à 50 mg par ml, sont réalisées en réhydratant le lyophilisat avec de l'eau distillée. L'hydrolyse de la caséine isoélectrique à 2 p. 100, à 42° C, est déterminée après les durées de réaction s'échelonnant entre 5 et 60 mn.

Pour l'étude du système enzymatique de *P. fluorescens* 28 P 12, nous retenons une concentration de 15 mg par ml et un arrêt de l'hydrolyse de la caséine après 10 mn de réaction. Comparativement, le système enzymatique de *Cytophaga* 20 C 2 étant moins actif, nous choisissons une concentration de 37,5 mg par ml et une durée de 60 mn.

5. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante est déterminée par la mesure du temps nécessaire à la coagulation d'un lait reconstitué selon Berridge [9] et dans des conditions définies. 12 g de lait écrémé (marque Lesaffre-Normandie) sont dissous pendant 20 mn dans 100 ml de solution de CaCl_2 0,01 M, puis le lait est gardé au repos pendant 1 h à 25° C. Après maintien du lait et de la solution enzymatique en bain d'eau à

35° C pendant 5 mn, 1 ml d'extrait est ajouté à 10 ml de lait. La rotation du tube immergé permet la formation d'un film homogène sur la paroi et le temps de coagulation (en mn et s) est atteint dès qu'apparaissent les premières particules de caillé.

6. Etude de la dégradation de la caséine par électrophorèse en gel de polyacrylamide en tube

La protéolyse de la caséine, lors de la culture sur lait des souches *P. fluorescens* 28 P 12 et *Cytophaga* 20 C 2, est observée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en tube. L'électrophorèse est réalisée selon Ornstein (1964) et Davis (1964) dans des gels à 7 p. 100 d'acrylamide contenant de l'urée (concentration finale 6 M), en tampon TRIS-Glycine 0,1 M, pH 8,3. Le volume de l'échantillon à analyser est de 6 µl par gel. La migration est réalisée sous 2 mA par gel, pendant 2 h, en utilisant comme indicateur de front de migration le bleu de bromophénol, dans un appareil (marque Canalco) contenant six tubes de verre de 7 × 0,5 cm.

Les protéines, après achèvement de l'électrophorèse, sont révélées par coloration, pendant 1 h au moins, avec une solution de noir amido, puis l'excès de colorant est totalement éliminé, par passages successifs des gels dans des bains à 7 p. 100 (V/V) en acide acétique. Les diagrammes d'électrophorèse sont obtenus à l'aide d'un photomètre intégrateur enregistreur de marque Vernon.

RESULTATS

1. Activité protéolytique

1.1. Influence de la concentration en caséine

Pour les deux souches étudiées, l'activité protéolytique, à 42° C, atteint rapidement un maximum pour des concentrations en caséine supérieures ou égales à 2 p. 100 (fig. 1).

1.2. Influence de la température

1.2.1. Température optimale d'activité protéolytique.

L'hydrolyse de la caséine à 2 p. 100 montre que les systèmes enzymatiques protéolytiques des deux souches se comportent d'une manière sensiblement identique vis-à-vis de la température de réaction, car les vitesses d'hydrolyse sont maxima entre 42 et 44° C (fig. 2 A et 2 B).

A 20° C, l'activité protéolytique est loin d'être négligeable puisqu'elle représente entre 30 et 40 p. 100 de l'activité maxima. Pour des températures supérieures ou égales à 45° C, l'inactivation thermique de ces deux systèmes est très rapide et devient totale à 50° C, ce qui semble dénoter une grande thermolabilité des protéases de *P. fluorescens* 28 P 12 et de *Cytophaga* 20 C 2.

fig. 1

Activité enzymatique ($\mu\text{g/ml/mn}$) en fonction de la concentration en substrat

- Système enzymatique de *P. fluorescens* LCM 28 P 12.
 - - - - - Système enzymatique de *Cytophaga* LCM 20 C 2 (moyennes de quatre essais).

1.2.2. Stabilité thermique.

Les extraits enzymatiques sont stables pour des températures inférieures à 40° C. Comme l'indiquent les figures 3 A et 3 B, l'extrait enzymatique de *Cytophaga* 20 C 2 est toutefois moins thermosensible que celui de *P. fluorescens* 28 P 12, car l'inactivation thermique des protéases de *P. fluorescens* commence à se manifester dès la température de 40° C, alors qu'après 60 mn à 43° C, celle de *Cytophaga* est

fig. 2 A

Activité protéolytique ($\mu\text{g/ml/mn}$) du système enzymatique de *P. fluorescens* LCM 28 P 12 en fonction de la température (durée de réaction 10 mn, extrait enzymatique contenant 15 mg/ml de protéines ; moyennes de cinq essais).

fig. 2 B

Activité protéolytique ($\mu\text{g/ml/mn}$) du système enzymatique de *Cytophaga* LCM 20 C 2 en fonction de la température (durée de réaction : 60 mn, extrait enzymatique contenant 37,5 mg/ml de protéines ; moyennes de cinq essais).

fig. 3 A

Logarithme décimal de l'activité enzymatique ($\mu\text{g/ml/mn}$) pour les protéases de *P. fluorescens* en fonction de la durée de chauffage (mn) à différentes températures : ○ 40° C ; □ 42° C ; △ 43° C ; + 45° C ; ◇ 47,5° C ; ▽ 50° C (moyennes de trois essais).

fig. 3 B

Logarithme décimal de l'activité enzymatique ($\mu\text{g/ml/mn}$) pour les protéases de *Cytophaga* en fonction de la durée de chauffage (mn) à différentes températures : ▲ 43° C ; + 45° C ; ◆ 47,5° C ; ▼ 50° C (moyennes de trois essais).

