Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles

Rôle au cours de l'affinage des fromages

par

M. J. DESMAZEAUD et L. VASSAL

*Laboratoire de Microbiologie Laitière et de Génie Alimentaire, I.N.R.A.
et Laboratoire de Biochimie et Technologie Laitières, I.N.R.A.
F 78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

La dégradation progressive des protéines du caillé constitue le phénomène majeur de l'affinage des fromages entraînant l'assouplissement de la pâte et son changement d'aspect. Par les peptides et les acides aminés produits elle participe au développement de la saveur et de l'arôme ou de leurs précurseurs (Schörmuller, 1968 ; Jacquet et Lenoir, 1969). Il est désormais bien établi que cette protéolyse résulte à la fois de l'action de la présure et de celle des enzymes microbiennes (Visser, 1977 ; O'Keeffe, 1978 ; Desmazeaud et Gripon, 1977) comme il a été montré dans ces études grâce à la technique des caillés aseptiques ou à flore contrôlée. En particulier il est apparu qu'une souche de *Streptococcus lactis* libérait dans ces caillés principalement des acides aminés et des peptides de bas poids moléculaire (Desmazeaud *et al.*, 1976) alors que la présure était responsable de la formation de peptides de haut poids moléculaire (Gripon *et al.*, 1975). Parallèlement, O'Keeffe *et al.* (1976, 1978) étudiant la maturation du Cheddar et Kleter (1967), Visser (1977) et Visser et de Groot-Mostert (1977) étudiant l'affinage du Gouda arrivèrent à la même conclusion. Ceci peut donc traduire l'existence chez les bactéries lactiques d'activités de type exopeptidase actives au cours de l'affinage des fromages et dans une moindre mesure la présence d'endopeptidases d'activité plus faible. En effet, plusieurs auteurs ont décrit la présence de protéinases et de peptidases chez les bactéries lactiques [revues bibliographiques de Castberg et Morris (1976) et Schmidt *et al.* (1976)] ; Desmazeaud et Zévaco (1976, 1977). Par contre, peu de travaux ont été consacrés

à l'étude de la libération des enzymes microbiennes elles-mêmes dans les caillés. En particulier, Law *et al.* (1974) ont décrit la libération d'une dipeptidase intracellulaire de *S. cremoris* au cours de l'affinage du fromage de Cheddar. Il apparaît donc que la connaissance des enzymes protéolytiques bactériennes réellement actives dans les caillés et celle de leurs propriétés peut revêtir une importance fondamentale dans le choix des levains appropriés à la fabrication des fromages, compte tenu des facteurs technologiques.

C'est pourquoi cet article traite de la caractérisation générale des activités peptidasiques intracellulaires de souches de streptocoques lactiques mésophiles et décrit l'évolution de la fraction azotée et la recherche d'activités protéolytiques et exopeptidasiques dans des fabrications expérimentales de fromages à pâte pressée effectuées avec des souches pures.

MATERIEL ET METHODES

I. Micro-organismes

Les différentes souches utilisées dans ce travail sont *S. lactis* CNRZ 29, CNRZ 261, CNRZ 272, NCDO 700 et ML 8, *S. cremoris* HP et AM 2, *S. diacetylactis* CNRZ 258 et CNRZ 267. Elles étaient maintenues par repiquage sur lait écrémé stérile et conservées par congélation à -30°C .

II. Caractérisation des activités protéolytiques des extraits bactériens

1. Conditions de culture et préparation des extraits cellulaires

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des bactéries avait la composition suivante : Bacto-tryptone (Difco) 20 g ; extrait de levure (Difco) 7 g ; lactose 40 g ; tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 6,50, 1 000 ml. Il était stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

Au début de la phase stationnaire (après 16 h d'incubation à 30°C) les cellules bactériennes étaient obtenues par centrifugation à 10 000 g pendant 30 mn à partir d'une culture de 1 l pour chaque souche. Elles étaient lavées deux fois par remise en suspension dans du tampon phosphate de sodium 0,066 M à pH 6,50 suivie d'une centrifugation à 10 000 g pendant 30 mn. Elles étaient ensuite broyées dans ce même tampon par des microbilles de verre (Braun) (diamètre 0,10-0,11 mm) pendant deux fois 10 mn dans un appareil Vibrogen (Edmond Bülher, Tübingen, R.F.A.) réfrigéré à 4°C . L'extrait cellulaire entier était séparé des microbilles par filtration sous vide sur verre fritté G 2. Une fraction de cet extrait était centrifugée

à 30 000 g pendant 30 mn à 4° C, le surnageant étant seul conservé par congélation à -30° C. Il sera désigné : fraction soluble.

2. Détermination des teneurs en protéines

La concentration en protéines de l'extrait cellulaire entier et de la fraction soluble était déterminée selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) avec le réactif de Folin et Ciocalteu (Merck). La sérum-albumine bovine (Sigma) était employée comme protéine étalon.

