Effet de l'addition de lactase au lait sur le développement des lactobacilles et des streptocoques thermophiles

par

D. HEMME, L. VASSAL, Hélène FOYEN et J. AUCLAIR

*Institut National de la Recherche Agronomique
78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

Une étape essentielle de la fabrication des fromages à pâte cuite est l'acidification sous presse du caillé résultant de la production d'acide par les levains lactiques. Cette acidification doit être suffisamment importante et se produire au moment opportun. Des modifications du lait ont été tentées au laboratoire en vue d'obtenir une meilleure production d'acide par les levains ; elles consistent à faire subir au lait des traitements tels que le chauffage (Auclair et Portmann, 1955), ou à ajouter au lait divers hydrolysats riches en peptides (Koburger *et al.*, 1963 ; Smith *et al.*, 1975) ou en facteurs de croissance ou acides aminés (Garvie et Mabbitt, 1956 ; Bautista *et al.*, 1966 ; Accolas *et al.*, 1971), ou bien encore à ensemercer le lait avec des micro-organismes (Desmazeaud et Devoyod, 1970) dont le développement entraîne des modifications favorables à la multiplication bactérienne et à la production d'acide lactique concomitante. Ces stimulations peuvent éventuellement s'ajouter à la syntrophie qui se manifeste très fréquemment entre par exemple *Streptococcus thermophilus* et divers lactobacilles dans le cas des fromages à pâte cuite (Accolas *et al.*, 1971) ou des yoghourts (Accolas *et al.*, 1977). Certaines des modifications rapportées ci-dessus sont toutefois difficiles à mettre en pratique dans l'industrie fromagère.

L'hydrolyse du lactose en glucose et galactose par les levains a été démontrée par Pulay (1958) et plus récemment par Steffen (1975 a, b). Cette hydrolyse étant une étape obligatoire du catabolisme, on pouvait imaginer que la croissance des bactéries lactiques serait plus rapide si on leur fournissait, dans le lait, du glucose comme source

énergétique. Pour libérer le glucose à partir du lactose, l'addition de lactase au lait a été proposée par Thompson et Brower (1974) et Thompson et Gyuricsek (1974). Par ce procédé, O'Leary et Woychik ont noté une stimulation des levains tant au laboratoire (1976 a) qu'en fabrication de Cheddar ou de yoghourt (1976 b).

Dans le présent travail, nous avons étudié l'action de la lactase sur la production d'acide par les bactéries lactiques thermophiles habituellement utilisées en fabrication de fromages à pâte cuite, en culture sur lait et en fabrication de Gruyère de Comté. Nous avons également recherché les conditions dans lesquelles les stimulations pouvaient être observées et les raisons pour lesquelles ces stimulations se produisaient seulement avec une lactase industrielle.

MATERIEL ET METHODES

Souches

Les souches suivantes de la collection du Centre National de Recherches Zootechniques (CNRZ) ont été utilisées : *Lactobacillus helveticus* 303, *L. bulgaricus* 369 et *Streptococcus thermophilus* 7, 21, 160, 302, 307, 308, 368, 385, 391, et 445. Les cultures étaient conservées à -30°C , non incubées. Lors de leur utilisation, ces cultures étaient décongelées rapidement et incubées pendant 15 h à 42°C , puis repiquées 2 fois sur lait tournesolé avant utilisation.

Lait

Le lait (Elle et Vire) utilisé pour les essais était du lait reconstitué (lait écrémé sec granulé exempt d'antibiotiques) à raison de 100 g de poudre pour 1 litre d'eau distillée. Le lait était réparti en flacons à raison de 100 ml de lait par flacon de 125 ml bouché hermétiquement. Une pasteurisation du lait dans les flacons était effectuée à 63°C pendant 30 mn, 15 h avant l'utilisation. Le lait était ensuite refroidi et stocké à 4°C .

Lactase et sucres

La lactase utilisée était une préparation industrielle isolée de *Kluyveromyces lactis* (Gist-Brocades, Pays-Bas), vendue sous l'appellation « Maxilact 40 000 » lots 10.2581.954 et GK 611.69). Une solution à 1 p. 100 de cette préparation en tampon phosphate 50 mM pH 6,5 était utilisée de telle sorte que 1 ml de cette solution apportait au lait 400 U.ONPG, en prenant comme base l'activité 40 000 donnée par le fabricant. Une β -galactosidase très purifiée (EC.3.2.1.23) d'*Escherichia coli* (Boehringer-Mannheim, référence 105 031, 5 mg/ml) a également été utilisée.