fig. 4 A

Protéolyse du lait écrémé par le système enzymatique de *P. fluorescens* LCM 28 P 12 (0,75 mg d'extrait/ml de mélange réactionnel) lors du stockage à différentes températures : □ 2° C ; △ 5° C ; ● 7° C ; ▽ 10° C ; ◇ 25° C ; ○ 42° C.

fig. 4 B

Protéolyse du lait écrémé par le système enzymatique de *Cytophaga* LCM 20 C 2 (1,5 mg d'extrait par ml de mélange réactionnel) lors du stockage à différentes températures : ■ 2° C ; ▲ 5° C ; ● 7° C ; ▼ 10° C ; ◆ 25° C ; ● 42° C.

encore nulle. Après 10 mn de chauffage à 45° C, les activités protéolytiques résiduelles sont respectivement de 18 p. 100 et 89 p. 100 pour les extraits de *P. fluorescens* et de *Cytophaga* et après 2 mn à 50° C, de 8,2 p. 100 et de 64,7 p. 100.

1.2.3. Activités aux températures de réfrigération.

0,6 g d'extrait enzymatique de *P. fluorescens* (ou 1,2 g pour *Cytophaga*), réhydraté dans 400 ml d'eau distillée, est soumis à une filtration stérilisante sur filtre Seitz ($\varnothing$ 0,45 μ). 300 ml de solution enzymatique sont additionnés à 500 ml de lait U.H.T. (restérilisé pendant 10 mn à 115° C), et le mélange est réparti à raison de 5 ml en tubes stériles 220 $\times$ 20. Les températures d'incubation retenues sont 2, 5, 7, 10, 25 et 42° C.

Entre 2 et 25° C, les activités protéolytiques des deux systèmes enzymatiques se comportent d'une manière identique, en montrant une même adaptabilité au froid. Même à 2° C, l'hydrolyse de la caséine est loin d'être négligeable puisqu'elle correspond à 5 p. 100 environ de celle mesurée dans les conditions optimales (42° C) (fig. 4 A et 4 B).

1.3. Influence du pH

Les extraits enzymatiques protéolytiques des deux souches présentent une activité maxima à pH 7,0, à la température de 42° C, en tampon Phosphate ou en tampon TRIS-HCl 0,05 M. A pH 6, en tampon citrate-NaOH, l'activité résiduelle est encore notable, 72 p. 100 pour *P. fluorescens* et 76,4 p. 100 pour *Cytophaga*. En revanche, pour des pH basiques, pH 8,5, cette activité résiduelle ne représente plus que respectivement 19 p. 100 et 42 p. 100 de l'activité maximale (fig. 5 A et 5 B).

Dans le lait frais (pH 6,4-6,6), ces enzymes conservent une activité protéolytique importante, supérieure ou égale à 90 p. 100.

2. Activité coagulante

2.1. Influence de la concentration en extrait enzymatique

Les mesures des activités coagulantes de dilutions successives, en H₂O distillée, d'une solution coagulante de *P. fluorescens* 28 P 12 (30 mg par ml), montrent que la vitesse d'apparition des particules de caillé est proportionnelle à la concentration de la solution enzymatique (fig. 6).

2.2. Activité en fonction de la température

Avec l'élévation de la température, l'activité coagulante des solutions de 15 mg par ml (*P. fluorescens*) ou de 60 mg par ml (*Cytophaga*) d'extraits enzymatiques augmente progressivement jusqu'à une limite au-delà de laquelle l'apparition des flocons de caséine est très forte-

fig. 5 A

Activité protéolytique résiduelle du système enzymatique de *P. fluorescens* LCM 28 P 12 en fonction du pH de la réaction.

Tampons utilisés : [0,05 mM] $\diamond$ citrate ; $\circ$ phosphate ; $\triangle$ TRIS-HCl ; $\square$ borate.

fig. 5 B

Activité protéolytique résiduelle du système enzymatique de *Cytophaga* LCM 20 C 2 en fonction du pH de la réaction.

Tampons utilisés : [0,05 mM] ♦ citrate ; ● phosphate ; ▲ TRIS-HCl ; ■ borate.

fig. 6

Courbe d'étalonnage : activité coagulante (mn) à 35° C en fonction de la concentration en enzyme (solution mère d'extrait enzymatique de *P. fluorescens* LCM 28 P 12 contenant 30 mg/ml de protéines (moyennes de trois essais).

fig. 7

Activité coagulante (mn) en fonction de la température
(moyennes de cinq essais)

$\triangle$ Système enzymatique de *P. fluorescens* LCM 28 P 12.

$\blacktriangle$ Système enzymatique de *Cytophaga* LCM 20 C 2.

ment retardée (50° C et 52° C pour les extraits de *Cytophaga* et *P. fluorescens*) (fig. 7).

Malgré une solution enzymatique quatre fois plus concentrée, l'activité coagulante du système enzymatique de *Cytophaga* LCM 20 C 2 reste très faible : à la température de 48° C, elle représente seulement 3 p.100 de celle du système enzymatique de *P. fluorescens* 28 P 12, et c'est la raison pour laquelle son étude ne sera pas poursuivie.

2.3. Stabilité thermique

La représentation graphique, selon la loi d'Arrhénius, de l'activité coagulante résiduelle, mesurée à 35° C, en fonction de la température, montre qu'entre 40 et 100° C, après 60 mn de chauffage, le système enzymatique coagulant de *P. fluorescens* est très fortement inactivé par deux processus indépendants, l'un agissant à des températures relativement basses, voisines de 45° C, et l'autre à des températures très élevées, de l'ordre de 90 à 100° C (fig. 8).