3. Détermination de l'activité caséinolytique

L'activité caséinolytique était estimée par dosage des groupements aminés libérés à 37° C et à pH 7,0 en tampon phosphate de sodium 0,066 M en employant la caséine isoélectrique (qualité Hammersten, N.B.C.) comme substrat. Le mélange réactionnel avait la composition suivante : caséine (2 g dans 100 ml du tampon phosphate) 9 ml ; extrait enzymatique total 1 ml ; merthiolate (à une concentration finale de 0,01 p. 100). Après 24 h et 48 h d'incubation les acides aminés et les peptides libérés étaient séparés par filtration sur papier Whatman n° 42 après précipitation des protéines par l'acide trichloracétique à une concentration finale de 12 p. 100. Les groupements aminés étaient estimés par réaction de 1 ml du filtrat trichloracétique avec 1 ml du réactif à la ninhydrine selon Moore et Stein (1948). Après dilution par 8 ml d'alcool à 50 p. 100 on mesurait la variation d'absorbance à 570 nm. Des tubes témoins permettant de suivre l'évolution de la caséine seule et de l'extrait enzymatique seul étaient aussi incubés.

4. Caractérisation de l'activité aminopeptidasique

4.1. L'activité aminopeptidasique a été estimée par mesure du taux d'hydrolyse de la L-leucine-para-nitroanilide (LNA) (Sigma). Le mélange réactionnel avait la composition suivante : 0,5 ml du substrat LNA (6,4 mg en solution dans 1 ml de méthanol) ; 11 ml de tampon phosphate de sodium 0,066 M à pH 7,50 ; 1 ml d'extrait enzymatique total. Après différents intervalles de temps d'incubation à 37° C on mesurait la variation d'absorbance à 410 nm provoquée par la libération de nitroaniline de couleur jaune.

4.2. Différentes activités aminopeptidasiques ont aussi été mises en évidence après électrophorèse en gel d'acrylamide de la fraction soluble de l'extrait bactérien, en étudiant l'hydrolyse de plusieurs L-acides aminés- β -naphthylamides (X- β NA) selon la méthode de Miller et Mc Kinnon (1974). Les substrats utilisés, les conditions d'hydrolyse et de révélation des aminopeptidasés sur les gels d'électrophorèse ont été décrits par ailleurs (Desmazeaud et Jugé, 1976).

5. Mise en évidence des activités dipeptidasiques

Les activités dipeptidasiques ont été mises en évidence après électrophorèse en gel d'acrylamide de la fraction soluble de l'extrait

bactérien, en étudiant l'hydrolyse de plusieurs dipeptides selon la méthode de Lewis et Harris (1967) décrite précédemment (Desmaizeaud et Jugé, 1976).

6. Définition de l'activité spécifique

L'unité d'activité caséinolytique et d'activité aminopeptidasique est définie, respectivement, comme la variation d'une unité de densité optique à 570 nm par heure ou à 410 nm par minute d'incubation dans les conditions définies ci-dessus. L'activité spécifique est mesurée par le nombre d'unités d'activité caséinolytique ou aminopeptidasique par mg de protéines contenues dans 1 ml d'extrait.

III. Fabrication et contrôle des fromages

1. Méthode de fabrication

Pour chacune des trois souches de streptocoques (*S. lactis* NCDO 700, *S. lactis* 261, *S. diacetylactis* 267) étudiées, deux fabrications type pâte pressée de petit format ont été effectuées à 5 j d'intervalle. Pour chacune d'elles trente-six pièces de 250 g chacune ont été faites à partir de 80 l de lait pasteurisé à 72° C pendant 15 s, la teneur en matière grasse de celui-ci ayant été standardisée à 25 g/l. Après réchauffage à 32° C le lait de pH 6,6 a étéensemencé par 1,5 l de levain constitué par une culture de 20 h sur lait autoclavé de chaque souche pure. Après addition de 7,8 g de CaCl_2 /80 l lait, 16 ml de présure Boll (force 1/10500) étaient employés pour obtenir la coagulation.

Après 50 mn le caillé était découpé, brassé et lavé, après soutirage de 32 l de sérum, par addition de la même quantité d'eau. Deux brassages à 10 mn d'intervalle étaient encore effectués puis le caillé était moulé et pressé. Le démoulage était effectué 20 h après et le salage réalisé par immersion dans un bain de saumure. Le pH du fromage était alors voisin de 5,0. Les fromages étaient ensuite recouverts de paraffine et affinés à 12° C.

2. Analyses de contrôle

2.1. Mesure du pH : le pH était mesuré à l'aide d'une électrode de pénétration Ingold, directement sur les fromages.

2.2. Matière sèche : norme internationale FIL 4:1958.

2.3. Matière grasse : la matière grasse du lait a été dosée par la méthode butyrométrique Gerber.

2.4. Dosage des chlorures : les chlorures ont été dosés par la méthode de Silverman *et al.* (1959).

2.5. Dosage du calcium : le calcium a été dosé par titrage au permanganate de potassium après calcination de l'échantillon et précipitation du calcium sous forme d'oxalate.

3. *Dénombrement spécifique des streptocoques du fromage*

Le nombre de streptocoques revivifiables du fromage a été estimé d'une manière spécifique par comparaison des numérations sur milieu M 17 (Terzaghi et Sandine, 1975) de la flore totale de l'échantillon de fromage d'une part, et après addition d'autre part, d'une préparation de titre élevé en bactériophages spécifiques de la souche de streptocoque employée, selon la méthode de Robertson (1960).