Les oses étaient du D-glucose anhydre (Grade III Sigma) et du D-galactose (poudre cristalline Sigma, garantie sans glucose). L'activité β -galactosidase était mesurée par l'hydrolyse du substrat synthétique ortho-nitrophényl- β -D-galactoside (ONPG). L'activité protéolytique globale était estimée d'après la tyrosine libérée en employant la caséine comme substrat (1 U. d'enzyme est la quantité d'enzyme libérant 1,5 μ g de tyrosine/ml). L'activité était mesurée après une incubation de 5 h à 32° C et à pH 6,5. Après précipitation par l'acide trichloracétique à 2 p. 100 tamponnée par un tampon acétate, la densité optique à 275 nm du surnageant filtré était mesurée.

Dosages des sucres

Le lait était déprotéinisé par addition d'acide perchlorique 1 N (v/v) et, après décantation du précipité et filtration, le filtrat était utilisé pour les dosages des sucres selon les méthodes Bøhringer-Mannheim basées sur la réduction du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Le glucose et le galactose étaient dosés à l'aide des coffrets « Glucose UV » (réf. 158 062) et « Galactose UV » (réf. 124 273) respectivement. Le lactose était dosé indirectement ; le glucose libéré après hydrolyse du lactose par une préparation de β -galactosidase de *E. coli* (Bøhringer-Mannheim) était dosé comme le glucose libre.

Schéma expérimental

Pour les essais, le lait était réchauffé à 32° C et l'action de la lactase variait de 30 mn à 2 h 30, avec une même dose de lactase (4 000 U. ONPG/l en concentration finale). Cette action était de 1 h lorsque la dose de lactase variait (de 2 000 à 12 000 U. ONPG/l en concentration finale). Après le temps d'action choisi, les flacons de lait étaient transférés dans un bain thermostaté à 45° C (sans chauffage destiné à détruire la lactase) pendant 20 mn, puis ensemencés à raison de 2 ml de culture de lactobacilles ou de streptocoques pour 100 ml de lait. Dans le cas de cultures mixtes, les flacons étaient inoculés avec 2 ml de chacun des organismes. Après 1 h d'incubation, le contenu des flacons était réparti en tubes (15 ml par tube) et on poursuivait l'incubation des tubes à 45° C. A intervalles de temps réguliers, les tubes étaient prélevés un à un et refroidis immédiatement dans l'eau glacée. Ils étaient ensuite réchauffés à la température du laboratoire pour la mesure du pH (pH-mètre PHM 64 Radiometer) ou la mesure de l'acidité titrable (Accolas *et al.*, 1977). Tous les essais comportaient des témoins sans lactase et avec ensemencement bactérien. On a d'autre part vérifié que l'addition de lactase n'entraînait pas d'acidification du lait consécutive au développement de contaminants. On comparait les courbes d'acidification du lait en l'absence de lactase (témoin) et en présence de lactase (essais). Il y avait stimulation lors-

que l'acidification du lait était plus rapide en présence de lactase, et inhibition lorsque l'acidification était plus lente en présence de lactase. Dans les conditions de nos essais, notamment avec un ensemencement à 2 p. 100 et une incubation à 45° C, un temps d'incubation de 5 h a été retenu lorsqu'on ne désirait pas établir toute la courbe d'acidification.

Fabrication de Gruyère de Comté

Pour les essais en fromagerie, le lait destiné aux fromages d'essai était additionné de Maxilact à raison de 50 g de poudre pour 500 l de lait (4 000 U. ONPG/l en concentration finale) et maintenu à 4-7° C pendant 16 h. Le lait cru, traité ou non par la lactase, était transformé en Gruyère selon le procédé classique, dans des cuves en cuivre. Les fromages étaient fabriqués par paire (un témoin + un essai). Dans tous les cas la température d' emprésurage était de 32,5° C et le mélange de caillé et de lactosérum en cuve subissait un chauffage à 53,5° C. On notait le temps de coagulation, la durée de fabrication, le pH du fromage sous presse après 6 h et 20 h d'égouttage, la teneur en matière sèche ainsi que la couleur des résidus obtenus après dessiccation pendant 24 h à l'étuve à 101° C, d'un échantillon de fromage âgé de 20 h. Une couleur jaune indique qu'il ne reste plus de sucre résiduel dans le fromage. Une couleur brune est le signe d'une fermentation incomplète des sucres.

RESULTATS

Caractéristiques de la lactase utilisée

La lactase utilisée hydrolysait le lactose du lait conformément aux caractéristiques données par le fabricant. En outre cette lactase possédait une activité protéolytique contaminante faible mais non négligeable (2 mg de tyrosine libérés par ml de filtrat après 5 h d'incubation). Cette activité est plus forte pendant la première 1/2 h d'action ; elle est donc très certainement due à plusieurs enzymes contaminantes. Une solution à 1 p. 100 de lactase perd 66 p. 100 de son activité protéolytique contaminante après chauffage pendant 1 h à 40° C ou à 50° C. Dans ces conditions, la lactase perd respectivement 25 et 92 p. 100 de son activité. Une solution de lactase à 0,1 p. 100 perd toute activité lactase après 15 mn à 54° C. L'activité lactase est donc totalement détruite par le chauffage en cuve lors de la fabrication des fromages à pâte cuite.