Cette inactivation entre 44 et 50° C semble expliquer, lors de l'étude précédente sur l'activité coagulante en fonction de la température, les retards importants observés dans les temps de coagulation aux températures proches de 50° C. Après 10 mn de chauffage, l'inhibition du système coagulant est moins prononcée à 90° C qu'à 60° C ; ce résultat paradoxal peut s'expliquer si l'on admet que, dans le cas de l'essai à 90° C, en raison d'un gradient de température plus important, la durée de séjour du système enzymatique dans la zone critique d'inactivation (44-50° C), est plus courte.

Pour des températures comprises entre 80 et 100° C, l'inactivation thermique est très importante pendant la première minute du traitement, car 80 à 90 p.100 du système enzymatique coagulant sont dénaturés à des températures supérieures ou égales à 80° C, mais la dénaturation totale n'intervient, à 100° C, que pour des durées de chauffage supérieures à 1 h (fig. 9).

2.4. Influence du pH : Courbe pH - stabilité

L'extrait enzymatique de *P. fluorescens* (7,5 mg/ml) est porté à différentes valeurs de pH, avec HCl ou NaOH (N ou N/10), comprises entre pH 2,5 et pH 12. Après un repos de 2 h à 4° C, le pH de la solution enzymatique est réajusté à 7,0 et le test de coagulation est réalisé à 35° C.

La courbe pH - stabilité (fig. 10) montre qu'aux valeurs extrêmes de la gamme, pH 3 et pH 12, la stabilité du système coagulant est très réduite, tandis qu'elle n'est pas altérée à la neutralité, entre pH 6,5 et 7,5.

Pour la zone de pH comprise entre 8,75 et 9,70, nous observons une inhibition importante du pouvoir coagulant qui semblerait être en relation, mais cela reste à démontrer, avec une modification dans l'ionisation du site actif.

fig. 8

Inactivation thermique du système enzymatique coagulant de *P. fluorescens* LCM 28 P 12 (représentation de la loi d'Arrhénius).

Durées de chauffage : □ 10 mn ; + 30 mn ; △ 60 mn.

fig. 9

Taux d'inhibition de l'activité coagulante (mn) en fonction des durées de chauffage à différentes températures : ▲ 80° C ; ● 90° C ; ■ 100° C.

fig. 10

Courbe pH-stabilité du système enzymatique coagulant de *P. fluorescens* LCM 28 P 12.

2.5. Influence de la concentration en Ca^{++}

Comme avec l'utilisation de la présure ou d'enzymes d'origine fongique, l'augmentation de la teneur en Ca^{++} du lait entraîne une diminution du temps de coagulation (fig. 11). Le lait Spray utilisé,

fig. 11

Influence de la concentration en Ca^{++} (mg/ml) sur le temps de coagulation (mn).

fabriqué à des températures relativement basses, contient encore des quantités notables de Ca^{++} (1,54 mg/ml).

2.6. Comparaison des propriétés mécaniques des caillés présure et des caillés obtenus à l'aide des protéases de *P. fluorescens* 28 P 12

Des solutions enzymatiques contenant par ml, 2,9 μ l de présure, de marque Boll et de force 1/10 000, ou 7,5 mg d'extrait enzymatique donnent, à la température de 35° C, un temps de coagulation de 5 mn 10 s.

L'observation en continu des différentes phases de la formation de chaque coagulum est réalisée à l'aide d'un thrombélástographe (marque Thrombocord, La.r.a.). L'examen des thrombodynamogrammes, selon Frentz [20], montre qu'après des temps de coagulation identiques, le caillé réalisé à partir de l'extrait enzymatique de *P. fluorescens* acquiert plus rapidement ses propriétés mécaniques maximales, qui restent cependant plus faibles que celles du caillé présure. La rétraction du coagulum intervient donc plus tôt et les différents paramètres Ir (calculés après 30, 60, 120 et 180 mn) montrent qu'elle est plus prononcée (tab. 1).

Le coagulum ainsi réalisé est toujours moins ferme que le caillé présure et subit très rapidement l'action de la protéolyse générale.

TABLEAU 1

Paramètres thrombodynamographiques des caillés

Extrait enzymatique de <i>P. fluorescens</i> (7,5 mg/ml)	Présure (2,9 μ l/ml)	Paramètres thrombodynamo- graphiques
10,30 mm	10,30 mm	r
10 mm	11 mm	k
35,5 mm	46,75 mm	Am
55,04	87,8	$Em = \frac{100 \text{ Am}}{100 - \text{Am}}$
83 mm	145 mm	S
		Paramètres de rétraction
1,052	1,016	$Ir 30 = \frac{\text{Am}}{A 30}$
1,127	1,039	Ir 60
1,291	1,087	Ir 120
1,578	1,126	Ir 180

3. Etude de la dégradation de la caséine par électrophorèse en gel de polyacrylamide

En culture sur lait, les souches *P. fluorescens* 28 P 12 et *Cytophaga* 20 C 2, avec des populations initiales de 10 800 et 17 000 bactéries par ml, dégradent rapidement la caséine β , alors que la dénaturation de la caséine α , plus tardive, reste encore faible après 50 h d'incubation, respectivement à 20 et à 30°. Après 100 h d'incubation, nous observons la protéolyse totale des caséines β et α , avec apparition de fractions ayant une mobilité électrophorétique plus grande. La β -lactoglobuline ne semble pas être altérée par ces enzymes protéolytiques.

DISCUSSION

1. Obtention des systèmes enzymatiques protéolytiques

Les informations sur la production et les propriétés des systèmes enzymatiques protéolytiques des espèces bactériennes psychrotrophes sont fort peu nombreuses. La majorité des travaux concernent le genre *Pseudomonas*, et c'est surtout l'espèce *P. fluorescens*, isolée fréquemment de lait cru, qui est la plus étudiée.