IV. **Caractérisation des activités protéolytiques des extraits de fromage**

1. *Evolution de la matière azotée au cours de l'affinage*

La fraction azote total (NT) du fromage et les différentes fractions azotées correspondant à l'azote soluble à pH 4,6 (N soluble), l'azote non protéique (N-NPN) et l'azote soluble dans l'acide phosphotungstique (N-APT) ont été isolées selon les méthodes décrites précédemment (Gripon *et al.*, 1975). Le dosage de l'azote de ces fractions a été réalisé par la méthode de Koops *et al.* (1975).

2. *Fractionnement électrophorétique des caséines et des produits d'hydrolyse insolubles à pH 4,6*

La préparation des échantillons de fromage et les électrophorèses étaient réalisées selon les techniques décrites précédemment (Gripon *et al.*, 1975).

3. *Dosage de la présure restant active dans les fromages*

L'extraction de la présure active contenue dans les échantillons de fromage et son dosage ont été effectués selon la méthode de Stadhouders *et al.* (1977).

4. *Dosage de l'activité protéolytique des extraits solubles de fromages*

L'extraction de l'activité protéolytique était effectuée par broyage à 4° C, dans un mortier, de 5 g de fromage dans 20 ml de tampon phosphate M/150 à pH 7,0. Après homogénéisation le broyat était centrifugé à 25 000 g pendant 30 mn. La couche de matière grasse était éliminée et le surnageant (S1) conservé. Le précipité de protéines était lavé par 5 ml du même tampon puis après centrifugation, le surnageant (S2) réuni à l'extrait S1. L'ensemble S1 + S2 sera désigné comme « les enzymes protéolytiques de la fraction soluble » du fromage. L'activité protéolytique de ces enzymes était dosée en employant la caséine radioactive (C*₁₄) comme substrat. Celle-ci a été préparée selon la méthode de Exterkate (1975). Le mélange réactionnel avait la composition suivante : caséine marquée 20 µl ; extrait soluble de fromage 50 µl ; tampon TRIS-HCl 0,1 M pH 7,50 q.s. 150 µl. Après différents temps d'incubation à 37° C la réaction était arrêtée par addition de 30 µl de TCA à 50 p. 100. Les protéines pré-

cipitées étaient éliminées par centrifugation à 7 000 g pendant 20 mn, puis 100 µl du surnageant limpide étaient mélangés à 10 ml du liquide de scintillation de Bray. La radioactivité des peptides libérés était finalement mesurée à l'aide d'un scintillateur.

5. Dosage de l'activité aminopeptidasique des extraits solubles de fromages

L'activité aminopeptidasique a été recherchée sur l'ensemble des extraits S 1 + S 2 selon la méthode décrite ci-dessus (§ II. 4.1.) en omettant l'addition de tampon phosphate.

6. Séparation électrophorétique des peptidases des extraits solubles de fromages

Afin de diminuer la concentration en sel, les extraits soumis à l'électrophorèse ont été obtenus selon la technique décrite ci-dessus (§ IV. 4.) en remplaçant le tampon phosphate par de l'eau distillée. L'ensemble S 1 + S 2 était ensuite lyophilisé. Avant l'électrophorèse il était repris dans le tampon de migration TRIS-Acide borique à pH 8,2. La conduite de l'électrophorèse et la révélation des aminopeptidases et des dipeptidases étaient effectuées selon les techniques décrites précédemment (§ II. 4.2. et II. 5. selon Desmazeaud et Jugé, 1976).

RESULTATS

1. Activités caséinolytique et aminopeptidasique des streptocoques mésophiles

Les différentes souches de streptocoques mésophiles étudiées présentent toutes une activité caséinolytique dosable permettant leur classement après 24 h d'incubation en présence de caséine entière. En fonction des activités spécifiques obtenues, une variation de 1 à 3,5 était observée entre *S. diacetylactis* 267 souche la plus protéolytique et *S. lactis* NCDO 700 la plus faiblement caséinolytique (tab. 1).

Par contre, dans nos conditions expérimentales toutes les souches ne présentent pas d'activité aminopeptidasique dosable sur la leucine-p-nitroanilide, en particulier *S. diacetylactis* 267 et *S. lactis* 272 (tab. 1). Il est à noter également que les activités spécifiques des aminopeptidases des différentes souches entraînent un classement tout à fait différent de celles-ci par comparaison à celui obtenu avec les activités spécifiques de la caséinolyse.

2. Fractionnement électrophorétique des aminopeptidases et des dipeptidases des broyats bactériens

L'incubation des gels après électrophorèse en présence de leucine-p-nitroanilide n'a pas permis de révéler de zone active envers ce substrat pour les extraits solubles des souches ayant cette activité.

TABLEAU 1

Activité caséinolytique et activité aminopeptidasique intracellulaire
de différentes souches de streptocoques mésophiles

Souches (n° CNRZ)	Activité caséinolytique (substrat : caséine entière)	Activité aminopeptidasique (substrat : L.N.A.)
<i>S. diacetylactis</i> 267	100	0
<i>S. lactis</i> 29	70	50
<i>S. cremoris</i> HP	63	91
<i>S. lactis</i> 261	62	57
<i>S. diacetylactis</i> 258	59	17
<i>S. lactis</i> 272	52	0
<i>S. lactis</i> ML 8	51	100
<i>S. cremoris</i> AM 2	43	72
<i>S. lactis</i> NCDO 700	28	25

Les résultats sont exprimés en activités spécifiques, en prenant comme 100 p. 100 la souche la plus active.