Le trouble observé dans la solution à 1 p. 100 de lactase n'était pas dû à une mauvaise mise en solution de la lactase elle-même. En effet, après éclaircissement par filtration sur papier Whatman

n° 40, on obtenait une solution claire dont l'activité était celle de la solution non filtrée. L'activité de la lactase Maxilact 40 000 en tampon phosphate pH 6,5 est de 197 200 U. ONPG. L'examen chromatographique montre la présence de lactose comme support.

Effet de l'addition de lactase au lait sur les cultures pures de lactobacilles et de streptocoques

Action sur les cultures pures de *Lactobacillus*

La figure 1 montre que *L. helveticus* 303 produit une quantité d'acide identique avec ou sans lactase à une concentration finale de 4 000 U. ONPG/l, lorsque le lait est inoculé avec des bactéries qui produisent l'acidité avec une phase de latence courte (courbe 303 a).

fig. 1

Effet de l'addition au lait de lactase industrielle sur la croissance des lactobacilles thermophiles

T : lait témoin sans addition de lactase.

E : lait avec addition de lactase (4 000 unités ONPG/l).

a : inoculum 2 p. 100 ; b : inoculum 0,2 p. 100.

303 : *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303 ; 36 : *L. bulgaricus* CNRZ 36.

Le lait est chauffé à 32° C et la lactase industrielle est ajoutée (1). Après 1 h d'incubation, le lait est porté à 45° C en 15 mn (2) et ensemencé (3). Le pH des cultures est mesuré après des temps variables d'incubation à 45° C.

Par contre, lorsqu'il existe une phase de latence plus longue (courbes 303 b), l'addition de lactase détermine d'abord une légère stimulation, puis une forte inhibition. La production d'acide par *L. bulgaricus* 36 semble être par contre légèrement stimulée, que le taux de production d'acide soit fort (courbes 36 a) ou faible (courbes 36 b).

Action sur les cultures pures de Streptococcus thermophilus

Les réponses des souches de *S. thermophilus* essayées sont variables (tab. 1). Les souches 21, 445, 307 et 302 sont fortement

TABLEAU 1

Effet de l'addition de lactase industrielle au lait sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*

Souches de <i>Streptococcus thermophilus</i>	pH après 5 h de culture à 45° C		Δ pH (témoin - essai)
	témoin sans lactase	essai avec lactase à 4 000 U. ONPG/l	
21	6,35	5,75	0,60
445	6,20	5,75	0,45
307	5,70	5,35	0,35
302	5,90	5,70	0,20
160	6,00	5,90	0,10
385	4,80	4,80	0

stimulées, la souche 160 l'est peu. Enfin, la souche 385, qui a la particularité d'acidifier le lait beaucoup plus rapidement que toutes les autres souches, n'est pas stimulée. Comme pour les lactobacilles, les stimulations observées pour les souches 21 et 445 sont d'autant plus importantes que le taux de production de l'acide est faible (cultures lentes).

Action sur les cultures mixtes

Lorsqu'on utilise des cultures pures bonnes acidifiantes, par exemple les souches *L. helveticus* 303 (fig. 2, courbe 1) et *S. thermophilus* 302 (courbe 2), la culture mixte des deux organismes présente

fig. 2

Effet de l'addition au lait de lactase industrielle sur la croissance de cultures mixtes de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus helveticus*

ST 302 : *S. thermophilus* CNRZ 302 ;

LH 303 : *L. helveticus* CNRZ 303.

1 : témoin (sans addition de lactase) : LH 303, inoculum 2 p. 100.

2 : témoin : ST 302, inoculum 2 p. 100.

3 : témoin et essai (addition de lactase à une concentration finale de 4 000 unités ONPG/l) : ST 302, inoculum 2 p. 100 + LH 303, inoculum 2 p. 100.

4 : témoin : LH 303, inoculum 0,2 p. 100.

5 : témoin : ST 302, inoculum 2 p. 100 + LH 303, inoculum 0,2 p. 100.

6 : essai (lactase à 4 000 unités ONPG/l) : ST 302, inoculum 2 p. 100 + LH 303, inoculum 0,2 p. 100.

7 : somme théorique des cultures témoins 2 et 4.

Le lait est chauffé à 32° C et la lactase industrielle est ajoutée. Après 1 h d'incubation, le lait est porté à 45° C en 15 mn etensemencé. Le pH des cultures est mesuré après des temps variables d'incubation à 45° C.