Ces différentes recherches ne concordent pas sur le choix de la température et de la durée d'incubation qui permettent l'élaboration maximale d'enzymes protéolytiques.

Peterson *et al.* [62] trouvent que la production des enzymes de membrane (exoenzymes) est inversement proportionnelle à la température d'incubation, entre 0 et 30° C, et de nombreuses études indiquent que l'élaboration des protéases, par les bactéries psychrotrophes, est maximale aux environs de 0° C [25, 43, 54, 62]. Cependant pour d'autres chercheurs cette activité augmente avec la température : Juffs [26], en 1976, en travaillant sur les espèces *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* observe que l'activité protéolytique par cellule, la plus intense, est obtenue après 7 j de culture, à 20° C, et qu'elle diminue avec des incubations à 10° C et à 5° C ; cette constatation confirme les travaux plus anciens de Vanderzant et Moore [72], Sanvik et Fossum [64], Hurley *et al.* [23].

Dans notre étude, l'activité maximale se manifeste en phase stationnaire de croissance à 20° C pour *P. fluorescens* et à 30° C pour *Cytophaga*. Nous n'avons pu mettre en évidence, comme Peterson *et al.* [62], en plus des exoprotéines périplasmiques, la présence d'enzymes intracellulaires, mais il est certain que ces deux systèmes coexistent dans nos extraits enzymatiques obtenus après 5 j de culture.

La plupart des chercheurs arrêtent le développement bactérien lorsque l'activité protéolytique, par ml de substrat, atteint un maximum, d'où des durées d'incubation s'échelonnant entre 2 et 11

jours [1, 71], variables selon la composition du milieu, la température et le taux d'ensemencement choisis. Le système enzymatique de *P. fluorescens* LCM 28 P 12 est extrait après 120 h d'incubation à 20° C, barème également retenu par Adams *et al.* [1].

Le pourcentage de saturation en $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ utilisé lors de l'extraction du système enzymatique, varie aussi très largement ; d'une manière générale la majorité des chercheurs ayant travaillé avec *P. fluorescens* dépassent rarement 65 p. 100 de saturation : 50 p. 100 pour Adams [1], 55 p. 100 pour Mayerhoffer [49], 65 p. 100 pour Barach *et al.* [7] et White *et al.* [73], 70 p. 100 pour Malik [44]. Seuls Hurley *et al.* [23] récupèrent les fractions jusqu'à 85 p. 100 de saturation. Dans nos essais, la quasi-totalité de l'activité enzymatique est concentrée dans la fraction 0-50 p. 100.

2. Activité protéolytique

Les résultats des études précédentes ne permettent pas de définir avec précision les propriétés particulières du système enzymatique protéolytique de l'espèce *P. fluorescens*, car de nombreux paramètres interviennent, certains inhérents à la souche, d'autres dépendant des conditions de production et d'obtention des enzymes, ainsi que des protocoles utilisés lors de la détermination de l'activité protéolytique.

En ce qui concerne la température optimale d'activité enzymatique de l'espèce *P. fluorescens*, de 42 à 43° C dans notre étude, elle est de 45° C [1, 44] ou atteint même 50° C [58]. La mesure de cette température est étroitement liée au pH du substrat et à la durée de la réaction enzymatique et il n'est donc pas étonnant de noter ces différences.

Le système enzymatique de *Cytophaga* 20 C 2 et surtout celui de *P. fluorescens* 28 P 12 sont très thermosensibles, et ce dernier est rapidement inactivé à des températures inférieures ou égales à 50° C. Adams [1] constate également que l'activité des protéases de *P. fluorescens* décroît rapidement au-dessus de 45° C et s'annule à 55° C. Cependant de nombreux chercheurs rapportent des activités résiduelles notables après des traitements thermiques sévères tels que la pasteurisation [45, 61, 64] ou même la stérilisation U.H.T. (tab. 2). C'est ainsi que le système enzymatique de l'espèce *P. fluorescens* MC 60 de Barach *et al.* [6], inactivé à un taux de 24,4 p. 100 à 149° C pendant 10 s, est détruit à plus de 97,8 p. 100 après seulement 10 mn de maintien à 55° C. Speck et Adams [66] pensent que les mécanismes d'altération de l'activité protéolytique qui interviennent aux températures comprises entre 50 et 60° C, non élucidés, sont différents d'une action thermique.

Les écarts dans les pH optima des réactions enzymatiques sont plus restreints, car ils sont généralement compris entre pH 7 et pH 8 [27], résultat qui concorde avec celui de notre étude. Les pro-