L.N.A. = leucine-p-nitroanilide.

fig. 1

Fractionnement des activités aminopeptidasiques et dipeptidasiques
de la fraction soluble des broyats cellulaires

Substrats hydrolysés : Ala-β-na = Alanine-β-naphtylamide ; Arg-β-na = Arginine-β-naphtylamide ; Gly-β-na = Glycine-β-naphtylamide ; Leu-β-na = Leucine-β-naphtylamide ; Asp-β-na = Acide aspartique-β-naphtylamide.

PG = Phénylalanyle-Glycine ; ML = Méthionyle-Leucine ; LL = Leucyle-Leucine ; Pro-L = Prolyle-Leucine ; Lys-T = Lysyle-Tyrosine ; LT = Leucyle-Tyrosine.

Par contre, les différents substrats acide-aminé- β -naphtylamide permettent de mettre en évidence des activités aminopeptidasiques chez *S. lactis* ML 8, *S. lactis* 261, *S. lactis* 29, *S. diacetylactis* 258 et *S. cremoris* AM 2 (fig. 1). Selon les souches il apparaît une spécificité et un comportement électrophorétique différents de ces diverses enzymes. En effet, *S. lactis* 261 montre six bandes actives envers la leucine- β NA et l'alanine β NA alors que *S. lactis* ML 8 et *S. cremoris* AM 2 hydrolysent respectivement l'alanine β NA, l'arginine β NA, la glycine β NA ou l'alanine β NA, la leucine β NA, l'acide aspartique β NA. Les extraits de *S. diacetylactis* 258 et *S. lactis* 29 présentent des aminopeptidasés de plus faible mobilité électrophorétique (fig. 1), l'enzyme de cette dernière souche étant la plus spécifique n'hydrolysant que la leucine β NA et l'acide aspartique β NA.

L'incubation des gels après électrophorèse en présence de différents dipeptides révèle l'existence de plusieurs activités dipeptidasiques chez toutes les souches étudiées. Deux souches, *S. lactis* 272 et *S. diacetylactis* 267, montrent deux zones actives sur les mêmes dipeptides (fig. 1). Les autres souches ne présentent qu'une bande unique d'activité dipeptidasique celle-ci correspondant, sauf pour la souche *S. lactis* 29 à une des bandes d'activité aminopeptidasique ce qui tendrait à montrer qu'il ne s'agit pas de dipeptidasés vraies. Sauf pour la souche *S. lactis* 261 qui n'hydrolyse que la phénylalanine-glycine et la leucyl-tyrosine, toutes les autres activités dipeptidasiques sont de large spécificité. En effet, ces enzymes selon les cas sont capables d'hydrolyser des dipeptides très hydrophobes comme la méthionyle-leucine ou la phénylalanine-glycine, ou au contraire un dipeptide renfermant un résidu polaire tel que la lysyle-tyrosine ou même un dipeptide présentant un résidu prolyle NH_2 -terminal (fig. 1).

3. Evolution de la flore lactique et son rôle dans la libération des différentes formes d'azote au cours de l'affinage des fromages

Pour les fabrications en souche pure ont été retenus *S. diacetylactis* 267 présentant l'activité caséinolytique maximum, *S. lactis* NCDO 700 l'activité caséinolytique minimum et *S. lactis* 261 de comportement intermédiaire. Pour les trois souches on observait au cours des premiers jours d'affinage le maintien ou une légère augmentation du nombre de cellules vivantes par gramme de fromage, entre 10^9 et 10^{10} , puis un déclin continu (fig. 2 D). Dans tous les cas les fabrications avec *S. diacetylactis* 267 présentent le nombre le plus faible de cellules (fig. 2 D). L'évolution de l'azote soluble à pH 4,6 des fromages est très semblable pour les trois souches bien que les fabrications à *S. lactis* NCDO 700 soient moins protéolysées en général, puisque l'azote soluble ne représente que 18 p. 100 de l'azote total au lieu de 20 p. 100 pour les autres souches, en fin d'affinage (fig. 2 A). La même tendance apparaît plus nettement si l'on examine l'évolution de l'azote non protéique (fig. 2 B). L'évolution de la

fig. 2

Evolution de la flore lactique et des différentes fractions azotées des fromages

● 261 = fromages fabriqués avec *S. lactis* 261 ; □ 267 = fromages fabriqués avec *S. diacetylactis* 267 ; ○ NCDO 700 = fromages fabriqués avec *S. lactis* NCDO 700.

N soluble = azote soluble à pH 4,6 total ; NPN = azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p.100 ; N-APT = azote soluble dans l'acide phosphotungstique ; NT = azote total du fromage.

Log N/g = log nombre de cellules viables par gramme de fromage.

fraction azote soluble dans l'acide phosphotungstique, traduisant globalement la libération d'acides aminés et de certains dipeptides montre que la souche *S. diacetylactis* 267 possède dans les fromages la plus forte activité exopeptidasique (fig. 2 C).