TABLEAU 2

Caractéristiques de fabrication et composition de fromages de Gruyère fabriqués avec du lait additionné de lactase industrielle

Essais	Temps de coagulation (mn)		pH après 6 h de pressage				pH après 20 h de pressage				Extrait sec total (en p. 100)		Couleur de l'extrait sec du fromage de 20 h (24 h de dessiccation à 101° C)	
			Centre		Périphérie		Centre		Périphérie					
	T	E	T	E	T	E	T	E	T	E	T	E	T	E
1	29	28	5,42	5,29	5,41	5,30	5,27	5,13	5,22	5,19	62,4	63,2	jaune	brune
2	30	29	5,42	5,41	5,44	5,44	5,31	5,21	5,13	5,18	63,0	63,3	jaune	brune
3	29	27	5,38	5,38	5,37	5,34	5,27	5,18	5,15	5,12	62,7	63,1	jaune	jaune
4	28	26	5,34	5,34	5,38	5,36	5,15	5,11	5,13	5,13	62,6	62,4	jaune	brune
5	29	28	5,24	5,29	5,34	5,36	5,14	5,12	5,16	5,16	62,3	62,4	jaune	brune

T = témoins sans lactase.

E = essais avec lactase ajoutée au lait (4 000 unités ONPG/l pendant 16 h à 6° C - 7° C).

Centre et périphérie : portions d'une sonde radiale prise dans le talon du fromage, à égale distance des deux faces, prélevées respectivement à 15 cm et 2 cm de la croûte.

une très forte production d'acide qui n'est pas influencée par la présence de lactase (courbe 3). Lorsque, au contraire, l'une des deux cultures pures présente une longue phase de latence, obtenue par exemple avec un ensemencement plus faible (*L. helveticus* 303, courbe 4), la production d'acide par la culture mixte est moins bonne que dans le premier cas et elle est alors influencée par la lactase (courbes 5 et 6). La zone hachurée représente la stimulation. L'effet stimulant sur des cultures pures lentes se retrouve donc pour les cultures mixtes lentes.

Fabrication de Gruyère de Comté

Lorsque les cultures mixtes ont été utilisées pour fabriquer du Gruyère de Comté, on a observé que le pH à 20 h mesuré au centre des fromages fabriqués avec le lait additionné de lactase était inférieur à celui des fromages témoins (tab. 2). Cela traduit l'existence d'une certaine stimulation de la culture mixte dans cette partie du fromage, dans la mesure où l'addition de lactase n'influence pas pour autant le degré d'égouttage final des fromages (extraits secs des fromages témoins et essai de 20 h non significativement différents). Par contre, l'hydrolyse du lactose qui avait lieu dans le lait (20 p. 100 d'hydrolyse environ) conduit probablement à une rétention des sucres non fermentés dans la pâte, comme en témoigne la couleur brune des extraits secs obtenus après dessiccation des échantillons de fromages d'essais dans 4 cas sur 5, alors que les extraits secs des fromages témoins correspondants étaient tous jaunes et ne contenaient donc pas de sucre résiduel. Notons enfin que le temps de coagulation du lait qui avait subi l'action de la lactase était toujours plus court que le temps de coagulation du lait témoin.

Conditions des stimulations observées

*Effet de la dose de lactase sur la stimulation de *S. thermophilus**

Avec des doses croissantes de lactase, on a observé, sauf pour la souche 385, une stimulation croissante des souches de *S. thermophilus* (fig. 3). Toutefois les stimulations observées variaient selon la souche, pouvant être importantes (par exemple souche 21) ou faibles (par exemple souche 160). La stimulation la plus forte (souche 307 avec une dose de lactase de 10 000 U. ONPG/l) n'a cependant pas permis d'obtenir une acidification du lait comparable à celle obtenue avec la souche 385 seule, sans addition de lactase au lait. Cette dose de 10 000 U. ONPG/l peut être pourtant considérée comme la dose maximale utilisable dans la mesure où elle entraîne, dans nos conditions expérimentales, une hydrolyse très forte du lactose (environ 90 p. 100).

Effet du temps d'action de la lactase sur les stimulations

Si une même dose de lactase est ajoutée au lait pendant une durée variable avant l'ensemencement, on peut supposer que son

fig. 3

Effet de la dose de lactase industrielle sur la croissance de cinq souches de *Streptococcus thermophilus*

Le lait est chauffé à 32° C et des doses variables de lactase industrielle sont ajoutées. Après 1 h d'incubation à 32° C, le lait est porté à 45° C en 15 mn etensemencé à 2 p. 100. Le pH des cultures est mesuré 5 h après l'ensemencement.

action sera d'autant plus importante que la durée d'action sera longue. Les résultats obtenus infirment cette hypothèse. Pour la souche 302, 30 mn suffisaient pour obtenir la stimulation maximale (fig. 4) ; pour la souche 21, la stimulation est maximale après 1 h et on observe une inhibition si la durée d'action est allongée à 2 h. Cette stimulation suivie d'une inhibition, se retrouve, plus accusée, pour la souche 445. Par contre, la souche 160 qui ne présente qu'une légère stimulation avec des doses fortes de lactase (fig. 3), n'est pas stimulée avec les longues durées d'action (fig. 4), bien que l'hydrolyse du lactose soit équivalente. Avec la souche 385, on observe une très légère inhibition.

fig. 4

Effet du temps d'action de la lactase industrielle sur la croissance de cinq souches de *Streptococcus thermophilus*

Le lait est chauffé à 32° C et la lactase industrielle est ajoutée (concentration finale 4 000 unités ONPG/l). Après des temps d'incubation à 32° C variant de 30 mn à 2 h 30, le lait est porté à 45° C en 15 mn et ensemencé à 2 p. 100. Le pH des cultures est mesuré 5 h après l'ensemencement.