TABLEAU 2. — Résistance thermique des protéases des bactéries psychrotrophes

Références bibliographiques	Sources
PETERSON, GUNDERSON (1960) [62] SANDVIK, FOSSUM (1963) [64] HURLEY, GARDNER, VANDERZANT (1963) [23] Mc CASKEY (1967) [43]	<i>P. fluorescens</i> <i>Pseudomonas</i> species <i>P. fluorescens</i> Filtrats acellulaires de Psychrotrophes (<i>P. fluorescens</i> , <i>P. punctatum</i>)
KIELWEIN, JOHNE, GERLACH (1969) [31] KISHONTI, SJÖSTRÖM (1970) [32]	Genres <i>Pseudomonas</i> et <i>Aeromonas</i> 60 souches de Psychrotrophes <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Alcaligenes</i> , <i>Aerobacter</i> <i>P. fluorescens</i> P. 26 Psychrotrophes Psychrophiles <i>P. fluorescens</i>
MAYERHOFER (1971) [47] THOMAS, DRUCE (1971) [69] MAYERHOFER, LU, MARSHALL, WHITE (1971) [48] KNAUT, MECH (1972) [37]	<i>P. fluorescens</i> P. 26 Psychrotrophes <i>P. fluorescens</i> P. 26
WHITE, MARSHALL (1973) [73] CHENG, GELDA (1973) [11] MAYERHOFER, MARSHALL, WHITE, LU (1973) [49]	<i>P. fluorescens</i> P. 26 Psychrotrophes <i>P. fluorescens</i> P. 26
BERGTSSON, GARDHAGE, ISAKSSON (1973) [8] MALIK, SWANSON (1974) [45] MALIK, SWANSON (1975) [46] KISHONTI (1975) [32]	<i>Pseudomonas</i> spp Psychrotrophes (<i>Pseudomonas</i>) <i>P. fluorescens</i> (3 souches) Majorité de <i>Ps. spp</i> (60 cultures)
ADAMS, BARACH, SPECK (1975) [1]	<i>Pseudomonas</i> (10 souches) Souche <i>P. fluorescens</i> MC 60 Flore psychrotrophe totale lait cru <i>P. fluorescens</i> MC 60
BARACH, ADAMS, SPECK (1975) [6] MALIK (1976) [44] COUSINS, SHARPE, LAW (1977) [16]	<i>P. fluorescens</i> <i>P. fluorescens</i>

téases possèdent encore une stabilité résiduelle importante, supérieure à 85 p. 100, lorsqu'elles sont placées, pendant 2 h à 21° C, dans des tampons qui couvrent la gamme de pH entre 5 et 10 [7].

Les systèmes protéolytiques de *P. fluorescens* 28 P 12 et de *Cytophaga* 20 C 2 semblent particulièrement bien adaptés au lait, puisqu'ils montrent une très bonne activité (environ 90 p. 100 d'acti-

Résistances thermiques des protéases

Inactivation 100° C - 10 mn.

Résistent à la pasteurisation.

Inactivation filtrat acellulaire : 28 mn - 50° C, 40 s - 60° C, 20 s - 70° C.

Pas inactivation totale à 62,8° C - 82 mn.

Résistent à un traitement U.H.T.

90° C - 2 mn : perte de ≤ 75 p. 100 activité initiale.

130° C - 5 à 10 mn, perte de 99 p. 100 activité initiale.

71,4° C - 8,5 h, inactivation enzyme non purifiée.

100° C - 20 mn, inactivation totale.

Stabilité à la chaleur : 71,4° C - 8,5 h.

63° C - 30 mn, inactivation faible.

75° C - 10 mn, inactivation 50 p. 100.

85° C : 5 mn inactivation 70 p. 100.

100° C - 5 mn, inactivation totale.

71,4° C - 30 mn, conservation 71 p. 100 activité initiale.

Résistent partiellement à 136,7° C - 8 s dans la crème à 10 p. 100.

149° C = 90 s ; 120° C - 9 mn $\rightarrow$ perte 90 p. 100 activité.

Inactivation totale en 15 h à 62,8° C ; 8 h à 71,4° C ; 9 mn à 121° C ; après 71,4° C - 30 mn, conservation 71 p. 100 activité.

Résistent partiellement au traitement U.H.T.

Résistent partiellement à 135° C - 3,5 mn.

Résistent à 132° C - 110 s.

90° C - 20 mn ou 63° C - 30 mn, gardent 75 p. 100 activité initiale.

120° C - 5 mn, conservation 20 p. 100 activité.

149° C = 90 s ; z = 32,5° C.

49° C - 4 s, inactivation < 10 p. 100 activité initiale.

Survie à 149° C - 10 s.

5° C - 10 mn, inactivation 90 p. 100 (en solution tampon).

5° C - 60 mn, inactivation 96,8 p. 100 ou 70 p. 100 (lait stérile).

Résistent à 132° C - 110 s, conservent 44 p. 100 de leur activité après 100° C - 10 mn.

Résistent à 140° C - 3,5 s.

tivité résiduelle) entre pH 6,4 et 6,6, et pour des concentrations en caséine supérieures ou égales à 2 p. 100.

3. Activité coagulante

Si les travaux de De Beukelar *et al.* [18] montrent que la caséine γ n'est pas affectée lors de la protéolyse des fractions α et β , différentes

études mentionnent la dégradation de ce colloïde protecteur, donc la coagulation de la caséine par certaines souches psychrotrophes [45], appartenant aux genres *Flavobacterium* et *Aerobacter* [33, 34], *Pseudomonas* [8], et plus particulièrement aux espèces *P. aeruginosa* [25, 55] et *P. fluorescens* [1, 8, 16, 25, 40, 73].

Lors de cultures sur lait écrémé reconstitué, additionné de Ca^{++} , nous observons, après 24 h d'incubation à 25° C, chez *P. fluorescens* et plus tardivement chez *Cytophaga*, la coagulation du substrat et sa protéolyse non spécifique en surface. Nous avons défini certaines propriétés particulières du système enzymatique coagulant de *P. fluorescens*, telles qu'une inactivation rapide pour des températures relativement basses (46° C), une thermorésistance cependant élevée puisque la dénaturation totale n'intervient à 100° C que pour des durées de chauffage supérieures à 1 h, et une très grande stabilité, puisqu'il conserve plus de 90 p. 100 d'activité entre pH 5 et pH 8,5.

L'étude au thrombélastographe de la formation du coagulum à 35° C, montre que le caillé obtenu par l'action des protéases de *P. fluorescens* acquiert, par rapport au caillé présure, des propriétés mécaniques plus faibles qui diminuent très rapidement en raison d'une activité protéolytique générale intense.