4. Mise en évidence des activités protéolytiques au cours de l'affinage

Étudiés jusqu'à 40 j d'affinage les extraits solubles de fromage montrent la présence d'une activité caséinolytique décroissante tout au long de la maturation, dès 24 h de fabrication. Les extraits des fromages faits avec *S. diacetylactis* 267 sont les plus fortement protéolytiques. Les extraits correspondant aux fromages fabriqués avec les souches *S. lactis* NCDO 700 et *S. lactis* 261 ont des activités proches comprises entre les 2/3 et 1/4 des activités des extraits de fromages fabriqués avec *S. diacetylactis* 267 (fig. 3 A). Cette activité protéolytique doit être attribuée aux enzymes bactériennes et non à la présure puisque les analyses de contrôle ont montré qu'au cours de l'affinage la quantité de présure dosable était en moyenne de 180 µl/kg de fromage et qu'au pH 7,5 utilisé la présure est totalement inactivée.

D'autre part, les pH des différentes fabrications sont restés stables et comparables, les variations maximum des analyses individuelles ayant été comprises entre 4,93 et 5,09. Au cours de la même période les extraits secs et les teneurs en NaCl et en calcium ont présenté de faibles amplitudes de variation ne pouvant pas expliquer par elles-mêmes l'évolution de l'activité protéolytique (tab. 2). D'autre part les numérations bactériennes ont montré qu'une des fabrications avec *S. diacetylactis* 267 avait subi une attaque de phages ce qui a permis de l'éliminer de cette étude. La figure 3 B rappelle l'évolution de la flore lactique pour chaque souche au cours de la même période d'affinage, la méthode de contrôle utilisant les phages spécifiques ayant montré que les bactéries contaminantes ne représentent que 1 p. 100 ou 1 p. 1000 de la flore lactique. On doit noter qu'il n'y a pas d'évolution parallèle entre l'activité caséinolytique de l'extrait soluble des fromages et le nombre de cellules viables de streptocoques.

5. Mise en évidence des activités peptidasiques au cours de l'affinage

Il n'a pas été possible de mettre en évidence d'activité aminopeptidasique sur le substrat leucine-p-nitroanilide avec les extraits de fromages, même ceux fabriqués avec la souche *S. lactis* NCDO 700 ou *S. lactis* 261 dont les extraits cellulaires solubles renfermaient cette activité. De même, après électrophorèse aucune activité n'était révélée avec les extraits solubles de fromages si l'on employait les substrats acide aminé-β-naphtylamide. Seuls les dipeptides ont été hydrolysés par les extraits de fromage. Pour les trois souches étudiées, jusqu'à 11 j d'affinage les mêmes dipeptides étaient hydro-

TABLEAU 2. — Caractéristiques des fromages

Souche utilisée en fabrication	Age du fromage	pH	NaCl (p. 100)	Calcium (p. 100)	Extrait sec	Azote total (p. 100)	Matière grasse (p. 100)
<i>Streptococcus lactis</i> 261	Après salage	4,9	1,0	0,677	46,0	3,44	19,0
	11 j	5,0	1,7	0,653	47,0	3,47	20,0
	39 j	5,0	1,1	0,635	46,9	3,57	19,75
	68 j	5,0	1,8	0,608	46,5	3,61	20,0
<i>Streptococcus diacetylactis</i> 267	Après salage	5,0	0,8	0,644	45,6	3,56	19,0
	11 j	5,0	1,7	0,664	46,1	3,44	20,0
	39 j	4,9	1,0	0,608	44,8	3,60	19,25
	68 j	5,1	1,7	0,593	45,4	3,49	19,5
<i>Streptococcus lactis</i> NCDO 700	Après salage	5,0	0,5	0,644	45,2	3,54	18,5
	11 j	5,0	1,7	0,663	45,3	3,49	19,75
	39 j	5,0	1,4	0,634	44,4	3,71	19,5
	68 j	5,1	1,3	0,627	45,5	3,66	19,25

fig. 3

Partie A : Evolution de l'activité caséinolytique dosable dans l'extrait soluble des fromages au cours de l'affinage.

L'activité est exprimée en unités arbitraires (nombre de coups par mn dans le filtrat trichloracétique par mn d'hydrolyse) par gramme de fromage $\times 10^{-3}$.

Partie B : Evolution de la flore lactique au cours de la même période d'affinage. Log N/g ; ● 261 ; □ 267 ; ○ NCDO 700 = mêmes légendes que figure 2.

fig. 4

Mise en évidence des activités dipeptidasiques dans les extraits solubles de fromages fabriqués avec *S. lactis* 261, *S. diacetylactis* 267 et *S. lactis* NCDO 700.

lysés : la lysyle-tyrosine, phénylalanine-glycine, méthionyle-leucine et leucyle-leucine (fig. 4). Après 25 j d'affinage seules deux activités subsistaient dans les extraits de fromages avec *S. lactis* NCDO 700 (fig. 4). Il faut noter qu'en fin d'affinage dans les trois cas l'activité vis-à-vis de la leucyle-leucine a disparu ou selon les fabrications l'activité vis-à-vis de la méthionyle-leucine ou de la phénylalanine-glycine. Seule l'activité hydrolysant la lysyle-tyrosine était toujours décelable. Il semblerait que la capacité de synthèse des dipeptidases de la souche *S. lactis* 261 soit meilleure lorsqu'elle cultive dans le lait ou un caillé en cours de fabrication puisque les extraits de fromage faits avec cette souche possèdent quatre activités (fig. 4) alors que les extraits cellulaires solubles après culture sur milieu de laboratoire ne montraient que l'hydrolyse de la phénylalanyle-glycine et de la lysyle-tyrosine (fig. 1). Il faut noter qu'au cours de cette période les numérations effectuées avec les phages spécifiques montrent que les bactéries contaminantes ne représentent au plus en moyenne que 1 p. 100 de la flore lactique.