Nature de la stimulation par la lactase

Effet de l'addition au lait d'une β -galactosidase purifiée

L'addition au lait d'une β -galactosidase purifiée d'*E. Coli*, exempte d'impuretés protéolytiques, ne permet d'obtenir que l'hydrolyse du lactose. Nous avons ainsi observé (fig. 5), pour des pourcentages d'hydrolyse du lactose variant entre 8 et 40 p. 100 des résultats qui divergent de ceux obtenus avec l'enzyme industrielle. La souche 302 est insensible à une hydrolyse partielle du lactose. La souche 21 est d'autant plus inhibée que l'hydrolyse est importante. Les souches 445 et 385 sont inhibées lorsque l'hydrolyse est faible, et l'inhibition disparaît si l'hydrolyse augmente. Ces résultats laissent à penser que l'enzyme industrielle effectue dans le lait, en plus de l'hydrolyse du lactose, d'autres modifications.

Effet de l'addition de glucose et de galactose

Lorsque *S. thermophilus* se développe dans le lait, il y a libération de glucose. La teneur en glucose du lait après 5 h de croissance est

fig. 5

Effet de l'hydrolyse partielle du lactose du lait sur la croissance de quatre souches de *Streptococcus thermophilus*

Le lait est chauffé à 32° C et des doses variables de β -galactosidase purifiée d'*Escherichia coli* sont ajoutées. Après 1 h d'incubation à 32° C, le lait est porté à 45° C en 15 mn et ensemencé à 2 p. 100. Le pH des cultures est mesuré 5 h après l'ensemencement.

de 1 g/l. On peut simuler une hydrolyse partielle du lactose. Les résultats de l'addition simultanée de glucose et de galactose (3 g/l de chaque ose), de l'addition de glucose (5 g/l) et de l'addition de galactose (5 g/l) sont rassemblés dans le tableau 3. Le lait pour lequel on a simulé l'hydrolyse entraîne une inhibition forte pour trois souches, faible pour deux souches et n'a aucun effet sur cinq souches. L'addition de galactose seul inhibe uniquement la souche 302. L'addition de glucose seul inhibe faiblement les souches 385 et 7, mais active la souche 368.

Dans l'ensemble, les diverses souches présentent donc des réponses variables à l'addition d'oses, mais jamais d'activation telle qu'on l'obtient avec la lactase industrielle. Les inhibitions obtenues après addition de β -galactosidase purifiée sont rappelées pour comparaison dans ce même tableau 3. Elles sont différentes de celles obtenues par addition de galactose et de glucose sous forme d'oses purs. Mais dans ces derniers cas les concentrations en oses libres sont plus faibles que lors de l'hydrolyse.

TABLEAU 3

Effet de l'addition d'oses libres ou de β -galactosidase au lait sur la croissance de dix souches de *Streptococcus thermophilus*

Souches de <i>Streptococcus thermophilus</i>	Δ pH après 5 h d'incubation (témoin - essai)					
	galactose (3 g/l) + glucose (3 g/l)	galactose (5 g/l)	glucose (5 g/l)	β -galactosidase (unités lactose/l)		
				32	128	320
385	-0,26	0	- ϵ	-0,54	0	+ ϵ
445	-0,30	- ϵ	0	-0,44	-0,65	0
160	-0,18	- ϵ	0	0	- ϵ	ND
307	-0,10	- ϵ	0	- ϵ	- ϵ	ND
302	-0,08	-0,15	0	0	- ϵ	ND
7	- ϵ	- ϵ	- ϵ	0	0	ND
391	- ϵ	0	0	0	0	ND
308	0	- ϵ	0	+ ϵ	+ ϵ	0
368	+0,08	0	+0,08	0	0	ND
21	+0,10	+ ϵ	0	- ϵ	- ϵ	- ϵ

ϵ = Δ pH < 0,06 ; + = stimulation ; - = inhibition ; ND = non déterminé.

Effet de l'addition de lactase industrielle chauffée

La lactase industrielle chauffée pendant 2 h à 50° C ne présente plus que 6,5 p. 100 de son activité β -galactosidase, mais il subsiste 25 p. 100 de l'activité protéolytique contaminante. Or cette lactase ainsi chauffée stimule encore *S. thermophilus* 302 (Δ pH = 0,15 contre 0,20 pour la lactase non chauffée).