Juffs [25] a utilisé les protéases d'une souche de *P. fluorescens* en fromagerie, mais l'emploi de ces enzymes comme succédané de la présure ne semble pas devoir être retenu, car même une addition à la présure de la protéase de *P. fluorescens*, en très faibles proportions (2 à 17 p. 100), ne permet pas d'obtenir des résultats très concluants [25].

4. Etude électrophorétique de la dégradation de la caséine

Le développement des espèces bactériennes caséolytiques, dans le lait, provoque des altérations physicochimiques de la structure des caséines. Les bactéries psychrotrophes dégradent, à des degrés divers, les caséines α_s et β [12, 14, 17, 33, 46, 74] et l'espèce *P. fluorescens* protéolyse la caséine β plus fortement que la caséine α [3, 18, 34, 40, 56, 63]. C'est ainsi que l'examen électrophorétique d'une culture sur lait de *P. fluorescens* montre la disparition de la fraction β après seulement 24 h d'incubation, tandis que la libération des composés mobiles x et y, issus de la dégradation de la caséine α_s , n'apparaît qu'après 48 h, suivie de la protéolyse générale des différentes fractions [36]. En ce qui concerne les protéines du sérum, De Beukelar *et al.* [18] et Cousin *et al.* [15] ne constatent aucune modification, mais Lindqvist *et al.* [41] signalent, après un stockage de 24 h à 4° C, une dénaturation complète des pseudoglobulines et des sérum-albumines et une attaque préférentielle de deux fractions de protéose-peptone plus vulnérables [65]. Kielwein [30] observe que les enzymes protéolytiques de *P. fluorescens* hydrolysent la caséine α_s et la β -lactoglobuline.

CONCLUSION

Les systèmes enzymatiques protéolytiques et coagulants des deux souches étudiées, *P. fluorescens* LCM 28 P 12 et *Cytophaga* LCM 20 C 2 sont particulièrement bien adaptés au lait, puisqu'ils possèdent des activités maxima pour des concentrations en caséine supérieures ou égales à 2 p. 100 à des pH proches de la neutralité. Ces protéases sont encore actives aux températures de réfrigération généralement adoptées à la ferme pour le stockage du lait cru. Avec des laits fortement contaminés, traités et conservés dans de mauvaises conditions d'hygiène, ou avec des cultures expérimentales de bactéries psychrotrophes caséolytiques, la protéolyse de la caséine provoque des modifications indésirables du lait qui sont à l'origine de certaines anomalies de maturation des fromages. Cousin et Marth [12] et Babel [5] observent une diminution du temps de prise en relation avec la prolifération de certaines espèces psychrotrophes, dont les protéases, douées d'activité coagulante, altèrent la structure de la caséine χ , facilitant ainsi l'action ultérieure de la présure, et un tel lait peut coaguler pendant un traitement U.H.T. [2]. L'activité des protéases augmente la teneur en fractions azotées solubles du lait cru [59, 75], confère au coagulum des propriétés rhéologiques médiocres, telles qu'un manque de fermeté [10, 60, 68], une synérèse insuffisante [59], une protéolyse générale intense du caillé [13] qui se traduit par l'apparition d'odeurs désagréables, de goûts amers [1, 4, 19, 47, 65] et une diminution des rendements fromagers.

Les niveaux de population associés aux défauts de flaveur varient selon les genres et selon les espèces d'un même genre, mais il convient de souligner qu'ils sont généralement compris entre 1.10^6 et 1.10^8 bactéries par ml. Pour des laits jugés de qualité insatisfaisante sur le plan bactériologique, de telles modifications dans la structure physico-chimique peuvent être observées, à des degrés divers, mais pour des laits correctement stockés pendant 48 h entre 3 et 4° C, et contenant entre 1.10^4 et 1.10^5 bactéries par ml, aucune altération n'est décelée.

Résumé

Les systèmes enzymatiques protéolytiques bruts de deux souches psychrotrophes, *P. fluorescens* et *Cytophaga*, isolées de laits crus réfrigérés, sont caractérisés. L'extraction au $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$, à 50 p. 100 de saturation, permet de récupérer la totalité de l'activité enzymatique. En utilisant la caséine à 2 p. 100 comme substrat, les deux extraits enzymatiques donnent des réponses sensiblement identiques : température optimale d'activité comprise entre 42 et 44° C, thermostabilité très importante pour des températures supérieures à 45° C,

activités non négligeables aux températures de réfrigération et pH optima, à 42° C, compris entre pH 7 et 7,5.

Sur lait, ces protéases dégradent rapidement la caséine β , puis plus tardivement la caséine α . Une activité coagulante est mise en évidence pour ces deux extraits, mais la dénaturation de la caséine γ par *Cytophaga* étant très faible, son étude n'est pas poursuivie. Le système enzymatique coagulant de *P. fluorescens* présente une thermolabilité importante pour des températures proches de 46° C, mais n'est totalement inactivé qu'après 1 h de chauffage à 100° C ; il est stable entre pH 6,5 et 7,5. Comparativement au caillé présure, le coagulum obtenu avec l'extrait enzymatique de *P. fluorescens* est moins ferme et est rapidement le siège d'une protéolyse générale intense.

Summary

The crude proteolytic enzymatic systems of two psychrotrophic strains, *P. fluorescens* and *Cytophaga*, isolated from refrigerated raw milks, were characterized.

Extraction with $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, at 50 p. 100 saturation, allowed the recovery of the whole of the enzymatic activity. By the use of casein substrate (2 p. 100), both enzymatic extracts gave almost identical results: the optimal temperature for the enzymatic activity was between 42° C and 44° C, thermolability was very high at temperatures above 45° C, lower activities remained at refrigeration temperatures, optimum pH activity was between pH 7 and 7.5, at a temperature of 42° C.