6. Evolution de la dégradation des caséines au cours de l'affinage

L'électrophorèse permet de comparer entre les fabrications l'action globale de la présure et des enzymes bactériennes sur les caséines du caillé (fig. 5). Il ne semble pas que l'activité protéolytique des souches *S. lactis* 261 et *S. lactis* NCDO 700 soit suffisamment forte pour entraîner l'apparition d'autres produits que ceux libérés par la présure responsable en particulier de l'hydrolyse de la caséine α_{s1}

fig. 5

Enregistrement densitométrique des plaques d'électrophorèse des différents fromages fabriqués avec *S. lactis* 261, *S. diacetylactis* 267 et *S. lactis* NCDO 700.

en α_{s1} I et de l'apparition de la caséine para- γ . Seule la souche *S. diacetylactis* 267 modifie partiellement la caséine résiduelle α_{s1} et son composé de dégradation par la présure α_{s1} I. En effet, les électrophorogrammes montrent un dédoublement de ces deux produits à 28 j et particulièrement après 39 j d'affinage (fig. 5). Par contre la caséine β ne semble pas modifiée au cours de la maturation.

DISCUSSION

Dans les conditions de culture utilisée à pH non contrôlé et sur milieu de laboratoire toutes les souches de streptocoques mésophiles présentent une activité caséinolytique permettant de les classer. Par contre l'activité aminopeptidasique dosée sur substrat synthétique n'est pas répartie selon le même mode. En effet, en particulier *S. diacetylactis* 267 et *S. lactis* 272 ne présentent pas d'activité aminopeptidasique dans ces conditions et le classement observé ne correspond plus à celui obtenu en utilisant l'activité caséinolytique. Nos résultats sont aussi en accord avec les études précédentes (Exterkate, 1975) ayant montré de fortes activités aminopeptidasiques chez *S. cremoris* et en particulier chez la souche HP. Ceci confirme donc la nature complexe des systèmes protéolytiques intracellulaires des streptocoques lactiques mésophiles (Castberg et Morris, 1976 ; Exterkate, 1975, 1976 a et b) et la nécessité d'utiliser différentes méthodes de dosage pour décrire de manière satisfaisante leur activité protéolytique réelle. Comme pour l'espèce *S. thermophilus* (Desmazeaud et Jugé, 1976) la méthode électrophorétique de Miller et McKinnon (1974) permet de révéler la présence de plusieurs types d'aminopeptidases intracellulaires. En effet il existe une grande variabilité de spécificité d'action vis-à-vis des substrats, du nombre de bandes actives ou des mobilités électrophorétiques non seulement selon les espèces mais aussi selon les souches. Cependant cette méthode n'a pas permis de mettre en évidence d'activité aminopeptidasique sur les substrats de type acide aminé β -naphtylamide pour certaines souches (*S. lactis* NCDO 700 ou *S. cremoris* HP) pourtant actives sur la leucine-p-nitroanilide. En conclusion, compte tenu du fait qu'après électrophorèse aucune activité aminopeptidasique n'est révélée avec la leucine-p-nitroanilide la présence de plusieurs groupes d'aminopeptidases de stabilité différente peut être supposée. En conséquence, la LNA ne semblerait pas être un substrat universel de détection de ce type d'enzyme. Par contre, la méthode électrophorétique de Lewis et Harris (1967) permet de révéler pour toutes les souches de streptocoques lactiques mésophiles étudiées des activités dipeptidasiques. Nos résultats sont en accord avec ceux de Mou *et al.* (1975) qui ont montré chez certaines souches de *S. diacetylactis* et *S. cremoris* la présence d'une prolyle-dipeptidase (EC.3.4.13.8) et d'une leucine aminopeptidase (EC.3.4.11.1) et avec ceux de Sørhaug et Solberg (1973) qui

montraient après séparation électrophorétique la nature complexe du système dipeptidasique de certaines souches de *S. lactis*.

L'influence de la variabilité, selon les souches, des différentes activités caséinolytiques est retrouvée lors des fabrications fromagères expérimentales. En effet, *S. lactis* NCDO 700 — dont le broyat cellulaire présentait la plus faible activité caséinolytique — produit les fromages les moins affinés quelles que soient les fractions azotées solubles examinées, au contraire de *S. diacetylactis* 267 qui entraîne dans les fromages une hydrolyse plus prononcée des caséines, visible par électrophorèse. Ces résultats sont en accord avec ceux de Visser (1977) qui démontre que le choix de la souche de levain utilisée pour des fabrications de Gouda influence fortement la libération de la fraction azotée renfermant les acides aminés et dans une moindre mesure la production d'azote soluble.