DISCUSSION

L'utilisation de β -galactosidase purifiée, d'oses purs ou encore de lactase industrielle chauffée, confirme que les stimulations observées

ne sont pas dues à l'activité β -galactosidase de la lactase industrielle, mais sont dues, au contraire aux activités protéolytiques contaminantes. Ces activités protéolytiques se manifestent par une certaine hydrolyse des caséines avec libération de peptides. Ce sont ces peptides qui stimulent la production d'acide, au moins chez certaines souches de *S. thermophilus*, comme l'ont montré Desmazaud et Devoyod (1970). La stimulation par la lactase industrielle se manifeste surtout par une diminution de la phase de latence de la culture, mais également dans une moindre mesure par une augmentation de la vitesse de production de l'acide. Cette production d'acide lactique accrue peut être due à une croissance plus rapide des bactéries ou bien à une production d'acide plus forte par une population identique de bactéries, comme l'ont montré Garvie *et al.*, (1956) et Gilliland *et al.*, (1972).

Les différences observées selon la dose et selon le temps d'action de la lactase laissent à penser que l'activité protéolytique contaminante est due à plusieurs enzymes présentes dans la préparation qui sont très probablement à des concentrations différentes et qui ont des spécificités différentes.

Si l'on s'en tient à l'action de l'hydrolyse du lactose sur la production d'acide, on peut conclure qu'elle est inutile sinon défavorable (cas des souches 445 et 21) mais jamais favorable. Or *S. thermophilus* possède pourtant une voie d'attaque du lactose de type β -galactosidase à côté d'une voie de type phospho- β -galactosidase (Hemme *et al.*, en préparation, a). On peut donc supposer que cet organisme peut utiliser le glucose aussi bien que le lactose, voire mieux, ce qui n'est pas le cas. La réponse obtenue, variable selon les souches, rend l'interprétation encore plus difficile. Le glucose n'exerce pas de stimulation. Le galactose à faible concentration semble être inhibiteur. Par contre une hydrolyse suffisante du lactose, qui correspond à la fois à une concentration en lactose plus faible que celle du lait et à des concentrations en glucose et en galactose fortes, est inhibitrice.

Chez les streptocoques mésophiles, qui phosphorylent le lactose avant de l'hydrolyser par une phospho- β -galactosidase (Molskness *et al.*, 1973 ; Bisset et Anderson, 1974), Woodard *et al.* (1970) et Gilliland et Speck (1972) ont décrit une stimulation de la production d'acide par l'hydrolyse du lactose. Paradoxalement, les streptocoques mésophiles, devant obligatoirement phosphoryler le lactose, seraient donc stimulés par les produits d'hydrolyse du lactose, alors que *S. thermophilus* n'est pas stimulé et est parfois inhibé, alors qu'il est capable d'hydrolyser le lactose par une β -galactosidase ! L'explication de tels comportements reste à donner.

Les réactions parfois différentes observées selon que l'hydrolyse est réalisée par une β -galactosidase purifiée, ou simulée par addition d'oses, peut être aussi due à la formation dans le premier cas d'oligosaccharides (Wierzbicki et Kosikowski, 1973 a et b) qui peuvent

être inhibiteurs. Nos résultats montrent également qu'en présence de lactose les souches ne libèrent dans le lait que de faibles quantités de glucose (1 g/l). Cette libération pourrait d'ailleurs être le fait de l'action de β -galactosidase libérée dans le lait après lyse d'une très faible fraction de la population.

Les réactions d'inhibition observées avec les souches cultivées sur lait, se retrouvent également dans le milieu de laboratoire de Terzaghi et Sandine (1975). Un organisme tel que *S. thermophilus* 385, qui est inhibé par la présence de glucose et de galactose dans le lait, alors que la souche 302 ne l'est pas, a une croissance sur milieu M 17 moins bonne que 302, lorsque le lactose du milieu M 17 est remplacé par un mélange de galactose et de glucose. Cela diffère de ce qui a été décrit pour les streptocoques mésophiles qui se développent mieux dans un milieu contenant du glucose que dans un milieu contenant du lactose. Paradoxalement, nous avons d'ailleurs pu constater que l'activité β -galactosidase spécifique des broyats bactériens croît d'autant plus que les bactéries récoltées proviennent d'une culture dont le pH était bas (Hemme et Wahl, en préparation, b).