In milk, these proteases quickly degraded the β -casein and later the α -casein. Clotting activity was noted in the case of both extracts, but because the proteolysis of γ -casein by *Cytophaga* was very weak, this study was not continued. The clotting enzymatic system of *P. fluorescens* was characterized by a significant degree of thermolability at temperatures around 46° C, by complete inactivation after 1 hour's heating at 100° C and by its optimum stability between pH 6.5 and 7.5. Compared with rennet-curd, the coagulum obtained with the enzymatic extract of *P. fluorescens* was less firm and more quickly and deeply proteolyzed.

Bibliographie

- [1] ADAMS (D. M.), BARACH (J. T.), SPECK (M. L.) (1975). — *J. Dairy Sci.*, 58, 6, 828-834.
- [2] ADAMS (D. M.), BARACH (J. T.), SPECK (M. L.) (1976). — *J. Dairy Sci.*, 59, 5, 823-827.
- [3] ANNIBALDI (S.) (1962). — *XVI^e Congr. Int. Lait.*, 13, 545-556.
- [4] ATHERTON (H. V.), DOAN (F. J.), WATROUS (G. H. Jr.) (1953). — *J. Dairy Sci.*, 36, 6, 570, abstr. M 42.

- [5] BABEL (F. J.) (1953). — *J. Dairy Sci.*, 36, 6, 562, abstr. M 12.
- [6] BARACH (J. T.), ADAMS (D. M.), SPECK (M. L.) (1976). — *J. Dairy Sci.*, 59, 3, 391-395.
- [7] BARACH (J. T.), ADAMS (D. M.), SPECK (M. L.) (1976). — *Appl. and environmental Microbiol.*, 31, 6, 875-879.
- [8] BENGTSOON (K.), GARDHAGE (L.), ISAKSSON (B.) (1973). — *Milchwissenschaft*, 28, 8, 495-499.
- [9] BERRIDGE (N. J.) (1945). — *Biochem. J.*, 39, 179-186.
- [10] CHAPMAN (H. R.), SHARPE (M. E.), LAW (B. A.) (1976). — *Dairy Ind.*, 41, 2, 42-45.
- [11] CHENG (W. S.), GELDA (C. S.) (1973). — *J. Dairy Sci.*, 56, 5, 625, abstr. M 16.
- [12] COUSIN (M. A.), MARTH (E. H.) (1977). — *J. Dairy Sci.*, 60, 7, 1042-1047.
- [13] COUSIN (M. A.), MARTH (E. H.) (1977). — *J. Dairy Sci.*, 60, 7, 1048-1056.
- [14] COUSIN (M. A.), MARTH (E. H.) (1977). — *J. Dairy Sci.*, 60, suppl. 1, 34, abstr. D. 3.
- [15] COUSIN (M. A.), MARTH (E. H.) (1977). — *J. Dairy Sci.*, 60, suppl. 1, 34, abstr. D. 2.
- [16] COUSINS (C. M.), SHARPE (M. E.), LAW (B. A.) (1977). — *Dairy Ind.*, 42, 7, 12-17.
- [17] DE BEUKELAR (N. J.), BRADLEY (R. L.), MARTH (E. H.) (1975). — *J. Dairy Sci.*, 58, 5, 785, abstr. DFR 6.
- [18] DE BEUKELAR (N. J.), COUSIN (M. A.), BRADLEY (R. L.), MARTH (E. H.) (1977). — *J. Dairy Sci.*, 60, 6, 857-861.
- [19] ERDMAN (I. E.), THORNTON (H. R.) (1951). — *Can. J. Techn.*, 29, 232-237.
- [20] FRENTZ (R.) (1965). — *Le Lait*, 45, 447, 489-508.
- [21] GAVINI (F.), LECLERC (H.) (1975). — *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, 37-38, 17-67.
- [22] HOSHINO (M.) (1973). — *J. Jap. Soc. Fd Nutrit.*, 26, 4, 233-238.
- [23] HURLEY (W. C.), GARDNER (F. A.), VANDERZANT (C.) (1963). — *J. Fd Sci.*, 28, 47-54.
- [24] JENNESS (R.), KOOPS (J.) (1962). — *Neth. Milk Dairy J.*, 16, 153-164.
- [25] JUFFS (H. S.) (1974). — *Aust. J. Dairy Techn.*, 29, 2, 74-78.
- [26] JUFFS (H. S.) (1976). — *J. Appl. Bact.*, 40, 1, 23-32.
- [27] JUFFS (H. S.), DOELLE (H. W.) (1968). — *J. Dairy Res.*, 35, 3, 395-398.
- [28] JUFFS (H. S.), HAYWARD (A. C.), DOELLE (H. W.) (1968). — *J. Dairy Res.*, 35, 3, 385-393.
- [29] JUFFS (H. S.), MADSEN (O.) (1974). — *Aust. J. Dairy Techn.*, 29, 2, 99-100.
- [30] KIELWEIN (G.) (1975). — *Milchwissenschaft*, 30, 10, 605-606.
- [31] KIELWEIN (G.), JOHNE (H.), GERLACH (R.) (1969). — *Archiv Lebensmittel-Hyg.*, 20, 3, 55-61.
- [32] KISHONTI (E.), SJÖSTRÖM (G.) (1970). — *XVIII^e Congr. Int. Lait.*, 1 F, 516.
- [33] KIURU (K.), EKLUND (E.) (1970). — *Karjantuote*, 53, 4, 124-126, Anal.: *Dairy Sci. Abstr.*, 32, 9, 572, abstr. 3816.
- [34] KIURU (K.), EKLUND (E.), GYLLENBERG (H.), ANTILA (M.) (1971). — *Milchwissenschaft*, 26, 3, 138-141 und *XVIII^e Congr. Int. Lait.*, 1 F, 111 (1970).
- [35] KNAUT (T.) (1967). — *Milchwissenschaft*, 22, 5, 289-292.
- [36] KNAUT (T.), BRUDERER (G.) (1965). — *Milchwissenschaft*, 20, 6, 316-318.
- [37] KNAUT (T.), MECH (H.) (1972). — *Milchwissenschaft*, 27, 3, 167-170.
- [38] KOZLOVA (L. A.) (1974). — *Anal.: Dairy Sci. Abstr.*, 38, 7, 467, abstr. 4393.