Les plus fortes concentrations d'activités caséinolytiques et exopeptidasiques sont notées au premier jour de l'affinage et décroissent ensuite. Par contre, le nombre de bactéries vivantes n'évolue pas au cours des 10 ou 20 premiers jours. Ce résultat diffère partiellement des observations de Law *et al.* (1974) qui notaient dans des fabrications de Cheddar une augmentation d'une activité dipeptidasique entre 10 et 20 j d'affinage. Cependant dans ces fromages il était observé dès le premier jour une diminution du nombre des bactéries vivantes. Parallèlement on observe que c'est dans les fromages les moins affinés (fabrications avec *S. lactis* NCDO 700) que certaines des activités dipeptidasiques disparaissent également le plus rapidement. Ceci peut indiquer l'importance des propriétés de stabilité des enzymes sur leur rôle au cours de l'affinage des caillés. De plus, le fait que l'on n'ait pas pu mettre en évidence d'activités aminopeptidasiques sur les extraits de fromage, s'explique aussi par l'instabilité de ces enzymes au pH du caillé, alors que la dipeptidase et dans une moindre mesure la protéase, présentent une stabilité supérieure à pH 5 ou 5,5 (Desmazeaud et Zévaco, 1976, 1977, 1979).

En conclusion, si le rôle synergique de la présure restant active dans les caillés et celui des levains n'est plus à démontrer (Desmazeaud et Gripon, 1977), il importe d'attacher une plus grande attention au choix des souches des levains lactiques. En effet, il conviendrait de choisir celles-ci non seulement sur leur aptitude à la production d'acide lactique et leur résistance aux phages mais également en tenant compte de la variabilité de certaines de leurs autres propriétés métaboliques, telles que l'aptitude à la protéolyse, puisque celle-ci peut avoir un rôle très important au cours de l'affinage des fromages (Kleter, 1977). De tels critères ont déjà été pris en considération pour le choix des cultures utilisées par certaines fromageries suisses pour la fabrication de fromages d'Emmental (Steffen, 1977).

En particulier, ces expériences permettent de montrer que la mesure de la protéolyse globale de la caséine par le broyat cellulaire

peut être un critère valable du rôle de la souche au cours de la protéolyse du caillé. Les tests simples de dégustation (non reportés dans ce travail) que nous avons effectués sur les fromages en fin de maturation indiquaient d'ailleurs une pâte plus molle pour les fabrications comportant *S. diacetylactis* 267, souche la plus protéolytique.

Remerciements

Nous remercions vivement Mme Odile Charberet et Mlle Edith Fracchia qui ont participé à ce travail en tant que stagiaires au Laboratoire de Microbiologie Laitière et de Génie Alimentaire, ainsi que Mlle Hélène Foyen et M. Grataudoux pour leur collaboration technique et MM. Pitel et Le Gouar pour les fabrications fromagères.

Résumé

Le système protéolytique intracellulaire de neuf souches de streptocoques lactiques mésophiles a été étudié en comparant leur activité sur la caséine entière et la leucine-p-nitroanilide comme substrats, et en effectuant un fractionnement électrophorétique des exopeptidases à partir des extraits solubles des broyats cellulaires.

Trois souches ont été utilisées pour des fabrications fromagères afin de connaître leur rôle respectif dans la dégradation des protéines au cours de l'affinage. *Streptococcus diacetylactis* 267 libérait des activités exopeptidasique et protéolytique dans les fromages, supérieures à celles de *Streptococcus lactis* 261 ou *Streptococcus lactis* NCDO 700. En effet, d'une part ces activités ont été mises en évidence directement sur les extraits solubles de fromages et d'autre part les électrophorèses de la fraction insoluble à pH 4,6 des caillés ont montré une dégradation plus poussée des caséines dans les fabrications avec *S. diacetylactis* 267.

La recherche de l'aptitude à la protéolyse des souches de streptocoques lactiques devrait donc être un des critères de sélection de ceux-ci avant leur emploi en fromagerie.

Summary

CHARACTERIZATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITIES FROM MESOPHILIC LACTIC ACID BACTERIA AND THEIR ROLE DURING CHEESE RIPENING

The proteolytic activities of the intracellular enzymes from nine strains belonging to species *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* and *S. diacetylactis* have been determined with whole casein and leucine-p-nitroanilide and separated by «disc» electrophoresis from soluble cellfree extracts.

Three strains were used for cheese-making to determine their individual role in protein breakdown during cheese ripening. *Streptococcus diacetylactis* 267 released exopeptidases and proteolytic activities at higher rate than *S. lactis* 261 or *S. lactis* NCDO 700. As a matter of fact these activities were directly showed from soluble cheese extracts and, in other part, electrophored curds displayed a higher breakdown of caseins from *S. diacetylactis* 267 cheeses.

The determination of proteolysis fitness of lactic acid bacteria strains could be a useful test for the selection before their use in cheese-making.

Reçu pour publication en mars 1979.