Puisque ce sont les activités contaminantes de la lactase industrielle utilisée dans nos essais qui stimulent *S. thermophilus*, il serait bien sûr plus judicieux d'utiliser directement les facteurs stimulants eux-mêmes. Nous ne pouvons d'ailleurs pas attribuer les observations faites en fabrication de Gruyère (temps de prise plus court et pH à 20 h plus bas pour les fromages fabriqués avec du lait additionné de lactase industrielle) à la seule hydrolyse du lactose. Les enzymes contaminantes jouent probablement un rôle qui s'ajoute à celui de la présure, comme l'ont souligné récemment Marschke et Dulley (1978), en fabrication de Cheddar. Elles peuvent intervenir aussi ultérieurement, car le chauffage à 54° C fait disparaître l'activité d'hydrolyse du lactose, mais non l'activité protéolytique de la lactase industrielle. Le rôle probable d'enzymes protéolytiques contaminantes ne fait que confirmer, s'il en est besoin, l'intérêt d'une protéolyse qui libère des peptides stimulant la production d'acide lactique par *S. thermophilus*. Tant au regard de la législation que de l'efficacité, il serait sans doute préférable de choisir des sources d'enzymes protéolytiques mieux adaptées, comme par exemple les extraits de lactobacilles thermophiles, dont l'addition au lait stimule la production d'acide beaucoup plus que ne le fait la lactase industrielle utilisée ici (Hemme *et al.*, 1978).

*
**

Remerciements

Nous remercions M. Cassaigne (Sté Rapidase) pour les analyses qu'il a effectuées, ainsi que M. J. P. Accolas pour ses conseils lors de la rédaction.

Résumé

L'addition au lait d'une préparation commerciale de lactase (β -galactosidase) isolée de *Kluyveromyces lactis* n'entraîne pas de stimulation de la production d'acide des lactobacilles thermophiles (*Lactobacillus helveticus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*). Par contre elle entraîne une stimulation de la production d'acide de *Streptococcus thermophilus*, mais nous avons montré que cette stimulation n'est pas due à l'hydrolyse du lactose. En effet l'addition au lait de β -galactosidase purifiée ou d'un mélange de glucose et de galactose simulant une hydrolyse partielle du lactose, ne produit pas de stimulation. La stimulation de *S. thermophilus* par la lactase commerciale résulte probablement d'une légère protéolyse du lait provoquée par des enzymes présentes dans la préparation commerciale à l'état d'impuretés. *S. thermophilus* se comporte donc différemment des streptocoques mésophiles qui sont stimulés par l'hydrolyse du lactose. Ces résultats sont discutés en relation avec l'équipement enzymatique, notamment en β -galactosidase et phospho- β -galactosidase de *S. thermophilus*.

Summary

When a commercial preparation of lactase (β -galactosidase) isolated from *Kluyveromyces lactis* is added to milk, there is no stimulation of the acid production of the thermophilic lactobacilli (*Lactobacillus helveticus*, *L. lactis* and *L. bulgaricus*). However there is a stimulation of the acid production of *Streptococcus thermophilus* but we have shown that this stimulation is not due to the hydrolysis of lactose. In fact there is no stimulation when a purified β -galactosidase or a mixture of glucose and galactose are added to milk. The stimulation of *S. thermophilus* by the commercial preparation is probably due to a slight proteolysis produced by some enzymes present as contaminants in the preparation. Thus *S. thermophilus* behaves differently from the mesophilic streptococci which are stimulated by the hydrolysis of lactose. The results are discussed taking into account the glycolytic enzymes levels of *S. thermophilus*, in particular the β -galactosidase and phospho- β -galactosidase levels.

Zusammenfassung

Wird ein handelsübliches Laktasepräparat (β -Galactosidase), isoliert aus *Kluyveromyces lactis*, der Milch zugesetzt, so führt dies zu keiner Stimulierung der Säureproduktion durch thermophile Laktobazillen (*Lactobacillus helveticus*, *L. lactis* und *L. bulgaricus*). Bei *Streptokokkus thermophilus* konnte eine Stimulierung der Säureproduktion nachgewiesen werden, doch zeigen wir daß diese Stimulierung nicht auf der Laktosehydrolyse beruht. Es stellte sich heraus, daß durch Hinzufügen von reiner β -Galactosidase oder Mischung aus Glukose und Galactose, die eine partielle Laktosehydrolyse simuliert, keine Stimulierung entsteht. Die Stimulierung von *S. thermophilus* durch handelsübliche Laktase entsteht wahrscheinlich durch eine leichte Proteolyse der Milch, hervorgerufen durch Enzyme, die im handelsüblichen Präparat als Verunreinigungen vorhanden sind. *S. thermophilus* verhält sich anders als mesophile Streptokokken, die durch Laktosehydrolyse stimuliert werden. Diese Ergebnisse werden im Zusammenhang mit dem Anteil an glykolytischen Enzymen bei *S. thermophilus*, insbesondere an β -Galaktosidase und Phospho- β -Galaktosidase, diskutiert.

Reçu pour publication en septembre 1979.