- [39] LACROSSE (R.) (1966). — *Milchwissenschaft*, 21, 5, 278-279.
- [40] LAW (B. A.), ANDREWS (A. T.), SHARPE (M. E.) (1977). — *J. Dairy Res.*, 44, 1, 145-148.
- [41] LINDQVIST (B.), STOGARDS (T.) (1966). — *XVII^e Congr. Int. Lait.*, A, 297-300.
- [42] LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.), RANDALL (R. L.) (1951). — *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- [43] MC CASKEY (T. A.) (1967). — *Diss. Abstr. Sect.*, B 27, 11, 4046.
- [44] MALIK (A. C.) (1976). — *Dissert. Abstr. Int.*, B 36, 11, 5499-5500.
- [45] MALIK (A. C.), SWANSON (A. M.) (1974). — *J. Dairy Sci.*, 57, 591, abstr. M 54.
- [46] MALIK (A. C.), SWANSON (A. M.) (1975). — *J. Dairy Sci.*, 58, 5, 795, DFR 42.
- [47] MAYERHOFER (H. J.) (1971). — *Dissert. Abstr. Int.*, B 31, 10, 6158.
- [48] MAYERHOFER (H. J.), LU (M.), MARSHALL (R. T.), WHITE (C. H.) (1971). — *J. Dairy Sci.*, 54, 5, 763, abstr. M 72.
- [49] MAYERHOFER (H. J.), MARSHALL (R. T.), WHITE (C. H.), LU (M.) (1973). — *Appl. Microbiol.*, 25, 1, 44-48.
- [50] MIKAWA (K.), HOSHINO (T.) (1973). — *Jap. J. Dairy Sci.*, 22, 5, A 176 - A 186.
- [51] MILLER (I.), KANDLER (O.) (1967). — *Milchwissenschaft*, 22, 7, 435-439.
- [52] MILLIÈRE (J. B.) (1978). — Thèse de Docteur-Ing., Université Nancy I.
- [53] MILLIÈRE (J. B.), VEILLET-PONCET (L.) (1979). — *Le Lait*, 49, 581-582, 56-78.
- [54] MOCQUOT (G.), AUCLAIR (J.) (1967). — *Rev. Lait. Franç.*, 239, 21-25.
- [55] MORIHARA (K.) (1963). — *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 113-124.
- [56] MURTHY (L.), HERREID (E. O.), Mc WHITNEY (L. R.) (1958). — *J. Dairy Sci.*, 41, 10, 1324-1341.
- [57] NAKANISHI (T.), TANABE (T.) (1970). — *Jap. J. Dairy Sci.*, 19, 3, A 75 - A 87.
- [58] NEWTON (S. B.) (1965). — *Dissert. Abstr.*, 26, 1, 374.
- [59] O'LEARY (J.), HICKS (C. L.), BUCY (J.) (1977). — *J. Dairy Sci.*, 60, suppl. 1, 55, abstr. D 51.
- [60] PELTOLA (E.), VOGT (P.) (1959). — *XV^e Congr. Int. Lait.*, 1, 268-271.
- [61] PERRON-LAPIED (L.), ODET (G.) (1968). — *Rev. Lait. Franç.*, 256, 439-441.
- [62] PETERSON (A. C.), GUNDERSON (M. F.) (1960). — *Appl. Microbiol.*, 8, 98-104.
- [63] PÜRSCHEL (M.), POLLACK (C.) (1972). — *Nahrung*, 16, 5, 451-459.
- [64] SANDVIK (O.), FOSSUM (K.) (1963). — *Meieriposten*, 52, 28, 639-645.
- [65] SKEAN (J. D.), OVERCAST (W. W.) (1960). — *Appl. Microbiol.*, 8, 335-338.
- [66] SPECK (M. L.), ADAMS (D. M.) (1976). — *J. Dairy Sci.*, 59, 4, 786-789.
- [67] STORGARDS (T.), LINDQVIST (B.) (1962). — *XVI^e Congr. Int. Lait.*, A, 793-798.
- [68] SWARTLING (P.) (1966). — *Fed. Int. Lait.*, Munich, 3, doc. 35, 18 p.
- [69] THOMAS (S. B.), DRUCE (R. G.) (1971). — *Dairy Ind.*, 36, 2, 145-150.
- [70] THOMAS (S. B.), THOMAS (B. F.) (1973). — *Dairy Ind.*, 38, 1, 11-15, part 1, 38, 2, 61-70, part 2.
- [71] VAN DER ZANT (W. C.) (1957). — *Fd Res.*, 22, 2, 151-157.
- [72] VAN DER ZANT (W. C.), MOORE (A. V.) (1955). — *J. Dairy Sci.*, 38, 7, 743-750.
- [73] WHITE (C. H.), MARSHALL (R. T.) (1973). — *J. Dairy Sci.*, 56, 7, 849-853.
- [74] YANAGIYA (T.), MIKAMI (M.), MIURA (H.) (1973). — *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 47, 4, 259-266.
- [75] YOUSSEF (A. M.), SALAMA (F. A.), EL-DEEB (S. A.) (1975). — *Egyptian J. Dairy Sci.*, 3, 2, 113-122.