Références bibliographiques

- CASTBERG (H. B.) and MORRIS (H. A.) (1976). — Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese making. A review. *Milchwissenschaft*, 31, 85-90.
- DESMAZEAUD (M. J.) and GRIPON (J. C.) (1977). — General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32, 731-734.
- DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.), LE BARS (D.) et BERGÈRE (J. L.) (1976). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes (*Streptococcus lactis*, *P. caseicolum* et *Penicillium roqueforti*). *Le lait*, 56, 379-396.
- DESMAZEAUD (M. J.) et JUGE (M.) (1976). — Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidases et aminopeptidases de *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, 56, 241-260.
- DESMAZEAUD (M. J.) and ZEVACO (C.) (1976). — General properties and substrate specificity of an intracellular neutral protease from *Streptococcus diacetylactis*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 16, 851-869.
- DESMAZEAUD (M. J.) and ZEVACO (C.) (1977). — General properties and substrate specificity of an intracellular soluble dipeptidase from *Streptococcus diacetylactis*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 17, 723-736.
- DESMAZEAUD (M. J.) and ZEVACO (C.) (1979). — Isolation and general properties of two aminopeptidases from *Streptococcus diacetylactis*. *Milchwissenschaft* (soumis pour publication).
- EXTERKATE (F. A.) (1975). — An introductory study of the proteolytic system of *Streptococcus cremoris* strain H.P. *Neth. Milk Dairy J.*, 29, 303-318.
- EXTERKATE (F. A.) (1976 a). — The proteolytic system of a slow lactic-acid-producing variant of *Streptococcus cremoris* H.P. *Neth. Milk Dairy J.*, 30, 3-8.
- EXTERKATE (F. A.) (1976 b). — Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. *Neth. Milk Dairy J.*, 30, 95-105.
- FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE LAITERIE (1958). — Détermination de la matière sèche du fromage et du fromage fondu. *Norme internationale F.I.L.*, 4 (Bruxelles).
- GRIPON (J. C.), DESMAZEAUD (M. J.), LE BARS (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.
- JACQUET (J.) et LENOIR (J.) (1969). — Mécanismes intimes de l'affinage des fromages. *Economie Médecine Anim.*, 10, 38-71.

- KLETER (G.) (1976). — The ripening of Gouda cheese made under strict aseptic conditions. 1. Cheese with no other bacterial enzymes than those from a starter *Streptococcus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 30, 254-270.
- KLETER (G.) (1977). — The ripening of Gouda cheese made under strictly aseptic conditions. 2. The comparison of the activity of different starters and the influence of certain lactobacillus strains. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 177-187.
- KOOPS (J.), KLOMP (H.) and ELGERSMA (R. H. C.) (1975). — Rapid determination of nitrogen in milk and dairy products by colorimetric estimation of ammonia following an accelerated digestion procedure. *Neth. Milk Dairy J.*, 29, 169-180.
- LAW (B. A.), SHARPE (M. E.) and REITER (B.) (1974). — The release of intracellular dipeptidase from starter streptococci during Cheddar cheese ripening. *J. Dairy Res.*, 41, 137-146.
- LEWIS (W. H. P.) and HARRIS (H.) (1967). — Human Red cell peptidases. *Nature*, 215, 351-355.
- LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.) and RANDALL (R. J.) (1951). — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MILLER (C. G.) and Mc KINNON (K.) (1974). — Peptidase mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 120, 355-363.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1948). — Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 176, 367-388.
- MOU (L.), SULLIVAN (J. J.) and JAGO (G. R.) (1975). — Peptidase activities in group N streptococci. *J. Dairy Res.*, 42, 147-155.
- O'KEEFE (A. M.), FOX (P. F.) and DALY (C.) (1978). — Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. *J. Dairy Res.*, 45, 465-477.
- O'KEEFE (R. B.), FOX (P. F.) and DALY (C.) (1976). — Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 43, 97-107.
- ROBERTSON (P. S.) (1960). — Methods for investigating the bacteria in young Cheddar cheese: inhibition of starter streptococci with bacteriophage and α -bromopropionic acid. *J. Dairy Res.*, 27, 1-7.
- SCHMIDT (R. H.), MORRIS (H. A.), CASTBERG (H. B.) and Mc KAY (L. L.) (1976). — Hydrolysis of milk proteins by bacteria used in cheese making. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1106-1113.
- SCHORMÜLLER (J.) (1968). — The chemistry and biochemistry of cheese ripening. *Adv. Food Res.*, 16, 231-334.
- SILVERMAN (G. J.), WOLIN (A. G.) and KOSIKOWSKY (F. V.) (1959). — Simplification of standard methods for salt analysis in cheese. *J. Dairy Sci.*, 42, 1095-1096.
- SØRHAUG (T.) and SOLBERG (P.) (1973). — Fractionation of dipeptidase activities of *Streptococcus lactis* and dipeptidase specificity of some lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.*, 25, 388-395.
- STADHOUDERS (J.), HUP (G.) and VAN DER WAALS (C. B.) (1977). — Determination of calf rennet in cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 3-15.
- STEFFEN (C.) (1977). — Cultures indépendantes de la cuve de fromagerie. *Schweizerische Milchzeitung*, 103, 334-335, 364-380.
- TERZAGHI (B. E.) and SANDINE (W. E.) (1975). — Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29, 807-813.
- VISSER (F. M. W.) (1977). — Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen and amino acid nitrogen fractions. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 210-239.
- VISSER (F. M. W.) and DE GROOT-MOSTERT (A. E. A.) (1977). — Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 296-313.