Références

- ACCOLAS (J. P.), VEAUX (M.) et AUCLAIR (J.) (1971). — Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 51, 249-272.
- ACCOLAS (J. P.), BLOQUEL (R.), DIDIENNE (R.) et RÉGNIER (J.) (1977). — Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt. *Le Lait*, 57, 1-23.
- AUCLAIR (J. E.) et PORTMANN (A.) (1955). — Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. I. Croissance des bactéries lactiques dans des laits chauffés à des températures variables. *Ann. Technol. Agric.*, 4, 121-131.
- BAUTISTA (E. S.), DAHIYA (R. S.) and SPECK (M. L.) (1966). — Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. *J. Dairy Res.*, 33, 299-307.
- BISSET (D. L.) and ANDERSON (R. L.) (1974). — Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci: presence of enzymes for both the D-galactose 1-phosphate and D-tagatose 6-phosphate pathways. *J. Bacteriol.*, 117, 318-320.
- DESMAZEAUD (M.) et DEVROY (J. J.) (1970). — Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques thermophiles. Mise en évidence de la nature peptidique des substances stimulantes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 10, 413-430.
- GARVIE (E. I.) and MABBITT (L. A.) (1956). — Acid production in milk by starter cultures. The effect of peptone and other stimulatory substances. *J. Dairy Res.*, 23, 305-314.

- GILLILAND (S. E.), SPECK (M. L.) and WOODARD (J. R. Jr) (1972). — Stimulation of streptococci in milk by β -galactosidase. *Appl. Microbiol.*, 23, 1-25.
- HEMME (D.), VASSAL (L.) et AUCLAIR (J.) (1978). — Stimulation de *Streptococcus thermophilus* par addition au lait de lactase ou d'extraits de lactobacilles. *XX^e Cong. Int. Lait.*, Paris, F, 520-521.
- KOBURGER (J. A.), SPECK (M. L.) and AURAND (L. W.) (1963). — Identification of growth stimulants for *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 85, 1051-1055.
- MARSCHKE (R. J.) et DULLEY (J. R.) (1978). — The effect of partial lactose hydrolysis on the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 33, 139-142.
- MOLSKNESS (T. A.), LEE (D. R.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1973). — β -D-phosphogalactoside galactohydrolase of lactic streptococci. *Appl. Microbiol.*, 25, 373-380.
- O'LEARY (V.) and WOYCHIK (J. H.) (1976). — Utilization of lactose, glucose and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. *Appl. Environ Microbiol.*, 32, 89-94.
- O'LEARY (V. S.) and WOYCHIK (J. H.) (1976). — A comparison of some chemical properties of yoghurts made from control and lactase-treated milks. *J. Food Sci.*, 41, 791-793.
- PULAY (G.) (1958). — Breakdown of lactose in cheese. I. Lactose breakdown in Emmental cheese. *Tejipar Kutat Közlem.*, 1, 1-10.
- QUTUB (A.) (1970). — The influence of nutritional factors and mutations on the rates of acid production by lactic streptococci. Ph. D. Thesis, Oklahoma State University.
- SMITH (J. S.), HILLIER (A. J.), LEES (G. J.) and JAGO (G. R.) (1975). — The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *J. Dairy Res.*, 42, 123-138.
- STEFFEN (C.), NICK (B.) et BLANC (B.) (1975). — Le rôle d'agent de fermentation du lactose, glucose et galactose dans la fabrication d'Emmental. *Schweiz. Milchw. Forsch.*, 4, 16-22.
- STEFFEN (C.) (1975). — Enzymatische Bestimmungsmethoden zur Erfassung der Gärungsvorgänge in der milchwirtschaftlichen Technologie. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 8, 1-6.
- TAMINE (A. Y.) (1977). — The behaviour of different starter cultures during the manufacture of yoghurt from hydrolysed milk. *Dairy Ind. Int.*, 42, 7-11.
- TERZAGHI (B.) and SANDINE (W. E.) (1975). — Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 27, 807-813.
- THOMPSON (M. P.) and GYURICSEK (D. M.) (1974). — Manufacture of yoghurt, butter-milk, and cottage cheese from hydrolysed lactose milks. *J. Dairy Sci.*, 57, 584.
- THOMPSON (M. P.) and BROWER (D. P.) (1974). — Manufacture of Cheddar cheese from hydrolysed lactose milks. *J. Dairy Sci.*, 57, 598.
- WIERZBICKI (L. E.) and KOSIKOWSKI (F. V.) (1973). — Kinetics of lactose hydrolysis in acid whey by β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *J. Dairy Sci.*, 56, 1396-1399.
- WIERZBICKI (L. E.) and KOSIKOWSKI (F. V.) (1973). — Formation of oligosaccharides during β -galactosidase action on lactose. *J. Dairy Sci.*, 56, 1400-1404.
- WOODARD (J. R.), GILLILAND (S. E.) and SPECK (M. L.) (1970). — Response of lactic streptococci to exogenous β -galactosidase. *J. Dairy Sci.*, 53, 631.